



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0024771

(51)⁷ C07D 401/14; A61K 31/4545; A61P 35/00; C07D 405/14; C07D 401/12; A61K 31/454; A61P 43/00 (13) B

(21) 1-2017-00858

(22) 30/09/2015

(86) PCT/US2015/053098 30/09/2015

(87) WO2016/057278 14/04/2016

(30) 62/060,724 07/10/2014 US

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/07/2017 352A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) BEIGHT, Douglas W. (US); COATES, David A. (US); JOSEPH, Sajan (US);

MCMILLEN, William T. (US); PARTHASARATHY, Saravanan (US); PEI,

Huaxing (US); SAWYER, Jason Scott (US); WOLFANGEL, Craig D. (US); ZHAO, Gaiying (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT AMINOPYRIDYLOXYPYRAZOL VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất aminopyridyloxypyrazol, các hợp chất này ức chế hoạt tính của thụ thể yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta 1 (TGF β R1) và dược phẩm chứa các hợp chất này. Các hợp chất này hữu dụng để điều trị ung thư, đặc biệt là ung thư đại tràng, ung thư hắc tố, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư thận, u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư tụy, hội chứng rối loạn sinh tủy, ung thư phổi, và ung thư dạ dày, và/hoặc bệnh xơ hóa, nhất là xơ gan và bệnh thận mãn tính.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất aminopyridyloxypyrazol ức chế hoạt tính của thụ thể yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta 1 (TGF β R1) và dược phẩm chứa các hợp chất này. Các hợp chất này hữu dụng để điều trị ung thư, đặc biệt là ung thư đại tràng, ung thư hắc tố, ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), ung thư thận, u nguyên bào thần kinh đệm (GBM), ung thư tụy, hội chứng rối loạn sinh tủy (MDS), ung thư phổi, và ung thư dạ dày, và/hoặc bệnh xơ hóa, nhất là xơ gan và bệnh thận mãn tính.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

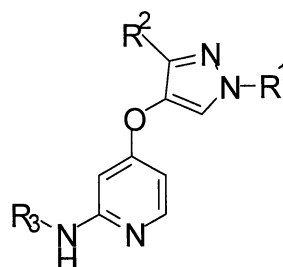
Yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF-beta hoặc TGF β) là một xytokin đa chức năng, nó liên kết với các phức hợp dị thể của các thụ thể TGF-beta typ I và thụ thể serin/treonin kinaza typ II và kích hoạt phức thụ thể TGF-beta, phức này phosphoryl hóa và kích hoạt SMAD2 và SMAD3, sau đó các phức này kết hợp với SMAD4 và di chuyển vào trong nhân và điều hòa sự biểu hiện của các gen đích khác nhau. Các yếu tố đóng vai trò chính của quá trình truyền tín hiệu thụ thể TGF-beta bao gồm TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, TGF β R1, TGF β R2, SMADs, SnoN, SARA, SKI, DAB, TRAP, TAK1, SMIF, E2F4, E2F5, RBL1, RBL2, RB1, TFDP1, TFDP2, SMURF1, SMURF2, P300, CBP, và JUN. Con đường thụ thể TGF-beta trung gian bởi SMAD điều hòa các quá trình tế bào và sinh lý khác nhau như tăng sinh, biệt hóa, sinh trưởng, di cư, myelin hóa, dừng chu trình tế bào, tế bào chết theo lập trình và quá trình phát triển.

Các chất ức chế phân tử nhỏ của TGF β R1 đã được biết đến trong lĩnh vực để điều trị ung thư và/hoặc xơ hóa. Ví dụ, xem trong tài liệu WO2012/002680, WO2009/022171, WO2004/048382, và WO2002/094833. Không may, chưa có điều trị thành công nào đã biết đối với nhiều loại ung thư hoặc xơ hóa. Mong muốn có được các chất ức chế phân tử nhỏ bổ sung của TGF β R1 để điều trị ung thư, nhất là ung thư đại tràng, ung thư hắc tố, ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), ung thư thận, u nguyên bào thần kinh đệm (GBM), ung thư tụy, hội chứng rối loạn sinh tủy (MDS), ung thư

phổi, và ung thư dạ dày, và/hoặc bệnh xơ hóa, nhất là xơ gan và bệnh thận mãn tính, đặc biệt là các hợp chất mà chúng có tính chọn lọc hơn đối với TGF β R1.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức:



trong đó:

R¹ là hydro, isopropyl, diflometyl, difloetyl, hoặc xyclopropyl;

R² là etyl, tert-butyl, pyridin-2-yl, tetrahydropyran-4-yl, tetrahydrofuran-3-yl, xyclopropyl, hoặc xyclobutyl; và

R³ là cacbamoylphenyl, pyridin-2-yl, (1-hydroxy-1-metyletyl)pyridinyl, 1-metyl-2-oxo-1H-pyridin-4-yl, 1-metylpyrazolyl, pyrazin-2-yl, 2-metoxypyrimidin-4-yl, 1-metyl-2-oxo-1H-pyrimidin-4-yl, pyridazin-3-yl, 6-clopyridazin-3-yl, 6-metylpyridazin-3-yl, hoặc 6-metoxypyridazin-3-yl;

hoặc muối được dụng của hợp chất này.

Sáng chế cũng đề cập đến hợp chất 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol hoặc muối được dụng của hợp chất này.

Sáng chế cũng đề cập đến hợp chất 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol 4-metylbenzensulfonat.

Sáng chế cũng đề cập đến hợp chất 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol 4-metylbenzensulfonat kết tinh. Sáng chế còn đề xuất hợp chất 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-

yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol 4-methylbenzensulfonat kết tinh được đặc trưng bởi mô hình nhiễu xạ bột tia X (bức xạ Cu, λ -1,54060 Å) bao gồm một đỉnh tại $17,8^\circ$ với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm $19,7^\circ$, $18,4^\circ$, và $22,0^\circ$ ($2\theta \pm 0,2^\circ$).

Bản mô tả này cũng mô tả phương pháp điều trị ung thư, tốt hơn là ung thư đại tràng, ung thư hắc tố, ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), ung thư thận, u nguyên bào thần kinh đệm (GBM), ung thư tụy, hội chứng rối loạn sinh tủy (MDS), ung thư phổi, và ung thư dạ dày, ở bệnh nhân cần được điều trị, bao gồm bước cho bệnh nhân dùng một lượng hữu hiệu của hợp chất hoặc muối theo sáng chế.

Bản mô tả này cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh xơ hóa, nhất là xơ gan và bệnh thận mãn tính, ở bệnh nhân cần được điều trị bao gồm bước cho bệnh nhân dùng một lượng hữu hiệu của hợp chất hoặc muối theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa hợp chất hoặc muối theo sáng chế, và một hoặc nhiều tá dược, chất mang, hoặc chất pha loãng được dụng.

Sáng chế này cũng đề xuất hợp chất hoặc muối theo sáng chế để sử dụng trong liệu pháp điều trị. Ngoài ra, sáng chế này đề xuất hợp chất hoặc muối theo sáng chế để sử dụng trong điều trị ung thư, nhất là ung thư đại tràng, ung thư hắc tố, ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), ung thư thận, u nguyên bào thần kinh đệm (GBM), ung thư tụy, hội chứng rối loạn sinh tủy (MDS), ung thư phổi, và ung thư dạ dày và/hoặc bệnh xơ hóa, nhất là xơ gan và bệnh thận mãn tính. Ngoài ra, bản mô tả này cũng mô tả việc sử dụng hợp chất hoặc muối theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị ung thư, nhất là ung thư đại tràng, ung thư hắc tố, ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), ung thư thận, u nguyên bào thần kinh đệm (GBM), ung thư tụy, hội chứng rối loạn sinh tủy (MDS), ung thư phổi, và ung thư dạ dày và/hoặc bệnh xơ hóa, nhất là xơ gan và bệnh thận mãn tính.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các đoạn tiếp theo mô tả các nhóm được ưu tiên theo sáng chế:

- a) R^1 là diflometyl, difloetyl, hoặc xyclopropyl;
- b) R^2 là pyridin-2-yl, tetrahydropyran-4-yl, hoặc xyclopropyl;
- c) R^3 là cacbamoylphenyl hoặc (1-hydroxy-1-metyletyl)pyridinyl;

- d) R^1 là xyclopropyl và R^2 là tetrahydropyran-4-yl;
- e) R^1 là xyclopropyl và R^2 là xyclopropyl;
- f) R^1 là difloetyl và R^2 là tetrahydropyran-4-yl;
- g) R^1 là diflometyl và R^2 là pyridin-2-yl;
- h) R^1 là xyclopropyl, R^2 là tetrahydropyran-4-yl, và R^3 là (1-hydroxy-1-metyletyl)pyridinyl;
- i) R^1 là xyclopropyl, R^2 là xyclopropyl, và R^3 là (1-hydroxy-1-metyletyl)pyridinyl;
- j) R^1 là difloetyl, R^2 là tetrahydropyran-4-yl, và R^3 là (1-hydroxy-1-metyletyl)pyridinyl; và
- k) R^1 là diflometyl, R^2 là pyridin-2-yl, và R^3 là cacbamoylphenyl.

Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, các dạng bazơ tự do của hợp chất theo sáng chế có khả năng tạo thành các muối và muối như vậy được dự định là một phần của sáng chế. Các hợp chất bazơ tự do theo sáng chế là các amin, và do đó phản ứng với axit bất kỳ trong số nhiều axit vô cơ và hữu cơ để tạo ra các muối cộng axit được dụng. Các muối cộng axit được dụng này và phương pháp chung để điều chế chúng đã được biết rõ trong lĩnh vực. Ví dụ, xem trong P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2008); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 66, No. 1, January 1977. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, hóa học lượng thức của muối có thể được xác định một cách dễ dàng. Ví dụ, xem trong D. Risley, *et al.*, Simultaneous Determination of Positive and Negative Counterions Using a Hydrophilic Interaction Chromatography Method, *LCGC NORTH AMERICA*, Vol 24, No. 8, August 2006 pages 776-785.

Một số hợp chất theo sáng chế ở dạng kết tinh. Đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học rằng, đối với bất kỳ dạng tinh thể xác định nào, cường độ tương đối của các đỉnh nhiễu xạ có thể khác nhau do sự định hướng ưu tiên xuất phát từ các yếu tố như hình thái và dạng tinh thể. Trường hợp có mặt các tác động của sự định hướng ưu tiên, các

cường độ đỉnh bị thay đổi, nhưng các vị trí đỉnh đặc trưng của dạng đa hình không thay đổi. Ví dụ, xem trong The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995. Ngoài ra, cũng đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học rằng, đối với bất kỳ dạng tinh thể xác định nào, các vị trí đỉnh của góc có thể hơi khác nhau. Ví dụ, các vị trí đỉnh có thể thay đổi do sự dao động về nhiệt độ hoặc độ ẩm mà tại đó, mẫu được phân tích, sự dịch chuyển mẫu hoặc sự có mặt hoặc không có mặt của nội tiêu chuẩn. Trong những trường hợp này, sự dao động vị trí đỉnh $\pm 0,2$ về góc 2θ sẽ tính đến những sự thay đổi tiềm tàng này mà không làm cản trở sự nhận diện chính xác dạng tinh thể chỉ ra. Việc khẳng định dạng tinh thể có thể được tiến hành dựa vào tổ hợp riêng bất kỳ của các đỉnh khác biệt (theo đơn vị $^\circ$ góc 2θ), điển hình là các đỉnh dễ nhận thấy hơn. Các mô hình nhiễu xạ của dạng tinh thể, được tập hợp ở nhiệt độ môi trường và độ ẩm tương đối, được hiệu chỉnh dựa vào các đỉnh chuẩn theo NIST 675 tại góc 2 -theta bằng 8,853 và 26,774 độ.

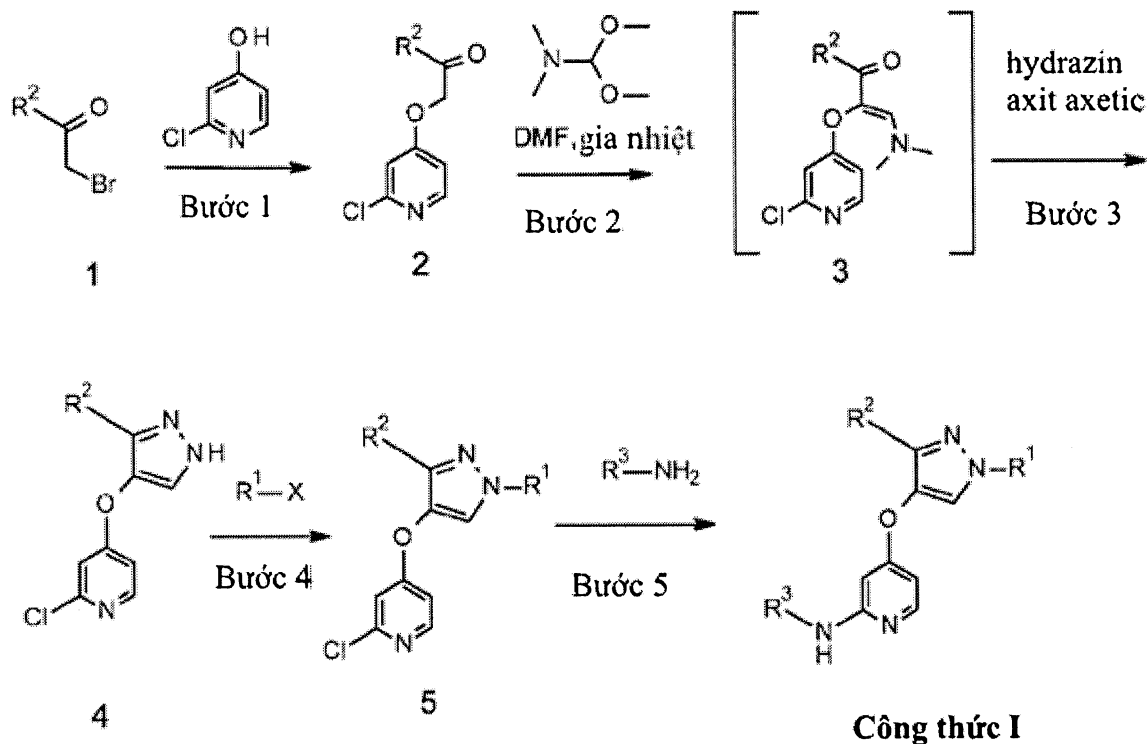
Hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế theo các sơ đồ tổng hợp sau bằng các phương pháp đã biết và được nhận thức rõ trong lĩnh vực. Các điều kiện phản ứng thích hợp của các bước trong các sơ đồ này là đã biết trong lĩnh vực và những sự thay thế thích hợp đối với các dung môi và các chất đồng phản ứng nằm trong phạm vi kỹ năng trong lĩnh vực. Tương tự, người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng, các hợp chất trung gian tổng hợp có thể được tách và/hoặc được tinh chế bằng các kỹ thuật đã biết khác nhau khi cần thiết hoặc mong muốn và một cách thường xuyên, có thể sử dụng các hợp chất trung gian khác nhau trực tiếp trong các bước tổng hợp tiếp theo ít cần phải tinh chế hoặc không cần tinh chế. Ngoài ra, người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, trong một số tình huống, thứ tự trong đó các gốc được đưa vào là không mang tính quyết định. Thứ tự cụ thể của các bước cần thiết để tạo ra các hợp chất theo sáng chế là tùy thuộc vào hợp chất cụ thể đang được tổng hợp, hợp chất khởi đầu, và trách nhiệm tương đối của các gốc được thay thế, như được hiểu rõ bởi chuyên gia hóa học. Tất cả mọi phần tử thế, trừ khi được quy định rõ theo cách khác, là như được xác định ở trên, và toàn bộ các chất phản ứng là đã biết và được hiểu rõ trong lĩnh vực.

Một số hợp chất trung gian hoặc các hợp chất theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều tâm không đối xứng. Sáng chế dự tính đến tất cả các chất đồng phân đối ảnh

hoặc chất đồng phân không đối quang riêng biệt, cũng như hỗn hợp của các chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân không đối quang của các hợp chất nêu trên bao gồm cả các chất triệt quang. Tốt hơn, các hợp chất theo sáng chế chứa ít nhất một tâm không đối xứng tồn tại dưới dạng các chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang đơn. Các chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang đơn có thể được điều chế bắt đầu bằng các chất phản ứng không đối xứng hoặc bằng các kỹ thuật tổng hợp chọn lọc lập thể hoặc đặc thù lập thể. Theo cách khác, các chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang đơn có thể được tách từ các hỗn hợp bằng các kỹ thuật kết tinh hoặc sắc ký không đối xứng chuẩn. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, trong một số tình huống, thứ tự rửa giải của các chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang có thể khác nhau do các cột và các pha động sắc ký khác nhau.

Cách gọi “chất đồng phân 1” về tên hợp chất biểu thị rằng, hợp chất trung gian hoặc hợp chất tương ứng theo sáng chế là chất đồng phân thứ nhất trong hai chất đồng phân đối ảnh rửa giải khi hỗn hợp của một cặp chất đồng phân đối ảnh được tách bằng phương pháp sắc ký không đối xứng. Cách gọi “chất đồng phân 2” về tên hợp chất biểu thị rằng, hợp chất trung gian hoặc hợp chất tương ứng theo sáng chế là chất đồng phân thứ hai trong hai chất đồng phân đối ảnh rửa giải khi hỗn hợp của một cặp chất đồng phân đối ảnh được tách bằng phương pháp sắc ký không đối xứng.

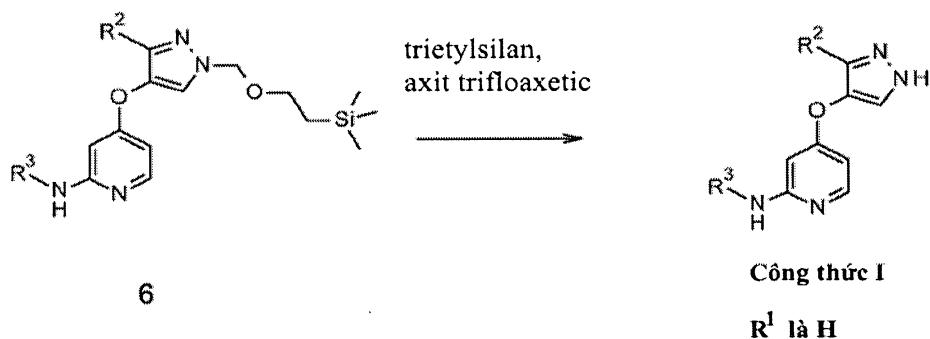
Các hợp chất theo sáng chế có thể được tổng hợp như được minh họa trong các sơ đồ sau, trong đó R^1 , R^2 , và R^3 là như được xác định ở trên.



Sơ đồ 1: Quy trình tổng hợp các hợp chất có công thức I

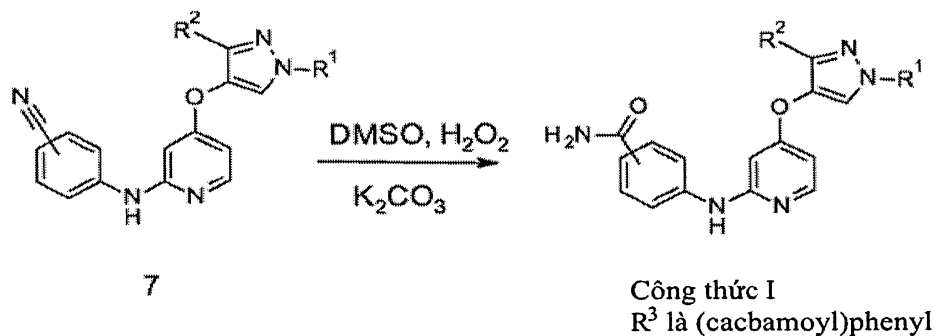
Sơ đồ 1 minh họa quy trình tổng hợp chung các hợp chất có công thức I. Hợp chất 1 được cho phản ứng với 2-clopyridin-4-ol trong dung môi thích hợp như dimetylformamit (DMF) hoặc axeton với bazơ thích hợp như xesi cacbonat hoặc kali cacbonat ở nhiệt độ trong phòng hoặc nhiệt độ cao để tạo ra hợp chất 2. Hợp chất 2 được cho phản ứng với 1,1-dimethoxy-N,N-dimetyl-metanamin ở nhiệt độ cao để tạo ra hợp chất 3. Hợp chất 3 có thể được tinh chế hoặc được sử dụng không cần tinh chế thêm để phản ứng với hydrazin trong axit axetic để tạo ra hợp chất 4. Hợp chất 4 có thể phản ứng với chất phản ứng alkyl hóa thích hợp như kali alkyltrifloborat hoặc axit alkyboronic trong các điều kiện phản ứng kết hợp Chan-Lam để tạo ra hợp chất 5. Cụ thể hơn, trước tiên gia nhiệt huyền phù chứa 2,2'-bipyridin và đồng(II)axetat trong dung môi thích hợp như 1,2-dicloetan tới nhiệt độ cao và làm sạch bằng nitơ, và tiếp theo, lọc hỗn hợp phản ứng và bổ sung phần dịch lọc vào hỗn hợp của hợp chất 4, boronat thích hợp như kali alkyltrifloborat hoặc axit alkyboronic, và bazơ thích hợp như natri cacbonat trong dung môi thích hợp như 1,2-dicloetan. Gia nhiệt hỗn hợp

phản ứng tới nhiệt độ cao để tạo ra hợp chất 5. Hợp chất 4 cũng có thể phản ứng với alkyl halogenua thích hợp như alkyl iodua, alkyl bromua hoặc alkyl clorua với bazơ thích hợp như natri hydrua trong dung môi thích hợp như DMF hoặc tetrahydrofuran (THF) để tạo ra hợp chất 5. Hợp chất 5 được cho phản ứng với amin thích hợp trong các điều kiện phản ứng kết hợp Buchwald đã biết để tạo ra hợp chất có công thức I. Cụ thể hơn, hợp chất 5 được cho phản ứng với amin thích hợp ở nhiệt độ cao với sự có mặt của bazơ thích hợp như xesi cacbonat, chất phản ứng phối tử thích hợp như 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimetylxanthen, và chất xúc tác thích hợp như paladi(II)axetat trong dung môi thích hợp như 1,4-dioxan để tạo ra hợp chất có công thức I.



Sơ đồ 2: Quy trình tổng hợp các hợp chất có công thức I khi R¹ là H

Sơ đồ 2 minh họa quy trình tổng hợp chung các hợp chất có công thức I khi R¹ là H. Như được minh họa trong bước 4 của sơ đồ 1, khi chất phản ứng alkyl hóa là 2-(trimetylsilyl)etoxymetyl clorua, hợp chất 6 có thể thu được bằng phản ứng alkyl hóa thông qua bước 4 và phản ứng kết hợp Buchwald thông qua bước 5. Hợp chất 6 có thể phản ứng với triethylsilan trong axit trifloaxetic để tạo ra hợp chất có công thức I trong đó R¹ là H. Khi R¹ là H, người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này đã biết rằng, hợp chất có công thức I có thể tồn tại dưới dạng một cặp các chất đồng phân, trong đó nguyên tử hydro có thể di chuyển giữa hai nguyên tử nitơ trên vòng pyrazolyl.



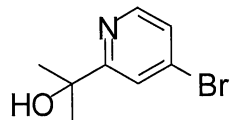
Sơ đồ 3: Quy trình tổng hợp các hợp chất có công thức I khi R³ là (cacbamoyl)phenyl

Sơ đồ 3 minh họa quy trình tổng hợp chung các hợp chất có công thức I khi R³ là nhóm (cacbamoyl)phenyl. Hợp chất 7 có thể được tạo ra bằng phương pháp được minh họa trong bước 5 của sơ đồ 1 khi R³ là benzonitril được thể thích hợp. Hợp chất 7 được cho phản ứng với hydro peroxit và bazơ thích hợp như kali cacbonat trong dimetyl sulfoxit (DMSO) để tạo ra hợp chất có công thức I khi R³ là nhóm (cacbamoyl)phenyl.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ sau có ý nghĩa được chỉ rõ: “ACN” để chỉ axetonitril; “BSA” để chỉ albumin huyết thanh bò; “DCM” để chỉ diclometan; “DMF” biểu thị N,N-dimetylformamit; “DMSO” để chỉ dimetyl sulfoxit; “DTT” để chỉ dithiotreitol; “EDTA” để chỉ axit etylenđiamintetraaxetic; “EGTA” để chỉ etylen glycol axit tetraaxetic; “ELISA” để chỉ thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym; “EtOAc” để chỉ etyl axetat; “EtOH” để chỉ etanol; “FBS” để chỉ huyết thanh thai bò; “HEC” để chỉ hydroxyetylxenluloza; “HPLC” để chỉ phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao; “IVTI” để chỉ ức chế đích *in vivo*; “MS” để chỉ phổ khối; “MeOH” để chỉ metanol; “NMR” để chỉ cộng hưởng từ hạt nhân; “THF” để chỉ tetrahydrofuran; “TBS” để chỉ nước muối đệm tris; “TED” để chỉ liều ngưỡng hiệu quả; “UVW” để chỉ bước sóng cực tím và “XRD” để chỉ nhiễu xạ tia X.

Trừ khi được lưu ý ngược lại, các hợp chất minh họa ở đây được gọi tên và đánh số sử dụng phần mềm ACDLABS hoặc Accelrys Draw 4.1.

Ví dụ thực hiện sáng chế

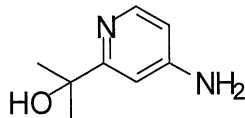
Ví dụ điều chế 1**2-(4-Bromo-2-pyridyl)propan-2-ol**

Bổ trí trên bình thót cổ đáy tròn 3 cổ thể tích 3L bằng một phễu bổ sung, bộ ngưng hồi lưu, cửa vào của nitơ và đầu dò nhiệt độ. Nạp vào bằng metylmagie bromua (3,2M trong 2-metyltetrahydrofuran, 239,07mL, 765,01mmol) và làm lạnh trong một chậu nước đá. Bổ sung dung dịch chứa etyl 4-bromopyridin-2-cacboxylat (80,0g, 347,73mmol) trong THF (800,0mL) vào phễu bổ sung. Bổ sung từng giọt dung dịch vào dung dịch metylmagie bromua trong khi duy trì nhiệt độ bên trong dưới 25°C. Loại bỏ chậu làm lạnh và cho phép khuấy ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 30 phút. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ 5°C và làm dừng phản ứng cẩn thận bằng cách bổ sung từng giọt dung dịch nước axit clohydric (1M) trong khi duy trì nhiệt độ bên trong dưới 30°C. Bổ sung dung dịch nước axit clohydric bổ sung (1M) cho tới khi hỗn hợp đạt tới độ pH vào khoảng 7. Loại bỏ chậu làm lạnh và pha loãng bằng etyl axetat (EtOAc; 200mL). Tách riêng lớp hữu cơ, làm khô trên natri sulfat khan, lọc qua nút lọc CELITE® và rửa bằng EtOAc. Cô đặc phần dịch lọc để thu được dầu màu da cam. Tinh chế bằng cách sử dụng đệm silicagel rửa giải bằng hexan/EtOAc (3/1) để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (63,15g; hiệu suất 84,0%) là dầu không màu. MS (m/z): 216/218 (M+1/M+3).

Điều chế hợp chất sau về cơ bản bằng phương pháp trong ví dụ điều chế 1.

Bảng 1:

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý
2	2-(5-Bromo-2-pyridyl)propan-2-ol		MS (m/z): 216/218 (M+1/M+3)

Ví dụ điều chế 3**2-(4-Amino-2-pyridyl)propan-2-ol**

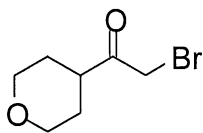
Nạp vào bình phản ứng Parr thể tích 2L bằng thanh khuấy, đồng (dạng bột, 12,6g, 198,6mmol), 2-(4-bromo-2-pyridyl)propan-2-ol (63,1g, 292,0mmol) và amoni hydroxit (28% trọng lượng/trọng lượng trong nước, 757,2mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong điều kiện không khí mở trong thời gian 30 phút cho tới khi có màu xanh đậm. Loại bỏ thanh khuấy, gắn lên con quay khuấy cơ học, làm kín và đặt lên dụng cụ khuấy. Gia nhiệt hỗn hợp tới nhiệt độ 100°C (chậu gia nhiệt, bên trong ở nhiệt độ 120°C) và khuấy qua đêm. Làm mát hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và bổ sung 2-metyltetrahydrofuran (600mL). Lọc qua nút lọc CELITE® và rửa bằng 2-metyltetrahydrofuran. Tách riêng lớp hữu cơ và chiết lớp nước bằng 2-metyltetrahydrofuran (200mL). Kết hợp các lớp hữu cơ và làm khô trên natri sulfat khan. Tiến hành lọc, cô đặc và làm khô trong chân không qua đêm để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (31,3g; hiệu suất 70,4%) là dầu màu vàng. MS (m/z): 153 (M+1).

Điều chế hợp chất sau cơ bản bằng phương pháp trong ví dụ điều chế 3.

Bảng 2:

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý
4	2-(5-Amino-2-pyridyl)propan-2-ol		MS (m/z): 153 (M+1)

Ví dụ điều chế 5**2-Bromo-1-tetrahydropyran-4-yl-etanon**



Phương pháp 1:

Bổ sung oxalyl clorua (28,69mL, 330,73mmol) từng giọt vào hỗn hợp của axit tetrahydropyran-4-cacboxylic (39,13g, 300,67mmol) trong DCM (250mL) và DMF (15 giọt). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2,5 giờ trong môi trường nitơ. Cô đặc trong điều kiện áp suất giảm và hòa tan phần còn lại trong DCM (250mL). Bổ sung dung dịch tạo ra từng giọt vào (trimetylsilyl)diazometan (2M trong hexan, 450mL, 900,00mmol) ở nhiệt độ -10°C và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ 0°C và bổ sung axit bromhydric (48% trọng lượng/trọng lượng trong nước, 52mL, 462,73mmol) từng giọt. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ 0°C và bổ sung axit bromhydric (48% trọng lượng/trọng lượng trong nước, 26mL, 231,36mmol) từng giọt vào đó. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Bổ sung nước (250mL), DCM (250mL) và tách riêng lớp hữu cơ. Chiết lớp nước bằng DCM (2 x 250mL). Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa và dung dịch nước natri clorua bão hòa. Làm khô trên natri sulfat khan và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (58,2g; hiệu suất 93,48%) là chất rắn màu nâu. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4,00 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,45 (m, 2H), 2,98 (m, 1H), 1,78 (m, 4H).

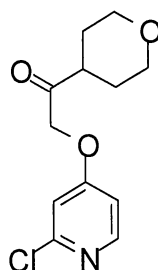
Phương pháp 2:

Làm lạnh dung dịch chứa 1-tetrahydropyran-4-yletanon (10g, 78,02mmol) trong metanol (MeOH; 50mL) xuống nhiệt độ -10°C . Bổ sung brom (4,01mL, 78,02mmol) từng giọt vào đó. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 45 phút và tiếp theo, ở nhiệt độ 10°C trong thời gian 45 phút. Bổ sung dung dịch nước chứa axit sulfuric (11M, 27,5mL, 302,50mmol) vào đó và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Bổ sung nước vào đó và chiết bằng dietyl ete ba lần. Kết hợp các lớp hữu cơ. Rửa bằng dung dịch nước chứa natri bicacbonat và nước. Làm khô trên natri sulfat khan và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu

ở tiêu đề (12g; hiệu suất 74,28%) là chất rắn màu trắng. ^1H NMR (400,13 MHz, CDCl_3) δ 4,00 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,45 (m, 2H), 2,98 (m, 1H), 1,78 (m, 4H).

Ví dụ điều chế 6

2-[(2-Clo-4-pyridyl)oxy]-1-tetrahydropyran-4-yl-etanon



Phương pháp 1:

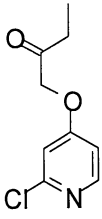
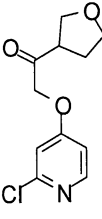
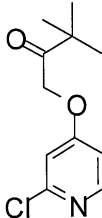
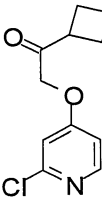
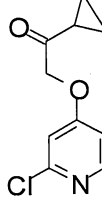
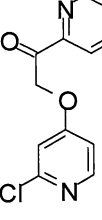
Bổ sung dung dịch chứa 2-bromo-1-tetrahydropyran-4-yl-etanon (24,35g, 117,60mmol) trong DMF (50mL) từng giọt vào hỗn hợp đang khuấy của 2-clopyridin-4-ol (13,85g, 106,91mmol) và xesi cacbonat (69,67g, 213,82mmol) trong DMF (380mL) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 2,5 giờ. Làm mát xuống nhiệt độ trong phòng để thu được hỗn hợp thô. Kết hợp với hỗn hợp thô của 2,85g (2-clopyridin-4-ol) nữa, phản ứng được thực hiện như chỉ rõ ở trên. Pha loãng hỗn hợp kết hợp với nước (200mL) và EtOAc (300mL). Tách riêng lớp hữu cơ và chiết lớp nước bằng EtOAc (3 x 250mL). Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng nước (100mL) và nước natri clorua bão hòa (100mL). Làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (29,32g; hiệu suất 88,96%) là dầu màu nâu. MS (m/z): 256 (M+1).

Phương pháp 2:

Bổ sung 2-bromo-1-tetrahydropyran-4-yl-etanon (10,03g, 48,42mmol) và kali cacbonat (10,14g, 72,62mmol) vào dung dịch chứa 2-clopyridin-4-ol (6,40g, 48,42mmol) trong axeton (150mL) và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Lọc để loại bỏ chất rắn và rửa chất rắn bằng DCM. Cô đặc phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề về mặt định lượng. MS (m/z): 256 (M+1).

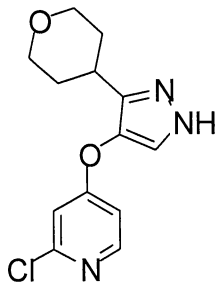
Điều chế các hợp chất sau cơ bản bằng phương pháp 2 trong ví dụ điều chế 6.

Bảng 3:

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý MS (m/z):
7	1-[(2-Cl-4-pyridyl)oxy]butan-2-on		200 (M+1)
8	2-[(2-Cl-4-pyridyl)oxy]-1-tetrahydrofuran-3-yl-etanon		242 (M+1)
9	1-[(2-Cl-4-pyridyl)oxy]-3,3-dimetyl-butan-2-on		228 (M+1)
10	2-[(2-Cl-4-pyridyl)oxy]-1-xyclobutyl-etanon		226 (M+1)
11	2-[(2-Cl-4-pyridyl)oxy]-1-xyclopropyl-etanon		212 (M+1)
12	2-[(2-Cl-4-pyridyl)oxy]-1-(2-pyridyl)etanon		249 (M+1)

Ví dụ điều chế 13

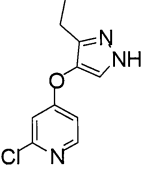
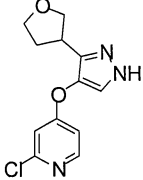
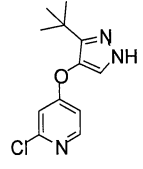
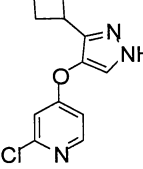
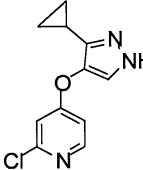
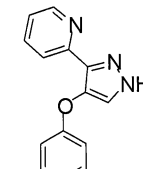
2-Clo-4-[(3-tetrahydropyran-4-yl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin



Khuấy hỗn hợp của 2-[(2-clo-4-pyridyl)oxy]-1-tetrahydropyran-4-yl-etanon (29,3g, 114,59mmol) và 1,1-dimetoxy-N,N-dimetyl-metanamin (65mL, 486,83mmol) ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 2 giờ. Làm mát xuống nhiệt độ trong phòng, cô đặc trong điều kiện áp suất giảm và hòa tan phần còn lại trong EtOAc (400mL). Rửa bằng nước (100mL) và nước natri clorua bão hòa (100mL). Làm khô trên natri sulfat khan và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được chất rắn màu nâu. Hòa tan trong axit axetic (350mL) và làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C. Bổ sung hydrazin monohydrat (16,8mL, 345,66mmol) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm trong môi trường nitơ. Rót hỗn hợp vào trong hỗn hợp nước đá/nước (250mL) và chiết bằng EtOAc (4 x 200mL). Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng nước (200mL), dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (100mL) và nước natri clorua bão hòa (100mL). Làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được dầu màu nâu. Tinh chế dầu màu nâu bằng cách sử dụng đệm silicagel rửa giải bằng EtOAc. Kết hợp các phần thích hợp và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Làm khô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (24,43g; hiệu suất 76,22%) là chất rắn màu vàng. MS (m/z): 280 (M+1).

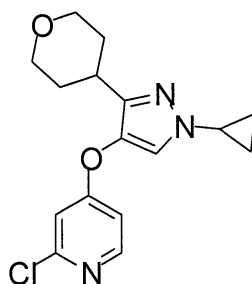
Điều chế các hợp chất sau cơ bản bằng phương pháp trong ví dụ điều chế 13.

Bảng 4:

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý MS (m/z):
14	2-Clo-4-[(3-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin		224 (M+1)
15	2-Clo-4-[(3-tetrahydrofuran-3-yl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin		266 (M+1)
16	4-[(3-Tert-butyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]-2-clo-pyridin		252 (M+1)
17	2-Clo-4-[(3-xyclobutyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin		250 (M+1)
18	2-Clo-4-[(3-xyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin		236 (M+1)
19	2-Clo-4-[[3-(2-pyridyl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy]pyridin		273 (M+1)

Ví dụ điều chế 20

2-Clo-4-(1-xyclopropyl-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin



Phương pháp 1:

Tiến hành hồi lưu hỗn hợp của 2,2'-bipyridin (13,73g, 87,90mmol) và đồng(II)axetat (15,97g, 87,90mmol) trong 1,2-dicloetan (244,3mL) ở nhiệt độ 75°C trong thời gian 25 phút và tiếp theo, làm mát xuống nhiệt độ trong phòng. Bổ sung dung dịch chứa 2-clo-4-[(3-tetrahydropyran-4-yl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin (24,43g, 79,91mmol) trong 1,2-dicloetan (335,30mL) vào đó, tiếp theo bổ sung axit xyclopropylboronic (13,73g, 159,82mmol) và natri cacbonat (16,94g, 159,82mmol) vào đó. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 75°C trong thời gian 2 giờ trong môi trường oxy và làm mát xuống nhiệt độ trong phòng. Pha loãng bằng EtOAc (200mL), lọc qua đệm silicagel và rửa bằng EtOAc (250mL). Rửa phần dịch lọc bằng nước (200mL) và nước natri clorua bão hòa (200mL). Làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm và làm khô phần còn lại trong chân không ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel bằng 6-27% EtOAc trong DCM để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (20,75g; hiệu suất 81,2%) là chất rắn màu vàng. MS (m/z): 320 (M+1).

Phương pháp 2:

Gia nhiệt huyền phù chứa 2,2'-bipyridin (28,8g, 56,5mmol) và đồng(II)axetat (8,2g, 45,2mmol) trong 1,2-dicloetan (50mL) tới nhiệt độ 70°C và làm sạch bằng nito trong thời gian 3 phút. Lọc và bổ sung phần dịch lọc vào hỗn hợp của 2-clo-4-[(3-tetrahydropyran-4-yl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin (8g, 22,6mmol), kali xyclopropyl(triflo)borat (6,7g, 45,2mmol) và natri cacbonat (4,8g, 45,2mmol) trong 1,2-dicloetan (50mL). Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 4 ngày. Làm mát xuống nhiệt độ trong phòng. Lọc và rửa bằng DCM. Rửa phần dịch lọc bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa và dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa. Làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc phần dịch lọc trong điều kiện áp suất

giảm. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel bằng 1-10% MeOH trong DCM để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (6,0g; hiệu suất 82,2%). MS (m/z): 320 (M+1).

Điều chế các hợp chất sau cơ bản bằng phương pháp 1 trong ví dụ điều chế 20.

Việc thay đổi về phương thức hoạt động được chỉ rõ.

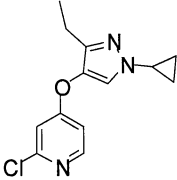
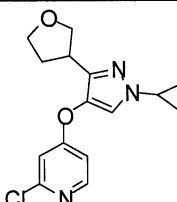
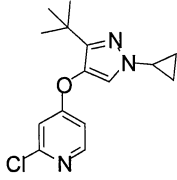
Bảng 5:

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý MS (m/z):	Chú giải
21	2-Clo-4-(3-xyclobutyl-1-xyclopropyl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin		290 (M+1)	
22	2-Clo-4-(1,3-dixyclopropylpyrazol-4-yl)oxy-pyridin		276 (M+1)	
23	2-Clo-4-[1-xyclopropyl-3-(2-pyridyl)pyrazol-4-yl]oxy-pyridin		313 (M+1)	Sử dụng 23% amoniac hydroxit trong nước để làm dừng phản ứng.

Điều chế các hợp chất sau cơ bản theo phương pháp 2 trong ví dụ điều chế 20.

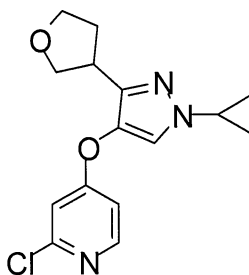
Bảng 6:

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý MS (m/z):
-------------------	-------------	----------	--------------------------

24	2-Clo-4-(1-xyclopropyl-3-etyl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin		264 (M+1)
25	2-Clo-4-(1-xyclopropyl-3-tetrahydrofuran-3-yl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin		306 (M+1)
26	4-(3-Tert-butyl-1-xyclopropyl-pyrazol-4-yl)oxy-2-clo-pyridin		292 (M+1)

Ví dụ điều chế 27

2-Clo-4-(1-xyclopropyl-3-tetrahydrofuran-3-yl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin, chất đồng phân 1

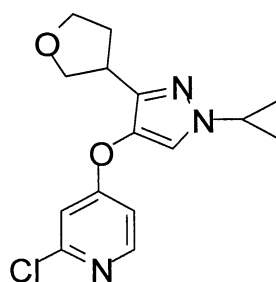


Tinh chế hỗn hợp triệt quang của 2-clo-4-(1-xyclopropyl-3-tetrahydrofuran-3-yl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin (ví dụ điều chế 25) bằng phương pháp sắc ký không đối xứng để tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất là hợp chất nêu ở tiêu đề. MS (m/z): 306 (M+1).

Điều kiện tinh chế: CHIRALPAK® IC; Pha động: 20% etanol (EtOH) trong cacbon dioxit; Tốc độ dòng: 300g/phút; UVW: 240nm; Thời gian duy trì: 2,44 phút.

Ví dụ điều chế 28

2-Clo-4-(1-xyclopropyl-3-tetrahydrofuran-3-yl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin, chất đồng phân 2

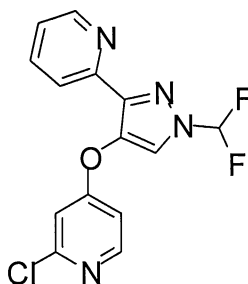


Tinh chế hỗn hợp triệt quang của 2-clo-4-(1-xyclopropyl-3-tetrahydrofuran-3-yl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin (ví dụ điều chế 25) bằng phương pháp sắc ký không đối xứng để tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai là hợp chất nêu ở tiêu đề. MS (m/z): 306 (M+1).

Điều kiện tinh chế: CHIRALPAK® IC; Pha động: 20% EtOH trong cacbon dioxit; Tốc độ dòng: 300g/phút; UVW: 240nm; Thời gian duy trì: 2,93 phút.

Ví dụ điều chế 29

2-Clo-4-[1-(diflometyl)-3-(2-pyridyl)pyrazol-4-yl]oxy-pyridin



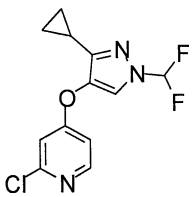
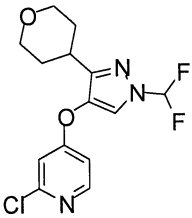
Làm lạnh dung dịch chứa 2-clo-4-[[3-(2-pyridyl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy]pyridin (2,0g, 7,33mmol) trong DMF (73,34mL) trong một chậu nước đá và bổ sung natri hydrua (60% trong dầu khoáng, 880,02mg, 22,00mmol) theo từng phần. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 10 phút, làm ấm hỗn hợp lên nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian 10 phút. Bổ sung difloiodometan (10% trọng lượng trong THF, 27,19mL, 36,67mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 45°C qua đêm. Làm mát xuống nhiệt độ trong phòng và pha loãng bằng EtOAc. Trước tiên, rửa bằng 5% dung dịch nước lithi clorua và tiếp theo, rửa bằng nước natri clorua bão hòa. Làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột silicagel bằng 0-50% EtOAc trong

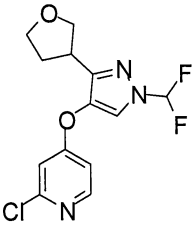
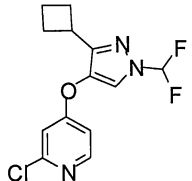
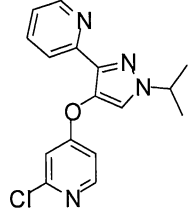
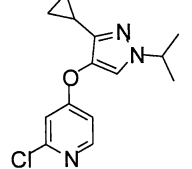
DCM. Kết hợp các phân thích hợp và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột silicagel bằng 0-10% EtOAc trong DCM để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (1,56g; hiệu suất 65,9%). MS (m/z): 323 (M+1).

Điều chế các hợp chất sau cơ bản bằng phương pháp trong ví dụ điều chế 29.

Những thay đổi về dung môi, bazơ và/hoặc nhiệt độ phản ứng được chỉ rõ.

Bảng 7:

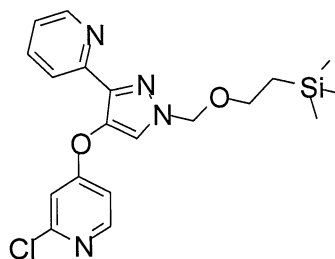
Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý	Chú giải
30	2-Clo-4-[3-xyclopropyl-1-(diflometyl)pyrazol-4-yl]oxy-pyridin		MS (m/z): 286 (M+1)	THF, kali tert-butoxit,
31	2-Clo-4-[1-(diflometyl)-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl]oxy-pyridin		¹ H NMR (399,83 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,42 (s, 1H), 8,30 (d, J=5,6 Hz, 1H), 7,71 (t, J=59,2 Hz, 1H), 7,15 (d, J=2,4 Hz, 1H), 7,04 (dd, J=2,4 Hz, J=5,6 Hz, 1H), 3,81 (m, 2H), 3,33 (m, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,64 (m, 4H).	

32	2-Cl-4-[1-(diflometyl)-3-tetrahydrofuran-3-yl-pyrazol-4-yl]oxy-pyridin		¹ H NMR (399,83 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,46 (s, 1H), 8,30 (d, J=5,6 Hz, 1H), 7,71 (t, J=59,2 Hz, 1H), 7,16 (d, J=2,4 Hz, 1H), 7,05 (dd, J=2,4 Hz, J=5,6 Hz, 1H), 3,89 (t, J=6,0 Hz, 1H), 3,68 (m, 3H), 3,26 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,99 (m, 1H).	
33	2-Cl-4-[3-xyclobutyl-1-(diflometyl)pyrazol-4-yl]oxy-pyridin		MS (m/z): 300 (M+1)	
34	2-Cl-4-[1-isopropyl-3-(2-pyridyl)pyrazol-4-yl]oxy-pyridin		MS (m/z): 315 (M+1)	THF, kali tert-butoxit, hồi lưu qua đêm
35	2-Cl-4-(3-xyclopropyl-1-isopropyl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin		MS (m/z): 278 (M+1)	nhiệt độ trong phòng

36	2-Clo-4-(1-isopropyl-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin		MS (m/z): 322 (M+1)	nhiệt độ trong phòng
37	2-Clo-4-(3-xyclobutyl-1-isopropyl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin		MS (m/z): 292 (M+1)	nhiệt độ trong phòng
38	2-Clo-4-[1-(2,2-difloetyl)-3-(2-pyridyl)pyrazol-4-yl]oxy-pyridin		MS (m/z): 337 (M+1)	THF, kali tert- butoxit, 50°C
39	2-Clo-4-[3-xyclopropyl-1-(2,2-difloetyl)pyrazol-4-yl]oxy-pyridin		MS (m/z): 300 (M+1)	Xesi cacbonat, 50°C
40	2-Clo-4-[1-(2,2-difloetyl)-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl]oxy-pyridin		MS (m/z): 344 (M+1)	Xesi cacbonat, 50°C

Ví dụ điều chế 41

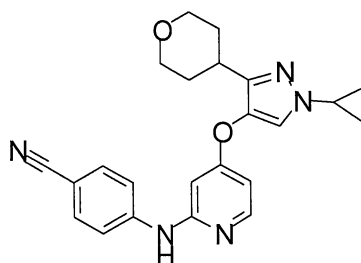
2-Clo-4-{[3-(pyridin-2-yl)-1-{[2-(trimethylsilyl)etoxy]metyl}]-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin



Bổ sung natri hydrua (huyền phù 60% trong dầu khoáng, 484mg, 12,10mmol) vào dung dịch chứa 2-clo-4-[[3-(2-pyridyl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy]pyridin (3,0g, 11,00mmol) trong THF (110mL) ở nhiệt độ 0°C. Khuấy trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 0°C và bổ sung 2-(trimetylsilyl)etoxymetyl clorua (2,02g, 12,10mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Cô đặc hỗn hợp. Phân chia phần còn lại thành DCM và nước. Tách riêng lớp hữu cơ và làm khô trên natri sulfat. Lọc hỗn hợp và cô đặc phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột silicagel bằng 0-30% EtOAc trong hexan để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (3,64g; hiệu suất 82,1%). MS (m/z): 403 (M+1).

Ví dụ điều chế 42

4-[[4-(1-Xyclopropyl-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl)oxy-2-pyridyl]amino]benzonitril

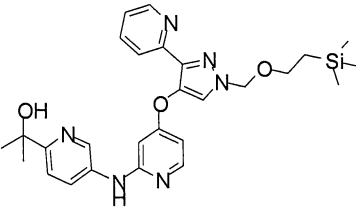
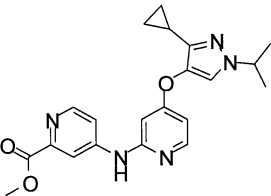
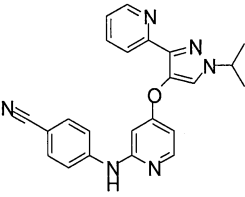
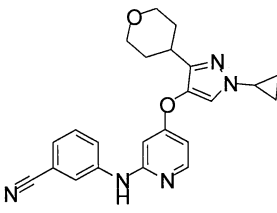
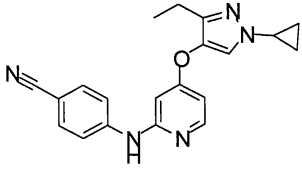


Làm sạch dung dịch chứa 2-clo-4-(1-xyclopropyl-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin (400mg, 1,2mmol), p-aminobenzonitril (219,9mg, 1,9mmol), xesi cacbonat (568,5mg, 1,7mmol), 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimetyl xanthen (134,6mg, 0,23mmol) trong 1,4-dioxan (15mL) bằng nitơ trong thời gian 5 phút. Xử lý hỗn hợp thu được bằng paladi(II)axetat (26,1mg, 0,12mmol) và làm sạch bằng nitơ trong thời gian 5 phút. Đóng kín lọ và khuấy ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 2 giờ, tiếp theo ở nhiệt độ 80°C trong thời gian cuối tuần. Làm mát xuống nhiệt độ trong phòng, lọc qua nút lọc CELITE® và rửa bằng 5% MeOH trong DCM. Cô đặc phần dịch lọc để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (467mg; hiệu suất 100%). MS (m/z): 402 (M+1).

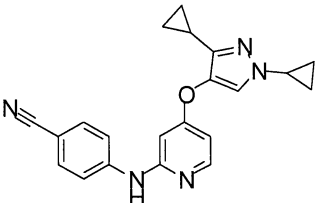
Điều chế các hợp chất sau cơ bản bằng phương pháp trong ví dụ điều chế 42.

Những thay đổi về chất xúc và/hoặc dung môi được chỉ rõ.

Bảng 8:

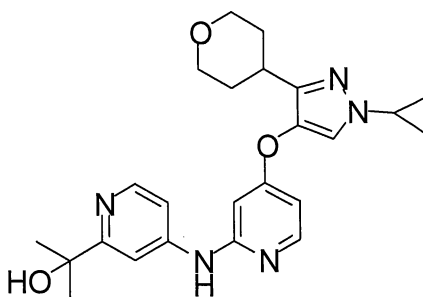
Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý MS (m/z):	Chú giải
43	2-[5-[[4-[3-(2-Pyridyl)-1-(2-trimethylsilyloxyethyl)pyrazol-4-yl]oxy-2-pyridyl]amino]-2-pyridyl]propan-2-ol		519 (M+1)	Tris(dibenzylidenaxeton)dipaladi(0), toluen
44	Metyl 4-[[4-(3-cyclopropyl-1-isopropyl-pyrazol-4-yl)oxy-2-pyridyl]amino]pyridin-2-carboxylat		394 (M+1)	Tris(dibenzylidenaxeton)dipaladi(0), toluen
45	4-[[4-[1-Isopropyl-3-(2-pyridyl)pyrazol-4-yl]oxy-2-pyridyl]amino]benzonitril		397 (M+1)	
46	3-[[4-(1-Xyclopropyl-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl)oxy-2-pyridyl]amino]benzonitril		402 (M+1)	
47	4-[[4-(1-Xyclopropyl-3-etyl-pyrazol-4-yl)oxy-2-pyridyl]amino]benzonitril		346 (M+1)	

	pyridyl]amino]benzo nitril			
48	4-[[4-[1-(Diflometyl)-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl]oxy-2-pyridyl]amino]benzo nitril		412 (M+1)	
49	N-[4-[1-(Diflometyl)-3-tetrahydrofuran-3-yl-pyrazol-4-yl]oxy-2-pyridyl]pyridazin-3-amin		375 (M+1)	Tris(dibenzylidenaxeton)dipaladi(0)
50	2-[4-[[4-(1-Xyclopropyl-3-tetrahydrofuran-3-yl-pyrazol-4-yl)oxy-2-pyridyl]amino]-2-pyridyl]propan-2-ol		422 (M+1)	
51	4-[[4-[3-Xyclobutyl-1-(diflometyl)pyrazol-4-yl]oxy-2-pyridyl]amino]benzo nitril		382 (M+1)	
52	3-[[4-[1-(Diflometyl)-3-(2-pyridyl)pyrazol-4-yl]oxy-2-pyridyl]amino]benzo nitril		405 (M+1)	

53	4-[[4-(1,3-Dioxycyclopropylpyrazol-1-yl)oxy-2-pyridyl]amino]benzonitril		358 (M+1)	
----	---	--	-----------	--

Ví dụ 1

2-{4-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol

**Phương pháp 1:**

Làm sạch dung dịch chứa 2-clo-4-(1-xyclopropyl-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin (45,6g, 142,6mmol), 2-(4-amino-2-pyridyl)propan-2-ol (26,0g, 171,1mmol) và natri phenat (26,5g, 228,2mmol) trong 1,4-dioxan (456mL) bằng nitơ trong thời gian 20 phút. Xử lý hỗn hợp thu được bằng 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimetyl-xanthen (8,25g, 14,3mmol) và bis(dibenzylidenaxeton)paladi (4,10g, 7,13mmol). Hồi lưu trong thời gian 21 giờ. Làm mát phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Lọc qua nút lọc CELITE® và rửa bằng DCM (500mL). Cô đặc phần dịch lọc trên silicagel. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel bằng 0-10% MeOH trong EtOAc. Cô đặc các phân thích hợp và làm khô trong chân không qua đêm để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (58,7g; hiệu suất 91,7%). MS (m/z): 436 (M+1). Nhiều mẻ sản phẩm được tạo ra nhờ sử dụng phương pháp nêu trên. Hòa tan các mẻ kết hợp của các hợp chất nêu ở tiêu đề (92,4g) trong EtOH (1L). Xử lý dung dịch bằng QUADRASIL® MP (100g, 1,0-1,5mmol/g) và lắc hỗn hợp ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ. Làm mát xuống

nhệt độ trong phòng và lọc để loại bỏ các chất rắn. Cô đặc để loại bỏ dung môi. Hòa tan phần còn lại trong EtOH (500mL) trong khi gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C. Tiếp theo, làm mát hỗn hợp từ từ xuống nhiệt độ trong phòng và bổ sung nước (500mL) một cách từ từ. Làm lạnh hỗn hợp xuống 5°C trong khi khuấy. Tập hợp chất rắn bằng cách lọc và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 45°C qua đêm để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (81,8g). MS (m/z): 436 (M+1).

Phương pháp 2:

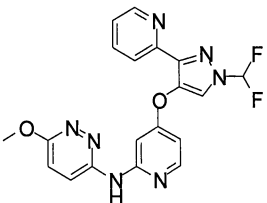
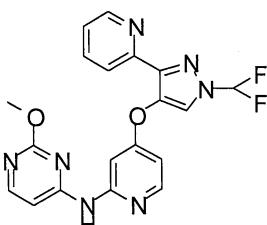
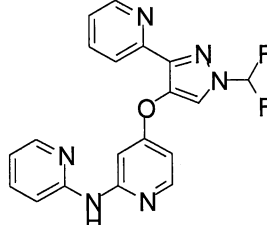
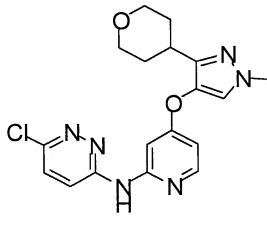
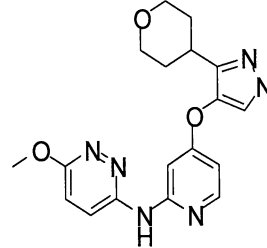
Hòa tan 2-clo-4-(1-xyclopropyl-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl)oxy-pyridin (400mg, 1,2mmol) trong 1,4-dioxan (15mL) trong một lọ nhỏ. Bổ sung 2-(4-amino-2-pyridyl)propan-2-ol (266,5mg, 1,6mmol), xesi cacbonat (568,5mg, 1,7mmol), 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimetylxanthen (134,6mg, 0,23mmol) vào đó và làm sạch bằng nitơ trong thời gian 5 phút. Bổ sung paladi(II)axetat (26,1mg, 0,12mmol) vào đó và làm sạch bằng nitơ trong thời gian 5 phút. Đóng kín lọ và khuấy ở nhiệt độ 100°C qua đêm. Làm mát phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng, lọc qua nút lọc CELITE® và rửa bằng 5% MeOH trong DCM. Cô đặc và tinh chế bằng phương pháp sắc ký pha đảo (Redisep Rf Gold High Performance C18 Cột pha đảo, 0-100% axit formic/axetonitril (ACN) trong axit formic /nước). Cô đặc các phần thích hợp và làm khô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (341mg; hiệu suất 67,3%). MS (m/z): 436 (M+1).

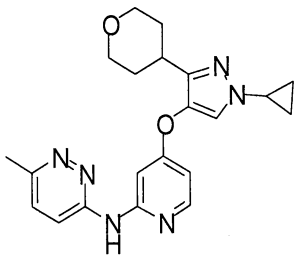
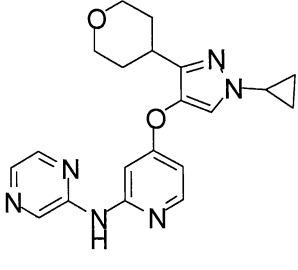
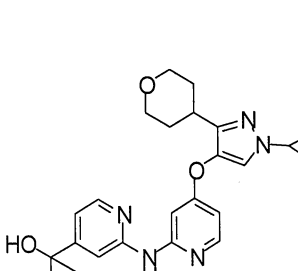
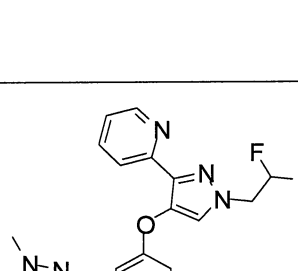
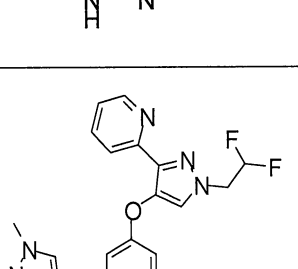
Điều chế các hợp chất sau cơ bản bằng phương pháp 2 trong ví dụ 1.

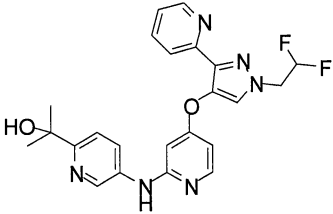
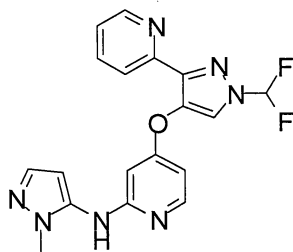
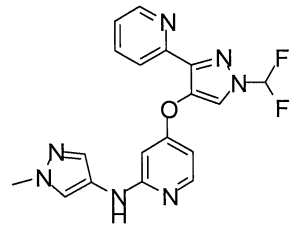
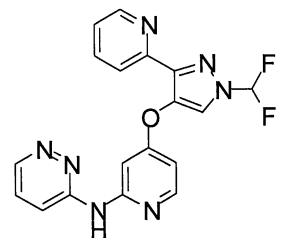
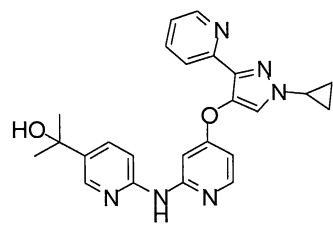
Những thay đổi về bazơ, chất xúc tác, phối tử và/hoặc dung môi được chỉ rõ.

Bảng 9:

Ví dụ số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý MS (m/z):	Chú giải
----------	-------------	----------	--------------------------	----------

2	N-(4-{[1-(Diflometyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)-6-metoxypyridazin-3-amin		412 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
3	N-(4-{[1-(Diflometyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)-2-metoxypyrimidin-4-amin		412 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
4	4-{[1-(Diflometyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}-N-(pyridin-2-yl)pyridin-2-amin		381 (M+1)	
5	6-Cl-N-(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)pyridazin-3-amin		413 (M+1)	
6	N-(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)-6-metoxypyridazin-3-amin		409 (M+1)	

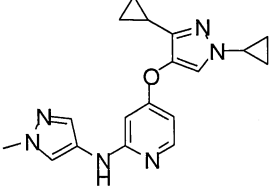
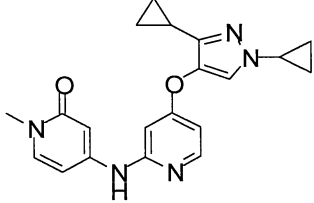
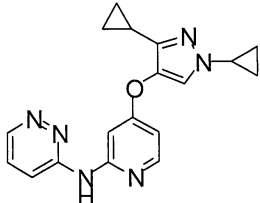
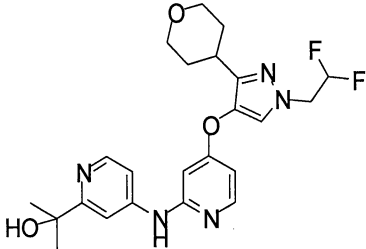
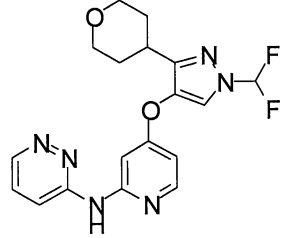
7	N-(4-{{1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy}pyridin-2-yl)-6-methylpyridazin-3-amin		393 (M+1)	
8	N-(4-{{1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy}pyridin-2-yl)pyrazin-2-amin		379 (M+1)	
9	2-{2-[(4-{{1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-4-yl}propan-2-ol		436 (M+1)	
10	4-{{1-(2,2-Difloetyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy}-N-(1-metyl-1H-pyrazol-3-yl)pyridin-2-amin		398 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
11	4-{{1-(2,2-Difloetyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy}-N-(1-metyl-1H-pyrazol-4-yl)pyridin-2-amin		398 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi

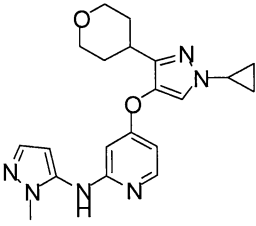
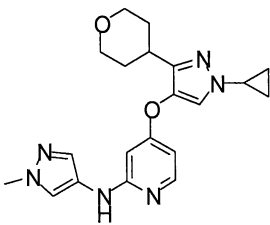
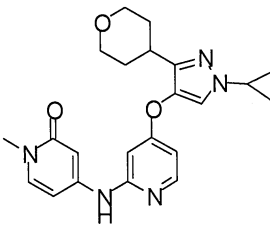
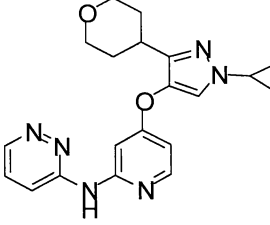
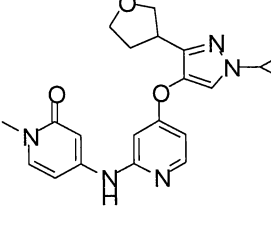
12	2-{5-[(4-{[1-(2,2-Difloetyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		453 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
13	4-{[1-(Diflometyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}-N-(1-metyl-1H-pyrazol-5-yl)pyridin-2-amin		384 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
14	4-{[1-(Diflometyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}-N-(1-metyl-1H-pyrazol-4-yl)pyridin-2-amin		384 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
15	N-(4-{[1-(Diflometyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)pyridazin-3-amin		382 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
16	2-{6-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-3-yl}propan-2-ol		429 (M+1)	

17	2-{5-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		429 (M+1)	
18	2-{4-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		429 (M+1)	
19	2-{6-[(4-{[1-(Propan-2-yl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-3-yl}propan-2-ol		431 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
20	1-Metyl-4-[(4-{[1-(propan-2-yl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2(1H)-on		403 (M+1)	
21	N-(4-{[1-(Propan-2-yl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)pyridazin-3-amin		374 (M+1)	

22	N-{4-[(3-Tert-butyl-1-xyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}pyridazin-3-amin		351 (M+1)	
23	2-[5-({4-[(3-Tert-butyl-1-xyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}amino)pyridin-2-yl]propan-2-ol		408 (M+1)	
24	2-[4-({4-[(3-Tert-butyl-1-xyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}amino)pyridin-2-yl]propan-2-ol		408 (M+1)	
25	2-[4-({4-[(1-Xyclopropyl-3-etyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}amino)pyridin-2-yl]propan-2-ol		380 (M+1)	
26	4-{[3-Xyclopropyl-1-(diflometyl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}-N-(1-metyl-1H-pyrazol-4-yl)pyridin-2-amin		347 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi

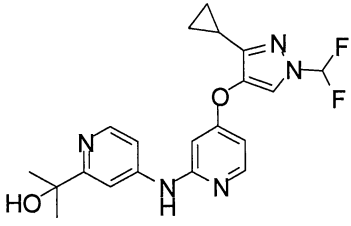
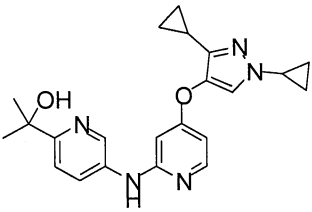
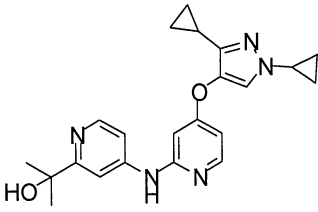
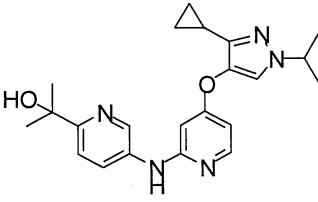
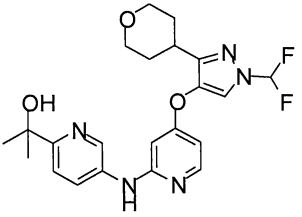
27	2-{4-[(4-{[3-Xyclopropyl-1-(2,2-difloetyl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		416 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
28	N-(4-{[3-Xyclopropyl-1-(diflometyl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)pyridazin-3-amin		345 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
29	4-({4-[(1,3-Dixyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}amino)-1-metylpyrimidin-2(1H)-on		365 (M+1)	
30	4-[(1,3-Dixyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]-N-(1-metyl-1H-pyrazol-3-yl)pyridin-2-amin		337 (M+1)	
31	2-[6-({4-[(1,3-Dixyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}amino)pyridin-3-yl]propan-2-ol		392 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi

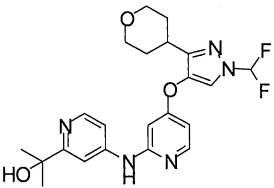
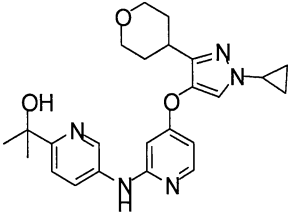
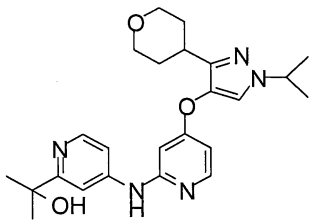
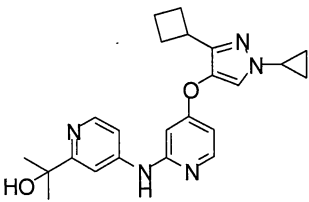
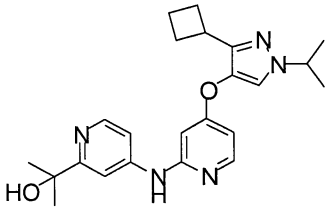
32	4-[(1,3-Dixyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]-N-(1-metyl-1H-pyrazol-4-yl)pyridin-2-amin		337 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
33	4-({4-[(1,3-Dixyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}amino)-1-metylpyridin-2(1H)-on		364 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi, toluen/N- metylpyrroli done
34	N-{4-[(1,3-Dixyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}pyridazin-3-amin		335 (M+1)	
35	2-{4-[(4-{[1-(2,2-Difloetyl)-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		460 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
36	N-(4-{[1-(Diflometyl)-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)pyridazin-3-amin		389 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi

37	4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}-N-(1-metyl-1H-pyrazol-5-yl)pyridin-2-amin		381 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
38	4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}-N-(1-metyl-1H-pyrazol-4-yl)pyridin-2-amin		381 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
39	4-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]-1-metylpyridin-2(1H)-on		408 (M+1)	
40	N-(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)pyridazin-3-amin		379 (M+1)	
41	4-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydrofuran-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]-1-metylpyridin-2(1H)-on		394 (M+1)	

42	N-[4-({1-Xyclopropyl-3-(tetrahydrofuran-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy)pyridin-2-yl]pyridazin-3-amin, chất đồng phân 2		365 (M+1)	
43	N-[4-({1-Xyclopropyl-3-(tetrahydrofuran-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy)pyridin-2-yl]pyridazin-3-amin, chất đồng phân 1		365 (M+1)	
44	2-{5-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydrofuran-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		422 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
45	2-{5-[(4-{[3-Xyclobutyl-1-(diflometyl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		416 (M+1)	
46	2-[5-({4-[(3-Xyclobutyl-1-xyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}amino)pyridin-2-yl]propan-2-ol		406 (M+1)	

47	2-{5-[(4-{[1-(Diflometyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		439 (M+1)	
48	2-{4-[(4-{[1-(Diflometyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		439 (M+1)	
49	2-{5-[(4-{[1-(Propan-2-yl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		431 (M+1)	
50	2-{4-[(4-{[1-(Propan-2-yl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		431 (M+1)	
51	2-{5-[(4-{[3-Xyclopropyl-1-(diflometyl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		402 (M+1)	

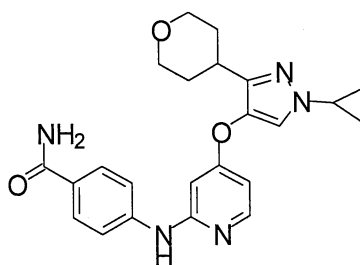
52	2-{4-[(4-{[3-Xyclopropyl-1-(diflometyl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		402 (M+1)	
53	2-[5-({4-[(1,3-Dixyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl} amino)pyridin-2-yl]propan-2-ol		392 (M+1)	
54	2-[4-({4-[(1,3-Dixyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl} amino)pyridin-2-yl]propan-2-ol		392 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
55	2-{5-[4-({3-Xyclopropyl-1-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		394 (M+1)	natri phenat, bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
56	2-{5-[4-({1-(Diflometyl)-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		446 (M+1)	

57	2-{4-[(4-{[1-(Diflometyl)-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		446 (M+1)	
58	2-{5-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		436 (M+1)	
59	2-{4-[(4-{[1-(Propan-2-yl)-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		438 (M+1)	
60	2-[4-((4-[(3-Xyclobutyl-1-xyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl)amino)pyridin-2-yl]propan-2-ol		406 (M+1)	bis(dibenzyl idenaxeton) paladi
61	2-{4-[(4-{[3-Xyclobutyl-1-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol		408 (M+1)	

	yl}propan-2-ol			
--	----------------	--	--	--

Ví dụ 62

4-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]benzamidit



Bổ sung kali cacbonat (80,4mg, 0,58mmol) vào dung dịch chứa 4-[[4-(1-xyclopropyl-3-tetrahydropyran-4-yl-pyrazol-4-yl)oxy-2-pyridyl]amino]benzonitril (467mg, 1,16mmol) trong DMSO (5mL). Bổ sung 30% hydro peroxit (1,77mL, 17,45mmol) vào đó và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Pha loãng bằng nước và chiết bằng DCM 4 lần. Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng nước natri clorua bão hòa. Làm khô trên natri sulfat khan. Lọc hỗn hợp và cô đặc phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký pha đảo (Redisep Rf Gold High Performance C18 Cột đảo pha, 0-100% axit formic/ACN trong axit formic/nước) để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (220mg; hiệu suất 45,9%). MS (m/z): 420 (M+1).

Điều chế các hợp chất sau cơ bản bằng phương pháp trong ví dụ 62.

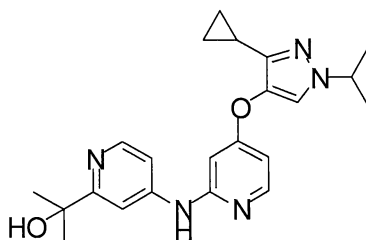
Bảng 10:

Ví dụ số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý MS (m/z):
63	3-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]benzamidit		420 (M+1)

	yl)amino]benzamid		
64	3-[(4-{[1-(Propan-2-yl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]benzamid		415 (M+1)
65	4-({4-[(1-Xyclopropyl-3-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}amino)benzamid		364 (M+1)
66	4-[(4-{[1-(Diflometyl)-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]benzamid		430 (M+1)
67	4-[(4-{[3-Xyclobutyl-1-(diflometyl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]benzamid		400 (M+1)
68	3-[(4-{[1-(Diflometyl)-3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]benzamid		423 (M+1)
69	4-({4-[(1,3-Dixyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)oxy]pyridin-2-yl}amino)benzamid		376 (M+1)

Ví dụ 70

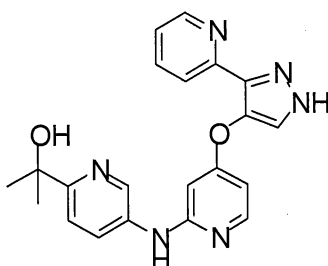
2-{4-[(4-{[3-Xyclopropyl-1-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol



Làm sạch dung dịch chứa metyl 4-[[4-(3-xyclopropyl-1-isopropyl-pyrazol-4-yl)oxy-2-pyridyl]amino]pyridin-2-cacboxylat (298mg, 0,76mmol) trong THF (6mL) trong một gấn kín bằng nito. Bỏ sung metylmagie bromua (3M trong dietyl ete, 1,01mL, 3,03mmol) tung giọt vào đó và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Cô đặc hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm và pha loãng phần còn lại bằng DCM và dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa. Tách riêng lớp hữu cơ và chiết lớp nước bằng DCM. Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng nước natri clorua bão hòa. Làm khô trên natri sulfate, lọc và cô đặc phần dịch lọc. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel bằng 5-10% MeOH trong DCM để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (160mg; hiệu suất 53,69%). MS (m/z): 394 (M+1).

Ví dụ 71

2-{5-[(4-{[3-(Pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol

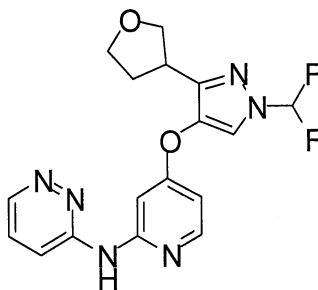


Làm lạnh dung dịch chứa 2-[5-[[4-[3-(2-Pyridyl)-1-(2-trimetylsilyletoxy-metyl)pyrazol-4-yl]oxy-2-pyridyl]amino]-2-pyridyl]propan-2-ol (500mg, 0,96mmol)

trong axit trifloaxetic (3mL) xuống nhiệt độ 0°C trong một chậu nước đá. Bổ sung triethylsilan (1mL, 6,24mmol) vào đó. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Cô đặc và tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký pha đảo (Redisep Rf Gold High Performance C18 Cột pha đảo, 0-100% amoni bicacbonat 10mM trong ACN). Cô đặc các phân thích hợp để loại bỏ ACN. Chiết hỗn hợp nước còn lại với DCM, tách riêng lớp hữu cơ và làm khô trên natri sulfat. Lọc và cô đặc phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (168mg; hiệu suất 44,9%). MS (m/z): 389 (M+1).

Ví dụ 72

N-[4-({1-(Diflometyl)-3-(tetrahydrofuran-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy)pyridin-2-yl]pyridazin-3-amin, chất đồng phân 1



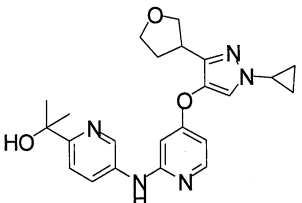
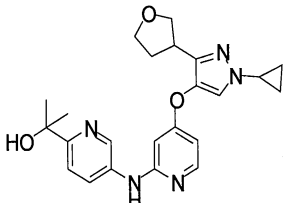
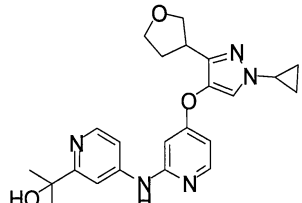
Tinh chế hỗn hợp triệt quang của N-[4-[1-(diflometyl)-3-tetrahydrofuran-3-yl-pyrazol-4-yl]oxy-2-pyridyl]pyridazin-3-amin (Ví dụ điều chế 49) bằng phương pháp sắc ký không đối xứng để tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất là hợp chất nêu ở tiêu đề. MS (m/z): 375 (M+1).

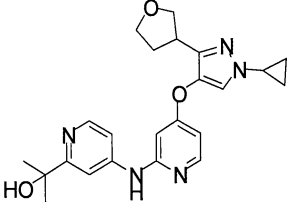
Các điều kiện tinh chế: CHIRALPAK® IC; Pha động: 30% isopropanol chứa 0,2% isopropyl amin trong cacbon dioxit; Tốc độ dòng: 70g/phút; UVW: 280nm; Thời gian duy trì: 3,93 phút.

Điều chế hợp chất sau cơ bản bằng phương pháp trong ví dụ 72.

Các điều kiện tinh chế thay thế được chỉ rõ.

Bảng 11:

Ví dụ số	Tên hóa học	Cấu trúc	Các điều kiện	Dữ liệu vật lý
73	2-(5-{[4-({1-Xyclopropyl-3-(tetrahydrofuran-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy)pyridin-2-yl]amino}pyridin-2-yl)propan-2-ol, chất đồng phân 1		CHIRALCEL® OJ-H; Pha động: 20% EtOH trong heptan; Tốc độ dòng: 425 mL/phút; UVW: 280nm; Thời gian duy trì: 17,39 phút	MS (m/z): 422 (M+1)
74	2-(5-{[4-({1-Xyclopropyl-3-(tetrahydrofuran-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy)pyridin-2-yl]amino}pyridin-2-yl)propan-2-ol, chất đồng phân 2		CHIRALCEL® OJ-H; Pha động: 20% EtOH trong heptan; Tốc độ dòng: 425 mL/phút; UVW: 280nm; Thời gian duy trì: 21,55 phút	MS (m/z): 422 (M+1)
75	2-(4-{[4-({1-Xyclopropyl-3-(tetrahydrofuran-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy)pyridin-2-yl]amino}pyridin-2-yl)propan-2-ol, chất đồng phân 1		CHIRALCEL® OJ-H; Pha động: 20% isopropanol chứa 0,2% isopropyl amin trong cacbon dioxit; Tốc độ dòng: 70g/phút; UVW: 225nm; Thời gian duy trì: 2,67 phút	MS (m/z): 422 (M+1)

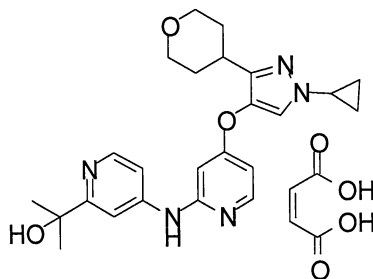
76	2-(4-{[4-({1-Xyclopropyl-3-(tetrahydrofuran-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl}oxy)pyridin-2-yl]amino}pyridin-2-yl)propan-2-ol, chất đồng phân 2		CHIRALCEL® OJ-H; Pha động: 20% isopropanol chứa 0,2% isopropyl amin trong cacbon dioxid; Tốc độ đòng: 70g/phút; UVW: 225nm; Thời gian duy trì: 3,59 phút	MS (m/z): 422 (M+1)
----	---	---	--	------------------------------

Phương thức tập hợp nhiễu xạ bột tia X trong các ví dụ từ 77 đến 79

Thu lấy các mô hình XRD của các chất rắn kết tinh trên nhiễu xạ kế bột tia X Bruker D4 Endeavor, được trang bị nguồn CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) và bộ dò Vantec, vận hành tại điện thế 35kV và 50mA. Quét mẫu ở góc 2θ nằm trong khoảng từ 4 đến 40° , với cỡ bước là $0,009^\circ$ về góc 2θ và tốc độ quét là 0,5 giây/bước, và với sự phân kỳ 0,6mm, chống tán xạ cố định 5,28 và các khe dò 9,5mm. Đặt bột khô lên giá giữ mẫu thạch anh và thu được bề mặt nhẵn sử dụng làm kính thủy tinh. Tập hợp các mô hình nhiễu xạ của dạng tinh thể ở nhiệt độ môi trường và độ ẩm tương đối.

Ví dụ 77

2-{4-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol, (2Z)-but-2-enedioat (1:1)



Bổ sung 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-

yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol (142mg) trong ACN (2mL). Chất rắn hòa tan hoàn toàn trong khi khuấy ở nhiệt độ 80°C/1000 vòng/phút. Bổ sung axit maleic (48mg, 1,20 đương lượng, trong 1mL ACN ở nhiệt độ 80°C) vào dung dịch thu được. Hỗn hợp ban đầu dạng đục vẫn nhưng nhanh chóng trở thành dung dịch trong màu. Ngừng gia nhiệt và khuấy. Làm mát dung dịch xuống nhiệt độ trong phòng. Bổ sung 2mL ACN khác để tạo huyền phù chất rắn. Tách riêng chất rắn màu trắng bằng cách lọc chân không và làm khô chất rắn tại chỗ trên dụng cụ lọc trong thời gian 15 phút dưới dòng không khí. Làm khô chất rắn thu được trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 65°C qua đêm để tạo ra hợp chất nêu ở tiêu đề (132mg, hiệu suất 73,4%). Tỷ lệ % theo lý thuyết của ion axit maleic trong muối tạo ra đối với muối đơn là 21,0%. Phân tích ion đối bằng phương pháp HPLC khẳng định rằng, tỷ lệ % thực tiễn của ion axit maleic trong muối tạo ra là 17,2%. Phân tích ion đối chỉ ra muối đơn.

Nhiều xạ bột tia X của ví dụ 77

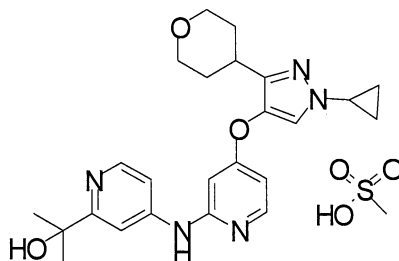
Mẫu điều chế của ví dụ 77 được đặc trưng bởi mô hình XRD sử dụng chiếu xạ CuK α có các đỉnh nhiễu xạ (các giá trị 2-theta) như được mô tả trong Bảng 13 dưới đây, và đặc biệt là có các đỉnh tại 9,6° kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm 12,5°, 17,5°, và 16,9°; với độ dung sai về các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Bảng 12: Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của ví dụ 77

Đỉnh	Góc (°2-Theta) +/- 0,2°	Cường độ tương đối (% của đỉnh có cường độ cao nhất)
1	9,6	100,0
2	12,5	88,2
3	17,5	74,4
4	16,9	55,8
5	12,9	54,0
6	20,1	45,9
7	21,5	44,1
8	19,2	36,4
9	20,9	35,5
10	23,5	32,0

Ví dụ 78

2-{4-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol, metansulfonat (1:1)



Bổ sung 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol (113mg) trong axeton (2mL). Chất rắn hòa tan hoàn toàn trong khi khuấy ở nhiệt độ 60°C/1000 vòng/phút. Bổ sung axit metansulfonic (21µL, 1,24 đương lượng) vào dung dịch tạo ra. Ngừng gia nhiệt và khuấy. Làm mát dung dịch xuống nhiệt độ trong phòng. Bổ sung 3mL axeton nữa để tạo huyền phù chất rắn. Tách riêng chất rắn màu trắng bằng cách lọc chân không và làm khô chất rắn tại chỗ trên dụng cụ lọc trong thời gian 15 phút dưới dòng không khí. Làm khô chất rắn thu được trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 65°C qua đêm để tạo ra hợp chất nêu ở tiêu đề (87mg, hiệu suất 63,08%). Tỷ lệ % theo lý thuyết của ion axit metansulfonic trong muối tạo ra đối với muối đơn là 18,1%. Phân tích ion đối bằng phương pháp HPLC khẳng định rằng, tỷ lệ % thực tiễn của ion axit metansulfonic ở muối tạo ra là 16,2%. Phân tích ion đối chỉ ra muối đơn.

Nhiều xạ bột tia X của ví dụ 78

Mẫu điều chế của ví dụ 78 được đặc trưng bởi mô hình XRD sử dụng chiếu xạ CuKα có các đỉnh nhiễu xạ (các giá trị 2-theta) như được mô tả trong Bảng 14 dưới đây, và đặc biệt là có các đỉnh tại 7,0° kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm 14,1°, 10,8°, và 18,6°; với độ dung sai về các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

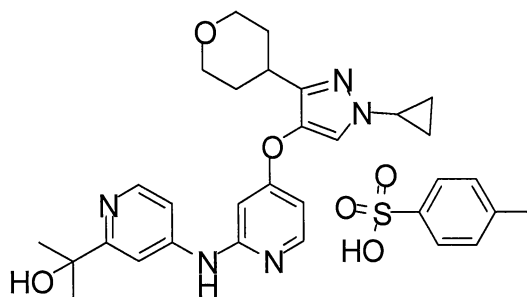
Bảng 13: Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của ví dụ 78

Đỉnh	Góc (°2-Theta) +/- 0,2°	Cường độ tương đối (% của đỉnh có cường độ cao nhất)
1	7,0	100,0
2	14,1	93,2

3	10,8	73,6
4	18,6	66,1
5	15,9	61,4
6	19,7	60,7
7	5,4	49,2
8	7,9	49,1
9	4,5	48,1
10	17,8	47,6

Ví dụ 79

2-{4-[(4-{[1-Xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol 4-metylbenzensulfonat (1:1)



Bổ sung 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol (122mg) trong EtOAc (2mL). Hòa tan chất rắn hoàn toàn trong khi khuấy ở nhiệt độ 80°C/1000 vòng/phút. Bổ sung monohydrat của axit p-toluensulfonic (1,23 đương lượng, trong 1mL EtOAc ở nhiệt độ 80°C) vào dung dịch tạo ra. Tạo huyền phù đặc hỗn hợp ở nhiệt độ 80°C/1000 vòng/phút trong thời gian 30 phút. Ngừng gia nhiệt và tiếp tục khuấy hỗn hợp tại tốc độ 1000 vòng/phút khi làm mát xuống nhiệt độ trong phòng. Tách riêng chất rắn màu trắng thu được bằng cách lọc chân không và làm khô chất rắn tại chỗ trên dụng cụ lọc trong thời gian 15 phút dưới dòng không khí. Làm khô chất rắn thu được trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 65°C qua đêm để tạo ra hợp chất nêu ở tiêu đề (159mg, hiệu suất 93,40%). Tỷ lệ % theo lý thuyết của ion axit p-toluensulfonic ở muối tạo ra đối với muối đơn là 29,3%. Phân tích ion đối bằng phương pháp HPLC khẳng định rằng,

tỷ lệ % thực tiễn của ion axit p-toluensulfonic ở muối tạo ra là 28,3%. Phân tích ion đối chỉ ra muối đơn.

Nhiều xạ bột tia X của ví dụ 79

Mẫu điều chế của ví dụ 79 được đặc trưng bởi mô hình XRD sử dụng chiếu xạ CuK α có các đỉnh nhiễu xạ (các giá trị 2-theta) như được mô tả trong Bảng 15 dưới đây, và đặc biệt là có các đỉnh tại 17,8° kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm 19,7°, 18,4°, và 22,0°; với độ dung sai về các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Bảng 14: Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của ví dụ 79

Đỉnh	Góc (°2-Theta) +/- 0,2°	Cường độ tương đối (% của đỉnh có cường độ cao nhất)
1	17,8	100,0
2	19,7	78,0
3	18,4	65,8
4	22,0	53,0
5	20,3	50,5
6	10,1	48,0
7	16,4	46,5
8	11,5	24,6
9	7,4	14,2
10	7,8	13,1

Sự truyền tín hiệu thông qua con đường TGF β kết hợp với sự tiến triển của ung thư và khối u ở nhiều dấu hiệu (Elliott et. al. (2005) J Clin Oncol 23:2078; Levy et. al. (2006) Xytokin & Growth Factor Rev 17:41-58). Có nhiều loại ung thư trong đó, các phối tử TGF β được tạo ra bởi khối u hoặc bởi chất đệm trong môi trường vi mô của khối u có thể tham gia vào sự tiến triển của khối u. Các tế bào ung thư tiền liệt tuyến của chuột MATLyLu (Steiner and Barrack (1992) Mol. Endocrinol 6:15-25) và các tế bào ung thư vú của người MCF-7 (Arteaga, et al. (1993) Cell Growth and Differ. 4:193-201) trở nên dễ tạo khối u và dễ di căn hơn sau khi chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện TGF β 1 chuột. TGF- β 1 được kết hợp với sự tạo mạch, sự di căn và tiên lượng

xấu trong ung thư tiền liệt tuyến và ung thư dạ dày tiến triển ở người (Wikstrom, P., et al. (1998) *Prostate* 37: 19–29; Saito, H. et al. (1999) *Cancer* 86: 1455–1462). Trong ung thư vú, tiên lượng xấu được kết hợp với TGF- β tăng cao (Dickson, et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:837-841; Kasid, et al. (1987) *Cancer Res.* 47:5733-5738; Daly, et al. (1990) *J. Cell Biochem.* 43:199-211; Barrett-Lee, et al. (1990) *Br. J. Cancer* 61:612-617; King, et al. (1989) *J. Steroid Biochem.* 34:133-138; Welch, et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7678-7682; Walker, et al. (1992) *Eur. J. Cancer* 238:641-644) và sự kích thích TGF- β 1 bởi việc điều trị bằng tamoxifen (Butta, et al. (1992) *Cancer Res.* 52:4261- 4264) đã được kết hợp với sự thất bại của việc điều trị bằng tamoxifen trong ung thư vú (Thompson, et al. (1991) *Br. J. Cancer* 63:609-614). Các kháng thể kháng TGF β 1 ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư vú người MDA-231 ở chuột thiếu tuyến ức (Arteaga, et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 92:2569-2576), việc điều trị tương quan với sự gia tăng hoạt tính của tế bào sát thủ tự nhiên ở lách. Các tế bào CHO chuyển nhiễm bằng TGF β 1 tiềm tàng cũng thể hiện giảm hoạt tính NK và tăng phát triển khối u ở chuột thiếu hụt miễn dịch (Wallick, et al. (1990) *J. Exp. Med.* 172:1777-1784). Do đó, TGF- β tiết ra bởi các khối u vú có thể gây ra sự ức chế miễn dịch - nội tiết. Nồng độ cao trong huyết tương của TGF β 1 đã được chứng minh là chỉ ra tiên lượng xấu đối với các bệnh nhân ung thư vú tiến triển (Anscher, et al. (1993) *N. Engl. J. Med.* 328:1592-1598). Những bệnh nhân có TGF β lưu hành cao trước khi hóa trị liệu liều cao và ghép tủy xương tự thân có nguy cơ cao về bệnh tắc tĩnh mạch gan (15-50% trong tổng số tất cả bệnh nhân với tỷ lệ tử vong lên đến 50%) và viêm phổi kẽ tự phát (40-60% trong tổng số tất cả bệnh nhân). Ngụ ý của các phát hiện này là ở chỗ, 1) mức nồng độ TGF β tăng cao trong huyết tương có thể được sử dụng để nhận diện các bệnh nhân có nguy cơ và 2) việc làm giảm sự truyền tín hiệu TGF β có thể làm giảm tỷ lệ bệnh và tỷ lệ tử vong của các điều trị phổ biến này ở bệnh nhân ung thư vú.

Những công bố gần đây cũng đã gợi ý rằng, sự truyền tín hiệu TGF β có thể đóng vai trò quan trọng trong việc đưa tính kháng khối u thành tiêu chuẩn của các liệu pháp điều trị chăm sóc, bao gồm liệu pháp hóa trị liệu và các tyrosine kinaza thụ thể (WO2012138783). Cụ thể, trong ung thư đại tràng, dấu ấn biểu hiện gen đặc hiệu đã

được chứng minh để phân lập nhóm bệnh nhân là những người kháng lại các điều trị hàng đầu thông thường. Các tế bào khối u này lấy lại được độ nhạy với liệu pháp điều trị khi con đường TGF β được phong bế bằng chất ức chế phân tử nhỏ đặc hiệu TGF β RI (Huang, et. al. (2012) Cell 151:937-950; Sadanandam et. al. (2013) Nat Med 19:619-625; Vermeulen et. al. (2013) Nat Med 19:614-618; Roepman et. al. (2014) 134:552-562).

Hội chứng rối loạn sinh tủy (MDS) là các rối loạn về hệ tạo huyết trong ống tủy xương và được đặc trưng bởi sự sản xuất không hiệu quả các tế bào tủy xương. MDS liên quan với những thay đổi của con đường TGF β được biểu thị bằng các mức nồng độ SMAD7 thấp. SMAD7 là một SMAD ức chế nó có chức năng ức chế sự truyền tín hiệu SMAD trung gian bởi TGF β và ở phía hạ lưu của sự truyền tín hiệu được kích hoạt bởi phối tử thông qua TGF β RI và TGF β RII. Do đó, sự biểu hiện quá mức của SMAD7 được cho là dẫn đến sự kích hoạt quá mức sự truyền tín hiệu TGF β ở MDS, và kiểu hình này có thể làm đảo ngược được nhờ điều trị bằng chất ức chế phân tử nhỏ TGF β RI (Zhou et. al. (2011) Cancer Res. 71:955-963). Tương tự, trong u nguyên bào thần kinh đệm (GBM), các mức phối tử TGF β tăng cao và có liên quan đến sự tiến triển của bệnh. Tác nhân trị liệu oligonucleotit đối nghĩa, AP1002, đã được chứng minh có hoạt tính tiềm tàng ở một nhóm nhỏ bệnh nhân GBM (Bogdahn et. al. (2011). Curr Pharm Biotechnol). Trong ung thư hắc tố, việc kích hoạt truyền tín hiệu của con đường TGF β cũng có liên quan đến tính kháng đối với các chất ức chế BRAF và MEK (Sun et. al. (2014) Nature. 508:118-122).

Nhiều tế bào ác tính tiết ra yếu tố tăng trưởng chuyển dạng- β (TGF- β), một chất ức chế miễn dịch hiệu quả, cho thấy rằng, sự sản xuất TGF β có thể biểu thị một cơ chế trốn thoát khỏi u quan trọng khỏi sự giám sát miễn dịch của vật chủ (Flavell et. al. (2010) Nat Rev Immunol 10:554-567; Kast et. al. (1999) Leukemia 13:1188-1199). Việc thiết lập một quần thể nhỏ bạch cầu với sự truyền tín hiệu TGF β bị gián đoạn ở vật chủ mang khối u tạo ra phương tiện tiềm tàng cho liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư riêng biệt hoặc kết hợp với một hoặc nhiều liệu pháp miễn dịch khác, ví dụ kết hợp với một hoặc nhiều chất ức chế PD-1 như nivolumab, pembrolizumab, các chất ức chế PD-L1, các vắc xin ung thư, và các phân tử liên kết miễn dịch song đặc hiệu như

IMCgp100. Phôi tử TGF β tạo ra bởi các tế bào lymphô đã được chứng minh về phương diện tiền lâm sàng là đối kháng với sự giám sát miễn dịch khối u (Donkor et. al. (2012) Development. Oncoimmunology 1:162-171, Donkor et. al. (2011) Cytokine Immunity 35:123-134); việc phá vỡ trục này đã được chứng minh về phương diện tiền lâm sàng là tạo ra lợi ích chống khối u ở các mẫu chuột và *in vitro* (Zhong et. al. (2010) Cancer Res 16:1191-1205; Petrausch et. al. (2009) J Immunol 183:3682-3689); Wakefield et. al. (2013) Nat. Rev Cancer 13:328-341). Một mẫu động vật chuyển gen với sự truyền tín hiệu TGF β bị phá vỡ ở các tế bào T có khả năng tiết trừ khối u lymphô biểu hiện quá mức TGF β gây chết thông thường, EL4 (Gorelik và Flavell, (2001) Nature Medicine 7(10): 1118-1122). Sự điều hòa theo hướng giảm đối với sự tiết TGF β trong các tế bào khối u dẫn đến sự phục hồi khả năng sinh miễn dịch ở vật chủ, trong khi tính không nhạy của tế bào T với TGF β dẫn đến tăng biệt hóa và khả năng tự miễn dịch, các yếu tố của quá trình này có thể cần thiết để chiến đấu với các khối u biểu hiện kháng nguyên tự thân ở vật chủ được dung nạp. Các tác dụng ức chế miễn dịch của TGF β cũng có liên quan tới quần thể bệnh nhân bị HIV với đáp ứng miễn dịch dự đoán thấp hơn dựa vào số lượng tế bào T CD4/CD8 của họ (Garba, et al. J. Immunology (2002) 168: 2247-2254). Kháng thể trung hòa TGF β có khả năng đảo ngược tác dụng trong nuôi cấy, cho thấy rằng, các chất ức chế sự truyền tín hiệu TGF β có thể hữu ích trong việc làm đảo ngược sự ức chế miễn dịch có mặt trong nhóm bệnh nhân bị HIV này.

Ở các giai đoạn phát sinh ung thư sớm nhất, TGF β 1 có thể tác động như một chất ức chế khối u hiệu quả và có thể trung gian cho các tác động của một số thuốc hóa dự phòng. Tuy nhiên, tại thời điểm nào đó trong quá trình phát triển và tiến triển của các khối u ác tính, các tế bào khối u hình như thoát khỏi sự ức chế tăng trưởng phụ thuộc TGF β song song với sự xuất hiện TGF β có hoạt tính sinh học trong môi trường vi mô. Các vai trò kép ức chế khối u /thúc đẩy khối u của TGF β đã được giải thích rõ ràng nhất trong hệ chuyển gen biểu hiện quá mức TGF β trong các tế bào sùng. Trong khi các gen chuyển có tính kháng tốt hơn với sự hình thành các tổn thương da lành tính, tỷ lệ biến đổi có tính di căn trong các gen chuyển tăng lên rất nhiều (Cui, et al (1996) Cell 86(4):531-42). Sự sản xuất TGF β 1 bởi các tế bào ác tính trong các khối u

nguyên phát hình như tăng lên với các giai đoạn tiến triển của sự tiến triển của khối u. Các nghiên cứu ở nhiều bệnh ung thư biểu mô chính cho thấy rằng, sự gia tăng sản xuất TGF β bởi các ung thư ở người xảy ra như một sự kiện tương đối muộn trong quá trình tiến triển của khối u. Ngoài ra, TGF β kết hợp khối u này cung cấp cho các tế bào khối u một lợi thế chọn lọc và thúc đẩy sự tiến triển của khối u. Tác dụng của TGF β lên các tương tác tế bào/tế bào và tế bào/chất đệm dẫn đến xu hướng xâm nhập và di căn tăng cao hơn. TGF β kết hợp khối u có thể cho phép các tế bào khối u tránh được sự giám sát miễn dịch vì nó là chất ức chế hiệu quả sự nhân rộng dòng của các tế bào lymphô hoạt hóa. TGF β cũng đã được chứng minh là ức chế sự sản xuất angiostatin. Các phương thức điều trị ung thư như liệu pháp xạ trị và hóa trị liệu kích thích sự sản xuất TGF β hoạt hóa trong khối u, bằng cách đó lựa chọn sự phát triển quá nhanh của các tế bào ác tính mà chúng kháng lại các tác dụng ức chế phát triển TGF β . Do đó, các điều trị chống ung thư này làm gia tăng nguy cơ và đẩy nhanh sự phát triển các khối u với sự tăng trưởng và tính xâm nhập cao. Trong tình huống này, các thuốc nhắm vào sự truyền tín hiệu qua trung gian TGF β có thể là chiến lược điều trị rất hiệu quả. Tính kháng của các tế bào khối u với TGF β đã được chứng minh là làm mất nhiều tác dụng gây độc tế bào của liệu pháp xạ trị và hóa trị liệu và sự hoạt hóa phụ thuộc điều trị của TGF β trong chất đệm thậm chí có thể có hại vì nó khiến cho môi trường vi mô có lợi hơn cho sự tiến triển của khối u và góp phần làm tổn thương mô dẫn đến xơ hóa. Sự phát triển các thuốc ức chế truyền tín hiệu TGF β chắc chắn giúp ích cho việc điều trị ung thư tiến triển riêng biệt và kết hợp với các liệu pháp khác.

Ngoài ra, đã biết trong lĩnh vực rằng, sự truyền tín hiệu TGF β có liên quan đến các tình trạng xơ hóa như xơ gan và bệnh thận mãn tính. Ví dụ, xem trong Ueha S, et al. 2012. *Front Immunol.* 3:71. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis; Bottinger et al. 2002. *J Amer Soc Nephrol.* 13:2600. TGF- β Signaling in Renal Disease; Trachtman H., et al. 2011. *Kidney International* 79:1236. A phase 1, single-dose study of fresolimumab, an anti-TGF- β antibody, in treatment-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis; và xem trong Rosenbloom J, et al. 2010. Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med* 152: 159–166.

Các thử nghiệm sau chứng minh rằng, các hợp chất minh họa ức chế TGF β R1 trong thử nghiệm phân tích sinh hóa, ở mức tế bào và ở động vật mẫu.

Thử nghiệm phân tích sinh hóa về hoạt tính TGF β R1

Mục đích của thử nghiệm *in vitro* này là nhằm để nhận diện các hợp chất mà chúng ức chế TGF β R1.

Sự biểu hiện và tinh chế protein

Đưa trình tự nucleotit mã hóa các axit amin từ 200 đến 503 của TGF β R1 người (NM_004612,2) với axit amin Thr tại vị trí 204 được chuyển thành Asp vào trong vectơ PFASTBAC™1 (Invitrogen, Cat# 10360-014) có đuôi HIS tận cùng N. Tạo ra baculovirus theo phương thức trong hệ biểu hiện BAC-TO-BAC® (Invitrogen, Cat# 10359-016). Gây nhiễm các tế bào Sf9 với mật độ $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL sử dụng 15mL virus P1 trên lít môi trường nuôi cấy và ủ ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 48 giờ. Thu hoạch các tế bào và bảo quản ở nhiệt độ -80°C để tinh chế protein sau đó. Tiến hành tinh chế protein ở nhiệt độ 4°C. Tạo huyền phù các viên kết từ 2L môi trường nuôi cấy trong 100mL dung dịch đệm A (50mM Tris-HCl, pH8, 200mM NaCl, 1mM DTT, 5mM imidazol, 10% glycerol) chứa 0,2% Triton X-100 và dung dịch hỗn hợp chất ức chế proteaza không chứa EDTA đầy đủ của Roche và tiến hành đồng nhất hóa. Làm trong các dịch phân giải tế bào bằng cách ly tâm trong rôto Bechman JA-18 trong thời gian 45 phút ở tốc độ 16500 vòng/phút. Ủ lớp nổi trên bề mặt với 5mL nhựa ái tính kim loại Ni-NTA (Qiagen) trong thời gian 3 giờ. Đặt nhựa lên cột và rửa bằng dung dịch đệm A. Tách rửa protein HIS-TGF β R1(200-503)(T204D) với gradient bằng 0-400mM imidazol trong dung dịch đệm A. Tập hợp và cô đặc các phần chứa HIS-TGF β R1(200-503)(T204D) và nạp lên cột HiLoad 16.600 Superdex 200 (GE Healthcare Bioscience). Tách rửa cột bằng dung dịch đệm bảo quản (50mM Tris-HCl, pH7,5, 150mM NaCl, 1mM DTT). Tập hợp và cô đặc các phần chứa HIS-TGF β R1(200-503)(T204D). Xác định nồng độ protein bằng UV280. Phân chia protein và bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Các điều kiện thử nghiệm TR-FRET

Ủ sơ bộ các hợp chất với His-TGF β R1(200-503)(T204D) tái tổ hợp và các kháng thể dò Eu kháng HIS (Invitrogen, Cat# PV5597) trong các đĩa màu đen hai nửa.

Điều chế loạt dung dịch pha loãng hợp chất từ 1mM hợp chất thử nghiệm gốc trong DMSO. Pha loãng hàng loạt dung dịch gốc 3 lần trong DMSO để thu được đường cong pha loãng 10 điểm với các nồng độ hợp chất cuối cùng nằm trong khoảng từ 2 μ M đến 0,1nM. Nồng độ DMSO cuối cùng trong thử nghiệm là 4%. Khởi đầu phản ứng bằng việc bổ sung chất đánh dấu kinaza (Kinase Tracer 178, Life Technologies PR9080A, InVitrogen). Sau thời gian 45 đến 60 phút, đọc huỳnh quang trên thiết bị đọc đĩa.

Tính toán % ức chế của nhóm được điều trị bằng hợp chất so với nhóm ức chế tối thiểu (DMSO duy nhất, không được điều trị). Tính toán IC₅₀ tuyệt đối sử dụng phương trình logistic phi tuyến tính 4 thông số, trong đó IC₅₀ tuyệt đối = nồng độ gây ra ức chế 50% sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu ActivityBase. Kết quả của các thử nghiệm này chứng minh rằng, các hợp chất minh họa là các chất ức chế hiệu quả của TGF β R1. Ví dụ, toàn bộ các hợp chất minh họa thể hiện các giá trị IC₅₀ thấp hơn 1 μ M. Cụ thể, IC₅₀ của ví dụ 1 là 0,027 μ M.

Thử nghiệm gen thông báo Luciferaza dựa vào tế bào đối với hoạt tính TGF β R1

Mục đích của thử nghiệm này là nhằm để nhận dạng các hợp chất mà chúng can thiệp theo cách chọn lọc vào sự biểu hiện gen phụ thuộc SMAD 2,3 trong các thử nghiệm dựa vào tế bào cho thấy rằng, các hợp chất nêu trên ức chế TGF β R1 ở mức tế bào.

Thiết kế các tế bào HEK293 (ATCC, CRL-1573) để biểu hiện men luciferaza đom đóm từ promoter phản ứng SMAD 2,3 đáp ứng lại sự kích thích TGF β . Dòng tế bào như vậy có thể được tạo ra thông qua việc gây nhiễm bằng các hạt lentivirus (SA Biosciences) và chọn lọc về tính kháng puromycin. Cấy các tế bào HEK293_SMAD 2/3 từ các dung dịch gốc đông lạnh sẵn sàng để thử nghiệm với mật độ 15000 tế bào trên một lỗ vào các đĩa 96 lỗ trong môi trường OPTI-MEM® chứa 10% huyết thanh thai bò. Sau thời gian 72 giờ, thay đổi môi trường bằng môi trường OPTI-MEM® chứa 0,1% albumin huyết thanh bò. Điều chế các hợp chất thử nghiệm trong DMSO để tạo ra 10mM dung dịch gốc. Pha loãng hàng loạt dung dịch gốc 3 lần trong DMSO để thu được đường cong pha loãng 10 điểm với các nồng độ hợp chất cuối cùng nằm trong khoảng từ 20 μ M đến 1nM có nồng độ DMSO cuối cùng trong thử nghiệm là

0,5%. Bổ sung các hợp chất thử nghiệm và sau khi làm cân bằng 1 giờ, bổ sung TGF β (nồng độ cuối = 2nM, R&D Systems).

Sau thời gian 24 giờ, bổ sung dung dịch đệm phân giải [Glo Lysis Buffer (Cat #E2661)] và chất phản ứng luciferaza [Promega Bright Glo Luciferase Reagent (Cat #E2620)] vào mỗi một lỗ để tăng gấp đôi thể tích lỗ. Chuyển các phần phân ước (80 μ L) vào các đĩa đáy đặc màu trắng để đọc sự phát quang trên thiết bị đọc đĩa (Bộ lọc phát: Phát quang 700, đọc 1 giây). Tính toán % ức chế của nhóm được điều trị bằng hợp chất so với nhóm ức chế tối thiểu (DMSO duy nhất, không được điều trị). Tính toán IC₅₀ tương đối của mỗi một hợp chất từ nghiên cứu đáp ứng liều lượng và là nồng độ cần thiết để đạt được sự ức chế 50%. Làm khớp dữ liệu được tạo ra từ các nghiên cứu đáp ứng liều lượng vào phương trình logistic 4 thông số sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu ActivityBase. Kết quả của các thử nghiệm này chứng minh rằng, các hợp chất minh họa là các chất ức chế hiệu quả đối với hoạt tính gen thông báo men luciferaza từ các tế bào HEK293_SMAD2/3 được kích thích bởi TGF β . Ví dụ, toàn bộ các hợp chất minh họa đều thể hiện các giá trị IC₅₀ nhỏ hơn 1 μ M. Cụ thể, IC₅₀ của ví dụ 1 là 0,0824 μ M ($\pm$ 0,005, n=2).

Thử nghiệm IVTI

Mục đích của thử nghiệm này là để đánh giá khả năng của hợp chất thử nghiệm trong việc ức chế sự biểu hiện pSMAD2 trong các khối u ở động vật mẫu đồng gen EMT6-LM2, nói cách khác, thử nghiệm đánh giá khả năng của hợp chất thử nghiệm trong việc ức chế sự truyền tín hiệu TGF β R1 ở mẫu động vật có khối u rắn.

Sự tạo ra tế bào EMT6-LM2

Ghép các tế bào EMT-6 (ATCC, CRL-2755) theo đường dưới da (5×10^5 /động vật) vào sườn của chuột BALB/cAnNHsd có thẩm quyền miễn dịch (Harlan Laboratories). Khi các khối u đạt tới xấp xỉ 3000mm³, tiến hành giết động vật bằng cách làm ngạt bằng CO₂. Tách riêng phổi ra khỏi các động vật mang khối u và để vào trong môi trường nuôi cấy. Tiến hành đồng nhất hóa nhẹ nhàng phổi để tạo ra huyền phù tế bào duy nhất. Cấy tế bào vào trong môi trường nuôi cấy (IMDM, 10% FBS) và phân lập các tế bào khối u để thu được các tế bào EMT6-LM1. Lặp lại quy trình trên bằng cách sử dụng các tế bào EMT6-LM1 để cấy ghép để tạo ra các tế bào EMT-LM2.

Phospho HIS-SMAD2 tinh chế (pSMAD2)

Đưa trình tự nucleotit mã hóa SMAD2 người độ dài đầy đủ (NM_005901.5) vào trong vector PFASTBACHTA™ (Invitrogen, Cat # 10584-027), sinh ra cấu trúc baculovirut để biểu hiện protein HIS-SMAD2. Đưa trình tự nucleotit mã hóa các axit amin từ 148 đến 503 của TGFβR1 người (NM_004612.2) với axit amin Thr tại vị trí 204 được đổi thành Asp vào trong vector PFASTBACHTA™ (Invitrogen, Cat # 10584-027), sinh ra cấu trúc baculovirut để biểu hiện protein HIS-TGFβR1(148-503)(T204D). Tạo ra baculovirut theo phương thức của hệ biểu hiện gen BAC-TO-BAC® (Invitrogen). Gây nhiễm các tế bào Sf9 với mật độ $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL sử dụng 10mL virut P1 chứa HIS-SMAD2 và virut P1 chứa HIS-TGFβR1(148-503)(T204D) trên 1 lít môi trường nuôi cấy và ủ ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 45 giờ. Bổ sung axit okadaic tới nồng độ cuối 0,1μM. Sau thời gian ủ bổ sung 3 giờ, thu hoạch các tế bào và bảo quản ở nhiệt độ -80°C để tinh chế protein sau đó. Tiến hành tinh chế protein ở nhiệt độ 4°C. Tiến hành dung giải các viên kết tế bào đông lạnh từ 6 L môi trường nuôi cấy bằng cách ủ cùng với khuấy trong 300mL dung dịch đệm lạnh A (50mM natri phosphat, pH7,5, 300mM NaCl, 2mM β-mercaptoetanol, 5mM imidazol, 10% glyxerol, 0,1μM axit okadaic) chứa 0,1% TRITON® X-100 và dung dịch hỗn hợp chất ức chế proteaza không chứa EDTA đầy đủ của Roche và tiến hành đồng nhất hóa. Làm trong các dịch phân giải tế bào bằng cách ly tâm trong rôto Bechman JA-18 trong thời gian 45 phút ở tốc độ 16500 vòng/phút. Ủ lớp nổi trên bề mặt với 10mL nhựa ái tính kim loại TALON (Clontech, Cat# 635504) trong thời gian 2 giờ. Rửa mẻ này bằng 100mL dung dịch đệm A chứa 0,1% TRITON® X-100. Đặt nhựa lên cột và rửa bằng dung dịch đệm A. Tách rửa protein HIS-SMAD2 với gradient bằng 0-100mM imidazol trong dung dịch đệm A. Tập hợp các phần chứa phospho HIS-SMAD2 và bổ sung bằng 0,1μM axit okadiac và 5mM EDTA. Tiến hành xác định nồng độ protein bằng thử nghiệm phân tích protein BioRad (BioRad DC Protein Assay kit #500-0116) sử dụng BSA làm tiêu chuẩn. Phân chia protein và bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Pha sống

Tiến hành nuôi cấy các tế bào EMT6-LM2 trong môi trường cơ bản MDM (Iscoves Modified Dulbecco's Media: MDM) có bổ sung 10% FBS, 2mM Glutamax và

0,1mM các axit amin không thiết yếu và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5% CO₂. Tiến hành trypsin hóa và tách riêng các tế bào từ môi trường nuôi cấy. Tái tạo huyền phù các tế bào trong dung dịch muối cân bằng của Hank (HBSS), tiếp theo kết hợp với MATRIGEL® (tỷ lệ 1:1). Ghép các tế bào (5×10^5 /động vật) theo đường dưới da vào sườn sau của chuột (chuột BALB/c cái, Harlan). Tiến hành đo thể tích khối u bằng thước cặp và thể trọng hai lần một tuần. Sau khi thể tích khối u đạt tới xấp xỉ 200-250mm³, phân chia các động vật ngẫu nhiên và nhóm thành các nhóm đối chứng chất mang và các nhóm điều trị bằng hợp chất. Sử dụng hợp chất (được phối chế trong 1% hydroxyethylxenluloza (HEC) và 0,25% TWEEN® 80 và 0,05% chất chống tạo bọt) và đối chứng chất mang (1% HEC và 0,25% TWEEN® 80 và 0,05% chất chống tạo bọt) bằng ống thông đường miệng. Tạo ra đáp ứng liều lượng bằng các hợp chất thử nghiệm tại một điểm thời gian (2 giờ) sau liều đơn: 2,7, 8,3, 25, 75, hoặc 150mg/kg. Biểu diễn quá trình diễn tiến thời gian tại liều lượng TED₅₀ hoặc TED₈₀ tính toán được (phương pháp được mô tả chi tiết dưới đây) từ nghiên cứu đáp ứng liều lượng bằng cách giết chuột tại nhiều thời điểm nằm trong khoảng từ 1 giờ đến 16 giờ sau liều đơn.

Xử lý mô

Thu hoạch các mô khối u và tiến hành đồng nhất hóa như được mô tả dưới đây. Làm đông lạnh các mô khối u (~100mg mỗi khối) trong nitơ lỏng và nghiền bằng chày. Đặt mô đã nghiền vào trong một ống (Ống phân giải chất nền A, MPBio # 6910-100) trên nước đá khô và tiến hành đồng nhất hóa trong dung dịch đệm phân giải (0,6mL mỗi ống) (150mM NaCl; 20mM Tris, pH 7,5; 1mM axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA); 1mM etylen glycol axit tetraaxetic (EGTA); 1% TRITON® X-100; dung dịch hỗn hợp chất ức chế proteaza (Sigma P8340); dung dịch hỗn hợp chất ức chế phosphataza II (Sigma P5726); dung dịch hỗn hợp chất ức chế phosphataza III (Sigma P0044)) trong thời gian 25 giây sử dụng thiết bị đồng nhất hóa Bio101 FASTPREP® FP120 (thiết đặt 4.5). Tạo viên kết phần mảnh vỡ và hạt tế bào bằng cách ly tâm ở tốc độ 14000 x g trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Chuyển dịch phân giải sang ống ly tâm mới và tiếp tục ly tâm ở tốc độ 14000 x g trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Chuyển dịch phân giải đã ly tâm vào đĩa lỗ sâu 96 lỗ và giữ ở trên nước đá. Tiến hành xác định nồng độ protein đối với mỗi một dịch phân giải sử dụng thử nghiệm protein BioRad (kit thử nghiệm protein BioRad DC #500-0116)

như sau. Điều chế chất thử bằng cách bổ sung chất phản ứng của bộ kit S (20 μ L) vào mỗi 1mL chất phản ứng của bộ kit A cần thiết cho thử nghiệm. Điều chế 3 đến 5 dung dịch pha loãng của protein chuẩn từ 0,2mg/mL đến 1,5mg/mL protein và tạo ra đường cong chuẩn. Hút 5 μ L dung dịch chuẩn và mẫu vào trong một đĩa vi chuẩn độ khô, sạch. Bổ sung 25 μ L chất thử vào mỗi một lỗ. Bổ sung 200 μ L chất thử B vào mỗi một lỗ và lắc trong thời gian 5 giây. Sau thời gian 15 phút, tiến hành đọc hệ số hấp thụ của mỗi một lỗ tại nồng độ 750nm. Các mức protein của mỗi một lỗ được xác định bằng cách so sánh hệ số hấp thụ của các lỗ mẫu với đường cong chuẩn thu được từ các lỗ chuẩn. Chuẩn hóa các dung dịch phân giải khối u tới 10mg/mL bằng dung dịch đệm phân giải để chuẩn bị cho phân tích pSMAD2 và SMAD2/3 tổng bằng phương pháp ELISA như phương pháp được mô tả dưới đây.

Phương pháp SMAD ELISA

Các dịch phân giải khối u được tiến hành thử nghiệm phân tích sử dụng các đĩa ELISA độc lập, trong đó một đĩa được sử dụng để xác định tổng các mức SMAD 2/3 và đĩa còn lại được sử dụng để xác định các mức phospho SMAD 2. Trong khi kháng thể phủ là giống nhau cho cả hai đĩa, kháng thể thứ hai đặc hiệu đối với tổng SMAD 2/3 hoặc phospho SMAD 2. Các đĩa này được gọi chung là “các đĩa ELISA” và lần lượt riêng biệt là “đĩa ELISA tổng” hoặc “đĩa phospho ELISA”. Điều chế kháng thể phủ ở nồng độ 2,5 μ g/mL trong dung dịch đệm BupH Cacbonate-Bicarbonate (kháng thể đơn dòng kháng SMAD 2/3, BD Biosciences #610843; BupH Cacbonate-Bicarbonate từ Pierce #28382) và bổ sung với lượng 100 μ L trên mỗi lỗ vào các đĩa miễn dịch 96 lỗ (Thermo Scientific #439454) và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C trên sàng lắc phẳng để tạo ra các đĩa ELISA. Tiếp theo, rửa các đĩa ELISA 4 lần bằng dung dịch đệm rửa (0,5% TWEEN® 20 trong nước muối đệm tris (TBS), pH 8,0 từ Sigma #T-9039) và sau đó, phong bế bằng 200 μ L dung dịch đệm phong bế cho mỗi lỗ (1% albumin huyết thanh bò (BSA) trong 1x TBS) ở nhiệt độ trong phòng trên sàng lắc phẳng trong thời gian 2 giờ. Rửa 4 lần bằng dung dịch đệm rửa. Bổ sung mỗi lỗ 100 μ L dịch phân giải khối u vào đĩa phospho SMAD ELISA hoặc dịch phân giải chất mang với lượng 10mg/ml vào các lỗ thích hợp. Bổ sung mỗi lỗ 98 μ L dung dịch đệm phân giải vào đĩa ELISA tổng và 2 μ L mỗi lỗ của 10mg/ml dịch phân giải khối u hoặc dịch phân giải chất mang vào các lỗ thích hợp (dịch phân giải protein cuối cùng 0,02mg).

Dung dịch thuộc đường cong chuẩn cũng được bổ sung vào mỗi một đĩa ELISA (phospho và tổng cả hai) sử dụng pSMAD2 tinh khiết. Ủ qua đêm. Lại rửa các đĩa ELISA 4 lần bằng dung dịch đệm rửa. Điều chế các kháng thể thứ hai (kháng thể đơn dòng thổ kháng phospho SMAD2 Millipore #04-953; kháng thể đa dòng thổ kháng SMAD2/3 Millipore #07-408) ở tỷ lệ pha loãng 1:500 trong dung dịch đệm phân giải có bổ sung 1% BSA và bổ sung 100 μ L trên mỗi lỗ vào đĩa thích hợp. Ủ các đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian từ 2 đến 3 giờ. Rửa 4 lần bằng dung dịch đệm rửa và bổ sung 100 μ L trên mỗi lỗ bằng kháng thể thông báo (kháng HRP thổ, GE Healthcare #NAV934V, pha loãng theo tỷ lệ 1:10000 trong dung dịch đệm phong bế) vào các đĩa. Ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và rửa các đĩa 4 lần cuối bằng dung dịch đệm rửa và bổ sung 100 μ L trên mỗi lỗ ở nhiệt độ trong phòng bằng 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin (TMB; Surmodics/BioFX #TMBW-0100-01). Ủ các đĩa ở nhiệt độ 37°C trong thời gian tới 30 phút. Làm dừng phản ứng bằng cách bổ sung 100 μ L dung dịch làm dừng (1N H₂SO₄). Đọc hệ số hấp thụ (OD) tại 450nm trên thiết bị đọc đĩa.

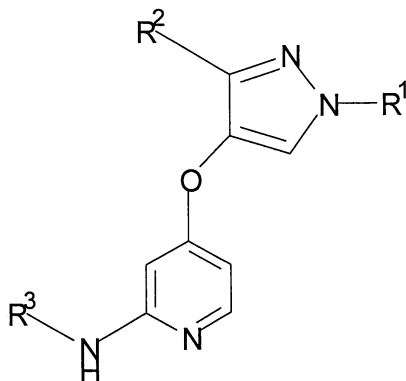
Sử dụng tỷ lệ giữa SMAD tổng (tSMAD) trên phospho SMAD (pSMAD) đối với nhóm đối chứng để xác định tỷ lệ ức chế tối thiểu (0%) của tín hiệu pSMAD. Tính toán tỷ lệ % ức chế của nhóm được điều trị bằng hợp chất so với tỷ lệ ức chế pSMAD tối thiểu của nhóm chất mang. Tính toán TED₅₀ và TED₈₀ từ nghiên cứu đáp ứng liều lượng (liều lượng cần thiết để đạt được tỷ lệ ức chế lần lượt 50% và 80% tại thời điểm này) bằng cách sử dụng phương thức NLIN trong SAS (Version 9.3, Cary, NC). Thử nghiệm này chứng minh rằng, ví dụ 1 có giá trị TED₅₀ là 10,8mg/kg 2 giờ sau 1 liều và TED₈₀ là 24,1mg/kg. Trong nghiên cứu theo diễn tiến thời gian tại liều lượng TED₅₀ (11 pmk), ví dụ 1 thể hiện tỷ lệ ức chế 48% tại 1 giờ và tỷ lệ ức chế 39% tại 2 giờ sau khi phân liều. Trong nghiên cứu theo diễn tiến thời gian tại (25 mpk), ví dụ 1 thể hiện tỷ lệ ức chế 71% tại 1 giờ và tỷ lệ ức chế 70% tại 2 giờ sau khi phân liều.

Các hợp chất theo sáng chế thông thường có hiệu quả trong một khoảng liều lượng rộng. Ví dụ, liều lượng mỗi ngày thông thường nằm trong khoảng hàng ngày từ 1 đến 2000mg. Tốt hơn, liều lượng như vậy nằm trong khoảng hàng ngày từ 10 đến 1000mg. Tốt hơn nữa, liều lượng như vậy nằm trong khoảng hàng ngày từ 10 đến 100mg. Thậm chí tốt hơn nữa, liều lượng như vậy nằm trong khoảng hàng ngày từ 10 đến 80mg. Tốt nhất, liều lượng như vậy nằm trong khoảng hàng ngày từ 10 đến 50mg.

Trong một số tình huống, mức liều lượng thấp hơn giới hạn dưới của khoảng nêu trên có thể thích hợp hơn, trong khi trong các trường hợp khác, liều lượng cao hơn có thể được sử dụng và do đó, các khoảng liều lượng nêu trên không nhằm để giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế theo bất kỳ cách nào. Sẽ hiểu rằng, lượng hợp chất thực tiễn sử dụng sẽ được xác định bởi thầy thuốc lâm sàng, căn cứ theo các tình huống thích hợp, bao gồm tình trạng cần điều trị, đường dùng lựa chọn, hợp chất hoặc các hợp chất thực tiễn sử dụng, tuổi, cân nặng và đáp ứng của từng bệnh nhân và mức độ nặng của các triệu chứng của bệnh nhân.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



trong đó:

R¹ là hydro, isopropyl, diflometyl, difloetyl, hoặc xyclopropyl;

R² là etyl, tert-butyl, pyridin-2-yl, tetrahydropyran-4-yl, tetrahydrofuran-3-yl, xyclopropyl, hoặc xyclobutyl; và

R³ là cacbamoylphenyl, pyridin-2-yl, (1-hydroxy-1-metyletyl)pyridinyl, 1-metyl-2-oxo-1H-pyridin-4-yl, 1-metylpyrazolyl, pyrazin-2-yl, 2-metoxypyrimidin-4-yl, 1-metyl-2-oxo-1H-pyrimidin-4-yl, pyridazin-3-yl, 6-clopyridazin-3-yl, 6-metylpyridazin-3-yl, hoặc 6-metoxypyridazin-3-yl;

hoặc muối được dụng của hợp chất này.

2. Hợp chất theo điểm 1, là hợp chất 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol hoặc muối được dụng của hợp chất này.

3. Hợp chất hoặc muối theo điểm 1 hoặc 2, là hợp chất 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol 4-metylbenzensulfonat.

4. Hợp chất hoặc muối theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, là hợp chất 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol 4-metylbenzensulfonat kết tinh.

5. Hợp chất hoặc muối theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, là hợp chất 2-{4-[(4-{[1-xyclopropyl-3-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]oxy}pyridin-2-yl)amino]pyridin-2-yl}propan-2-ol 4-metylbenzensulfonat kết tinh được đặc trưng bởi mô hình nhiễu xạ bột tia X (bức xạ Cu, λ -1,54060 Å) bao gồm ít nhất một đỉnh tại góc $17,8^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm $19,7^\circ$, $18,4^\circ$, và $22,0^\circ$ ($2\theta \pm 0,2^\circ$).

6. Dược phẩm chứa hợp chất hoặc muối theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và một hoặc nhiều tá dược, chất mang, hoặc chất pha loãng dược dụng.