



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

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

(11)



1-0025550

(51)⁷ C07D 413/14; A61K 31/422; A61P 11/00; A61P 19/08; A61P 9/12; C07D 413/12; A61K 31/4155; A61P 19/02 (13) B

(21) 1-2016-04751

(22) 14/05/2015

(86) PCT/US2015/030817 14/05/2015

(87) WO2015/175796 19/11/2015

(30) 14168303.7 14/05/2014 EP

(45) 25/09/2020 390

(43) 27/02/2017 347A

(73) NOVARTIS AG (CH)

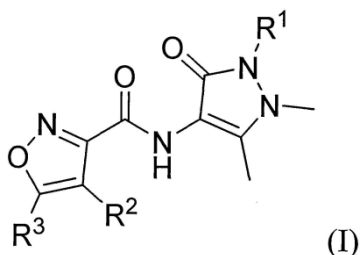
Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland

(72) D'SOUZA, Anne-Marie (GB); AHMED, Mahbub (GB); PULZ, Robert Alexander (DE); ROONEY, Lisa Ann (AU); SMITH, Nichola (GB); TROXLER, Thomas Josef (CH); BALA, Kamlesh Jagdis (GB); BREARLEY, Andrew (GB); DALE, James (GB); PORTER, David (GB); SANDHAM, David Andrew (GB); SHAW, Duncan (GB); TAYLOR, Jessica Louise (GB); TAYLOR, Roger John (GB); WRIGGLESWORTH, Joe (GB).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) CHẤT ỨC CHẾ YẾU TỐ ĐIỀU HÒA UBIQUITIN HÓA SMAD 1 (SMURF-1),
DUỢC PHẨM VÀ CHẾ PHẨM KẾT HỢP CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):



hoặc muối dược dụng của nó; trong đó các biến có ý nghĩa như được nêu trong bản mô tả; và phương pháp điều chế hợp chất này. Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa hợp chất nêu trên và chế phẩm kết hợp chứa hợp chất này kết hợp với chất có hoạt tính điều trị.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế mô tả các hợp chất hữu cơ hữu dụng trong liệu pháp trị bệnh. Các hợp chất có các đặc tính như các chất ức chế Smurf-1 chọn lọc và do đó có thể hữu dụng trong điều trị một loạt các rối loạn, chẳng hạn như, ví dụ, chứng tăng huyết áp động mạch phổi, bệnh tăng nhãn áp, chứng giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), nước tiểu có protein, làm lành vết thương, cũng như COPD và hen suyễn. Ngoài ra, sáng chế đề xuất được phẩm và chế phẩm kết hợp chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Smurf-1 (Smad ubiquitination regulatory factor 1) (yếu tố điều hòa ubiquitin hóa Smad 1) là thành viên thuộc họ HECT của ubiquitin ligaza E3 làm cho cơ chất đặc hiệu cho sự phân hủy phân giải protein thông qua con đường phân giải protein phụ thuộc ubiquitin. Các cơ chất chính của Smurf-1 bao gồm RhoA, thụ thể protein tạo hình thái xương (Bone Morphogenetic Protein - BMP) (BMPR) 1 và BMPR 2, smad1 và smad5, yếu tố gắn liền với thụ thể TNF α (TNF α Receptor Associated Factor - TRAF) 6 và myD88 (Andrews, P.S. *et al.* Assay Drug Dev. Technol. 2010). Trong danh sách cơ chất nêu trên, Smurf-1 có vai trò điều hòa truyền tín hiệu BMP (Chen, D *et al.* Growth Factors, 2004), phân cực tế bào thần kinh (Stiess, M. và Bradke, F. Neuron, 2011), di trú tế bào (Huang, C. Cell Adh. Migr. 2010), xâm lấn tế bào khối u (Sahai, E. *et al.* JCB, 2007), tự tiêu ty thể (Orvedahl, A. Nature, 2011) tăng sinh tế bào gốc trung mô (Zhao, L. *et al.* J. Bone Miner. Res. 2010) và chuyển hóa biểu mô-trung mô (Epithelial-Mesenchymal Transition - EMT) (Ozdamar, B *et al.* Science 2005).

Tăng huyết áp động mạch phổi (Pulmonary Arterial Hypertension - PAH) là bệnh phức tạp và nguy hiểm đe dọa tính mạng do nhiều nguyên nhân gây bệnh, đặc trưng bởi bệnh mạch phổi tiến triển dẫn đến phì đại/suy tâm thất phải và dẫn đến tử vong sớm trong hầu hết các trường hợp. Các liệu pháp được lý hiện nay là làm giảm tạm thời. Trong khi quan sát thấy các cải thiện về tuổi thọ, các liệu pháp hiện nay, tập trung thay đổi các yếu

tổ gây co mạch của bệnh này, không ngăn chặn hoặc đảo ngược tiến trình bệnh, và việc cấy ghép (hai lá phổi hoặc tim-phổi) vẫn là cách điều trị chữa khỏi bệnh duy nhất. Căn cứ vào hiệu quả giới hạn của các nhóm điều trị hiện nay, cần có các liệu pháp mới nhắm đích việc tái cấu trúc mạch phổi tiến triển là căn nguyên của bệnh PAH.

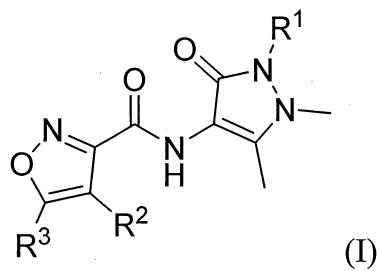
Các đột biến dòng mầm ở gen thụ thể protein tạo hình xương II (BMPR-II) của siêu họ thụ thể yếu tố sinh trưởng chuyển hóa dạng β (TGF- β) phổ biến ở 70% dạng di truyền và một số dạng ngẫu nhiên của PAH tự phát (IPAH). Protein tạo hình xương là phân tử truyền tín hiệu thuộc siêu họ TGF- β . Protein tạo hình xương ban đầu được xác định bởi khả năng kích thích hình thành sụn và xương của chúng, và sau đó, được xác định là protein đa chức năng điều hòa một loạt các chức năng chẳng hạn như tăng sinh, biệt hóa, và gây chết tế bào ở một loạt các loại tế bào, bao gồm tế bào tạo xương, tế bào biểu mô, tế bào thần kinh, tế bào miễn dịch, và tế bào cơ trơn. Cho tới nay >20 BMP của động vật có vú đã được xác định, nhưng chỉ ba loại thụ thể I và ba loại thụ thể II (tương ứng là BMPR-I và BMPR-II) có khả năng gắn kết với BMP được tạo dòng ở động vật có vú. Protein tạo hình xương được tổng hợp và tiết từ nhiều loại tế bào, bao gồm các tế bào cơ trơn mạch phổi và các tế bào nội mô. Ngoài các đột biến ở BMPR-I và BMPR-II, phổi của các bệnh nhân mắc PAH không di truyền thể hiện nồng độ BMPR-1 và BMPR -II mạch giảm đáng kể ngụ ý về vai trò trung tâm trong việc truyền tín hiệu BMP bị gián đoạn trong nhiều dạng của PAH (Du, L *et al.* N.Eng.J.Med, 2003). Do đó, sự phục hồi truyền tín hiệu BMP trong hệ mạch phổi ở bệnh nhân mắc PAH được quan tâm đáng kể trong việc phát triển các liệu pháp trị bệnh chống tái cấu trúc mới để điều trị PAH.

Smurf-1 đã được chứng minh là làm trung gian phân hủy BMPR-I, BMPR-II và smad1 và smad5 ở nhiều các loại tế bào bao gồm tế bào tạo xương (Zhao, M *et al.* JBC, 2003), nguyên bào cơ (Ying, SX *et al.* JBC, 2003), biểu mô phổi (Shi W, *et al.* Am.J.Physiol.Cell.Mol.Physiol, 2004), mô thần kinh (Kallan, T *et al.* Mol. Cell. Biol, 2009) và tế bào màng trong tim (Towsend, TA, *et al.* Cells Tissues Organs, 2011). Mới đây, bằng chứng đầu tiên đã được phát hiện ủng hộ vai trò của Smurf-1 trong PAH, trong đó đã quan sát thấy mức độ Smurf-1 được tăng cường trong các mẫu PAH *in-vivo* cận lâm sàng giảm oxy huyết và monocrotalin mạn tính và liên quan đến điều hòa giảm BMPR1 và BMPR2 (Murakami, K, *et al.* Exp. Biol. Med, 2010 và Yang, J. *et al.* Circ. Res, 2010).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vẫn có nhu cầu về các chất điều trị và các liệu pháp trị bệnh mới đối với chứng tăng huyết áp động mạch phổi. Sáng chế đề xuất hợp chất, muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó, dược phẩm của nó và chế phẩm kết hợp của nó, các hợp chất này là chất ức chế Smurf-1. Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị, ngăn ngừa, hoặc cải thiện bệnh tăng huyết áp động mạch phổi, bao gồm cho đối tượng cần thiết dùng lượng có hiệu quả chất ức chế Smurf-1.

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, phương án 1, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):



hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó, trong đó:

R^1 là (C_3-C_6) alkyl hoặc (C_3-C_6) xycloalkyl;

R^2 là methyl;

R^3 được chọn từ (C_6-C_{10}) alkyl phân nhánh, (C_6-C_{10}) alkenyl phân nhánh, (C_5-C_8) xycloalkenyl, (C_5-C_8) xycloalkyl, hoặc Het; trong đó (C_5-C_8) xycloalkenyl hoặc (C_5-C_8) xycloalkyl không được thế hoặc được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R^4 ; và trong đó Het được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R^4 ;

mỗi R^4 độc lập được chọn từ halo, (C_1-C_4) alkyl, halo (C_1-C_4) alkyl, (C_1-C_4) alkoxy, hoặc halo (C_1-C_4) alkoxy; hoặc

hai nhóm R^4 , khi được gắn với cùng nguyên tử cacbon, có thể cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành xyclopentyl, tetrahydrofuran hoặc vòng dioxolan; và

Het là vòng dị vòng no một phần hoặc no hoàn toàn 5 hoặc 6 cạnh bao gồm a) 1 nguyên tử oxy ở vị trí 2- hoặc 3-, hoặc b) 2 nguyên tử oxy ở vị trí 2- và 5-, hoặc 2- và 6-, trong đó số là tương ứng với điểm gắn kết; và

(C₅-C₈)xycloalkyl có thể là vòng một vòng hoặc hệ vòng có cầu chứa 5, 6, 7 hoặc 8 nguyên tử cacbon.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) như được xác định ở trên hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất theo định nghĩa của công thức (I), hoặc muối dược dụng hoặc đồng tinh thể của nó, hoặc công thức phụ của nó và một hoặc nhiều chất mang dược dụng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất theo định nghĩa của công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó, hoặc công thức phụ của nó và một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn hoặc bệnh được chọn từ chứng tăng huyết áp phổi, bao gồm chứng tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, làm lạnh xương gãy, bệnh tăng nhãn áp, giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lạnh vết thương, cũng như COPD và hen suyễn, bao gồm cho đối tượng dùng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất theo định nghĩa của công thức (I), hoặc muối dược dụng hoặc đồng tinh thể của nó, hoặc công thức phụ của nó hoặc muối dược dụng hoặc đồng tinh thể của nó. Theo một số phương án, cho đối tượng dùng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất theo định nghĩa của công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác, cho đối tượng dùng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất theo loài phụ của công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó. Theo các phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn hoặc bệnh được chọn từ bệnh tăng nhãn áp, giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lạnh vết thương, COPD và hen suyễn.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kết hợp, cụ thể là chế phẩm kết hợp dược, chứa lượng có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất theo định nghĩa của công thức (I), hoặc muối dược dụng hoặc đồng tinh thể của nó, hoặc công thức phụ của nó và một hoặc nhiều chất có hoạt tính điều trị.

Các phương án khác theo sáng chế được mô tả ở đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo đó, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó, như được mô tả trên đây là phương án 1.

Phương án 2. Hợp chất theo phương án 1 hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó, trong đó R^1 là iso-propyl, xyclobutyl hoặc xyclohexyl.

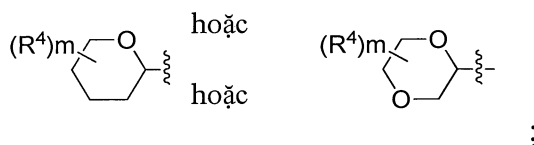
Phương án 3. Hợp chất theo phương án 1 hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó, trong đó R^1 là xyclohexyl.

Phương án 4. Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án đã nêu hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó, trong đó R^3 được chọn từ 2,2-đimethylpentyl, 2,2-đimethylpent-2-enyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xyclohexenyl, tetrahydropyranyl, dihydropyranyl, dioxanyl, tetrahydrofuryl, dioxolanyl và bixyclo[2.2.2]octanyl; trong đó vòng xyclopentyl, xyclohexyl, xyclohexenyl, tetrahydropyranyl, dihydropyranyl, dioxanyl, tetrahydrofuryl, dioxolanyl hoặc bixyclo[2.2.2]octanyl không được thế hoặc được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R^4 ; và

mỗi R^4 độc lập được chọn từ halo, (C_1-C_4) alkyl, halo (C_1-C_4) alkyl, (C_1-C_4) alkoxy, hoặc halo (C_1-C_4) alkoxy; hoặc

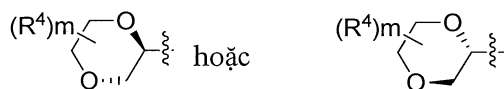
hai nhóm R^4 , khi được gắn với cùng nguyên tử cacbon, có thể cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng tetrahydrofuran hoặc dioxolan.

Phương án 5. Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án đã nêu, hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó, trong đó R^3 là



và m là 1, 2, 3 hoặc 4.

Phương án 6. Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án đã nêu, hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó, trong đó R^3 là



và m là 1, 2, 3 hoặc 4.

Phương án 7. Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án đã nêu, hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó, trong đó mỗi R^4 độc lập được chọn từ methyl, isopropyl, tert-butyl và metoxy.

Phương án 8. Hợp chất có công thức (I), theo phương án 1, trong đó hợp chất được chọn từ

Ví dụ 1

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

Ví dụ 1.1

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(6-etyl-4-metyl-xyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 1.2

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(6,6-đimetyl-xyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ;

Ví dụ 1.3

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-etyl-xyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

Ví dụ 1.4

[5-(4-(tert-butyl)xyclohex-1-en-1-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

Ví dụ 1.5

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(4-metyl-xyclohex-1-en-1-yl)isoxazol-3-cacboxamit];

Ví dụ 1.6

5-(xyclohept-1-en-1-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 1.7

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(4-(triflometyl)xyclohex-1-en-1-yl)isoxazol-3-cacboxamit];

Ví dụ 2

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 2.1

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit];

Ví dụ 2.2

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 3

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclopent-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 4

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit];

Ví dụ 5

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-isopropoxyxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

Ví dụ 6

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohexyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 6.1

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylxcyclopentyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

Ví dụ 7

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbutyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 8

(Z)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbut-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 9

(E)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbut-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 10

5-xyclohexyl-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 11

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 12

5-(6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 13

5-(6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ;

Ví dụ 14

5-(6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 15

5-(6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 16

5-(6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ;

Ví dụ 17

5-(6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-isopropyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ;

Ví dụ 18

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(6-isopropyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 19

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(6-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 20

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimetyl-1,4-đioxan-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 21.1

[5-(4-bromo-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

Ví dụ 21.2

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(5-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 22

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit ;

Ví dụ 23

5-(4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 24

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-isopropyltetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ;

Ví dụ 25

5-(4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 26

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(5,5-đimetyl-1,3-đioxan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó.

Phương án 9. Hợp chất có công thức (I), theo phương án 1, trong đó hợp chất này được chọn từ

Ví dụ 20

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimetyl-1,4-đioxan-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 26

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(5,5-đimetyl-1,3-đioxan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 2.2

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

Ví dụ 2.1

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit]; và

Ví dụ 11

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó .

Phương án 10. Hợp chất có công thức (I), theo phương án 1, trong đó hợp chất này là

Ví dụ 20

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimetyl-1,4-đioxan-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit, hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó.

Phương án 11. Hợp chất có công thức (I), theo phương án 1, trong đó hợp chất này là

Ví dụ 26

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(5,5-đimetyl-1,3-đioxan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit, hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó.

Phương án 12. Hợp chất có công thức (I), theo phương án 1, trong đó hợp chất này là

Ví dụ 2.2

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó.

Phương án 13. Hợp chất có công thức (I), theo phương án 1, trong đó hợp chất này là

Ví dụ 2.1

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit] hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó.

Phương án 14. Hợp chất có công thức (I), theo phương án 1, trong đó hợp chất này là

Ví dụ 11

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “halo” (hoặc halogen) dùng để chỉ flo, brom, clo hoặc iot, cụ thể là flo, clo. Các nhóm và các gốc được thế halogen, chẳng hạn như alkyl được thế bằng halogen (haloalkyl) có thể được halogen hóa một lần, nhiều lần hoặc hết mức.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nguyên tử khác loại” dùng để chỉ nguyên tử nitơ (N), oxy (O) hoặc lưu huỳnh (S), cụ thể là nitơ hoặc oxy.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “alkyl” dùng để chỉ gốc hydrocacbon mạch thẳng hoặc phân nhánh no hoàn toàn có đến 10 nguyên tử cacbon. Nếu không có quy định khác, alkyl dùng để chỉ các gốc hydrocacbon có 1 đến 10 nguyên tử cacbon, 1 đến 6 nguyên tử cacbon, hoặc 1 đến 4 nguyên tử cacbon. Các ví dụ tiêu biểu của alkyl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, metyl, etyl, *n*-propyl, *iso*-propyl, *n*-butyl, *sec*-butyl, *iso*-butyl,

tert-butyl, *n*-pentyl, isopentyl, neopentyl, *n*-hexyl, 3-methylhexyl, 2,2- đimethylpentyl, 2,3- đimethylpentyl, *n*-heptyl, *n*-octyl, *n*-nonyl, *n*-dexyl và tương tự. Các ví dụ tiêu biểu về alkyl phân nhánh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, *iso*-propyl, *sec*-butyl, *iso*-butyl, *tert*-butyl, isopentyl, 3-methylhexyl, 2,2- đimethylpentyl, 2,3-đimethylpentyl, và tương tự. Alkyl được thể là nhóm alkyl chứa một hoặc nhiều, chẳng hạn như một, hai hoặc ba phần tử thể được chọn từ nhóm halogen, hydroxy hoặc alkoxy.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “haloalkyl” dùng để chỉ alkyl như được xác định ở đây, được thể bằng một hoặc nhiều nhóm halo như được xác định ở đây. Haloalkyl có thể là monohaloalkyl, dihaloalkyl hoặc polyhaloalkyl bao gồm perhaloalkyl. Monohaloalkyl có thể có iot, brom, clo hoặc flo trong nhóm alkyl. Các nhóm dihaloalkyl và polyhaloalkyl có thể có hai hoặc nhiều nguyên tử halo giống nhau hoặc tổ hợp các nhóm halo khác nhau trong alkyl. Thông thường polyhaloalkyl chứa tới 12, hoặc 10, hoặc 8, hoặc 6, hoặc 4, hoặc 3, hoặc 2 nhóm halo. Các ví dụ không giới hạn về haloalkyl bao gồm flometyl, diflometyl, triflometyl, clometyl, diclometyl, triclometyl, pentaflometyl, heptaflometyl, diflocloetyl, dicloflometyl, difloetyl, diflopropyl, dicloetyl và diclopropyl. Perhalo-alkyl dùng để chỉ alkyl có tất cả các nguyên tử hydro được thể bằng nguyên tử halo.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “alkoxy” dùng để chỉ alkyl-O-, trong đó alkyl được xác định ở trên đây. Các ví dụ tiêu biểu về alkoxy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, metoxy, etoxy, propoxy, 2-propoxy, butoxy, *tert*-butoxy, pentyloxy, hexyloxy, xyclopropyloxy-, xyclohexyloxy- và tương tự. Thông thường, các nhóm alkoxy có 1-4 nguyên tử cacbon.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “haloalkoxy” dùng để chỉ alkoxy như được xác định ở đây, được thể bằng một hoặc nhiều nhóm halo như được xác định ở đây.

Nếu không có quy định khác, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "xycloalkyl" dùng để chỉ các nhóm hydrocacbon một vòng, hai vòng, hoặc vòng xoắn no có 3-8 nguyên tử cacbon. Nếu không có quy định khác, xycloalkyl dùng để chỉ các nhóm hydrocacbon có vòng có từ 3 đến 6 hoặc từ 5 đến 8 nguyên tử cacbon vòng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "xycloalkenyl" dùng để chỉ các nhóm hydrocacbon một vòng, hai vòng, hoặc vòng xoắn no một phần có 3-8 nguyên tử cacbon.

Nếu không có quy định khác, xycloalkenyl dùng để chỉ các nhóm hydrocacbon có vòng có từ 3 đến 6 hoặc từ 5 đến 8 nguyên tử cacbon vòng.

Tùy thuộc vào việc lựa chọn nguyên liệu khởi đầu hoặc quy trình, các hợp chất có thể có mặt ở dạng của một trong số các đồng phân có thể hoặc dạng hỗn hợp của chúng, ví dụ, dạng đồng phân quang học tinh khiết, hoặc dạng hỗn hợp đồng phân, chẳng hạn như raxemat và hỗn hợp đồng phân không đối quang, tùy thuộc vào số nguyên tử cacbon không đối xứng. Sáng chế có mục đích bao gồm tất cả các đồng phân có thể có này, bao gồm hỗn hợp raxemic, hỗn hợp đồng phân không đối quang và các dạng tinh khiết quang học. Các đồng phân (*R*)- và (*S*)- có hoạt tính về mặt quang học có thể được điều chế bằng cách sử dụng synthon không đối xứng hoặc các chất phản ứng không đối xứng, hoặc được phân tách bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Nếu hợp chất chứa liên kết đôi, phân tử thể có thể ở cấu hình E hoặc Z. Nếu hợp chất chứa xycloalkyl được thế đôi, phân tử thể xycloalkyl có thể có cấu hình cis- hoặc trans-. Sáng chế cũng có mục đích bao gồm tất cả các dạng hỗn hợp.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “muối” hoặc “các muối” dùng để chỉ muối cộng axit hoặc muối cộng bazơ của hợp chất theo sáng chế. “Muối” bao gồm, cụ thể là “muối dược dụng”. Thuật ngữ “muối dược dụng” dùng để chỉ muối mà giữ được các đặc tính và hiệu quả sinh học của hợp chất theo sáng chế và, thông thường là muối này không phải là không mong muốn về mặt sinh học hoặc mặt khác.

Hợp chất theo sáng chế, tức là hợp chất có công thức (I) chứa các nhóm có khả năng hoạt động như các chất cho và/hoặc chất nhận liên kết hydro có khả năng tạo đồng tinh thể với các chất tạo đồng tinh thể phù hợp. Các đồng tinh thể này có thể được điều chế từ hợp chất có công thức (I) bằng các quy trình tạo đồng tinh thể đã biết. Các quy trình này bao gồm nghiền, gia nhiệt, đồng thăng hoa, đồng sôi, hoặc cho hợp chất có công thức (I) trong dung dịch tiếp xúc với chất tạo đồng tinh thể trong điều kiện kết tinh và phân tách các đồng tinh thể đã được tạo thành bằng cách đó. Các chất tạo đồng tinh thể thích hợp bao gồm các chất được mô tả trong WO 2004/078163. Do đó, sáng chế còn đề xuất các đồng tinh thể chứa hợp chất có công thức (I).

Trong nhiều trường hợp, hợp chất theo sáng chế có khả năng tạo thành muối axit và/hoặc muối bazơ và/hoặc các đồng tinh thể nhờ vào sự có mặt của nhóm cacboxamit hoặc các nhóm tương tự.

Muối cộng axit được dụng hoặc các đồng tinh thể có thể được tạo thành từ các axit hữu vô cơ và axit hữu cơ.

Các axit vô cơ mà từ đó đồng tinh thể hoặc muối có thể được dẫn xuất bao gồm, ví dụ, axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, và tương tự.

Axit hữu cơ mà từ đó đồng tinh thể hoặc muối được dẫn xuất bao gồm, ví dụ, axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit oxalic, axit maleic, axit malonic, axit succinic, axit fumaric, axit tartaric, axit citric, axit benzoic, axit mandelic, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit toluensulfonic, và tương tự.

Muối cộng bazơ được dụng hoặc đồng tinh thể có thể được tạo thành từ các bazơ vô cơ và bazơ hữu cơ.

Bazơ vô cơ mà từ đó đồng tinh thể hoặc muối có thể được dẫn xuất bao gồm, ví dụ, muối amoni và các kim loại từ cột I đến XII trong bảng tuần hoàn. Theo phương án nhất định, các muối được dẫn xuất từ natri, kali, amoni, canxi, magie, bạc, và kẽm; cụ thể là, các muối phù hợp bao gồm muối amoni, muối kali, muối natri, muối canxi và muối magie.

Bazơ hữu cơ mà từ đó đồng tinh thể hoặc muối được dẫn xuất bao gồm, ví dụ, amin bậc một, bậc hai và bậc ba, amin được thể bao gồm các amin được thể có trong tự nhiên, amin vòng, nhựa trao đổi ion bazơ, và tương tự. Các amin hữu cơ nhất định bao gồm cholinat, lysin, meglumin, piperazin và trometamin.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I ở dạng đồng tinh thể hoặc muối axetat, ascorbat, adipat, aspartat, benzoat, besylat, bromua/hydrobromua, bicacbonat/cacbonat, bisulfat/sulfat, caprat, clorua/hydroclorua, xitrat, etandisulfonat, fumarat, gluxepat, gluconat, glucuronat, glutamat, glutarat, glycolat, hipurat, hydroiodua/iodua, isethionat, lactat, lactobionat, malat, maleat, malonat, mandelat, mesylat, metylsulphat, muxat, naphtoat, napsylat, nicotinat, nitrat, octadecanoat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, phosphat/hydro phosphat/dihydro phosphat, polygalacturonat, propionat, sebacat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, tosylat trifenat, hoặc xinafoat.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimetyl-1,4-dioxan-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit ở dạng đồng tinh thể hoặc muối axetat, ascorbat, adipat, aspartat, benzoat, besylat, bromua/hydrobromua, bicacbonat/cacbonat, bisulfat/sulfat, caprat, clorua/hydroclorua, xitrat, etandisulfonat, fumarat, gluxepat, gluconat, glucuronat, glutamat, glutarat, glycolat, hipurat, hydroiodua/iodua, isethionat, lactat, lactobionat, malat, maleat, malonat, mandelat, mesylat, metylsulphat, muxat, naphtoat, napsylat, nicotinat, nitrat, octadecanoat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, phosphat/hydro phosphat/dihydro phosphat, polygalacturonat, propionat, sebacat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, tosylat trifenatat, hoặc xinafoat.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(5,5-đimetyl-1,3-dioxan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ở dạng đồng tinh thể hoặc muối axetat, ascorbat, adipat, aspartat, benzoat, besylat, bromua/hydrobromua, bicacbonat/cacbonat, bisulfat/sulfat, caprat, clorua/hydroclorua, xitrat, etandisulfonat, fumarat, gluxepat, gluconat, glucuronat, glutamat, glutarat, glycolat, hipurat, hydroiodua/iodua, isethionat, lactat, lactobionat, malat, maleat, malonat, mandelat, mesylat, metylsulphat, muxat, naphtoat, napsylat, nicotinat, nitrat, octadecanoat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, phosphat/hydro phosphat/dihydro phosphat, polygalacturonat, propionat, sebacat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, tosylat trifenatat, hoặc xinafoat.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ở dạng đồng tinh thể hoặc muối axetat, ascorbat, adipat, aspartat, benzoat, besylat, bromua/hydrobromua, bicacbonat/cacbonat, bisulfat/sulfat, caprat, clorua/hydroclorua, xitrat, etandisulfonat, fumarat, gluxepat, gluconat, glucuronat, glutamat, glutarat, glycolat, hipurat, hydroiodua/iodua, isethionat, lactat, lactobionat, malat, maleat, malonat, mandelat, mesylat, metylsulphat, muxat, naphtoat, napsylat, nicotinat, nitrat, octadecanoat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, phosphat/hydro phosphat/dihydro phosphat, polygalacturonat, propionat, sebacat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, tosylat trifenatat, hoặc xinafoat.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất [N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit] ở dạng đồng tinh thể hoặc muối axetat, ascorbat, adipat, aspartat, benzoat, besylat, bromua/hydrobromua, bicacbonat/cacbonat, bisulfat/sulfat, caprat, clorua/hydroclorua, xitrat, etandisulfonat, fumarat, gluxepat, gluconat, glucuronat, glutamat, glutarat, glycolat, hipurat, hydroiodua/iodua, isethionat, lactat, lactobionat, malat, maleat, malonat, mandelat, mesylat, metylsulphat, muxat, naphtoat, napsylat, nicotinat, nitrat, octadecanoat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, phosphat/hydro phosphat/dihydro phosphat, polygalacturonat, propionat, sebacat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, tosylat trifenatat, hoặc xinafoat.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit ở dạng đồng tinh thể hoặc muối axetat, ascorbat, adipat, aspartat, benzoat, besylat, bromua/hydrobromua, bicacbonat/cacbonat, bisulfat/sulfat, caprat, clorua/hydroclorua, xitrat, etandisulfonat, fumarat, gluxepat, gluconat, glucuronat, glutamat, glutarat, glycolat, hipurat, hydroiodua/iodua, isethionat, lactat, lactobionat, malat, maleat, malonat, mandelat, mesylat, metylsulphat, muxat, naphtoat, napsylat, nicotinat, nitrat, octadecanoat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, phosphat/hydro phosphat/dihydro phosphat, polygalacturonat, propionat, sebacat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, tosylat trifenatat, hoặc xinafoat.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I ở dạng đồng tinh thể hoặc muối natri, kali, amoni, canxi, magie, bạc, kẽm, cholinat, lysin, meglumin, piperazin hoặc tromethamin.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimetyl-1,4-dioxan-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit ở dạng đồng tinh thể hoặc muối natri, kali, amoni, canxi, magie, bạc, kẽm, cholinat, lysin, meglumin, piperazin hoặc tromethamin.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(5,5-đimetyl-1,3-dioxan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

ở dạng muối hoặc đồng tinh thể natri, kali, amoni, canxi, magie, bạc, kẽm, cholinat, lysin, meglumin, piperazin hoặc tromethamin.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-dihiđro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ở dạng đồng tinh thể hoặc muối natri, kali, amoni, canxi, magie, bạc, kẽm, cholinat, lysin, meglumin, piperazin hoặc tromethamin.

. Theo một phương án, sáng chế đề xuất [N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-dihiđro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit] ở dạng đồng tinh thể hoặc muối natri, kali, amoni, canxi, magie, bạc, kẽm, cholinat, lysin, meglumin, piperazin hoặc trometamin.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-dihiđro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit ở dạng đồng tinh thể hoặc muối natri, kali, amoni, canxi, magie, bạc, kẽm, cholinat, lysin, meglumin, piperazin hoặc tromethamin.

Công thức bất kỳ được nêu ở đây cũng được chủ định để đại diện cho các dạng không được đánh dấu cũng như các dạng được đánh dấu đồng vị của hợp chất. Hợp chất được đánh dấu đồng vị có cấu trúc được mô tả bởi công thức được nêu ra ở đây ngoại trừ việc một hoặc nhiều nguyên tử được thay thế bằng nguyên tử có khối lượng nguyên tử hoặc số khối được chọn. Các ví dụ về đồng vị có thể được kết hợp vào hợp chất theo sáng chế bao gồm các đồng vị của hydro, cacbon, nitơ, oxy, phospho, flo, và clo, chẳng hạn như lần lượt là ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I . Sáng chế bao gồm nhiều hợp chất được đánh dấu đồng vị như được xác định ở đây, ví dụ các hợp chất có mặt đồng vị phóng xạ, chẳng hạn như ^3H và ^{14}C , hoặc hợp chất có mặt đồng vị không phóng xạ, chẳng hạn như ^2H và ^{13}C . Các hợp chất được đánh dấu đồng vị hữu dụng trong các nghiên cứu chuyển hóa (với ^{14}C), các nghiên cứu động học phản ứng (với, ví dụ 2H hoặc ^3H), kỹ thuật phát hiện hoặc kỹ thuật hình ảnh, chẳng hạn như chụp cắt lớp phát xạ positron (PET) hoặc chụp cắt lớp bằng bức xạ đơn photon (SPECT) bao gồm thử nghiệm phân tán dược chất hoặc cơ chất trong mô, hoặc trong điều trị phóng xạ cho bệnh nhân. Cụ thể là, Hợp chất ^{18}F hoặc hợp chất được đánh dấu có thể là được mong muốn đặc biệt đối với nghiên cứu PET hoặc SPECT. Thông thường là hợp chất có công thức (I) được

đánh dấu đồng vị có thể được điều chế bằng các kỹ thuật thông thường đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hoặc bằng quy trình tương tự quy trình được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế và điều chế sử dụng chất phản ứng được đánh dấu đồng vị thích hợp thay cho chất không được đánh dấu được dùng trước đó.

Ngoài ra, thể bằng đồng vị nặng hơn, cụ thể là đơteri (tức là, ^2H hoặc D) có thể đem lại các lợi ích trị bệnh nhất định nhờ tính ổn định chuyển hóa cao hơn, ví dụ, chu kỳ bán thải in vivo tăng hoặc nhu cầu liều lượng giảm hoặc cải thiện các chỉ số trị bệnh. Cần hiểu rằng đơteri trong bản mô tả này được xem là phần tử thể của hợp chất có công thức (I). Nồng độ của đồng vị nặng hơn này, đặc biệt là đơteri, có thể được xác định bằng hệ số độ giàu đồng vị. Thuật ngữ "hệ số độ giàu đồng vị" như được sử dụng ở đây có nghĩa là tỷ lệ giữa độ giàu đồng vị và độ giàu tự nhiên của đồng vị cụ thể. Nếu phần tử thể trong hợp chất theo sáng chế được biểu thị là đơteri, hợp chất này có hệ số độ giàu đồng vị đối với mỗi nguyên tử đơteri được chỉ định ít nhất là 3500 (52,5% kết hợp đơteri ở mỗi nguyên tử đơteri được chỉ định), ít nhất là 4000 (60% kết hợp đơteri), ít nhất là 4500 (67,5% kết hợp đơteri), ít nhất là 5000 (75% kết hợp đơteri), ít nhất là 5500 (82,5% kết hợp đơteri), ít nhất là 6000 (90% kết hợp đơteri), ít nhất là 6333,3 (95% kết hợp đơteri), ít nhất là 6466,7 (97% kết hợp đơteri), ít nhất là 6600 (99% kết hợp đơteri), hoặc ít nhất là 6633,3 (99,5% kết hợp đơteri).

Solvat được dụng theo sáng chế bao gồm solvat mà trong đó dung môi kết tinh có thể được thể đồng vị, ví dụ, D_2O , d_6 -axeton, d_6 -DMSO.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất mang được dụng" bao gồm tất cả và bất kỳ dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa, chất bảo quản (ví dụ, chất kháng khuẩn, chất kháng nấm), chất đẳng trương, chất trì hoãn hấp thu, muối, chất bảo quản, chất ổn định dược chất, tá dược dính, tá dược, chất gây rã, tá dược trơn, chất tạo ngọt, chất tạo vị, thuốc nhuộm, và tương tự và tổ hợp của chúng, đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289- 1329). Ngoại trừ trường hợp chất mang thông thường bất kỳ không thích hợp với thành phần hoạt tính đã biết, việc sử dụng chúng trong dược phẩm hoặc chế phẩm trị bệnh được dự tính.

Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị bệnh" của hợp chất theo sáng chế dùng để chỉ lượng hợp chất theo sáng chế sẽ đem lại các phản ứng sinh học hoặc y học ở đối tượng, ví dụ, giảm hoặc ức chế enzym hoặc hoạt tính protein, hoặc cải thiện triệu chứng, làm giảm tình trạng, làm chậm hoặc trì hoãn tiến trình bệnh, hoặc ngăn ngừa bệnh, v.v. Theo một phương án không giới hạn, thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị bệnh" dùng để chỉ lượng hợp chất theo sáng chế mà, khi đối tượng dùng, có hiệu quả để (1) ít nhất là làm nhẹ, ức chế, ngăn ngừa và/hoặc cải thiện một phần tình trạng, hoặc rối loạn hoặc bệnh (i) gây ra bởi Smurf-1, hoặc (ii) có liên quan đến hoạt tính Smurf-1, hoặc (iii) đặc trưng bởi hoạt động (bình thường hoặc không bình thường) của Smurf-1; hoặc (2) giảm hoặc ức chế hoạt tính của Smurf-1; hoặc (3) giảm hoặc ức chế sự biểu hiện của Smurf-1. Theo phương án không giới hạn khác, thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị bệnh" dùng để chỉ lượng hợp chất theo sáng chế mà, khi được dùng cho tế bào hoặc mô, hoặc nguyên liệu sinh học không phải tế bào, hoặc môi trường, có hiệu quả ít nhất là giảm hoặc ức chế một phần hoạt tính của Smurf-1; hoặc ít nhất là giảm hoặc ức chế một phần sự biểu hiện của Smurf-1.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" dùng để chỉ động vật. Thông thường là, động vật là động vật có vú. Đối tượng cũng dùng để chỉ ví dụ, động vật linh trưởng (ví dụ, người, đàn ông hoặc phụ nữ), bò, cừu, dê, ngựa, chó, mèo, thỏ, chuột, chuột nhắt, cá, chim hoặc tương tự. Theo phương án nhất định, đối tượng là động vật linh trưởng. Theo phương án khác, đối tượng là người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ức chế", "sự ức chế" hoặc "làm ức chế" dùng để chỉ giảm hoặc ngăn chặn các tình trạng, triệu chứng, hoặc rối loạn, hoặc bệnh đã nêu, hoặc giảm đáng kể hoạt tính cơ bản của hoạt tính hoặc quá trình sinh học.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "điều trị", "việc điều trị" hoặc "sự điều trị" bệnh hoặc rối loạn bất kỳ, theo một phương án, dùng để chỉ việc cải thiện bệnh hoặc rối loạn (tức là, làm chậm hoặc ngừng hoặc giảm sự phát triển bệnh hoặc ít nhất một triệu chứng lâm sàng của nó). Theo phương án khác "điều trị", "việc điều trị" hoặc "sự điều trị" dùng để chỉ việc làm giảm hoặc cải thiện ít nhất một thông số thể chất bao gồm các thông số mà có thể không được nhận biết rõ bởi bệnh nhân. Theo phương án khác, "điều trị", "việc

điều trị" hoặc "sự điều trị" dùng để chỉ việc điều biến bệnh hoặc rối loạn, về mặt thể chất, (ví dụ, ổn định triệu chứng rõ rệt), hoặc sinh lý, (ví dụ, ổn định thông số thể chất), hoặc cả hai. Theo phương án khác, "điều trị", "việc điều trị" hoặc "sự điều trị" dùng để chỉ việc ngăn ngừa hoặc trì hoãn sự khởi phát hoặc sự phát triển hoặc tiến trình của bệnh hoặc rối loạn.

Như được sử dụng ở đây, đối tượng "cần thiết" điều trị nếu đối tượng này sẽ có lợi về mặt sinh học, y học hoặc chất lượng cuộc sống từ điều trị này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ chỉ số ít và các thuật ngữ tương tự được sử dụng trong bản mô tả sáng chế (đặc biệt là trong phần yêu cầu bảo hộ) được hiểu là bao gồm cả số ít và số nhiều, nếu không có quy định khác hoặc mâu thuẫn rõ ràng với ngữ cảnh.

Tất cả phương pháp được mô tả ở đây có thể được tiến hành theo thứ tự thích hợp bất kỳ nếu không có quy định khác hoặc mâu thuẫn rõ ràng với ngữ cảnh. Việc sử dụng bất kỳ và tất cả ví dụ, hoặc các từ ngữ điển hình (ví dụ, "chẳng hạn như") được dùng ở đây đơn thuần chỉ làm sáng chế rõ ràng hơn và không đặt ra giới hạn về phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Nguyên tử bất đối xứng bất kỳ (ví dụ, cacbon hoặc tương tự) của hợp chất theo sáng chế có thể có mặt ở dạng racemic hoặc được làm giàu chất đồng phân đối ảnh, ví dụ, cấu hình (*R*)-, (*S*)- hoặc (*R,S*)-. Theo các phương án nhất định, mỗi nguyên tử bất đối xứng có ít nhất 50% lượng dư chất đồng phân đối ảnh, ít nhất 60% lượng dư chất đồng phân đối ảnh, ít nhất 70% lượng dư chất đồng phân đối ảnh, ít nhất 80% lượng dư chất đồng phân đối ảnh, ít nhất 90% lượng dư chất đồng phân đối ảnh, ít nhất 95% lượng dư chất đồng phân đối ảnh, hoặc ít nhất 99% lượng dư chất đồng phân đối ảnh ở cấu hình (*R*)- hoặc (*S*)-. Các phân tử thể ở nguyên tử chứa liên kết đôi không bão hòa có thể, nếu có khả năng, có mặt ở dạng *cis*- (*Z*)- hoặc *trans*- (*E*)-.

Theo đó, như được sử dụng ở đây hợp chất theo sáng chế có thể ở dạng của một trong số các chất đồng phân, rotamer, atropisomer, tautomer có khả năng hoặc hỗn hợp của chúng, ví dụ, các chất đồng phân dị hình (*cis* hoặc *trans*), chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân quang học (thể đối quang), racemat về cơ bản là tinh khiết, hoặc hỗn hợp của chúng.

Hỗn hợp chất đồng phân tạo thành bất kỳ có thể được tách riêng trên cơ sở sự khác biệt lý hóa của các thành phần, thành các chất đồng phân hình học hoặc các chất đồng phân quang học, chất đồng phân không đối quang, raxemat tinh khiết hoặc về cơ bản là tinh khiết, ví dụ, bằng sắc ký và/hoặc kết tinh phân đoạn.

Các raxemat tạo thành bất kỳ của sản phẩm cuối cùng hoặc của các chất trung gian có thể được phân tách thành các thể đối quang quang học bằng các phương pháp đã biết, ví dụ, bằng cách phân tách các muối đồng phân không đối quang của chúng, thu được nhờ axit hoặc bazơ hoạt quang, và giải phóng hợp chất axit hoặc bazơ hoạt quang. Cụ thể, gốc bazơ, do đó, có thể được sử dụng để phân giải các hợp chất theo sáng chế thành các thể đối quang quang học của chúng, ví dụ, bằng cách kết tinh phân đoạn muối được tạo thành bằng axit hoạt quang, ví dụ, axit tartaric, axit dibenzoyl tartaric, axit diacetyl tartaric, axit di-*O,O'*-*p*-toluoyl tartaric, axit mandelic, axit malic hoặc axit camphor-10-sulfonic. Sản phẩm raxemic cũng có thể được phân giải bằng sắc ký không đối xứng, ví dụ, sắc ký lỏng cao áp (HPLC) sử dụng chất hấp phụ không đối xứng.

Ngoài ra, các hợp chất theo sáng chế, bao gồm muối của chúng, cũng có thể thu được ở dạng hydrat của chúng, hoặc bao gồm các dung môi khác được sử dụng cho việc kết tinh của chúng. Các hợp chất theo sáng chế tự nó có thể hoặc nhờ thiết kế tạo ra các solvat bằng dung môi được dụng (bao gồm nước); do đó, sáng chế dự định bao gồm cả dạng được solvat hóa và dạng không được solvat hóa. Thuật ngữ "solvat" dùng để chỉ phức phân tử của hợp chất theo sáng chế (bao gồm muối được dụng của nó) với một hoặc nhiều phân tử solvat. Các phân tử dung môi này là các phân tử thông thường được sử dụng trong lĩnh vực dược phẩm, đã biết là vô hại với người nhận, ví dụ, nước, etanol, và tương tự. Thuật ngữ "hydrat" dùng để chỉ phức trong đó phân tử dung môi là nước.

Các hợp chất theo sáng chế, bao gồm muối, đồng tinh thể, hydrat và solvat của nó, có thể là tự chúng hoặc bằng thiết kế tạo ra dạng đa hình.

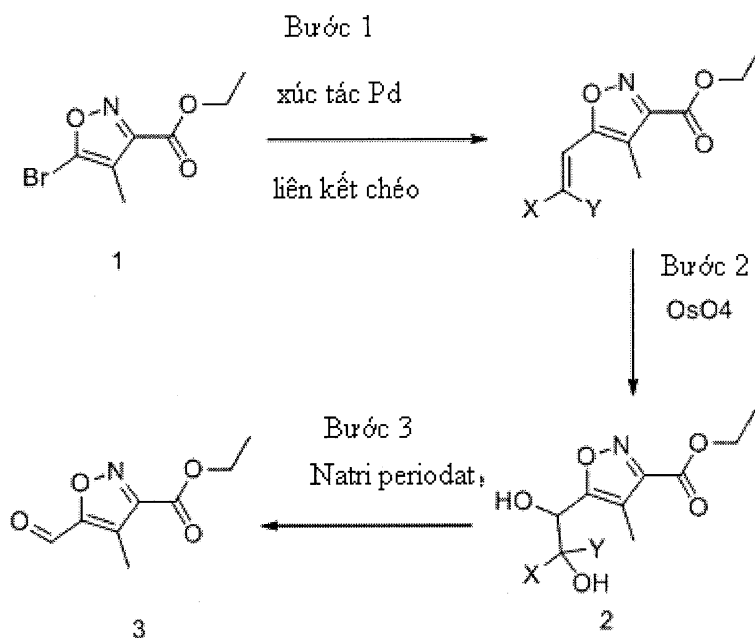
Sơ đồ chung

Thông thường, hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế theo các sơ đồ được đề xuất dưới đây.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế bằng quy trình được mô tả theo sơ đồ hoặc ví dụ dưới đây.

Tất cả các từ viết tắt được xác định trong phần ví dụ thực hiện sáng chế ở dưới đây.

Sơ đồ 1



trong đó X và Y độc lập là H hoặc $-(C_1-C_6)\text{alkyl}$.

Bước 1: Phản ứng gắn kết chéo được xúc tác paladi.

Các điều kiện thông thường: chất xúc tác paladi (0); hợp chất thiếc hoặc kẽm bo phù hợp chẳng hạn như axit boric, este boronate hoặc stannan; bazơ hữu cơ hoặc vô cơ; trong nước; trong dung môi phù hợp ở 80-110°C

Các điều kiện ưu tiên: Bis(điphenylphosphino)feroxen-paladi(II)diclorua, muối vinyl trifloborat, trietylamin trong ethanol ở 90°C

Bước 2: dihydroxyl hóa

Các điều kiện thông thường: Osmi tetroxit; chất đồng oxy hóa phù hợp chẳng hạn như N-metylmorpholin-N-oxit; trong dung môi phù hợp

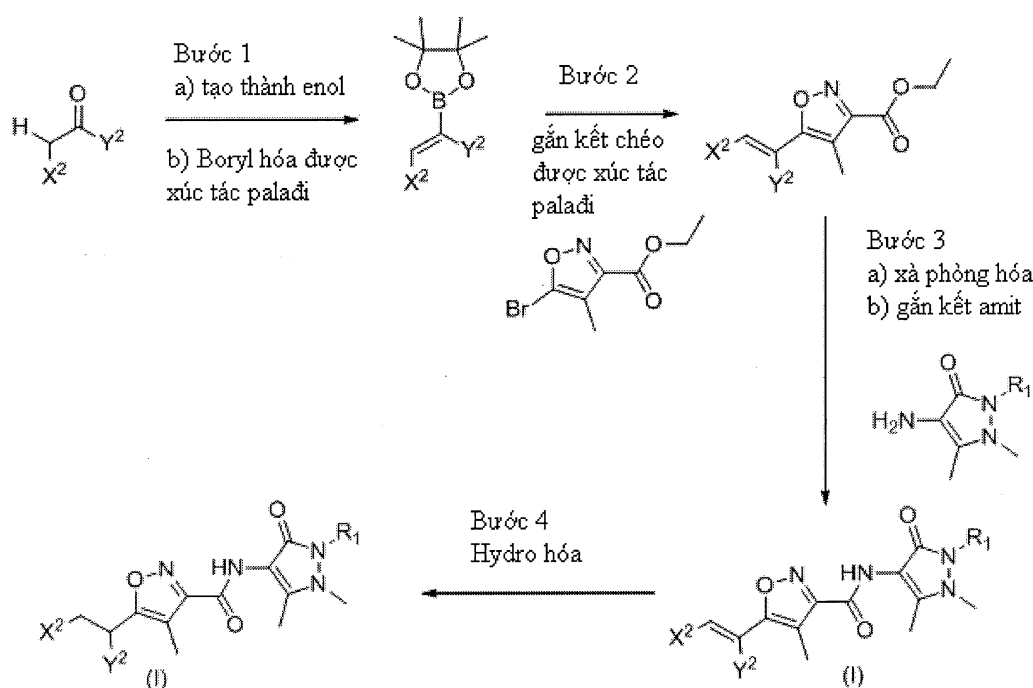
Các điều kiện ưu tiên: Osmi tetroxit (trộn lẫn alpha hoặc trộn lẫn beta) có thể được sử dụng để đưa vào diol không đối xứng, với chất phụ gia phù hợp chẳng hạn như metan sulphonamit. Hệ dung môi ưu tiên là tButanol/nước.

Bước 3: Phân cắt oxy hóa

Các điều kiện thông thường: Natri Periodat trong hệ dung môi THF/nước

Sơ đồ 2

Khi R^2 là methyl, điều chế hợp chất có công thức (I) theo sơ đồ 2.



trong đó X^2 và Y^2 được xác định sao cho, cùng với nguyên tử cacbon mà nó gắn vào, chúng tạo thành phần tử thể R^3 .

Bước 1 : Sự tạo thành vinyl boronat

Các điều kiện thông thường: a) Enol hóa khi có mặt bazơ mạnh, chẳng hạn như LDA hoặc LHMDs, sau đó làm ngừng bằng haloalkyl sulphonat hoặc sulphonamit phù

hợp để thu được dạng enol ổn định. b) Boryl hóa enol xúc tác paladi (0) sử dụng chất xúc tác paladi (0) phù hợp và bis pinacolatodiboron

Các điều kiện ưu tiên: a) LDA trong THF ở -78°C , sau đó làm ngừng bằng 1,1,1-triflo-N-(pyridin-2-yl)-N-((triflometyl)sulfonyl)metansulfonamit. b) phức 1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen-paladi(II)điclorua điclometan và bispinacolatodiboron, kali axetat, trong dioxan, ở $80-100^{\circ}\text{C}$, trong 4-16h.

Bước 2: Gắn kết chéo xúc tác paladi

Các điều kiện thông thường: Như được mô tả trong sơ đồ 1, bước 1

Các điều kiện ưu tiên: phức 1, 1'-bis (diphenylphosphino) feroxen-paladi (II) điclorua điclometan, kali cacbonat (2M trong nước) trong MeCN ở 80°C , trong 1,5h

Bước 3a: Xà phòng hóa

Các điều kiện thông thường: Bazơ chứa nước phù hợp, tùy ý với đồng dung môi phù hợp chẳng hạn như THF

Các điều kiện ưu tiên: Natri hydroxit 2M (aq.) với THF ở nhiệt độ phòng trong 30 phút

Bước 3b: Liên kết amit

Các điều kiện thông thường: Chất phản ứng gắn kết phù hợp chẳng hạn như HATU, T3P, EDCI, v.v, khi có mặt bazơ phù hợp chẳng hạn như trietylamin, DIPEA, v.v, trong dung môi không proton phù hợp.

Các điều kiện ưu tiên: HATU và DIPEA trong DMF ở nhiệt độ phòng trong khoảng 2h

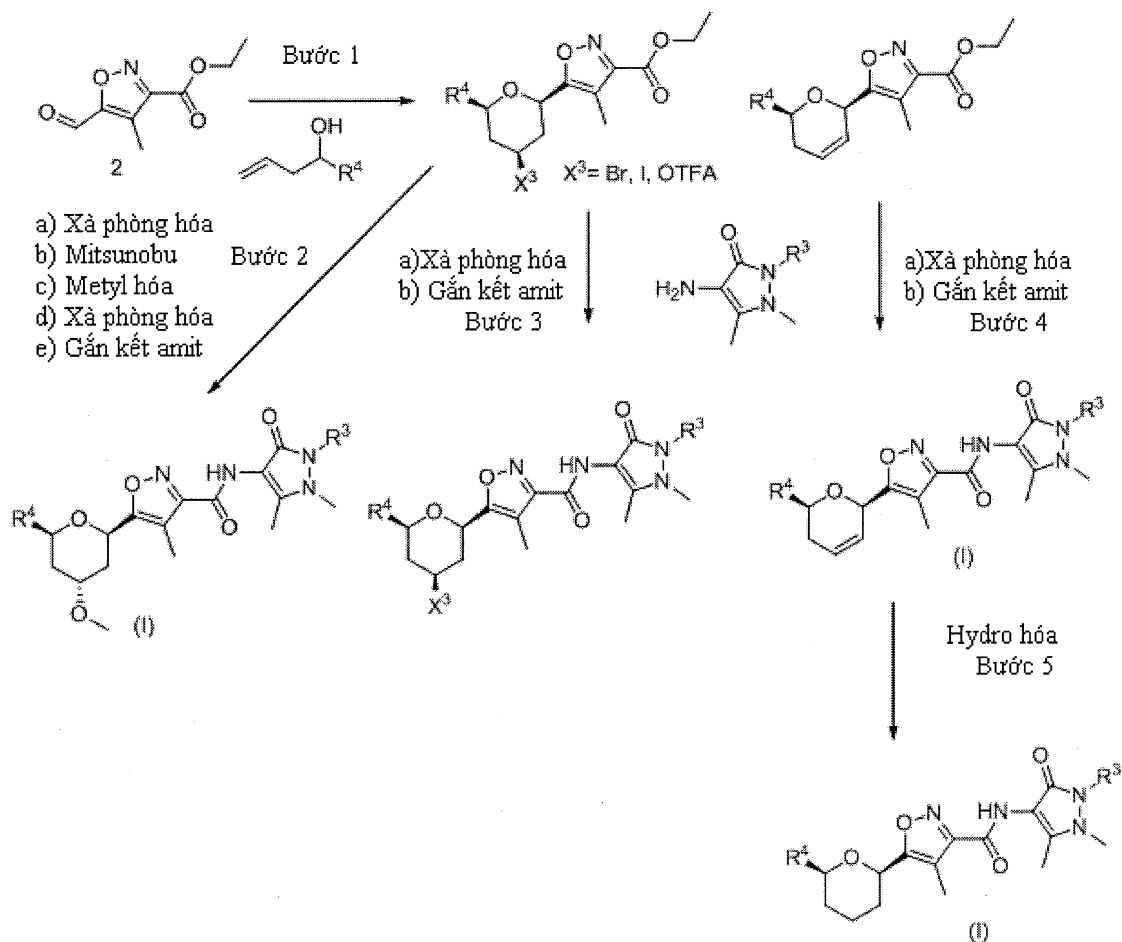
Bước 4: Hydro hóa

Hợp chất có công thức (I), trong đó R^3 chứa liên kết đôi $\text{C}=\text{C}$, có thể được chuyển thành hợp chất có công thức (I), trong đó R^3 no hoàn toàn, qua phản ứng hydro hóa.

Các điều kiện thông thường: Chất xúc tác paladi không tan, khí hydro, trong dung môi phù hợp chẳng hạn như rượu

Các điều kiện ưu tiên: Paladi 10% trên cacbon và khí hydro trong etanol

Sơ đồ 3



khi X^3 là Br hoặc I, sản phẩm của bước 3 cũng là hợp chất có công thức (I).

Bước 1: Phản ứng Prins

Các điều kiện thông thường: Xúc tác axit và chất khử nước phù hợp trong dung môi clo hóa.

Các điều kiện ưu tiên: (i) Axit trifloaxetic và rây phân tử trong DCM; hoặc (ii) $InBr_3$ và trimetyl silyl bromua trong DCM; hoặc (iii) $InOTf_3$ và trimetyl silyl triflat trong DCM.

Bước 2a: Phản ứng xà phòng hóa như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 3a

Bước 2b: Đảo ngược Mitsunobu

Các điều kiện thông thường: Triarylphosphin, dialkylazodicarboxylat và axit benzoic, trong dung môi phù hợp chẳng hạn như THF ở nhiệt độ phòng.

Các điều kiện ưu tiên: triphenylphosphin, diisopropylazodicarboxylat, và axit 2, 4-đinitrobenzoic, trong THF ở nhiệt độ phòng.

Bước 2c: Metyl hóa

Các điều kiện thông thường: Bazơ mạnh phù hợp và chất alkyl hóa trong dung môi phù hợp

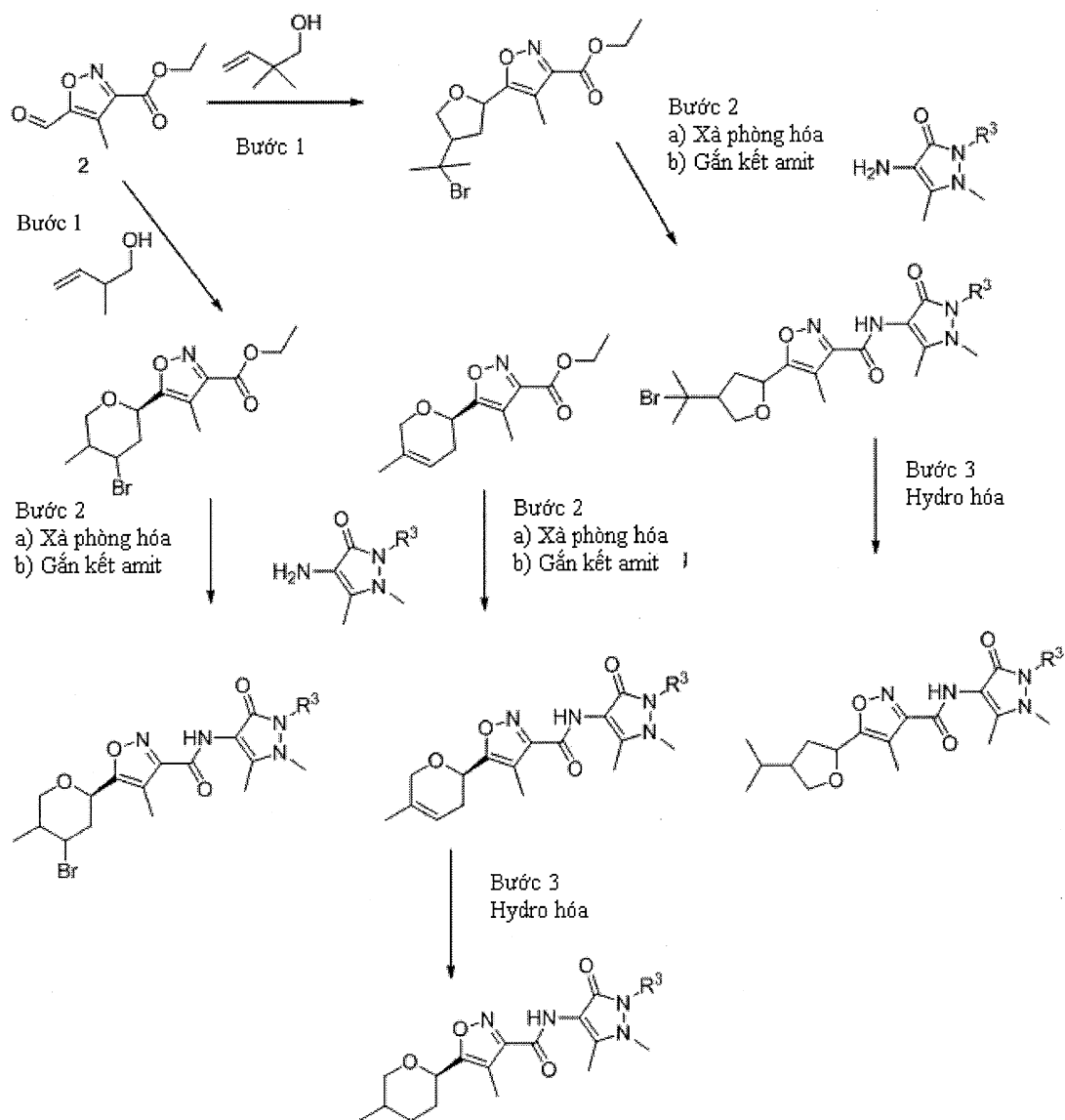
Các điều kiện ưu tiên: Natri hydrit và Metyl iodua trong DMF

Bước 2d, bước 3a, bước 4a: Phản ứng xà phòng hóa như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 3a

Bước 2e, 3b và 4b: Gắn kết amit như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 3b

Bước 5: Hydro hóa như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 4

Sơ đồ 4



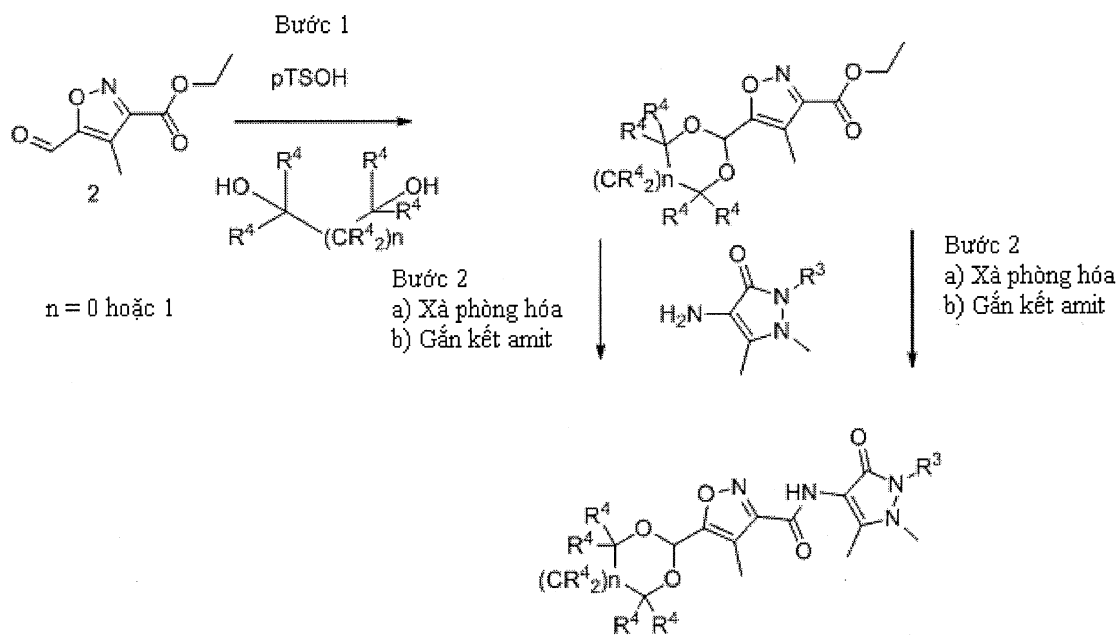
Bước 1: Phản ứng Prins như được mô tả trong sơ đồ 3, bước 1

Bước 2a: Phản ứng xà phòng hóa như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 3a

Bước 2b: Gắn kết amit như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 3b

Bước 3: Hydro hóa như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 4

Sơ đồ 5



Bước 1: Tạo thành axetal

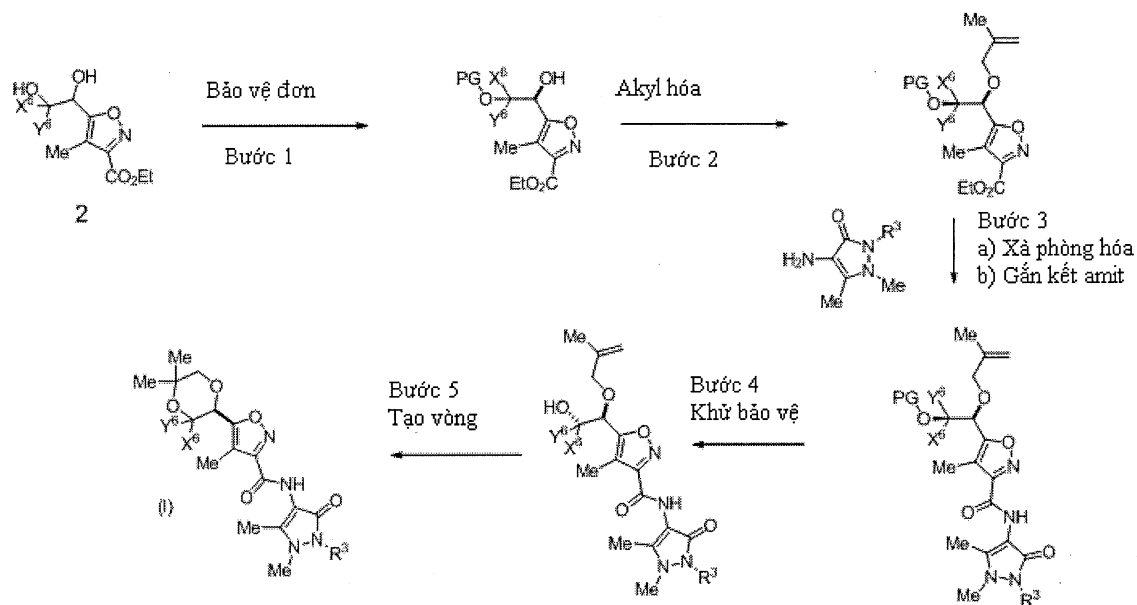
Các điều kiện thông thường: Chất xúc tác axit mạnh trong dung môi phù hợp trong điều kiện khử nước

Các điều kiện ưu tiên: pTSAH và toluen trong điều kiện Dean Stark ở 110°C trong 2-16h.

Bước 2a: Phản ứng xà phòng hóa như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 3a

Bước 2b: Gắn kết amit như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 3b

Sơ đồ 6



PG là nhóm bảo vệ phù hợp chẳng hạn như ^tButyldimetylsilyl
mỗi gốc X⁶ và Y⁶ độc lập là H hoặc -(C₁-C₆)alkyl.

Bước 1: Bảo vệ

Các điều kiện thông thường: Nhóm bảo vệ thích hợp, chẳng hạn như trialkylsilyl clorua, khi có mặt bazơ phù hợp trong dung môi phù hợp.

Các điều kiện ưu tiên: ^tButyldimetylsilyl clorua khi có mặt triethylamin và DMAP trong DMF.

Bước 2: Phản ứng alkyl hóa

Các điều kiện thông thường: Alkyl bromua khi có mặt bazơ phù hợp trong dung môi phù hợp

Các điều kiện ưu tiên: 3-bromo-2-metylprop-1-en và natri hydrit trong THF.

Bước 3a: Phản ứng xà phòng hóa như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 3a

Bước 3b: Gắn kết amit như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 3b

Bước 4: Khử bảo vệ

Các điều kiện thông thường: Nguồn florua trong dung môi phù hợp

Các điều kiện ưu tiên: TBAF trong THF

Bước 5: Phản ứng tạo vòng

Các điều kiện thông thường: Thủy ngân (II) Trifloxetat và thủy ngân (II) oxit trong THF ở nhiệt độ phòng, sau đó thêm triethylboran và natri borohydrit ở -78°C .

Sáng chế còn bao gồm biến thể bất kỳ của các quy trình này, trong đó sản phẩm trung gian có thể thu được ở giai đoạn bất kỳ của quy trình được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu và tiến hành các bước còn lại, hoặc trong đó nguyên liệu khởi đầu được tạo thành tại chỗ (*in situ*) trong điều kiện phản ứng, hoặc trong đó thành phần phản ứng được sử dụng ở dạng muối của chúng hoặc nguyên liệu tinh khiết về mặt quang học.

Các hợp chất theo sáng chế và chất trung gian cũng có thể được chuyển hóa lẫn nhau theo các phương pháp đã biết thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, và chất mang được dụng. Theo phương án khác, được phẩm chứa ít nhất hai chất mang được dụng, chẳng hạn như chất mang được mô tả ở đây. Đối với mục đích của sáng chế, nếu không có quy định khác, solvat và hydrat thông thường được xem như chế phẩm. Tốt hơn là, chất mang được dụng là vô trùng. Được phẩm có thể được bào chế cho đường dùng cụ thể chẳng hạn như dùng qua đường miệng, dùng theo đường ngoài tiêu hóa, và dùng theo đường ruột, v.v. Ngoài ra, được phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng rắn (bao gồm không giới hạn ở, viên nang, viên nén, viên nén tròn, dạng hạt, dạng bột hoặc thuốc đạn), hoặc ở dạng lỏng (bao gồm không giới hạn ở, dung dịch, huyền phù hoặc nhũ tương). Được phẩm có thể là đối tượng của các thao tác vận hành được phẩm thông thường chẳng hạn như vô trùng và/hoặc có thể chứa các chất pha loãng trợ, chất làm trơn, hoặc chất đệm thông thường, cũng như các tá dược, chẳng hạn như chất bảo quản, chất làm ổn định, chất làm ướt, chất nhũ hóa và chất đệm, v.v.

Thông thường, dược phẩm là viên nén hoặc viên nang gelatin chứa thành phần hoạt tính cùng với một hoặc nhiều trong số:

- a) tá dược pha loãng, ví dụ, lactoza, dextroza, sucroza, mannitol, sorbitol, xenluloza và/hoặc glyxin;
- b) tá dược trơn, ví dụ, silic oxit, bột talc, axit stearic, muối magie hoặc muối canxi của nó và/hoặc polyetylen glycol; còn đối với viên nén
- c) tá dược dính, ví dụ, magie nhôm silicat, hồ tinh bột, gelatin, gôm tragacanth, methylxenluloza, natri carboxymethylxenluloza và/hoặc polyvinylpyrrolidon; nếu muốn
- d) tá dược rã, ví dụ, tinh bột, aga, axit alginic hoặc muối natri của nó, hoặc hỗn hợp sủi bọt; và
- e) chất hấp phụ, chất tạo màu, chất tạo mùi và chất tạo ngọt.

Viên nén có thể được bao phim hoặc bao tan trong ruột theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Dược phẩm phù hợp để dùng qua đường miệng chứa lượng có hiệu quả của hợp chất theo sáng chế ở dạng viên nén, viên ngậm, huyền phù chứa dầu hoặc chứa nước, bột hoặc hạt phân tán, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, hoặc siro hoặc cồn ngọt. Dược phẩm để dùng qua đường miệng được bào chế theo phương pháp bất kỳ đã biết để bào chế dược phẩm và các dược phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm chất tạo ngọt, chất tạo mùi, chất tạo màu và chất bảo quản để tạo ra các chế phẩm để uống và bắt mắt. Viên nén có thể chứa thành phần hoạt tính trong hỗn hợp với tá dược được dụng không độc phù hợp với việc bào chế viên nén. Các tá dược này là, ví dụ, chất pha loãng trợ, chẳng hạn như canxi cacbonat, natri cacbonat, lactoza, canxi phosphat hoặc natri phosphat; chất tạo hạt và chất gây rã, ví dụ, tinh bột ngô, hoặc axit alginic; chất gắn kết, ví dụ, tinh bột, gelatin hoặc acacia; và chất làm trơn, ví dụ, magie stearat, axit stearic hoặc talc. Viên nén không được bao phủ hoặc được bao phủ bằng các kỹ thuật đã biết để trì hoãn phân rã và hấp thu trong đường tiêu hóa và nhờ đó đem lại tác dụng duy trì trong thời gian dài. Ví dụ, có thể sử dụng nguyên liệu trì hoãn thời gian chẳng hạn như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat. Chế phẩm để dùng qua đường miệng có thể là viên nang gelatin cứng trong đó thành phần hoạt tính được trộn với chất pha loãng rắn trợ, ví

dụ, canxi cacbonat, canxi phosphat hoặc cao lanh, hoặc viên nang gelatin mềm trong đó thành phần hoạt tính được trộn với nước hoặc dung môi dầu, ví dụ, dầu lạc, parafin lỏng hoặc dầu ôliu.

Các dược phẩm có thể tiêm nhất định là dung dịch hoặc huyền phù đẳng trương chứa nước, và thuốc đạn được bào chế thuận lợi từ nhũ tương hoặc huyền phù béo. Dược phẩm này có thể được vô trùng và/hoặc chứa tá dược, chẳng hạn như chất bảo quản, chất làm ổn định, chất làm ướt hoặc chất nhũ hóa, promoter dung dịch, muối để điều hòa áp suất thẩm thấu và/hoặc chất đệm. Ngoài ra, chúng cũng có thể chứa các chất có tác dụng trị bệnh khác. Các dược phẩm này được bào chế lần lượt theo các phương pháp trộn, nghiền, hoặc phủ thông thường, và chứa khoảng 0,1-75%, hoặc chứa khoảng 1-50%, thành phần hoạt tính.

Dược phẩm phù hợp để dùng qua da chứa lượng có hiệu quả của hợp chất theo sáng chế với chất mang phù hợp. Các chất mang phù hợp để vận chuyển qua da bao gồm dung môi được dụng có thể được hấp thu để hỗ trợ vận chuyển qua da của vật chủ. Ví dụ, thiết bị qua da ở dạng băng chứa thành phần lót, phần chứa chứa hợp chất tùy ý với chất mang, tùy ý thanh kiểm soát tốc độ để vận chuyển hợp chất qua da của vật chủ ở tốc độ kiểm soát và định trước trong thời gian kéo dài, và dụng cụ để giữ thiết bị này với da.

Dược phẩm phù hợp để dùng tại chỗ, ví dụ, cho da và mắt, bao gồm dung dịch, huyền phù, thuốc mỡ, kem, gel chứa nước hoặc chế phẩm có thể phun, ví dụ, để vận chuyển bằng sol khí hoặc tương tự. Hệ vận chuyển tại chỗ này sẽ đặc biệt thích hợp để dùng cho da, ví dụ, để điều trị bệnh ung thư da, ví dụ, để sử dụng dự phòng trong kem chống nắng, thuốc nước, thuốc xịt và tương. Do đó, chúng đặc biệt phù hợp để sử dụng tại chỗ, bao gồm mỹ phẩm, chế phẩm đã biết rõ trong lĩnh vực này. Chúng có thể chứa chất hòa tan, chất ổn định, chất tăng cường ưu trương, chất đệm và chất bảo quản.

Như được sử dụng ở đây việc dùng tại chỗ cũng có thể để chỉ việc hít hoặc dùng qua đường mũi. Chúng có thể được vận chuyển thuận lợi ở dạng bột khô (riêng lẻ, hoặc hỗn hợp, ví dụ, hỗn hợp khô với lactoza, hoặc hạt thành phần trộn, ví dụ, với phospholipit) từ máy hít bột khô hoặc dạng phun sol khí từ một bình chứa điều áp, bơm, bình phun, bình xịt hoặc máy phun, sử dụng hoặc không sử dụng chất đẩy phù hợp.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm và dạng bào chế khan chứa hợp chất theo sáng chế làm thành phần hoạt tính, vì nước có thể tạo điều kiện phân rã hợp chất nhất định.

Dược phẩm và dạng bào chế khan theo sáng chế được bào chế bằng cách sử dụng thành phần chứa độ ẩm ở mức thấp hoặc khan và điều kiện độ ẩm ở mức thấp hoặc hơi nước thấp. Dược phẩm khan có thể được bào chế và bảo quản sao cho trạng thái khan tự nhiên của nó được duy trì. Theo đó, dược phẩm khan được đóng gói bằng cách sử dụng các nguyên liệu đã biết để ngăn sự phơi nhiễm với nước sao cho chúng có thể được chứa trong kit bào chế phù hợp. Các ví dụ về bao gói phù hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, lá kim loại, nhựa được hàn kín, thiết bị chứa liều đơn vị (ví dụ, lọ thuốc), vỉ gói, và vỉ xé.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm và dạng bào chế chứa một hoặc nhiều chất giảm tốc độ mà theo đó hợp chất theo sáng chế làm thành phần hoạt tính sẽ phân hủy. Các chất này, được đề cập đến ở đây là "chất làm ổn định," bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất chống oxy hóa chẳng hạn như axit ascorbic, chất đệm pH, hoặc chất đệm muối, v.v.

Hợp chất có công thức I ở dạng tự do hoặc dạng muối được dùng, biểu hiện các đặc tính dược lý có giá trị, ví dụ, đặc tính điều biến Smurf-1, ví dụ, như được chỉ ra ở các thử nghiệm in vitro và in vivo như được đề xuất trong phần tiếp theo, và do đó được chỉ định để trị bệnh hoặc để sử dụng làm hóa chất nghiên cứu, ví dụ, làm các hợp chất công cụ.

Các hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dùng của nó hữu dụng trong điều trị nhiều chỉ định bệnh bao gồm:

Tăng huyết áp phổi, bao gồm Tăng huyết áp động mạch phổi (PAH)

Xơ

Viêm khớp dạng thấp

Làm lành xương gãy

Bệnh tăng nhãn áp

Giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT)

Bệnh nước tiểu có protein

Làm lành vết thương

COPD

Hen suyễn

Tăng huyết áp động mạch phổi (PAH)

Tăng huyết áp động mạch phổi có bệnh lý học do nhiều nhân tố. Co mạch, tái cấu trúc thành mạch phổi và huyết khối góp phần vào sức cản mạch phổi tăng trong PAH (Humbert *et al*, J. Am. Coll. Cardiol., 2004.). Các hợp chất theo sáng chế được bộc lộ ở đây hữu dụng trong điều trị PAH và các triệu chứng của nó. Tăng huyết áp động mạch phổi được hiểu là bao gồm các dạng tăng huyết áp phổi sau: PAH tự phát (IPAH); PAH di truyền (HPAH); PAH gây ra bởi thuốc hoặc chất gây độc, PAH có liên quan đến các tình trạng khác (APAH), chẳng hạn như PAH có liên quan đến các bệnh mô liên kết, PAH có liên quan đến nhiễm HIV, PAH có liên quan đến tăng huyết áp kịch phát, PAH có liên quan đến bệnh tim bẩm sinh, PAH có liên quan đến bệnh sản mán, PAH có liên quan đến thiếu máu tan huyết mạn tính, hoặc tăng huyết áp phổi dai dẳng ở trẻ sơ sinh (Galiè *et al*, ERJ, 2009; Simonneau *et al*, JACC, 2009).

PAH tự phát dùng để chỉ PAH không rõ nguyên nhân. PAH di truyền dùng để chỉ PAH mà sự truyền bệnh di truyền được nghi ngờ hoặc được ghi chép là bao gồm PAH chứa đột biến ở thụ thể BMP, BMPRII hoặc PAH chứa đột biến ở ALK1 hoặc endoglin (có hoặc không có giãn mạch xuất huyết di truyền).

PAH liên quan đến thuốc hoặc độc tố được hiểu là bao gồm PAH liên quan đến dùng qua đường miệng aminorex, hợp chất fenfluramin (ví dụ, fenfluramin hoặc dexfenfluramin), dầu độc hại cụ thể (ví dụ, dầu cải dầu), pyrolizidin alkaloid (ví dụ, trà bụi), monocrotalin, amphetamin, L-tryptophan, metamphetamin, cocain, phenylpropanolamin, St John's Wort, chất hóa trị liệu hoặc SSRI's.

PAH liên quan đến bệnh mô liên kết được hiểu là bao gồm PAH liên quan đến xơ cứng hệ thống, xơ phổi, viêm đa cơ, viêm khớp dạng thấp, hội chứng Sjogren hoặc PAH liên quan đến bệnh luput ban đỏ hệ thống.

PAH liên quan đến bệnh tim bẩm sinh được hiểu là bao gồm bệnh nhân có ống dẫn hệ thống đến phổi, PAH liên quan đến hội chứng Eisenmenger, vách thất nhỏ hoặc khuyết tật vách nhĩ hoặc PAH liên quan đến phẫu thuật chỉnh tim.

PAH liên quan đến thiếu máu tan huyết mạn tính được hiểu là bao gồm bệnh nhân thiếu máu sau sinh và di truyền mạn tính bao gồm bệnh nhân mắc bệnh tế bào hình liềm,

thiếu máu miền biển, bệnh tăng hồng cầu hình cầu di truyền, bệnh hồng cầu răng cưa và bệnh thiếu máu tan huyết vi mạch.

Triệu chứng PAH bao gồm khó thở, đau thắt ngực, ngất và phù nề (McLaughlin et al., Circulation, 2006, 114:1417-1431). Hợp chất theo sáng chế được bộc lộ ở đây hữu dụng trong điều trị các triệu chứng của PAH.

Tăng huyết áp phổi (PH)

Tăng huyết áp phổi (PH) được hiểu là liên quan đến các tình trạng sau đây được nhóm lại theo phân loại lâm sàng Dana Point (Simonneau, G et al. JACCC, 2009):

Nhóm 1' - PH được hiểu là liên quan đến bệnh nhân mắc bệnh tắc tĩnh mạch phổi (PVOD) và u máu mao mạch phổi (PCH).

Nhóm 2 – PH liên quan đến bệnh tim trái bao gồm các bệnh nhân mắc bệnh van tim hoặc tâm thất trái giãn.

Nhóm 3 - PH là kết quả của bệnh phổi và/hoặc thiếu oxy. Bệnh phổi gây ra PH được hiểu là bao gồm các bệnh nhân mắc xơ phổi, khí thũng, xơ phổi kết hợp với khí thũng, giãn phế quản, xơ nang và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD).

Nhóm 4 - PH liên quan đến huyết khối tắc mạch mạn tính (CTEPH).

Nhóm 5 - PH liên quan đến nguyên nhân gây bệnh không rõ ràng hoặc có nhiều nguyên nhân. Các bệnh nhân PH dạng này được hiểu là bao gồm bệnh nhân thuộc một trong số các nhóm sau: 1) rối loạn tăng sinh tủy xương mạn tính bao gồm đa hồng cầu nguyên phát, tăng tiểu cầu nguyên phát hoặc bạch cầu myeloid mạn tính; 2) Các rối loạn hệ thống bao gồm bệnh u hạt, các tình trạng gây ra sự phá hủy lớp mao mạch phổi chẳng hạn như xơ, chèn ép từ bên ngoài lên động mạch phổi lớn, bệnh nhân mắc hội chứng mô bào Langerhan ở phổi, bệnh u cơ trơn mạch bạch huyết, u xơ thần kinh loại 1 và viêm mạch liên quan đến kháng thể kháng bạch cầu đa nhân trung tính; 3) Các rối loạn chuyển hóa bao gồm bệnh dự trữ glycogen loại Ia, thiếu hụt glucoza-6-phosphatase, bệnh Gaucher và các bệnh tuyến giáp (suy tuyến giáp và bệnh cường giáp trạng); 4) Bao gồm các bệnh nhân mắc khối u thâm nhiễm vào lumen của động mạch phổi, tắc vi mạch phổi do tắc nghẽn mạch khối u di căn, xơ trung thất hoặc bệnh nhân mắc bệnh thận giai đoạn cuối tiếp nhận chạy thận nhân tạo thời gian dài.

Xơ hóa

Rối loạn quá trình truyền tín hiệu TGF β /BMP đã được chứng minh là có vai trò nguyên nhân gây xơ hóa ở nhiều cơ quan khác nhau bao gồm thận, tim, phổi, da, tuyến tụy và gan, cũng như gây xơ cứng hệ thống và các bệnh lý liên quan (như được xem xét bởi Leask và Abraham, FASEB, 2004). Người ta đã chứng minh rằng BMP7 chống lại sự chuyển hóa biểu mô-trung mô gây ra bởi TGF β 1 (EMT) (Zeisberg, M *et al.* Nat. Med, 2003) và cảm ứng collagen (Izumi, N *et al.* AJP. Lung, Cell, Mol., Physiol. 2005) là hai cơ chế chính trong sự phát triển xơ. Bằng chứng trực tiếp về vai trò của Smurf-1 trong bệnh lý xơ hóa đã được chỉ ra trong các mẫu chuột tắc nghẽn niệu đạo một bên (UUO) bị xơ hóa ống thận tiến triển ở thận trong đó mức độ Smurf-1 được tăng cường được thể hiện ở thận bị bệnh liên quan đến mức độ cơ chất cuSmurf-1 bảo vệ, Smad7 giảm (Fukasawa, H *et al.* PNAS, 2004). Gần đây, vai trò đối với Smurf-1 trong xơ phổi đã được gợi ý trong dữ liệu được tạo ra từ các tế bào biểu mô phổi xác định vai trò quan trọng đối với Smad7-cơ chất Smurf-1 trong EMT giới hạn (Shukla, MA, *et al.* Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 2009). Các hợp chất theo sáng chế được bộc lộ ở đây là hữu dụng trong điều trị xơ hóa và các triệu chứng của nó. Xơ hóa được hiểu là bao gồm các trường hợp sau: bệnh nhân mắc xơ phổi, xơ phổi tự phát, xơ nang, xơ gan, xơ màng trong tim, xơ trung thất, xơ tủy nguyên phát, xơ sau màng bụng, xơ khối tiến triển, xơ hệ thống do thận, bệnh Crohn, sẹo lồi, nhồi máu cơ tim ở người cao tuổi, xơ cứng bì (xơ cứng hệ thống), xơ khớp hoặc viêm dính bao khớp vai.

Viêm khớp dạng thấp

Xytokin tiền viêm chẳng hạn như yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF α) đóng vai trò chính trong sự khởi phát và kéo dài các tình trạng viêm mạn tính chẳng hạn như viêm khớp dạng thấp (RA). Giảm mật độ xương thường liên quan đến RA và Smurf-1 đã được chứng minh là đóng vai trò chính trong việc gián tiếp làm loãng xương do RA cảm ứng. Người ta đã chứng minh rằng TNF α kích hoạt phân rã phân hủy protein của cơ chất Smurf-1 Smad1 và Runx2, cả hai cơ chất này cần thiết cho hoạt động nguyên bào xương hình thành xương. Bằng chứng trực tiếp trong việc hỗ trợ liên kết này đã được chỉ ra ở chuột KO smurf-1, trong đó TNF α không ảnh hưởng đến hoạt tính nguyên bào xương từ

chuột KO Smurf-1 nhưng không phải là nguyên bào xương từ chuột kiểu đại tương ứng (Guo, R *et al.* JBC, 2008). Các hợp chất theo sáng chế được bộc lộ là hữu dụng trong điều trị viêm khớp dạng thấp các triệu chứng của nó. RA được hiểu là bao gồm các bệnh nhân mắc viêm hoạt dịch thứ phát và sung các tế bào hoạt dịch mạn tính, dư hoạt dịch và hình thành mô sợi trong khớp. Ngoài ra, RA cũng bao gồm các bệnh nhân mắc RA do u hạt hoại tử, viêm mạch, bệnh mủ da hoại tử hội chứng Sweet, hồng ban nút, viêm mô mỡ chia tủy, teo da ngón, ban đỏ lòng bàn tay hoặc mòn da lan tỏa. RA cũng lan rộng đến các cơ quan khác và ở đây sẽ bao gồm các bệnh nhân mắc xơ ở phổi, thoái hóa dạng tinh bột ở thận, xơ vữa động mạch là kết quả của RA, bệnh viêm màng ngoài tim, viêm màng trong tim, suy thất trái, viêm van tim và xơ. RA cũng bao gồm những bệnh nhân mắc tình trạng về mắt gồm viêm thượng củng mạc và viêm giác kết mạc khô, rối loạn máu gồm thiếu máu tan huyết tự miễn ảm, giảm bạch cầu và tăng tiểu cầu, các tình trạng về thần kinh gồm bệnh lý thần kinh ngoại biên, viêm đơn dây thần kinh đa ổ và hội chứng ống cổ tay, loãng xương và u lympho.

Làm lành xương gãy

Quá trình BMP đóng vai trò trong làm lành xương gãy và các chất ức chế Smurf-1 làm tăng quá trình truyền tín hiệu BMP. Các hợp chất theo sáng chế được bộc lộ là hữu dụng trong điều trị làm lành xương gãy. Làm lành xương gãy được hiểu là bao gồm kỹ thuật phục hồi gãy xương theo đó thiết bị cấy ghép trong màng xương chứa các lỗ mà nguyên bào xương và mô liên kết hỗ trợ có thể di trú vào đó được cấy ghép bằng phẫu thuật ở vị trí gãy xương. Việc dùng chất ức chế Smurf-1 sau khi chèn thiết bị cấy ghép được mô tả ở trên có thể hỗ trợ sự tương hợp thiết bị cấy ghép và đẩy nhanh phục hồi bằng cách tăng cường tăng sinh tế bào gốc trung mô mà biệt hóa nguyên bào xương (Zhao, M *et al.* JBC, 2004).

Bệnh tăng nhãn áp

Áp lực nội nhãn tăng (IOP: Intraocular pressure) là một trong số yếu tố nguy cơ chính đối với bệnh tăng nhãn áp góc mở (POAG: Primary Open Angle Glaucoma) chính. IOP được duy trì ở khoang ngoài (anterior chamber) bởi dịch thể chứa nước được tạo ra ở

thể mi và chảy ra qua vùng lưới sợi mô liên kết. Sự kháng chảy ra dịch thể chứa nước gia tăng liên quan đến sự tích lũy kết tụ chất nền ngoại bào (ECM) ở vùng lưới sợi mô liên kết quan sát được ở các bệnh nhân mắc bệnh tăng nhãn áp. Bệnh lý ECM này ở các bệnh nhân mắc POAG giống như xơ hóa gây ra bởi các protein TGFb trong nhiều hệ không nhãn cầu. Sự tăng IOP gây ra bởi TGFb2 được chứng minh ở các mẫu in vivo và ex vivo tiền lâm sàng. Theo nhiều nghiên cứu lâm sàng quy mô nhỏ, mức độ protein TGFb2 trong dịch thể chứa nước cũng được báo cáo là có mức độ cao ở các bệnh nhân POAG. Điều biến hoạt tính TGFb ở các bệnh nhân mắc bệnh tăng nhãn áp có khả năng giảm IOP và dẫn đến liệu pháp trị bệnh bệnh tăng nhãn áp mới (Wordinger RJ JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY and THERAPEUTICS Volume 30, Number 2, 2014). Xét về vai trò của Smurf1 trong điều hòa truyền tín hiệu TGFb qua cơ chất BMP9 và SMAD 7 của nó, các hợp chất theo sáng chế (hoặc muối được dụng của chúng) được mô tả ở đây hữu dụng trong điều trị bệnh tăng nhãn áp.

Giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT)

Giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT: Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia), cũng được biết là Hội chứng Osler-Weber-Rendu, là rối loạn mạch máu di truyền làm ảnh hưởng ở tỷ lệ từ 1:5000 đến 1:40.000. Người mắc HHT có xu hướng hình thành các mạch máu mà thiếu các mao mạch thông thường giữa động mạch và tĩnh mạch, khiến máu động mạch với áp suất cao chảy trực tiếp vào tĩnh mạch, mà có thể làm vỡ và chảy máu. Triệu chứng của HHT có thể biểu hiện từ nhẹ đến nặng, với 90-95% bệnh nhân bị chảy máu cam ở người trưởng thành, 90-95% phát triển thành giãn mao mạch trên mặt hoặc tay ở tuổi trung niên, và 40% phát triển thành dị dạng động-tĩnh mạch phổi (AVM), có thể gây nguy cơ đáng kể. AVM cũng có thể xảy ra ở não, gan và ruột, với mức độ tác động đến sức khỏe khác nhau. HHT có thể được điều trị, hầu hết là bằng điều trị đông máu, thuyên tắc, hoặc phẫu thuật cắt bỏ mô bị ảnh hưởng. Các đột biến HHT gây đơn bội thiếu ở truyền tín hiệu BMP (Ricard et al. Blood, 2010) tạo ra khuyết thiếu trưởng thành mạch và phân nhánh quá mức mạch máu mà là một phần nguyên nhân, góp phần vào việc truyền tín hiệu BMP9 suy yếu (Choi, et al. PlosOne, 2013). Smurf1 điều hòa giảm truyền tín hiệu BMP (Murakami Exp. Biol. Res. 2010 và Cao, et al. Sci. Rep.

2014) và được báo cáo là được biểu hiện ở các tế bào nội mô (Croese, et al. JBC, 2009 and Human Protein Atlas và GeneCards) và do đó, các chất ức chế Smurf1 có thể dùng để phục hồi truyền tín hiệu BMP và khắc phục sự bất thường của việc hình thành mạch. Vì vậy, các hợp chất theo sáng chế (hoặc muối được dụng của chúng) được mô tả ở đây sẽ hữu dụng trong điều trị HHT.

Bệnh nước tiểu có protein

Lượng protein bất thường trong nước tiểu là một trong những dấu hiệu sớm nhất của bệnh thận mạn tính mà có thể gây ra từ tăng huyết áp, bệnh tiểu đường hoặc các bệnh có liên quan đến viêm nhiễm thận. Nếu không được điều trị, bệnh thận mạn tính có thể dẫn đến bệnh thận giai đoạn cuối hoặc suy thận. Smurf1 tham gia vào nhiều cơ chế liên quan đến chức năng của thận và bệnh nước tiểu có protein. Họ gen tương đồng Ras cơ chất Smurf1, thành viên A (RhoA), đóng vai trò quan trọng trong điều hòa di chuyển tế bào có chân (podocyte) ở thận. Synaptopodin cho phép hình thành sợi căng trong tế bào có chân ở thận bằng cách chặn khả năng của Smurf1 gắn vào và ubiquitin hóa RhoA, do đó thúc đẩy nhu động tế bào có chân và điều biến đặc tính sàng lọc của thanh chắn lọc tế bào có chân của thận (Asanuma, et al. Nat. Cell Biol. 2006). Ngoài ra, chất đối vận nội bào biến nạp yếu tố sinh trưởng (TGF) β , Smad7 đóng vai trò bảo vệ chính ở thận. Hoạt tính Smurf1 được biểu hiện là ubiquitin hóa và phân hủy Smad7 dẫn đến xơ ống thận và rối loạn chức năng thận (Fukasawa, et al. PNAS 2004). Các báo cáo này cùng chỉ ra rằng chất ức chế Smurf1 có khả năng di trú tế bào có chân và duy trì thanh chắn lọc tế bào có chân bên cạnh việc chặn lan truyền việc truyền tín hiệu tiền xơ hóa đến thận cuối cùng là cung cấp lợi ích trị bệnh đối với bệnh nước tiểu có protein. Theo đó, các hợp chất theo sáng chế (hoặc muối được dụng của chúng) sẽ hữu dụng trong điều trị bệnh nước tiểu có protein.

Làm lành vết thương

Các vết thương không lành được mạn tính hầu hết là ở những người trên 60 tuổi dẫn đến một lượng đau thể chất đáng kể và được chia thành ba nhóm: viêm loét tĩnh mạch, tiểu đường và loét các điểm tỳ. Thời gian hoạt động chính xác của quá trình truyền tín hiệu yếu tố sinh trưởng biến nạp (TGF) β và protein hình thái xương (BMP) là cần thiết

trong việc làm lành vết thương thông thường điều hòa quá trình làm lành sơ bộ chính của di trú nguyên bào sợi và kết tụ chất nền ngoại bào, dòng tế bào viêm nhập bào, sự hình thành mạch và tái tạo biểu mô (Pakyari, M et al. *Adv. Wound Care* 2013). Sự hoạt hóa TGF β kéo dài có thể dẫn đến việc làm lành vết thương bị trì hoãn và việc can thiệp điều trị vết thương không lành tạo thành bằng kháng thể kháng-TGF β dẫn đến việc làm lành được cải thiện và sẹo lồi giảm (Lu et al. *J. Am. Coll. Surg.* 2005). Smurf1 điều hòa quy mô truyền tín hiệu TGF β và BMP (Murakami *Exp. Biol. Res.* 2010 và Cao, et al. *Sci. Rep.* 2014, Wang et al. *J. Cell. Mol. Med.* 2012) và do đó, được dự đoán là chất ức chế Smurf1 sẽ chuẩn hóa truyền tín hiệu TGF β quá mức cho phép làm lành vết thương mạn tính. Theo đó, hợp chất theo sáng chế (hoặc muối được dụng của chúng) sẽ hữu dụng trong điều trị vết thương không lành mạn tính và/hoặc làm lành vết thương thông thường.

COPD và hen suyễn

Biến đổi khí quản thể hiện rõ ở những bệnh nhân mắc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD) hoặc hen suyễn. Các đặc điểm nổi bật của biến đổi khí quản ở hen suyễn là xơ, dày lên màng nền, số lượng tế bào hình đài tăng và khối lượng tế bào cơ trơn tăng với phản ứng co tăng được cho là gây ra bởi sự viêm nhiễm mạn tính có vai trò đối với siêu đáp ứng khí quản và tắc nghẽn khí quản đảo ngược (Carroll et al. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1993, Metcalfe, et al. *Physiol. Rev.* 1997 và Roche, et al. *Lancet* 1989). Biến đổi phổi COPD đặc trưng bởi sự mất tổ chức thể bào biểu mô ở khí quản lớn có dị sản vảy, tăng sinh tế bào hình đài và tăng tiết chất nhày, và biến đổi khí quản nhỏ có mở rộng cơ trơn, xơ và phá hủy phế nang trong sự phát triển tràn khí cuối cùng dẫn đến sự hạn chế lưu lượng khí (De, Decramer, et al. *Lancet*, 2012, Pain et al. *Eur. Respir. Rev.* 2014 và Chung, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2005). Ở cả hai bệnh, có bằng chứng về sự truyền tín hiệu BMP điều hòa giảm (Kariyawasam, et al. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2008) và TGF β tăng (Mak. Et al. *Respir. Med.* 2009 và Chakir et al. *J. All. Clin. Immunol.* 2003) liên kết với cơ chế tiền biến đổi chẳng hạn như chuyển đổi nguyên bào sợi-trung mô (Araya, et al. *J. Clin. Invest.* 2007), kết tụ chất nền ngoại bào (Baarsma, et al. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. PHysiol.* 2011) và viêm nhiễm (Chakir et al. *J. All. Clin. Immunol.* 2003). Các chất ức chế Smurf1 có thể chuẩn hóa hướng hóa truyền tín hiệu TGF β ở tế bào tiền biến đổi

quyết định chẳng hạn như cơ trơn và nguyên bào sợi và chặn sự tiến triển việc biến đổi tạo thành lợi ích trị bệnh đối với bệnh nhân COPD hoặc hen suyễn. Theo đó, các hợp chất theo sáng chế (hoặc muối được dụng của chúng) sẽ là hữu dụng trong việc điều trị COPD và/hoặc hen suyễn.

Do đó, như phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó trong liệu pháp trị bệnh. Theo phương án khác, liệu pháp trị bệnh được chọn từ bệnh mà có thể được điều trị bằng ức chế Smurf-1. Theo phương án khác, bệnh được chọn từ danh sách được đề cập ở trên, thích hợp là tăng huyết áp phổi, bao gồm tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, và làm lành xương gãy; thích hợp hơn là tăng huyết áp động mạch phổi (PAH). Theo phương án khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I hoặc muối được dụng của nó, trong điều trị bệnh được chọn từ bệnh tăng nhãn áp, giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lành vết thương, COPD và hen suyễn.

Do đó, như phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó, để sử dụng trong liệu pháp trị bệnh. Theo phương án khác, liệu pháp trị bệnh được chọn từ bệnh mà có thể được điều trị bằng cách ức chế Smurf-1. Theo phương án khác, bệnh được chọn từ danh sách được liệt kê ở trên, thích hợp là tăng huyết áp phổi, bao gồm tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, và làm lành xương gãy; thích hợp hơn là tăng huyết áp động mạch phổi (PAH). Theo phương án khác, bệnh được chọn từ bệnh tăng nhãn áp, giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lành vết thương, COPD và hen suyễn.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh mà được điều trị bằng cách ức chế Smurf-1 bao gồm dung lượng có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó. Theo phương án khác, bệnh được chọn từ danh sách được liệt kê ở trên, thích hợp là tăng huyết áp phổi, bao gồm tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, và làm lành xương gãy; thích hợp hơn là tăng huyết áp động mạch phổi (PAH).

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh thông qua ức chế Smurf-1, phương pháp này bao gồm việc dùng lượng có hiệu quả của hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó, trong đó bệnh được chọn từ bệnh tăng nhãn áp,

giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lành vết thương, COPD và hen suyễn.

Do đó, như phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó để sản xuất thuốc chữa bệnh. Theo phương án khác, thuốc chữa bệnh dùng cho điều trị bệnh mà được điều trị bằng cách ức chế Smurf-1. Theo phương án khác, bệnh được chọn từ danh sách được liệt kê ở trên, thích hợp là tăng huyết áp phổi, bao gồm tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, và làm lành xương gãy; thích hợp hơn là tăng huyết áp động mạch phổi (PAH).

Theo phương án khác, thuốc chữa bệnh để điều trị bệnh được chọn từ bệnh tăng nhãn áp, giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lành vết thương, COPD và hen suyễn.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimetyl-1,4-dioxan-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó để sử dụng trong điều trị tăng huyết áp phổi, bao gồm tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, và làm lành xương gãy; thích hợp hơn là tăng huyết áp động mạch phổi (PAH).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimetyl-1,4-dioxan-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị bệnh tăng nhãn áp, giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lành vết thương, COPD và hen suyễn.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(5,5-đimetyl-1,3-dioxan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó để sử dụng trong điều trị tăng huyết áp phổi, bao gồm tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, và làm lành xương gãy; thích hợp hơn là tăng huyết áp động mạch phổi (PAH).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(5,5-đimetyl-1,3-dioxan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị bệnh tăng nhãn áp, giãn mao mạch

xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lành vết thương, COPD và hen suyễn.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó để sử dụng trong điều trị

Tăng huyết áp phổi, bao gồm tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, và làm lành xương gãy; thích hợp hơn là tăng huyết áp động mạch phổi (PAH).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị bệnh tăng nhãn áp, giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lành vết thương, COPD và hen suyễn.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất [N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit] hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó để sử dụng trong điều trị tăng huyết áp phổi, bao gồm tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, và làm lành xương gãy; thích hợp hơn là tăng huyết áp động mạch phổi (PAH).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất [N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit] hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị bệnh tăng nhãn áp, giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lành vết thương, COPD và hen suyễn.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit hoặc muối được dụng hoặc đồng tinh thể của nó để sử dụng trong điều trị tăng huyết áp phổi, bao gồm tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, và làm lành xương gãy; thích hợp hơn là tăng huyết áp động mạch phổi (PAH).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị bệnh tăng nhãn áp,

giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), bệnh nước tiểu có protein, làm lành vết thương, COPD và hen suyễn.

Dược phẩm hoặc chế phẩm kết hợp theo sáng chế có thể ở dạng liều đơn vị chứa khoảng 1-1000mg (các) thành phần hoạt tính cho đối tượng khoảng 50-70kg, hoặc khoảng 1-500mg hoặc khoảng 1-250mg hoặc khoảng 1-150mg hoặc khoảng 0,5-100mg, hoặc khoảng 1-50mg thành phần hoạt tính. Dạng bào chế có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất, dược phẩm, hoặc chế phẩm kết hợp của nó, phụ thuộc vào loại đối tượng, trọng lượng cơ thể, tuổi và tình trạng cá nhân, rối loạn hoặc bệnh hoặc mức độ nghiêm trọng của nó mà đang được điều trị. Bác sĩ, bác sĩ lâm sàng hoặc bác sĩ thú y có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định lượng hiệu quả của mỗi thành phần hoạt tính cần thiết để ngăn ngừa, điều trị hoặc ức chế tiến trình của rối loạn hoặc bệnh.

Đặc tính của dạng bào chế nêu trên có thể chứng minh bằng các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* sử dụng động vật có vú một cách thuận lợi, ví dụ, chuột nhắt, chuột, chó, khỉ hoặc các cơ quan được phân lập, các mô và các chế phẩm của nó. Các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng *in vitro* ở dạng dung dịch, ví dụ, dung dịch chứa nước, và *in vivo* qua đường ruột, đường ngoài tiêu hóa, đường tĩnh mạch, thuận lợi là theo đường tĩnh mạch, ví dụ, như huyền phù hoặc dung dịch chứa nước. Dạng bào chế *in vitro* có thể thay đổi nồng độ mol trong khoảng từ 10^{-3} đến 10^{-9} . Lượng có hiệu quả điều trị bệnh *in vivo* có thể thay đổi phụ thuộc vào con đường dùng, trong khoảng 0,1-500mg/kg, hoặc trong khoảng 1-100mg/kg.

Hoạt tính của hợp chất theo sáng chế có thể được đánh giá bằng các phương pháp *in vitro* & *in vivo* sau.

Thử nghiệm được học

Các hợp chất theo sáng chế và muối được dùng của chúng, sau đây gọi cách khác là "các chất theo sáng chế", hữu dụng làm dược phẩm. Cụ thể là, hợp chất là các chất ức chế Smurf-1 chọn lọc, và có thể được khảo nghiệm theo các thử nghiệm sau đây. Để xác định tính chọn lọc HECT E3 ligaza của hợp chất này, sử dụng bảng gồm các thử nghiệm ubiquitinyl hóa tự động HECT ligaza E3 hóa sinh (Smurf-1, Smurf-2, WWP1, WWP2, ITCH, Nedd4, Nedd4L và E6AP). Cộng hợp ubiquitin với cơ chất protein là quy trình

nhiều bước. Ở bước đòi hỏi ATP ban đầu, liên kết thioeste được hình thành giữa đầu cacboxyl của ubiquitin và gốc xystein bên trong của enzym hoạt hóa ubiquitin (E1). Sau đó ubiquitin đã được hoạt hóa được chuyển vào gốc xystein cụ thể của enzym liên hợp ubiquitin (E2). Các E2 cho HECT ligaza E3 (E3) ubiquitin từ đó nó được biến nạp vào cơ chất protein. Các HECT ligaza E3 có thể tự động ubiquitinyl hóa. Điều này được phát hiện trong thử nghiệm truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang phân giải thời gian (TR-FRET: Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) được sử dụng trong bảng thử nghiệm này. Hỗn hợp phản ứng chứa E1, E2, E3 đánh dấu, ubiquitin liên hợp biotin, hợp chất và ATP trong chất đệm phù hợp và ủ trong 45 phút để ubiquitinyl hóa tự động ligaza E3. Để đo mức độ ligaza E3 được ubiquitinyl hóa bằng TR-FRET, chất cho huỳnh quang Europi cryptat (Eu3+cryptat), được liên hợp với streptavidin tiếp theo gắn kết với ubiquitin được biotinyl hóa, và alophycocyanin XL665 biến đổi (chất nhận huỳnh quang sơ cấp HTRF®) được gắn với kháng thể gắn nhãn cụ thể (HA, His hoặc GST), nhận biết protein dung hợp ligaza E3 tương ứng, được thêm vào sau khi hoàn thành phản ứng. Khi hai nhóm huỳnh quang này được nối lại với nhau bằng tương tác sinh học phân tử (trong trường hợp này, ubiquitinyl hóa ligaza E3), một phần năng lượng đạt được bởi Cryptat trong suốt quá trình kích thích được giải phóng qua phát xạ huỳnh quang ở 620nm, trong khi năng lượng còn lại được chuyển vào XL665. Sau đó năng lượng này được giải phóng bởi XL665 như huỳnh quang đặc hiệu ở 665nm. Ánh sáng ở 665nm được phát xạ chỉ qua FRET bằng Europi. Bởi vì Europi Cryptat có trong thử nghiệm, ánh sáng ở 620nm được phát hiện thậm chí khi tương tác sinh học phân tử không mang XL665 trong phạm vi gần. Ubiquitinyl hóa tự động Smurf-1 ở tế bào dẫn đến phân giải proteasom của Smurf-1. Do đó, ức chế miền xúc tác Smurf-1 bãi bỏ ubiquitinyl hóa tự động và phân giải Smurf-1, dẫn đến tích lũy protein Smurf-1 được ức chế trong tế bào. Hoạt tính tế bào của hợp chất ở miền HECT Smurf-1 được thử nghiệm bằng cách đo tích lũy protein Smurf-1 trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định Smurf-1 được gắn nhãn ProLabel trong sự kiểm soát của promotor cảm ứng tetracyclin, sử dụng kit dò DiscoverX PathHunter ProLabel. Kỹ thuật này đo lượng Smurf-1 được gắn nhãn ProLabel trong các thử nghiệm bổ trợ enzyme của dịch thủy phân tế bào. Theo phương pháp này, mảnh bổ trợ 4kDa nhỏ của beta-galactosidaza, được gọi là ProLabel, được biểu

hiện là dung hợp đầu N với Smurf-1 của người. Nhãn này là thể cho enzym (ED: Enzyme Donor) và cho phép phát hiện các mức độ protein đích sau khi bổ trợ phần lớn beta-galactosidaza, EA được đặt cho thể nhận enzym, để tạo thành beta-galactosidaza có chức năng. EA được thêm ngoại sinh vào dịch thủy phân tế bào. Hoạt tính enzym được đo bằng cách sử dụng cơ chất hóa phát quang và tỷ lệ thuận với lượng enzym được tái hoàn nguyên và do đó tỷ lệ thuận với nồng độ Smurf-1.

Các hợp chất thử nghiệm và tham chiếu được điều chế ở nồng độ 180x [cuối] trong DMSO 90%, và pha loãng 1:3 trong DMSO 90%.

Đối với bảng thử nghiệm hóa sinh, chuyển 50nl hợp chất thử nghiệm, hợp chất tham chiếu và chất đệm/đối chứng DMSO vào giếng tương ứng của đĩa trắng GREINER "SMALL VOLUME" PS 384 giếng. Bảng thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ phòng ở máy xử lý chất lỏng Biomek FX. Thêm 4,5ul/giếng dung dịch ligaza E3 vào đĩa thử nghiệm chứa 50nl hợp chất hoặc dung dịch đối chứng trong DMSO 90%, sau đó thêm 4,5ul hỗn hợp E1/E2/Ub được ủ trước hoặc ubiquitin được pha loãng trước (đối chứng LOW). Lắc mạnh các đĩa sau khi thêm. Trong thử nghiệm này, nồng độ hợp chất trong khoảng từ 3nM đến 10uM trong đường cong đáp ứng liều 8 điểm.

Sau khi ủ 45 phút, dừng phản ứng ubiquitinyl hóa bằng cách thêm 4,5ul NEM 2mM, sau đó thêm trực tiếp 4,5ul dung dịch dò gồm kháng thể đánh dấu XL665 và europi được gắn streptavidin để thu được tổng thể tích là 18ul. Sau khi ủ 45 phút trong bóng tối, chuyển các đĩa vào máy đọc huỳnh quang Pherastar để đo tín hiệu TR-FRET.

Đối với thử nghiệm tế bào, 250nl hợp chất thử nghiệm, hợp chất tham chiếu và chất đệm/đối chứng DMSO sau đó được chuyển vào giếng tương ứng của đĩa nuôi cấy mô GREINER PS, CELLSTAR, uClear trắng 384 giếng 120ul vô trùng. Để phân phối dung dịch hợp chất đồng đều trong môi trường trước khi thêm tế bào, thêm 10ul môi trường nuôi cấy tế bào vào mỗi giếng của đĩa chứa hợp chất sử dụng máy phân phối MULTIDROP 384 và lắc mạnh. Các tế bào được tách ra khỏi bình phản ứng sau khi ủ nhanh bằng trypsin-EDTA, đếm và pha loãng đến nồng độ $1,5 \times 10^6$ tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy. Sự biểu hiện Smurf-1 được cảm ứng bằng cách thêm doxyxylin đến nồng độ cuối cùng là 0,2ug/ml. Thêm 10ul huyền phù tế bào vào mỗi giếng của đĩa chứa hợp chất bằng cách sử dụng máy phân phối MULTIDROP 384. Ủ các đĩa này qua đêm ở

37°C, 5%CO₂. Trong thử nghiệm này, nồng độ hợp chất trong khoảng từ 6,75nM đến 22,5uM trong đường cong đáp ứng liều 8 điểm.

Sau khi ủ qua đêm với các hợp chất, nồng độ Smurf-1 được xác định bằng cách sử dụng kit dò PathHunter Prolabel từ DiscoverX. Đầu tiên, thêm 10ul dung dịch gốc dò lysis/CL bằng tay sử dụng pipet đa kênh, sau đó thêm 5ul chất nhận enzym EA. Trộn các đĩa bằng máy lắc đĩa và ủ trong 2-3 giờ ở nhiệt độ phòng trước khi đo tín hiệu hóa phát quang bằng máy đọc đĩa PherStar.

Các hợp chất theo các ví dụ dưới đây, có giá trị IC₅₀ Smurf-1 trong các phép đo dữ liệu được mô tả ở trên như được thể hiện trong bảng A.

Bảng A

Ví dụ	Smurf-1 / IC50 nM
1	2,8
1.1	2,1
1.2	14
1.3	1,8
1.4	3,2
1.5	6,0
1.6	8,0
1.7	33
2	2,5
2.1	64
2.2	0,9
3	6,0
4	100
5	310
6	5,7
6.1	23

7	19
8	46
9	58
10	50
11	420
12	100
13	640
13a	290
13b	730
14	2500
15a	290
15b	630
16	37
17	980
18	91
19	1800
20	180
21.1	630
21.2	490
22	570
22a	420
22b	5100
22c	1,4
23	160
24	340
24a	350
24b	250
25a	160
25b	75

25c	840
25d	74
26	580

Có thể dùng hợp chất theo sáng chế đồng thời với, hoặc trước, hoặc sau, một hoặc nhiều chất trị bệnh khác. Hợp chất theo sáng chế có thể được dùng riêng, bằng đường dùng giống hoặc khác nhau. Chất trị bệnh là, ví dụ, hợp chất hóa học, peptit, kháng thể, mảnh kháng thể hoặc axit nucleic, mà có hoạt tính trị bệnh hoặc tăng cường hoạt tính trị bệnh khi cho bệnh nhân dùng kết hợp với hợp chất theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất sản phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó và ít nhất một chất trị bệnh làm chế phẩm kết hợp để sử dụng đồng thời, riêng biệt hoặc lần lượt trong liệu pháp trị bệnh. Theo một phương án, điều trị bệnh là điều trị bệnh hoặc tình trạng gây ra bởi Smurf-1. Các sản phẩm được đề xuất làm chế phẩm kết hợp bao gồm chế phẩm chứa hợp chất có công thức (I) và (các) chất trị bệnh khác trong cùng dược phẩm, hoặc hợp chất có công thức (I) và (các) chất trị bệnh khác ở dạng riêng biệt, ví dụ ở dạng kit.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó và (các) chất trị bệnh khác. Tùy ý, dược phẩm có thể chứa chất mang được dùng, như được mô tả ở trên.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kit bao gồm hai hoặc nhiều dược phẩm riêng biệt, ít nhất là một trong số chúng chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó. Theo một phương án, kit chứa thiết bị để chứa riêng các dược phẩm này, chẳng hạn như dụng cụ chứa, bình phân chia, hoặc gói kim loại phân chia. Ví dụ về kit này là gói vỉ, thông thường là được sử dụng để đóng gói viên nén, viên nang và tương tự.

Kit theo sáng chế có thể được sử dụng để dùng nhiều dạng bào chế khác nhau, ví dụ, qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, để dùng dược phẩm riêng biệt ở các khoảng dạng bào chế khác nhau, hoặc để chuẩn độ dược phẩm riêng biệt với dược phẩm khác. Để hỗ trợ việc tuân thủ, thông thường kit theo sáng chế bao gồm các hướng dẫn sử dụng.

Liệu pháp kết hợp theo sáng chế, hợp chất theo sáng chế và chất trị bệnh khác có thể được điều chế và/hoặc bào chế bởi nhà sản xuất giống hoặc khác nhau. Ngoài ra, hợp chất

theo sáng chế và chất trị bệnh khác có thể được đưa vào cùng liệu pháp kết hợp: (i) trước khi phát hành sản phẩm kết hợp đến các bác sĩ (ví dụ trong trường hợp kit chứa hợp chất theo sáng chế và chất trị liệu khác); (ii) bởi chính các bác sĩ (hoặc dưới sự hướng dẫn của bác sĩ) ngay trước khi dùng; (iii) ở chính bệnh nhân, ví dụ trong suốt quá trình dùng liên tục hợp chất theo sáng chế và chất trị bệnh khác.

Theo đó, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó để điều trị bệnh hoặc tình trạng gây ra bởi Smurf-1, trong đó được phẩm được bào chế để dùng với chất trị bệnh khác. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng chất trị bệnh khác để điều trị bệnh hoặc tình trạng gây ra bởi Smurf-1, trong đó được phẩm được dùng với hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng gây ra bởi Smurf-1, trong đó hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó được điều chế để dùng với chất trị bệnh khác. Sáng chế cũng đề xuất chất trị bệnh khác để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng gây ra bởi Smurf-1, trong đó chất trị bệnh khác được điều chế để dùng với hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó. Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức (I) để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng gây ra bởi Smurf-1, trong đó hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó được dùng với chất trị bệnh khác. Sáng chế cũng đề xuất chất trị bệnh khác để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng gây ra bởi Smurf-1, trong đó chất trị bệnh khác được dùng với hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó để điều trị bệnh hoặc tình trạng gây ra bởi Smurf-1, trong đó bệnh nhân đã được điều trị trước đó (ví dụ, trong 24 giờ) bằng chất trị bệnh khác. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng chất trị bệnh khác để điều trị bệnh hoặc tình trạng gây ra bởi Smurf-1, trong đó bệnh nhân được điều trị trước đó (ví dụ, trong 24 giờ) bằng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau nhằm để minh họa cho sáng chế và không có ý định làm giới hạn sáng chế. Nhiệt độ được dùng là độ C (độ bách phân). Nếu không được quy định khác, tất cả

quá trình bay hơi được tiến hành trong áp suất giảm, thông thường là khoảng 15mm Hg và 100mm Hg (= 20-133mbar). Cấu trúc của sản phẩm cuối cùng, chất trung gian và nguyên liệu khởi đầu được xác nhận bằng các phương pháp phân tích chuẩn, ví dụ, vi phân tích và đặc điểm quang phổ, ví dụ, MS, IR, NMR. Các ký hiệu viết tắt được sử dụng là các từ thông dụng trong lĩnh vực.

Tất cả nguyên liệu khởi đầu, chất căn bản, chất phản ứng, axit, bazơ, chất khử nước, dung môi, và chất xúc tác được dùng để tổng hợp các hợp chất theo sáng chế sẵn có trên thị trường hoặc có thể được điều chế bằng các phương pháp tổng hợp hữu cơ đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ngoài ra, các hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế bằng các phương pháp tổng hợp hữu cơ đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này như được thể hiện trong phần ví dụ sau đây.

Các điều kiện chung:

Khối phổ thu được trên hệ thống LC-MS, SFC-MS, hoặc GC-MS bằng cách sử dụng các phương pháp ion hóa tác động phun điện, hóa học và điện tử từ một loạt các thiết bị theo cấu hình sau: hệ thống Agilent 1100 HPLC với khối phổ Agilent 6110 [M+H]⁺ dùng để chỉ ion phân tử được proton hóa của loại hóa học.

Phổ NMR được chạy trên Bruker AVANCE 400MHz hoặc khối phổ 500MHz NMR bằng cách sử dụng ICON-NMR, theo sự điều khiển của chương trình TopSpin. Khối phổ được đo ở 298K, nếu không có quy định khác, và được tham chiếu tương ứng với cộng hưởng dung môi.

Thiết bị đo

Phương pháp MS: Sử dụng hệ Agilent 1100 HPLC với khối phổ Agilent 6110

LowpH_v002

Cột: Phenomenex Gemini C18 50x4,6mm, 3,0μm

Nhiệt độ cột: 50°C

Dung môi rửa giải: A: H₂O, B: metanol, cả hai chứa TFA 0,1%

Tốc độ dòng: 1,0ml/min

Gradient: 5% đến 95% B trong 2,0 min, 0,2 min 95% B

2minLC_v003

Cột: Waters BEH C18 50x2,1 mm, 1,7 μ m

Nhiệt độ cột: 50°C

Dung môi rửa giải: A: H₂O, B: axeonitril, cả hai chứa TFA 0,1%

Tốc độ dòng: 0,8ml/min

Gradient: 0,20 min 5% B; 5% đến 95% B trong 1,30min, 0,25min 95% B

8minLowpHv01:

Cột: Waters Acquity CSH 1,7 μ m, 2.1 x 100mm

Nhiệt độ: 50°C

Pha động: A: Nước + Axit formic 0,1% B: Axetonitril + Axit formic 0,1%

Tốc độ dòng: 0,7mL/min

Gradient: 0,0min 2%B, 0,3-6,5min 2-98%B, 6,5-7,5min 98%B, 7,5-8,0min 5-98%B

2minLowpH:

Cột: Waters Acquity CSH 1,7 μ m, 2,1 x 50mm

Nhiệt độ: 50°C

Pha động: A: Nước + Axit formic 0,1% B: Axetonitril + Axit formic 0,1%

Tốc độ dòng: 1,0mL/min

Gradient: 0,0min 5%B, 0,2-1.3min 5-98%B, 1.3-1,55min 98%B, 1,55-1,6min 98-5%B

2minLowpHv01:

Cột: Waters Acquity CSH 1,7 μ m, 2,1 x 50mm

Nhiệt độ: 50°C

Pha động: A: Nước + Axit formic 0,1% B: Axetonitril + Axit formic 0,1%

Tốc độ dòng: 1,0mL/min

Gradient: 0,0min 5%B, 0,2-1,55min 5-98%B, 1,55-1,75min 98%B, 1,75-1,8min 98-5%B

2minLowpHv03:

Cột: Waters Acquity CSH 1,7 μ m, 2,1 x 50mm

Nhiệt độ: 50°C

Pha động: A: Nước + Axit formic 0,1% B: Axetonitril + Axit formic 0,1%

Tốc độ dòng: 1,0mL/min

Gradient: 0,0min 5%B, 0,2-1,8min 5-98%B, 1,8-2,1min 98%B, 2,1-2,3min 98%B

2minHighpHv03:

Cột: Waters Acquity CSH 1,7 μ m, 2,1 x 50mm

Nhiệt độ: 50°C

Pha động: A: Nước + 0,1% Ammonia B: Axetonitril + 0,1% Ammonia

Tốc độ dòng: 1,0mL/min

Gradient: 0,0min 5%B, 0,2-1,8min 5-98%B, 1,8-2,1min 98%B, 2,1-2,3min 98-5%B

10minLowpHv01:

Cột: Waters Acquity CSH 1,7 μ m, 2,1 x 100mm

Nhiệt độ: 50°C

Pha động: A: Nước + Axit formic 0,1%

B: Axetonitril + Axit formic 0,1%

Tốc độ dòng: 0,7mL/min

Gradient: 0,0min 2%B, 0,5-8,0min 2-98%B, 8,0-9,0min 98%B, 9,0-9,1min 98-2%B

LCMS (SRPb)

Cột: Acquity HSS T3 2.1 x 50mm, 1,8 micron

Nhiệt độ cột: 60°C

Dung môi rửa giải: A: H₂O (axit formic 0,05%, amoni axetat 3,75mM)

B: axetonitril (axit formic 0,05%)

Tốc độ dòng: 1,0mL/min

Gradient: 5% đến 98% trong 1,4min

Ký hiệu viết tắt:

aq	chứa nước
br	rộng
d	đỉnh đôi
dd	đỉnh đôi kép
DBU	1,8-diazabixycloundec-7-en
DCM	diclometan
DIBAL-H	diisobutylaluminium hydrit
DIPEA	diethylisopropylamin
DME	dimetoxyetan
DMF	N,N-dimetylformamit
DMSO	đimetylsulfoxit
°C	độ C
EDCI	1-etyl-3-(3-đimetylaminopropyl)cacbodiimit
Et ₂ O	dietylete
EtOAc	etyl axetat
EtOH	etanol
Et ₃ N	trietylamin
HATU	(1-[bis(đimetylamino)metylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxit hexaflophosphat
HCl	axit clohydric
hr (s)	giờ
H ₂ SO ₄	axit sulfuric
K ₂ CO ₃	Kali cacbonat
KHMDS	Kali bis(trimetylsilyl)amit
KOAc	kali axetat
LCMS	sắc ký lỏng và khối phổ
LDA	litium diisopropylamit
M	phân tử
MgSO ₄	magie sulfat
MeCN	axeonitril

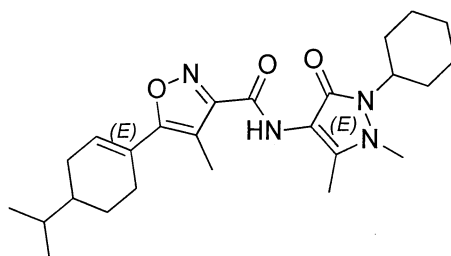
MeOH	metanol
MS	khối phổ
Mult(s)	đỉnh đa
mg	miligam
min	phút
ml	mililit
mmol	milimol
m/z	tỷ lệ khối lượng trên điện tích
NaBH ₄	natri borohydrit
NaH	natri hydrit
NaHCO ₃	natri hydro cacbonat
NaOH	natri hydroxit
Na ₂ SO ₄	natri sulfat
n-BuLi	butyllitium
NH ₄ Cl	amoni clorua
NMP	N-metylpyrrolidon
NMR	cộng hưởng từ hạt nhân
PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	Paladi(bis triphenylphosphin) diclorua
PdCl ₂ (dppf)	1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen-paladi(II)diclorua
	PdCl ₂ (dppf)-CH ₂ Cl ₂ phức 1,1'-
	bis(diphenylphosphino)feroxen-paladi(II)diclorua diclometan
Pd(Ph ₃ P) ₄	Tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0)
ppm	một phần triệu
pTsOH	axit <i>p</i> -toluensulfonic
q	đỉnh tư
<i>rac</i>	raxemic
Rt	thời gian lưu
s	đỉnh đơn
t	đỉnh ba
TBAI	tetrabutylamoni iodua

TBAF	tetrabutylamoni florua
TBME	metyl tert-butyl ete
TFA	axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran
TMSCl	trimetylsilyl clorua
TMSOTf	trimetylsilyl triflat
UV	tia cực tím

Điều chế các hợp chất cuối cùng

Ví dụ 1:

[N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit]



Bước 1: [4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl triflometansulfonat]

Xử lý dung dịch chứa 4-isopropylxyclohexanon (1g, 7,13mmol) trong THF khan (3mL) trong nitơ và được làm lạnh đến -70°C bằng cách thêm từng giọt LDA 2M (trong THF/heptan/etylbenzen) (4,28mL, 8,56mmol). Sau khi việc thêm hoàn thành, khuấy hỗn hợp ở -70°C trong 1,5 giờ. Thêm dung dịch 1,1,1-triflo-N-(pyridin-2-yl)-N-((triflometyl)sulfonyl)metansulfonamit (2,81g, 7,84mmol) trong THF khan (2mL) vào hỗn hợp. Duy trì phản ứng ở -70°C , khuấy trong 3 giờ và làm ngừng từ từ bằng nước và để nguyên qua đêm. Chiết hỗn hợp tạo thành bằng dietyl ete và rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng NaOH 10% (aq), làm khan qua MgSO_4 và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để

thu được nguyên liệu thô. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng iso-hexan 100% thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5,76 (1H, t), 2,45-2,30 (2H, mults), 2,22 (1H, br d), 1,99-1,90 (2H, mults), 1,61-1,52 (1H, mult), 1,48-1,36 (2H, mults), 0,93 (6H, dd).

Bước 2: [2-(4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl)-4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan]

Xử lý dung dịch đã khuấy [4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl triflometansulfonat] (1,75g, 6.43mmol) trong dioxan (30mL) bằng bispinacolatodiboron (1,714g, 6,75mmol), kali axetat (1,892g, 19,28mmol) và sản phẩm cộng $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (0,157g, 0,193mmol) và khuấy hỗn hợp ở 80°C trong 6 giờ. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng EtOAc và rửa bằng nước. Làm khan lớp hữu cơ qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được nguyên liệu thô. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-30% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 3: [Etyl 5-(4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat]

Thêm [2-(4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl)-4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan] (282mg, 1,127mmol), etyl 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian A) (264mg, 1,127mmol), $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (82mg, 0,113mmol), kali cacbonat (467mg, 3,38mmol), MeCN (2mL) và nước (0,667mL) vào lọ vi sóng 2-5mL. Sục khí nitơ vào trong lọ, đậy nắp và đặt trong lò vi sóng ở 80°C trong 1 giờ. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng EtOAc và tách nước và các lớp. Làm khan phần hữu cơ MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được dầu màu nâu, thô. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-10% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: $R_t = 1,73\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 278.5; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 4: [axit 5-(4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic]

Thêm natri hydroxit (aq) 2M (0,166mL, 0,332mmol) vào dung dịch [etyl 5-(4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat] (92mg, 0,332mmol) trong THF (5mL) và MeOH (3mL) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Cô đặc hỗn

hợp tạo thành trong áp suất giảm và pha loãng bằng nước. Rửa lớp chứa nước bằng EtOAc, axit hóa bằng HCl 2M (aq) và chiết bằng EtOAc. Làm cô dịch chiết hữu cơ qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,70 min; MS m/z [M+H]⁺ 250,2; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 5: [N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit]

Thêm DMF (0,026mL, 0,337mmol) vào dung dịch [axit 5-(4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic] (42mg, 0,168mmol) trong DCM khô (3mL) trong nitơ, sau đó thêm oxalyl clorua (0,016mL, 0,185mmol) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 30min. Sau đó thêm triethylamin (0,070mL, 0,505mmol) vào 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (38,8mg, 0,185mmol) và khuấy hỗn hợp trong 30 min. Thêm nước và mà khuấy mạnh hỗn hợp trước khi đưa qua hộp tách pha. Thu và cô đặc dung môi rửa giải hữu cơ trong áp suất giảm để thu được dầu màu cam. Hòa tan nguyên liệu thô trong DMSO (0,9mL) và tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký pha đảo tự động hóa khối phổ trực tiếp trong 9,5 phút Gradient của MeCN 50-98% trong nước (axit formic 0,1%). Cô đặc phần sản phẩm trong áp suất giảm. Xử lý dung dịch còn lại bằng dung dịch chứa nước bão hòa chứa natri hydro cacbonat và chiết bằng DCM, đưa dịch chiết hữu cơ qua hộp tách pha. Loại bỏ dung môi trong dòng khí và làm khô trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

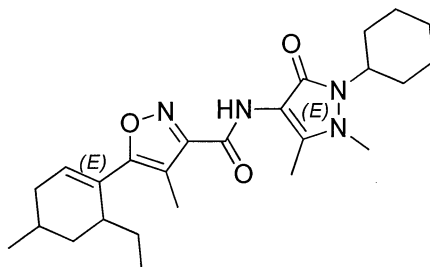
LC-MS: Rt = 4,98min; MS m/z [M+H]⁺ 441,4; phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,04 (1H, br s), 6,33 (1H, s), 4,06 (1H, tt), 3,26 (3H, s), 2,62 (1H, br d), 2,48-2,35 (2H, mults), 2,31 (3H, s), 2,22 (3H, s), 2,05-1,86 (8H, mults), 1,71 (1H, br d), 1,60-1,52 (1H, mults), 1,43-1,17 (5H, mults), 0,96 (3H, d), 0,94 (3H, d).

Điều chế ví dụ 1.1 đến 1.2 bằng phương pháp tương tự với phương pháp của ví dụ 1 bằng cách thay thế 4-isopropylxyclohexanon (Bước 1) bằng chất dẫn xuất keton thích hợp (có bán sẵn trên thị trường hoặc điều chế như được mô tả sau đây).

Ví dụ 1.1:

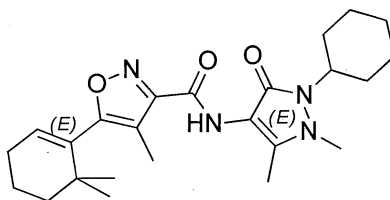
Hỗn hợp đồng phân không đối quang của N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(6-etyl-4-metylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



LC-MS: Rt = 4,90min; MS m/z [M+H]⁺ 441,1; phương pháp 8minLowpHv01

Ví dụ 1.2:

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(6,6-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

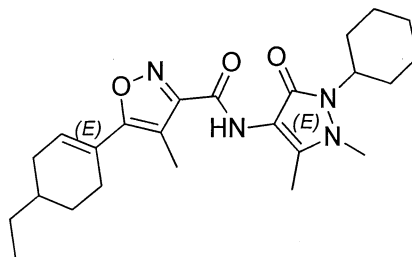


LC-MS: Rt = 4,60min; MS m/z [M+H]⁺ 427,7; phương pháp 8minLowpHv01

Điều chế ví dụ 1.3 đến 1.7 bằng phương pháp tương tự với phương pháp của ví dụ 1 bằng cách thay thế 2-(4-isopropylxcyclohex-1-en-1-yl)-4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan (Bước 3) bằng axit boronic thích hợp hoặc dẫn xuất dioxaborolan (có sẵn trên thị trường hoặc cách điều chế được mô tả sau đây).

Ví dụ 1.3:

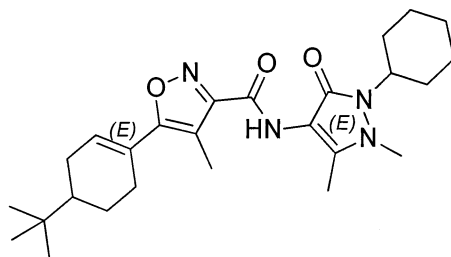
[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-etylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit]



LC-MS: Rt = 4,77min; MS m/z [M+H]⁺ 427,6; phương pháp 8minLowpHv01

Ví dụ 1.4:

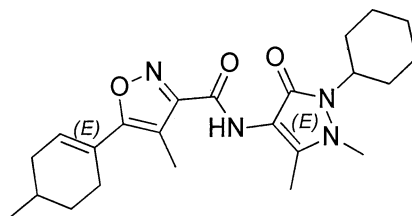
[5-(4-(tert-butyl)cyclohex-1-en-1-yl)-N-(2-cyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit]



LC-MS: Rt = 5,16min; MS m/z [M+H]⁺ 455,4; phương pháp 8minLowpHv01

Ví dụ 1.5:

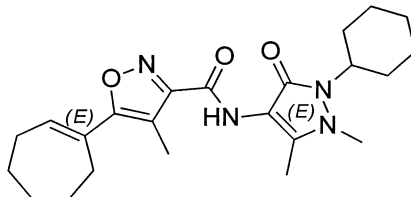
[N-(2-cyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(4-metylcyclohex-1-en-1-yl)isoxazol-3-cacboxamit]



LC-MS: Rt = 4,47min; MS m/z [M+H]⁺ 414,5; phương pháp 8minLowpHv01

Ví dụ 1.6:

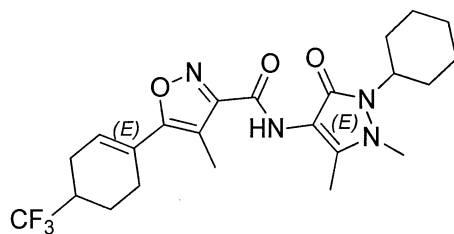
5-(xyclohept-1-en-1-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



LC-MS: Rt = 4,42min; MS m/z [M+H]⁺ 413,6; phương pháp 8minLowpHv01

Ví dụ 1.7:

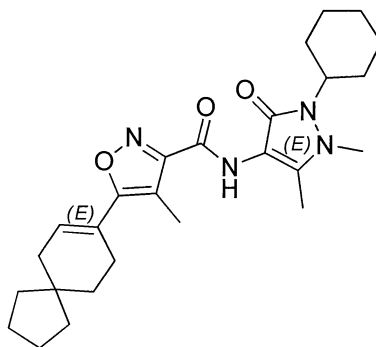
[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(4-(triflometyl)xyclohex-1-en-1-yl)isoxazol-3-cacboxamit]



LC-MS: Rt = 1,36min; MS m/z [M+H]⁺ 467,4; phương pháp 2minLowpHv03

Ví dụ 2:

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit



Bước 1: Spiro[4.5]dec-6-en-8-on

Thêm methyl vinyl keton (Alfa Aesar) (0,684mL, 8,36mmol) vào dung dịch xyclopentancarbaldehyt (Aldrich) (0,82g, 8,36mmol) trong toluen khô (10mL), sau đó thêm lượng xúc tác H_2SO_4 đặc (0,045mL, 0,836mmol). Gia nhiệt hỗn hợp ở 45°C trong 1,5 giờ, sau đó hồi lưu trong 1 giờ bằng cách sử dụng ống chữ U Dean-Stark. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ phòng và thêm tiếp methyl vinyl keton (Alfa Aesar) (0,684mL, 8,36mmol). Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở hồi lưu trong 1 giờ, làm lạnh đến nhiệt độ phòng và xử lý bằng dung dịch NaHCO_3 1M chứa nước (30mL). Chiết phần chứa nước bằng toluen và rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng nước muối, làm khan qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-20% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 6,74 (1H, d), 5,86 (1H, d), 2,45 (2H, t), 1,92 (2H, t), 1,80-1,71 (4H, br mults), 1,71-1,61 (4H, br mults).

Bước 2: Spiro[4.5]decan-8-on

Sục dung dịch spiro[4.5]dec-6-en-8-on (442mg, 2,94mmol) trong etanol (15mL) bằng nitơ và xử lý bằng Pd-C 10%, ẩm 50% (Alfa Aesar, 38303) (313mg, 2,94mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 16 giờ trong khí quyển hydro và lọc qua Celite®, rửa giải bằng etanol. Cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 2,31–2,25 (4H, t), 1,72-1,66 (4H, t), 1,65-1,60 (4H, br mults), 1,53-1,47 (4H, br mults).

Bước 3: Spiro[4.5]dec-7-en-8-yl triflometansulfonat

Thêm n-BuLi 1,6M trong hexan (1,900mL, 3,04mmol) vào dung dịch đã được khuấy gồm diisopropylamin (0,454mL, 3,19mmol) trong THF khan (20mL) trong nitơ ở -78°C . Để dung dịch ấm lên 0°C trong 20 phút trước khi tái làm lạnh xuống -78°C . Thêm dung dịch gồm spiro[4.5]decan-8-on (0,440g, 2,89mmol) trong THF khan (5mL) trong 5 phút và khuấy dung dịch ở -78°C trong 50 phút trước khi thêm dung dịch 2-[N,N-bis(triflometylsulfonyl)amino]pyridin (Alfa Aesar) (1,141g, 3,19mmol) trong THF khan

(5mL). Khuấy hỗn hợp và để ấm lên nhiệt độ phòng qua đêm. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng NaHCO_3 chứa nước bão hòa (4mL). Chiết phần chứa nước bằng TBME (x2) và rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng NaOH chứa nước 10%, nước muối, làm khan qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-30% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 4: 4,4,5,5-tetrametyl-2-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)-1,3,2-dioxaborolan

Sau đó thêm kali axetat (Acros) (438mg, 4,47mmol) và sản phẩm cộng $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (Alfa Aesar) (54,7mg, 0,067mmol) vào dung dịch đã được khuấy spiro[4.5]dec-7-en-8-yl triflometansulfonat (635mg, 2,234mmol) trong 1,4-dioxan khô (15mL), bis(pinacolato)diboron (Alfa Aesar) (567mg, 2,234mmol). Sục hỗn hợp phản ứng bằng nitơ và gia nhiệt đến 80°C trong 16 giờ. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ phòng và lọc qua Celite®, rửa giải bằng TBME. Cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm và phân căn được tách giữa EtOAc (50mL) và nước (50mL). Rửa pha hữu cơ bằng nước muối (30mL), làm khan qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-30% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 5: Ethyl 4-metyl-5-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-carboxylat

Tiếp theo thêm K_2CO_3 (266mg, 1,923mmol), sản phẩm cộng $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (Alfa Aesar) (52,3mg, 0,064mmol) và nước (1mL) vào lọ vi sóng 2-5mL chứa dung dịch 4,4,5,5-tetrametyl-2-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)-1,3,2-dioxaborolan (168mg, 0,641mmol) trong MeCN (2mL), ethyl 5-bromo-4-metylisoxazol-3-carboxylat (Chất trung gian A) (150mg, 0,641mmol). Sục lọ phản ứng bằng nitơ, đậy nắp và xử lý bằng vi sóng (Biotage Smith Initiator) ở 90°C trong 1 giờ. Phân tách hỗn hợp phản ứng giữa nước (20mL) và EtOAc (20mL) và rửa pha hữu cơ bằng nước muối (20mL), làm khan qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được dầu màu cam. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-30% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,75 min; MS m/z [M+H]⁺ 290,4; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 6: axit 4-metyl-5-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxylic

Thêm NaOH 2M (aq) (0,311mL, 0,622mmol) vào dung dịch đã khuấy etyl 4-metyl-5-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxylat (180mg, 0,622mmol) trong etanol (10mL), và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng nước (30mL) và axit hóa đến pH 5-6 bằng cách thêm HCl 2M (aq). Chiết phần chứa nước bằng EtOAc (2 x 20mL) và rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng nước muối (20mL), làm khan qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,61 mins; MS m/z [M+H]⁺ 262.3; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 7: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit

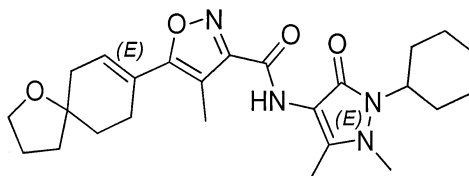
Thêm HATU (152mg, 0,400mmol) vào dung dịch đã khuấy axit 4-metyl-5-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxylic (95mg, 0,364mmol) trong NMP khô (3ml), sau đó thêm 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (84mg, 0,400mmol) và triethylamin (0,111mL, 0,800mmol) và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Phân tách hỗn hợp phản ứng giữa EtOAc (30mL) và NaOH 1M (aq) (30mL) và rửa pha hữu cơ bằng nước (30mL), nước muối (30mL), làm khan qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được dầu màu cam. Hòa tan nguyên liệu thô trong DMSO và tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký pha đảo tự động trực tiếp UV trong 9,5 phút Gradient của MeCN 50 - 98% trong nước (Axit formic 0,1%). Thêm phần sản phẩm vào EtOAc (50mL) và rửa bằng dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa (50mL). Làm khô phần chiết hữu cơ qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,59 min; MS m/z [M+H]⁺ 453.7; phương pháp 2minLowpHv03

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,21 (1H, br s), 6,19 (1H, mult), 4,00 (1H, tt), 3,25 (3H, s), 2,46-2,40 (2H, br mults), 2,23 (3H, s), 2,14 (3H, s), 2,10-2,05 (2H, mults), 1,99-1,88 (2H, mults), 1,84-1,74 (4H, br mults), 1,66-1,53 (7H, br mults), 1,41-1,35 (4H, br mults), 1,34-1,23 (2H, br mults), 1,21-1,10 (1H, br mult).

Ví dụ 2.1:

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit]

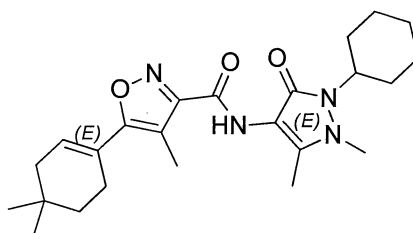


Điều chế hợp chất tiêu đề bằng phương pháp tương tự với phương pháp của ví dụ 2 bằng cách thay thế spiro[4.5]decan-8-on (bước 3) bằng [1-oxaspiro[4.5]decan-8-on] (Flochem);

LC-MS: Rt = 1,10min; MS m/z [M+H]⁺ 455.5; phương pháp 2minLowpHv01

Ví dụ 2.2:

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

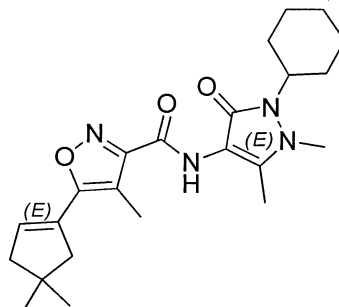


Điều chế hợp chất tiêu đề bằng phương pháp tương tự với phương pháp của ví dụ 2 bằng cách thay thế 4,4,5,5-tetrametyl-2-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)-1,3,2-dioxaborolan (Bước 5) bằng axit 4,4-đimetylxcyclohexen-1-yl boronic, pinacol este (Combi Blocks);

LC-MS: Rt = 5,52min; MS m/z 427,6 [M+H]⁺; phương pháp 10minLowpHv01

Ví dụ 3:

N-(2-cyclohexyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-dimethylcyclopent-1-en-1-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamit



Bước 1: 4,4-dimethylcyclopent-1-en-1-yl triflometansulfonat

Thêm L-Selectrit 1M trong THF (4,539mL, 4,54mmol) vào dung dịch đã khuấy 4,4-dimethylcyclopent-2-enon (Atlantic) (0,500g, 4,54mmol) trong THF khan (25mL) trong nitơ ở -78°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng ở -78°C trong 1 giờ và xử lý bằng dung dịch 1,1,1-triflo-N-(pyridin-2-yl)-N-((triflometyl)sulfonyl)metansulfonamit (Alfa Aesar) (1,626g, 4,54mmol) trong THF khan (5mL). Khuấy hỗn hợp và để ấm lên nhiệt độ phòng qua đêm. Phân tách hỗn hợp tạo thành giữa hexan (60mL) và nước (50mL), tách các pha và chiết pha chứa nước bằng hexan (50mL). Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng NaOH chứa nước 10% (40mL), nước muối (40mL), làm khan qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được dầu màu vàng nhạt. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng iso-hexan 100% thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.54 (1H, mult), 2.42-2.39 (2H, mult), 2.23-2.20 (2H, mult), 1.17 (3H, s), 1.17 (3H, s).

Bước 2: 2-(4,4-dimethylcyclopent-1-en-1-yl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan

Thêm bis(pinacolato)diboron (Alfa Aesar) (382mg, 1,503mmol) vào dung dịch đã khuấy 4,4-dimethylcyclopent-1-en-1-yl triflometansulfonat (367mg, 1,503mmol) trong 1,4-dioxan khô (10mL), sau đó là kali axetat (Acros) (295mg, 3,01mmol) và sản phẩm cộng $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (Alfa Aesar) (36,8mg, 0,045mmol). Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở 80°C và khuấy trong 16 giờ. Làm lạnh hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ phòng và lọc

qua Celite®, rửa qua TBME (100mL). Rửa phần lọc hữu cơ bằng nước (50mL), nước muối (30mL), làm khan qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được dầu màu nâu. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng iso-hexan 100% thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 6,34-6,31 (1H, mult), 2,21-2,18 (2H, mult), 2,17-2,14 (2H, mult), 1,20 (12H, s) 0,99 (6H, s).

Bước 3: Etyl 5-(4,4-đimetylcyclopent-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Thêm etyl 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian A) (226mg, 0,966mmol) vào lọ vi sóng 2-5mL chứa dung dịch 2-(4,4-đimetylcyclopent-1-en-1-yl)-4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan (214mg, 0,966mmol) trong axetonitril (2mL), sau đó thêm K_2CO_3 (400mg, 2,90mmol), sản phẩm cộng $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (Alfa Aesar) (79mg, 0,097mmol) và nước (1mL). Sục lọ phản ứng bằng nitơ, đậy nắp và gia nhiệt bằng vi sóng (Biotage Smith Initiator) ở 90°C trong 1 giờ. Lọc hỗn hợp tạo thành qua Celite®, rửa qua EtOAc (50mL). Rửa phần lọc bằng nước (50mL), nước muối (50mL), làm khan qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được dầu màu nâu. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng iso-hexan 100% thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,64 min; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 250,9/251,5; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 4: axit 5-(4,4-đimetylcyclopent-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic

Thêm NaOH 2M (aq) (0,975mL, 1,949mmol) vào dung dịch đã khuấy etyl 5-(4,4-đimetylcyclopent-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (243mg, 0,975mmol) trong ethanol (5mL), và khuấy dung dịch ở nhiệt độ phòng. Sau khi hoàn thành, pha loãng hỗn hợp phản ứng với nước (30mL) và axit hóa đến pH 5-6 bằng cách thêm HCl 2M (aq). Chiết pha chứa nước bằng EtOAc (2 x 20mL) và rửa phần chiết hữu cơ gom được bằng nước muối (20mL), làm khan qua MgSO_4 và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,46 min; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 222,5; phương pháp 2minLowpHv03.

Bước 5: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxylopent-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

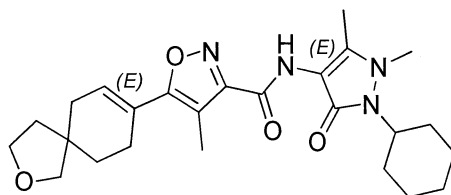
Thêm HATU (198mg, 0,522mmol) vào dung dịch đã khuấy axit 5-(4,4-đimetylxylopent-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (105mg, 0,475mmol) trong NMP khô (3mL), sau đó thêm 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (109mg, 0,522mmol) và trietylamin (0,146mL, 1.044mmol). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng qua đêm. Tách hỗn hợp tạo thành giữa EtOAc (20mL) và NaOH 1M (aq) (20mL) và rửa pha hữu cơ bằng nước (20mL), nước muối (20mL), làm khan qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-60% EtOAc trong iso-hexan thu được nguyên liệu thô. Hòa tan nguyên liệu thô trong DMSO và tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký pha đảo tự động hóa khối phổ trực tiếp trong 9,5 phút Gradient MeCN 40-80% trong nước (Axit formic 0,1%). Thêm phần sản phẩm vào EtOAc (50mL) và rửa bằng dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa (50mL). Làm khan dịch chiết hữu cơ qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,40min; MS m/z [M+H]⁺ 413,1/414,6; phương pháp 2minLowpHv03

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,09 (1H, br s), 6,27 (1H, br t), 4,06 (1H, tt), 3,27 (3H, s), 2,66 (2H, mult), 2,40 (2H, mult), 2,34 (3H, s), 2,22 (3H, s), 2,06-1,95 (2H, br mults), 1,92-1,83 (4H, br mults), 1,75-1,68 (1H, br mult), 1,44-1,31 (2H, br mults), 1,30-1,23 (1H, br mult), 1,19 (6H, s).

Ví dụ 4:

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit]



Bước 1: Etyl 1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-cacboxylat

Khuấy hỗn hợp gồm ethyl 4-oxocyclohexanecarboxylat (11,7g, 68,7mmol), ethylen glycol (5,75mL, 103mmol) và p-TsOH (0,620g, 3.26mmol) trong toluen (60mL) ở hồi lưu sử dụng ống chữ U Dean-Stark để thu được nước sau 4 giờ. Làm lạnh hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ phòng, làm ngừng bằng dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa (30mL) và pha loãng bằng EtOAc (100mL). Rửa lớp hữu cơ bằng nước muối (30mL), làm khan qua natri sulfat khan và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được dầu màu vàng. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 0-100% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4,14 (2H, q), 3,96 (4H, s), 2,38-2,31 (1H, br mult), 1,99-1,91 (2H, br mults), 1,87-1,76 (4H, br mults), 1,61-1,53 (2H, br mults), 1,26 (3H, t).

Bước 2: Ethyl 8-(2-(benzyloxy)ethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-carboxylat

Thêm (8-allyl-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-yl)metanol (6g, 28,0mmol) trong THF khan (100mL) vào dung dịch đã làm lạnh trước KHMDS (1M trong THF) (36,4mL, 36,4mmol) trong THF (100mL) ở -78°C trong nitơ. Khuấy dung dịch tạo thành ở nhiệt độ này trong 2 giờ và thêm dung dịch ((2-bromoethoxy)methyl)benzen (5,31mL, 33,6mmol) trong THF (100mL). Để hỗn hợp phản ứng ấm lên nhiệt độ phòng và khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng dung dịch amoni clorua chứa nước bão hòa và thêm EtOAc. Làm kha phần chiết hữu cơ qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 0-40% trong iso-hexan thu được nguyên liệu thô. Hấp thu lại nguyên liệu thô vào silica và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-20% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7,36-7,31 (2H, mults), 7,30-7,26 (3H, mults), 4,39 (2H, s), 4,01 (2H, q), 3,84 (4H, s), 3,40 (2H, t), 2,05-1,98 (2H, br mults), 1,78 (2H, t), 1,61-1,54 (2H, br mults), 1,49-1,41 (4H, br mults), 1,12 (3H, t).

Bước 3: [1, 4, 10-trioxadispiro[4.2.4. 2] tetradecan-9-on]

Khử khí [Ethyl 8-(2-(benzyloxy)ethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-carboxylat] (1,6g, 4.59mmol) trong ethanol (5mL) bằng cách nạp nitơ. Thêm Pd-C (0,147g, 1,378mmol) và

khuấy hỗn hợp trong khí quyển hydro. Sau khi hoàn thành, lọc hỗn hợp phản ứng qua cột Celite®, rửa giải bằng EtOH. Thu dịch lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4,29 (2H, t), 3,97 (4H, mult), 2,19 (2H, t), 2,08-1,99 (2H, br mults), 1,97-1,89 (2H, br mults), 1,71-1,56 (4H, br mults).

Bước 5: [1, 4, 10-trioxadispiro[4.2.4. 2]tetradecan-9-ol]

Làm lạnh 1, 4, 10-trioxadispiro[4.2.4. 2] tetradecan-9-on (880mg, 4,15mmol) trong toluen (30mL), trong nitơ, đến -78°C và xử lý bằng DIBAL-H 1M (1M trong toluen) (4,56mL, 4,56mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng bằng -78°C trong 2 giờ. Xử lý hỗn hợp tạo thành bằng dung dịch axit axetic chứa nước 10% (18mL)/ đá 60g) và khuấy trong 5 phút với cloform (150mL). Tách và chiết lớp chứa nước bằng cloform (x3) và Làm khan phần chiết hữu cơ gom được qua MgSO_4 và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5,13 (1H, s), 4,11 (1H, mult), 3,97 (4H, mult), 3,93 (1H, mult), 2,12 (1H, s), 1,95-1,77 (3H, br mults), 1,76-1,60 (6H, br mults), 1,58-1,49 (1H, br mults).

Bước 6: [1, 4,10-trioxadispiro[4.2.4.2]tetradecan]

Thêm liên tục axit trifloaxetic vào dung dịch đã khuấy triethylsilan (1,965mL, 12,30mmol) trong DCM (40mL), trong nitơ, ở -78°C (0,948mL, 12,30mmol) và [1,4,10-trioxadispiro[4.2.4.2]tetradecan-9-ol] (0,878g, 4,1mmol) trong DCM (40mL) ở -78°C . Làm ấm từ từ hỗn hợp tạo thành đến 0°C và khuấy trong 2 giờ. Thêm dung dịch NaHCO_3 chứa nước bão hòa và chiết xuất hỗn hợp bằng EtOAc. Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 7: [2-oxaspiro[4.5]decan-8-on]

Xử lý dung dịch đã khuấy 1,4,10-rioxadispiro[4.2.4.2]tetradecan(813mg, 4.1mmol) trong axeton (28mL) ở nhiệt độ phòng bằng dung dịch HCl chứa nước 10% (12,46mL,

41,0mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng nước muối (40mL) và chiết bằng EtOAc (3 x 30mL). Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng NaHCO₃ chứa nước bão hòa (2 x 30mL) và nước muối (1 x 30mL), làm khan qua MgSO₄ và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 3,96 (2H, t), 3,70 (2H, s), 2,45-2,36 (4H, br mults), 1,95-1,89 (6H, mults).

Bước 8: [2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl triflometansulfonat]

Làm lạnh dung dịch diisopropylamin (0,407mL, 2,85mmol) trong THF (25mL), trong nitơ, đến -78°C và xử lý bằng n-BuLi (1,0M trong hexan) (1,702mL, 2,72mmol). Làm ấm hỗn hợp phản ứng đến 0°C trong 30min và làm lạnh đến -78°C trước khi thêm 2-oxaspiro[4.5]decan-8-on (400mg, 2,59mmol) trong THF (25mL). Sau 1,5 giờ ở -78°C, xử lý hỗn hợp phản ứng bằng 1,1,1-triflo-N-(pyridin-2-yl)-N-((triflometyl)sulfonyl)metansulfonamit (1208mg, 3,37mmol) trong THF (10mL) và làm ấm lên nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa, sau đó pha loãng bằng EtOAc. Làm khan lớp hữu cơ qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-25% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5,77 (1H, t), 3,92 (2H, t), 3,56 (2H, mult), 2,46-2,29 (2H, br mult), 2,25-2,22 (2H, br mult), 1,83-1,76 (4H, br mults).

Bước 9: [4,4,5,5-tetrametyl-2-(2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)-1,3,2-dioxaborolan]

Xử lý [2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl triflometansulfonat] (270mg, 0,943mmol) và 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametyl-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolan) (251mg, 0,990mmol) trong dioxan (5mL) bằng kali axetat (185mg, 1,886mmol) và khử khí hỗn hợp hoàn toàn bằng cách nạp nitơ. Thêm sản phẩm cộng PdCl₂(dppf).CH₂Cl₂ (23,11mg, 0,028mmol) và gia nhiệt hỗn hợp lên 80°C trong 16 giờ. Hấp thu hỗn hợp phản ứng thô vào silica và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-15% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 6,54 (1H, mult), 3,88 (2H, t), 3,52 (2H, mult), 2,24-2,18 (2H, br mults), 2,15-2,12 (2H, br mults), 1,76-1,68 (2H, br mults), 1,62-1,57 (2H, br mults), 1,28 (12H, s).

Bước 10: [Etyl 4-metyl-5-(2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxylat]

Thu [4,4,5,5-tetrametyl-2-(2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)-1,3,2-đioxaborolan] (0,172g, 0,651mmol), etyl 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian A) (0,183g, 0,781mmol) và Cs_2CO_3 (0,849g, 2,60mmol) trong DME (3mL) và nước (1,250mL). Thêm sản phẩm cộng $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (0,016g, 0,020mmol) và khử khí hỗn hợp hoàn toàn bằng cách nạp nitơ. Khuấy hỗn hợp trong vi sóng ở 90°C trong 1 giờ. Tách hỗn hợp phản ứng lưỡng pha và hấp thu pha hữu cơ vào silic oxit. Tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng gradien của EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 6,27 (1H, mult), 4,42 (2H, q), 3,91(2H, t), 3,56 (2H, mult), 2,56-2,51 (2H, br mults), 2,31-2,27 (2H, br mults), 2,28 (3H, s), 1,83-1,72 (4H, br mults), 1,41 (3H, t).

Bước 11: [axit 4-metyl-5-(2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxylic]

Xử lý [etyl 4-metyl-5-(2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxylat] (170mg, 0,584mmol) trong MeOH (3,60mL) và THF (6mL) ở nhiệt độ phòng bằng NaOH 2M (aq) (0,584mL, 1,167mmol). Khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ phòng và xử lý bằng HCl 2M (aq) (0,2mL) và EtOAc. Làm khô lớp hữu cơ gom được qua MgSO_4 và lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 0,61min; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 264,4; phương pháp 2minHighpHv03

Bước 12: [N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit]

Xử lý dung dịch [axit 4-metyl-5-(2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxylic] (40mg, 0,152mmol) trong DMF (3mL) bằng 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (38,2mg, 0,182mmol), DIPEA (0,106mL, 0,608mmol) và HATU (75mg, 0,198mmol). Khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Thêm nước vào hỗn hợp và chiết phần chứa nước bằng EtOAc

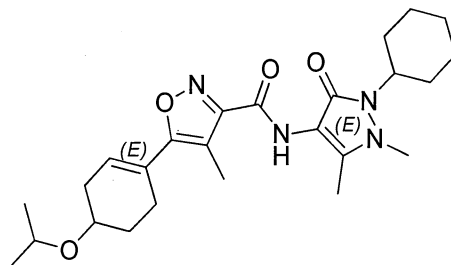
(x2). Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng liti clorua 0,5M (aq), làm khan qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-5% MeOH trong EtOAc thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: $R_t = 1,19\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 455,5; phương pháp 2minLowpHv03

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,31 (1H, s), 6,23 (1H, mult), 4,01 (1H, tt), 3,88 (2H, t), 3,53 (2H, s), 3,26 (3H, s), 2,51-2,44 (2H, br mults), 2,28-2,25 (2H, mults), 2,23 (3H, s), 2,14 (3H, s), 1,98-1,87 (2H, br mults), 1,81-1,70 (8H, mults), 1,65-1,58 (1H, br mult), 1,38-1,33 (1H, br mult), 1,31-1,25 (1H, br mult), 1,18-1,05 (1H br mult).

Ví dụ 5:

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit]



Bước 1: 1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-ol

Thêm từng giọt NaBH_4 (0,727g, 19,21mmol) vào dung dịch đã khuấy 1,4-xyclohexadion monoetylen axetal (Aldrich) (2g, 12,81mmol) trong MeOH khô (30mL) ở 0°C , giữ nhiệt độ dưới 5°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng bằng 0°C trong 15 phút và ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Cô đặc hỗn hợp tạo thành trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 3,96 (4H, s), 3,86-3,78 (1H, br mult), 1,94-1,79 (4H, br mults), 1,73-1,76 (4H, br mults), 1,43 (1H, br s).

Bước 2: 8-isopropoxy-1,4-đioxaspiro[4.5]decan

Thêm bạc (I) oxit (1,392g, 6,01mmol) vào dung dịch đã khuấy 1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-ol (0,5g, 3,16mmol) trong 2-iodopropan (5,37g, 31,6mmol), và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng. Sau khi hoàn thành, pha loãng huyền phù tạo thành bằng EtOAc và lọc huyền phù trong áp suất giảm. Cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm để thu được dầu màu vàng nhạt. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-30% EtOAc trong iso-hexan để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 3,84 (4H, s), 3,63 (1H, mult), 3,44 (1H, mult), 1,72-1,62 (4H, br mults), 1,53-1,42 (4H, br mults), 1,06 (3H, s), 1,05 (3H, s).

Bước 3: 4-isopropoxyxyclohexanon

Thêm p-TsOH (0,080g, 0,463mmol) vào dung dịch đã khuấy 8-isopropoxy-1,4-đioxaspiro[4.5]decan (0,464g, 2,317mmol) trong THF (2mL) và nước (2mL). Gia nhiệt hỗn hợp lên 100°C qua đêm. Để hỗn hợp tạo thành lạnh đến nhiệt độ phòng và phân tách giữa EtOAc (30mL) và nước (30mL). Rửa pha hữu cơ bằng nước muối (30mL), làm khan qua MgSO_4 và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 3,78 (1H, mult), 3,73 (1H, mult), 2,40-2,31 (2H, br mults), 2,27-2,18 (2H, br mults), 1,96-1,87 (2H, br mults), 1,85-1,75 (2H, br mults), 1,12 (3H, s), 1,11 (3H, s).

Bước 4: [4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl triflometansulfonat]

Thêm nBuLi 1,6M trong hexan (Aldrich) (1,285mL, 2,057mmol) vào dung dịch diisopropylamin (Acros) (0,307mL, 2,155mmol) trong THF khan (30mL) trong nitơ ở -78°C. Để dung dịch ấm lên 0°C trong 30 phút trước khi tái làm lạnh đến -78°C. Thêm dung dịch 4-isopropoxyxyclohexanon (306mg, 1,959mmol) trong THF khan (5mL) trong 5 phút và khuấy hỗn hợp ở -78°C trong 1 giờ trước khi thêm dung dịch 2-[N,N-bis(triflometylsulfonyl)amino]pyridin (Alfa Aesar) (772mg, 2,155mmol) trong THF khan (5mL). Khuấy hỗn hợp và để ấm lên nhiệt độ phòng qua đêm. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng dung dịch NaHCO_3 chứa nước bão hòa (30mL) và chiết phần chứa nước bằng TBME (2 x 20mL). Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng NaOH chứa nước 10%

(30mL), nước muối (30mL), làm khan qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-10% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 5,76 (1H, mult), 3,72-3,63 (2H, mults), 2,44-2,30 (3H, br mults), 2,14-2,06 (1H, mult), 1,86-1,73 (2H, br mults), 1,09-1,04 (6H, mults).

Bước 5: [2-(4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl)-4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan]

Thêm bis(pinacolato)diboron (Alfa Aesar) (404mg, 1,592mmol) vào dung dịch đã khuấy [4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl triflometansulfonat] (459mg, 1,592mmol) trong dioxan khô (15mL), sau đó thêm kali axetat (Acros) (313mg, 3,18mmol) và sản phẩm cộng $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (Alfa Aesar) (39,0mg, 0,048mmol). Sục khí nitơ vào bình phản ứng và gia nhiệt lên 80°C qua đêm. Làm lạnh hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ phòng và lọc qua Celite®, rửa bằng TBME. Cô đặc dịch lọc hữu cơ trong áp suất giảm và tách phần cạn giữa EtOAc (50mL) và nước (50mL). Rửa pha hữu cơ bằng nước muối (30mL), làm khan qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-30% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 6: [Etyl 5-(4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat]

Thêm etyl 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian A) (330mg, 1,410mmol) vào lọ vi sóng 2-5mL chứa dung dịch [2-(4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl)-4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan] (375mg, 1,410mmol) trong axeonitril (2mL), sau đó thêm K_2CO_3 (585mg, 4,23mmol), sản phẩm cộng $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (11,51mg, 0,014mmol) và nước (2mL). Sục lọ phản ứng bằng nitơ và xử lý bằng vi sóng (Biotage Smith Initiator) ở 80°C trong 90 phút. Tách hỗn hợp phản ứng giữa nước (30mL) và EtOAc (30mL). Rửa pha hữu cơ bằng nước muối (30mL), làm khan qua MgSO_4 , lọc qua miếng lọc Celite® và cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-60% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,33 phút; MS m/z [M+H]⁺ 294,4; phương pháp 2minLowpHv01

Bước 7: [axit 5-(4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic]

Thêm NaOH 2M (aq) (4,179mL, 8,36mmol) vào dung dịch đã khuấy [etyl 5-(4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat] (393mg, 1,340mmol) trong THF (3mL) và etanol (3mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng. Sau khi hoàn thành, rót hỗn hợp tạo thành vào nước (20mL) và điều chỉnh pH đến pH 6 bằng cách thêm HCl 1M (aq). Chiết phần chứa nước bằng EtOAc (30mL) và rửa dịch chiết hữu cơ bằng nước muối (20mL), làm khan qua MgSO₄ và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,13 phút; MS m/z [M+H]⁺ 266,1; phương pháp 2minLowpHv01

Bước 8: [N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit]

Thêm HATU (274mg, 0,721mmol) vào dung dịch đã khuấy axit 5-(4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (174mg, 0,656mmol) trong NMP khô (3mL), sau đó thêm 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (151mg, 0,721mmol) và triethylamin (0,201mL, 1,443mmol). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng qua đêm. Tách hỗn hợp tạo thành giữa EtOAc (20mL) và NaOH 1M (aq) (20mL) và rửa pha hữu cơ bằng nước (30mL), nước muối (30mL), làm khan qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Hòa tan nguyên liệu thô trong DMSO và tinh chế bằng sắc ký pha đảo trực tiếp UV với Gradient của MeCN 40-80% trong nước (Axit formic 0,1%) trong 9,5phút. Thêm phần sản phẩm vào EtOAc (50mL) và rửa bằng dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa (50mL). Làm khô pha hữu cơ qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

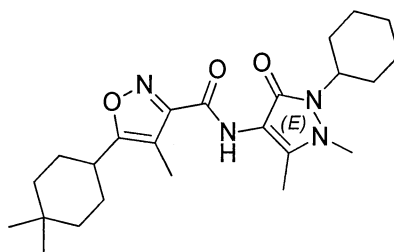
LC-MS: Rt = 1,19 phút; MS m/z [M+H]⁺ 457,3; phương pháp 2minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9,47 (1H, s), 6,27 (1H, mult), 3,91 (1H, mult), 3,75 (1H, mult), 3,75-3,67 (1H, br mult), 3,22 (3H, s), 2,58-2,40 (4H, br mults), 2,19 (3H, s), 2,19-2,09 (1H, br mults), 2,06-2,01 (4H, mults), 1,99 (1H, mult), 1,96-1,86 (1H, br mult),

1,82-1,74 (2H, br mults), 1,72-1,58 (4H, br mults), 1,38-1,24 (2H, br mults), 1,11-1,07 (6H, mults).

Ví dụ 6:

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohexyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



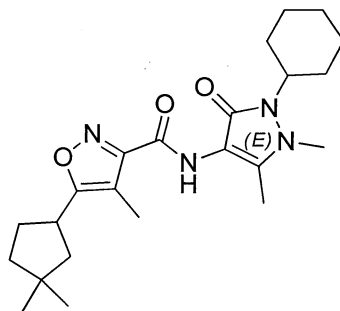
Sục khí nitơ vào dung dịch N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit (Ví dụ 2.2) (40mg, 0,094mmol) trong etanol (20mL) và xử lý bằng Pd-C10%, ẩm 50% (Alfa Aesar, 38303) (14,97mg, 0,141mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong khí quyển hydro trong 3 giờ. Lọc hỗn hợp tạo thành qua Celite®, rửa qua etanol sau đó thêm DCM. Cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm và đưa phần cặn qua cột sắc ký 500mg silica-TMT, rửa giải bằng etanol: ete (1:1). Thu dịch lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS; Rt = 1,33 phút; MS m/z [M+H]⁺ 429,5; phương pháp 2minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9,40 (1H, s), 3,92 (1H, tt), 3,21 (3H, s), 2,84 (1H, mult), 2,07 (3H, s), 2,02 (3H, s), 2,03-1,95 (2H, mults), 1,82-1,58 (9H, mults), 1,50-1,43 (2H, mults), 1,37-1,22 (5H, mults), 0,97 (3H, s), 0,95 (3H, s).

Ví dụ 6.1:

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylxcyclopentyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit]

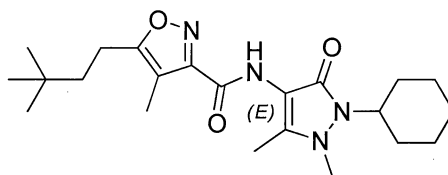


Điều chế hợp chất tiêu đề bằng phương pháp tương tự với phương pháp của ví dụ 6 bằng cách thay N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit (Ví dụ 2.2) (Bước 1) bằng N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-đimetylxcyclopent-1-en-1-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit (Ví dụ 3).

LC-MS: Rt = 1,46min; MS m/z [M+H]⁺ 415,1/416,4; phương pháp 2minLowpHv03

Ví dụ 7:

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbutyl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit



Bước 1: Etyl 5-(3,3-đimetylbut-1-yn-1-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxylat

Khử khí hoàn toàn etyl 5-bromo-4-metylisoaxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian A) (100mg, 0,427mmol) và 3,3-đimetylbut-1-yn (0,058mL, 0,470mmol) trong axeonitril (3mL) bằng cách nạp khí nitơ. Thêm dicyclohexylamin (0,085mL, 0,427mmol), CuI (2,85mg, 0,015mmol) và PdCl₂(PPh₃)₂ (750mg, 10,68 μmol). Khuấy hỗn hợp trong vi sóng ở 100 °C trong 45min. Hấp thu hỗn hợp tạo thành vào silica và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-10% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,53min; MS m/z [M+H]⁺ 236,4; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 2: axit 5-(3,3-đimetylbut-1-yn-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic

Xử lý etyl 5-(3,3-đimetylbut-1-yn-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (101mg, 0,429mmol) trong THF (3mL) và MeOH (1,800mL) ở nhiệt độ phòng bằng NaOH 2M (aq) (0,429mL, 0,859mmol) trong 1 giờ. Thêm HCl 2M (aq) (0,6mL) và nước và chiết phần chứa nước bằng EtOAc. Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO₄ và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 14,07 (1H, br s), 2,14 (3H, s), 1,33 (9H, s).

Bước 3: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbut-1-yn-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

Xử lý axit 5-(3,3-đimetylbut-1-yn-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (85mg, 0,410mmol) và 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (86mg, 0,410mmol) trong DMF (2mL) bằng DIPEA (0,287mL, 1,641mmol) và HATU (172mg, 0,451mmol) ở nhiệt độ phòng và khuấy trong 16 giờ. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng nước và chiết xuất bằng EtOAc. Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng dung dịch liti clorua 0,5 M (aq), làm khan qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 0-100% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,42 min; MS m/z [M+H]⁺ 399.7; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 4: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbutyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

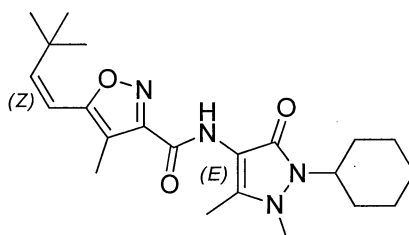
Khử khí hoàn toàn N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbut-1-yn-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit (30mg, 0,075mmol) trong etanol (5mL) bằng cách nạp nitơ và thêm Pd-C (16,02mg, 7,53μmol). Khuấy hỗn hợp trong khí quyển hydro. Sau khi hoàn thành, lọc hỗn hợp phản ứng qua Celite® và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,37min; MS m/z [M+H]⁺ 403,1/404,4; phương pháp 2minLowpHv03

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,97 (1H, br s), 4,04 (1H, tt), 3,24 (3H, s), 2,72-2,66 (2H, mult), 2,19 (3H, s), 2,16 (3H, s), 2,04-1,92 (2H, br mults), 1,90-1,81 (4H, br mults), 1,70 (1H, br mult), 1,60-1,54 (2H, mult), 1,43-1,29 (2H, br mults), 1,27-1,18 (1H, br mult), 0,96 (9H, s).

Ví dụ 8:

(Z)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbut-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

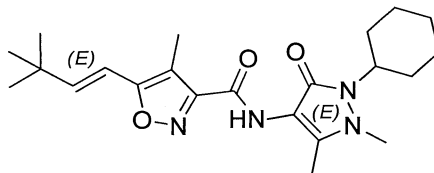


Bước 1: Xử lý (Z)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbut-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbut-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit (Ví dụ 7, Bước 3) (30mg, 0,075mmol) trong EtOAc (3mL) bằng 2,2'-(etan-1,2-điylbis(sulfanediyl))dietanol (13,72mg, 0,075mmol) và Pd-5% Bari sulphat (16,02mg, 7,53 μ mol). Khử khí hỗn hợp hoàn toàn bằng cách nạp nitơ và khuấy hỗn hợp trong khí quyển hydro ở nhiệt độ phòng qua đêm. Tiếp theo thêm Pd-5%Bari sulphat (16,02mg, 7,53 μ mol) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong khí quyển hydro trong 16 giờ. Lọc hỗn hợp tạo thành qua Celite® rửa giải bằng EtOAc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề; LC-MS: R_t = 1,35min; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 401,2; phương pháp 2minLowpHv03

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,94 (1H, br s), 6,00 (1H, d, J = 12,9Hz), 5,91 (1H, d, J = 12,9Hz), 4,01-3,92 (1H, tt), 3,16 (3H, s), 2,13 (3H, s), 2,09 (3H, s), 1,96-1,84 (2H, br mults), 1,82-1,74 (4H, br mults), 1,62 (1H, br mult), 1,34-1,23 (2H, mult), 1,19-1,10 (1H, br mult), 1,05 (9H, s).

Ví dụ 9:

(E)-N-(2-cyclohexyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-dimethylbut-1-en-1-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamid



Bước 1: (E)-tributyl(3,3-dimethylbut-1-en-1-yl)stannan

Thêm từng giọt tributyltin hydrit (1,637mL, 6,09mmol) vào dung dịch 3,3-dimethylbut-1-yn (500mg, 6,09mmol) và $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (70mg, 0,06mmol) trong THF (4mL) ở 0°C trong bong tối. Sau 30 phút khuấy hỗn hợp phản ứng, làm ấm lên nhiệt độ phòng và khuấy trong 16 giờ. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng iso-hexan 100% thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 2: (E)-ethyl 5-(3,3-dimethylbut-1-en-1-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylat

Hòa tan (E)-tributyl(3,3-dimethylbut-1-en-1-yl)stannan (1194mg, 0,8mmol) và ethyl 5-bromo-4-methylisoxazol-3-carboxylat (Chất trung gian A) (187mg, 0,8mmol) trong dioxan (6mL) và khử khí hỗn hợp hoàn toàn bằng cách nạp nitơ. Thêm $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (92mg, 0,080mmol) và khuấy hỗn hợp ở 100°C trong 16 giờ. Hấp thu hỗn hợp phản ứng thô vào silica và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-10% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 6,64 (1H, d, $J = 17\text{Hz}$), 6,19 (1H, d, $J = 17\text{Hz}$), 2,23 (3H, s), 1,45 (3H, t), 1,16 (9H, s).

Bước 3: axit (E)-5-(3,3-dimethylbut-1-en-1-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylic

Xử lý (E)-ethyl 5-(3,3-dimethylbut-1-en-1-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylat (160mg, 0,674mmol) trong THF (3mL) và MeOH (1,8mL) bằng NaOH 2M (aq) (1,349mL, 2,70mmol) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Xử lý hỗn hợp tạo thành bằng HCl 2M (aq) và chiết xuất bằng ethyl axetat (x3). Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO_4 và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 4: (E)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-đimetylbut-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

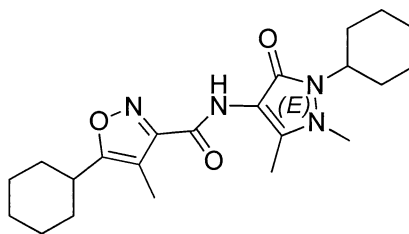
Xử lý axit (E)-5-(3,3-đimetylbut-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (102mg, 0,487mmol) và 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (112mg, 0,536mmol) trong DMF (2mL) bằng DIPEA (0,341mL, 1,950mmol) và HATU (222mg, 0,585mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Xử lý hỗn hợp tạo thành bằng nước và chiết xuất bằng EtOAc. Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng LiCl 0,5M (aq), làm khan qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,41min; MS m/z [M+H]⁺ 401,0/402,5; phương pháp 2minLowpHv03

¹H NMR (400MHz, MeOD) δ 6,64 (1H, d, J = 17Hz), 6,33 (1H, d, J = 17Hz), 4,16 (1H, tt), 3,36 (3H, s), 2,22 (3H, s), 2,20-2,09 (2H, br mults), 2,17 (3H, s), 1,95-1,82 (4H, br mults), 1,76-1,69 (1H, br mult), 1,50-1,38 (2H, br mults), 1,35-1,25 (1H, br mult), 1,18 (9H, s).

Ví dụ 10:

5-xyclohexyl-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



Bước 1: axit 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylic

Thêm NaOH 2M (aq) (18,48mL, 37,0mmol) vào dung dịch etyl 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian A) (8,65g, 37,0mmol) trong MeOH (100mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và axit hóa hỗn hợp tạo thành bằng cách sử dụng HCl 1M (aq) và cô đặc trong áp suất giảm để loại bỏ MeOH.

Pha loãng dung dịch bằng nước và chiết xuất bằng EtOAc (x3) và Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO_4 và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: $R_t = 0,82\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 206,0; phương pháp 2minLowpH

Bước 2: 5-bromo-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

Làm lạnh dung dịch DMF (5,33mL, 68,8mmol) trong DCM (200mL) đến 0°C và xử lý bằng oxalyl clorua (3,31mL, 37,9mmol). Thêm axit 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (7,09g, 34,4mmol) và khuấy trong đá lạnh trong 10min. Thêm 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (7,92g, 37,9mmol) và triethylamin (14,39mL, 103mmol) ở 0°C và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ này trong 30min. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng DCM và rửa bằng dung dịch NaHCO_3 (aq) bão hòa. Làm khan lớp hữu cơ qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 100% TBME thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: $R_t = 0,93\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 397,2/400,2; phương pháp 2minLowpH

Bước 3: 5-xyclohexyl-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

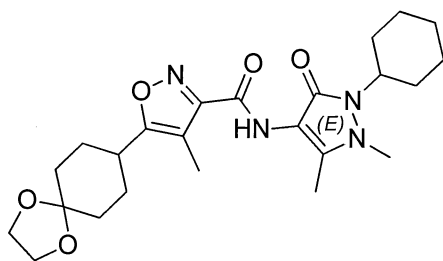
Thêm xyclohexylzinc(II) bromua (0,5M trong THF) (1133 μL , 0,566mmol) và bis(tri-t-butylphosphin)paladi(0) (9,65mg, 0,019mmol) vào 5-bromo-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit (75mg, 0,189mmol) và khuấy hỗn hợp ở 100°C trong vi sóng trong 30 phút. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng EtOAc và lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: $R_t = 1,12\text{ min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 401,0/402,4; phương pháp 2minLowpH

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 9,40 (1H, s), 3,90 (1H, m), 3,20 (3H, s), 2,90 (1H, m), 2,05 (3H, s), 2,00 (3H, s), 2,80-1,00 (20H, m).

Ví dụ 11:

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihiđro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit



Bước 1: 1,4-đioxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl triflometansulfonat

Làm lạnh dung dịch đã khuấy 1,4-xyclohexadion monoetylen axetal (Aldrich) (2g, 12,81mmol) trong THF khan (30mL) trong nitor đến -70°C và thêm từng giọt LDA 0,6M (trong heptan/THF/ etylbenzen) (25,6mL, 15,37mmol), giữ nhiệt độ dưới -65°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 20min ở -70°C trước khi xử lý bằng dung dịch 2-[N,N-bis(triflometylsulfonyl)amino]pyridin (Alfa Aesar) (5,05g, 14,09mmol) trong THF khan (10mL) trong 30 phút, đảm bảo nhiệt độ không vượt quá -65°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng bằng -70°C trong 1 giờ trước khi để ấm lên nhiệt độ phòng từ từ và khuấy qua đêm. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng NaHCO_3 chứa nước bão hòa (100mL) và chiết bằng TBME (2 x 150mL). Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng 10% NaOH (aq) (100mL), nước muối (100mL), làm khan qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-10% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 5,80 (1H, mult), 3,91 (4H, mult), 2,51-2,49 (2H, mult), 2,49-2,43 (2H, br mults), 2,37-2,34 (2H, br mults), 1,86-1,81 (2H, mults).

Bước 2: 4,4,5,5-tetrametyl-2-(1,4-đioxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)-1,3,2-đioxaborolan

Thêm bis(pinacolato)diboron (Alfa Aesar) (1,048g, 4,13mmol) vào dung dịch đã khuấy 1,4-đioxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl triflometansulfonat (1,19g, 4,13mmol) trong dioxan khô (15mL), sau đó là kali axetat (Acros) (0,810g, 8,26mmol) và sản phẩm cộng $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (Alfa Aesar) (0,101g, 0,124mmol). Sục hỗn hợp phản ứng bằng nitor

và khuấy ở 80°C qua đêm. Làm lạnh hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ phòng và lọc qua Celite®, rửa qua TBME. Cô đặc dịch lọc hữu cơ trong áp suất giảm và phân tách giữa EtOAc (50mL) và nước (50mL). Rửa pha hữu cơ bằng nước muối (30mL), làm khan qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-30% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 3: Ethyl 4-methyl-5-(1,4-dioxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-carboxylat

Thêm ethyl 5-bromo-4-methylisoxazol-3-carboxylat (Chất trung gian D) (515mg, 2,200mmol) vào lọ vi sóng 2-5mL chứa dung dịch 4,4,5,5-tetramethyl-2-(1,4-dioxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)-1,3,2-dioxaborolan (586mg, 2,200mmol) trong axetonitril (2mL), sau đó là K₂CO₃ (912mg, 6,60mmol), sản phẩm cộng PdCl₂(dppf).CH₂Cl₂ (17,97mg, 0,022mmol), và nước (0,667mL). Sục lọ phản ứng bằng nitơ và khuấy trong vi sóng (Biotage Smith Initiator) ở 80°C trong 1 giờ và 100°C trong 30 phút. Tách hỗn hợp tạo thành giữa nước (30mL) và EtOAc (30mL). Rửa pha hữu cơ bằng nước muối (30mL), làm khan qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm để thu được dầu màu cam. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-40% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 6,26 (1H, mult), 4,37 (2H, q), 3,93 (4H, s), 2,62-2,56 (2H, br mults), 2,47-2,43 (2H, mults), 2,23 (3H, s), 1,82 (2H, mult), 1,23 (3H, t).

Bước 4: Ethyl 4-methyl-5-(1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-carboxylat

Sục vào dung dịch ethyl 4-methyl-5-(1,4-dioxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-carboxylat (556mg, 1,896mmol) trong etanol (20mL) bằng nitơ và sau đó xử lý bằng Pd-C10%, ầm 50% (Alfa Aesar, 38303) (303mg, 2,84mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong khí quyển hydro ở nhiệt độ phòng qua đêm. Lọc hỗn hợp tạo thành qua Celite®, rửa qua etanol và DCM. Cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm và đưa phần cặn qua cột sắc ký silica-TMT 500mg, rửa giải bằng etanol: ete (1:1). Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,11min; MS m/z [M+H]⁺ 296,2; phương pháp 2minLowpHv01

Bước 5: axit 4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxylic

Thêm NaOH 2M (aq) (4,179mL, 8,36mmol) vào dung dịch đã khuấy etyl 4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxylat (558mg, 1,889mmol) trong THF (5mL), và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Rót hỗn hợp tạo thành vào nước (20mL) và điều chỉnh pH đến pH 5-6 bằng cách thêm HCl 1M. Chiết phần chứa nước bằng EtOAc (30mL) và rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng nước muối (20mL), làm khan qua MgSO₄ và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 0,89 phút; MS m/z [M+H]⁺ 268,2; phương pháp 2minLowpHv01

Bước 6: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit

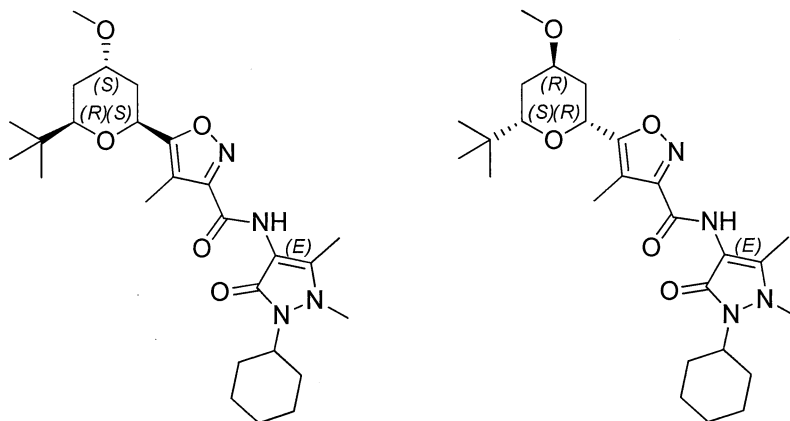
Thêm HATU (374mg, 0,984mmol) vào dung dịch đã khuấy axit 4-metyl-5-(1,4-đioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxylic (239mg, 0,894mmol) trong NMP khô (3mL), sau đó là 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (206mg, 0,984mmol) và trietylamin (0,274mL, 1,967mmol). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Tách hỗn hợp tạo thành giữa EtOAc (20mL) và NaOH 1M (20mL). Rửa pha hữu cơ bằng nước (30mL), nước muối (30mL), làm khan qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-2% MeOH trong DCM thu được nguyên liệu thô. Hòa tan nguyên liệu phân lập được trong DMSO (2mL) và nghiền nhỏ với nước (30mL). Lọc huyền phù tạo thành trong áp suất giảm và rửa chất rắn bằng nước (20mL) và để khô trong chân không để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 0,96 phút; MS m/z [M+H]⁺ 459,5: Phương pháp 2minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9,41 (1H, s), 3,96-3,86 (5H, mults), 3,21 (3H, s), 3,02 (1H, mult), 2,07 (3H, s), 2,05-1,92 (2H, br mults), 2,02 (3H, s), 1,84-1,72 (8H, br mults), 1,70-1,57 (5H, br mults), 1,38-1,23 (2H, br mults), 1,22-1,11 (1H, br mult).

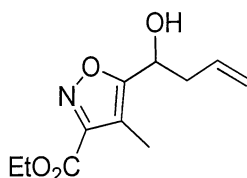
Ví dụ 12:

Hỗn hợp 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit và 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit



và

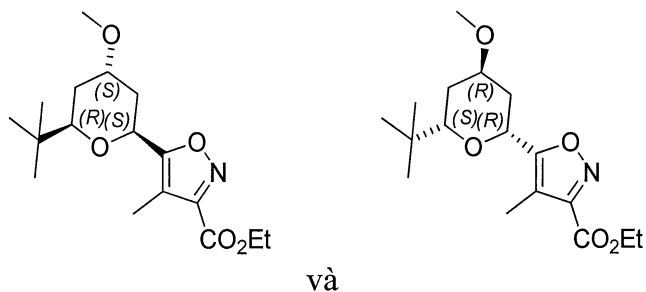
Bước 1: Ethyl 5-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxylat



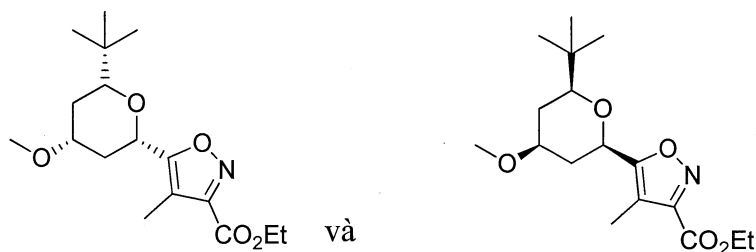
Thêm alyltrimetylsilan (276 μ l, 1,911mmol) vào dung dịch ethyl 5-formyl-4-metylisoaxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian C) (350mg, 1,911mmol) trong DCM (19mL) và làm lạnh hỗn hợp đến -78°C . Làm lạnh dung dịch boron triflorua eterat (278 μ l, 2,198mmol) trong DCM (5mL) đến -78°C và thêm vào hỗn hợp phản ứng trong 5 phút. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 15 min và thêm triethylamin (266 μ l, 1,911mmol). Duy trì hỗn hợp phản ứng ở -78°C trong 15 phút và làm ấm đến nhiệt độ phòng. Làm ngừng hỗn hợp phản ứng bằng cách thêm dung dịch NaHCO_3 chứa nước bão hòa (10mL) và tách chiết bằng DCM (2 x 10mL). Đưa dịch chiết hữu cơ gom được qua cột sắc ký tách pha và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-40% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề; LC-MS: $R_t = 1,06\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 225,8/226,4; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 2:

2a: Hỗn hợp racemic etyl 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat



và 2b: Hỗn hợp racemic etyl 5-((2S,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2R,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat



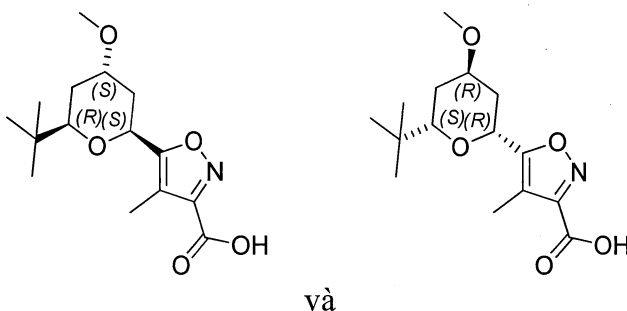
Thêm pivalaldehyt (67,5 μ l, 0,622mmol) vào dung dịch etyl 5-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (140mg, 0,622mmol) trong DCM (6.2mL). Thêm từng giọt TMSOTf (112 μ l, 0,622mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Thêm MeOH (2mL) và tách hỗn hợp tạo thành giữa nước (5mL) và DCM, tách các lớp và chiết xuất dung dịch bằng DCM (2 x 5mL). Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua Na₂SO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-50% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

2a: Hỗn hợp racemic gồm etyl 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-

metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat LC-MS: $R_t = 1,64\text{min}$; MS m/z $[M+H]^+$ 326,6; phương pháp 2minLowpHv03

2b: Hỗn hợp raxemic gồm etyl 5-((2S,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2R,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat LC-MS: $R_t = 1,54\text{ min}$; MS m/z $[M+H]^+$ 326,6; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 3: Hỗn hợp raxemic gồm axit 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic



Thêm NaOH 2M (aq) (59,9 μl , 0,120mmol) vào dung dịch của hỗn hợp hỗn hợp raxemic gồm 2a: etyl 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (9mg, 0,028mmol) trong MeOH (0,45mL) và THF (0,75mL),. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Cô đặc hỗn hợp tạo thành trong áp suất giảm để thu được cặn, pha loãng cặn này bằng NaOH 2M (aq) (5mL) và rửa bằng DCM (5mL). Axit hóa lớp hữu cơ chứa nước bằng HCl 2M (aq) (8mL) và chiết xuất bằng DCM (3 x 5mL). Đưa dịch chiết hữu cơ gom được qua cột sắc ký tách pha và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hỗn hợp raxemic gồm axit 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic;

LC-MS: $R_t = 1,44\text{min}$; MS m/z $[M+H]^+$ 298,5; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 4: Hỗn hợp raxemic gồm 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

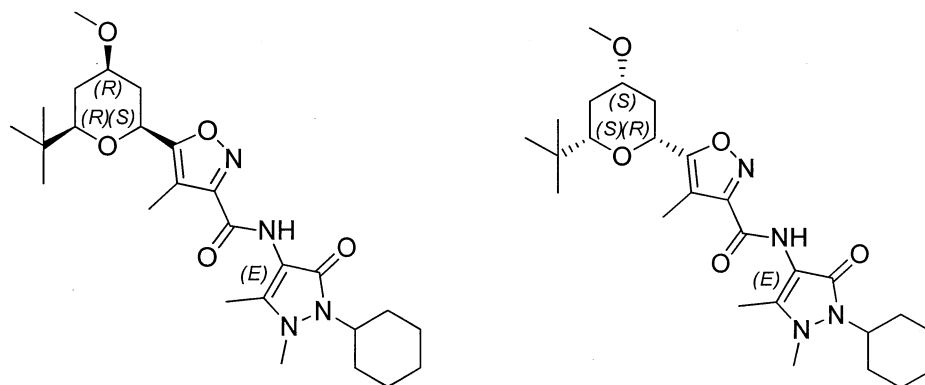
Thêm HATU (12,66mg, 0,033mmol) vào dung dịch của hỗn hợp raxemic gồm axit 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (9mg, 0,030mmol) trong NMP (0,3mL), sau đó thêm 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (6,33mg, 0,030mmol) và Et₃N (8,39μl, 0,061mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Tách hỗn hợp tạo thành giữa EtOAc (10mL) và dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa (10mL). Rửa lớp hữu cơ bằng nước muối (10mL), làm khan qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-10% MeOH trong DCM thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 4,57min; MS m/z [M+H]⁺ 489,3; phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,06 (1H, br s), 4,98 (1H, dd), 4,06 (1H, tt), 3,82 (1H, mult), 3,50 (1H, dd), 3,40 (3H, s), 3,26 (3H, s), 2,28 (3H, s), 2,21 (3H, s), 2,14-2,07 (1H, mults), 2,05–1,82 (8H, br mults), 1,71 (1H, br mult), 1,51 (1H, mult), 1,43-1,29 (2H, br mults), 1,29-1,17 (1H, br mult), 0,92 (9H, s).

Ví dụ 13:

Hỗn hợp gồm 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

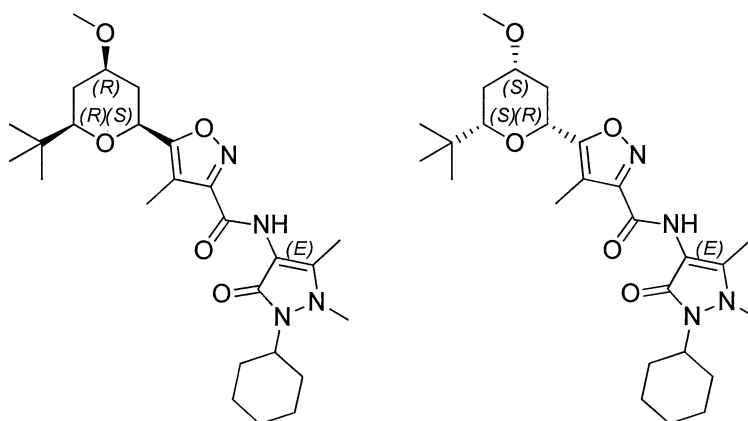


và

Điều chế Ví dụ 13 bằng phương pháp tương tự với phương pháp của ví dụ 12 bằng cách thế 2a bằng 2b trong bước 3;

LC-MS: Rt = 4,40min; MS m/z [M+H]⁺ 489,4; phương pháp 8minLowpHv01

Ví dụ 13a: 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và Ví dụ 13b: 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



Việc phân tách không đối xứng của Ví dụ 13 sử dụng Sắc ký lỏng siêu tới hạn thu được đồng phân đối ảnh riêng lẻ:

Chi tiết các phương pháp:

Cột: Chiralcel OD-H 250 x 10mm, 5µm @ 35°C
 Pha động: 35% Isopropanol + 0,1% v/v DEA / 65% CO₂
 Dòng: 10mL/min
 Lò: UV @ 220 nm
 Thiết bị: Berger Minigram SFC1

Ví dụ 13a: 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit

Thời gian lưu SFC = 4,86min

LCMS: Rt 1,42min MS m/z [M+H]⁺ 489,5; phương pháp 2minLowpHv03

Ví dụ 13b: 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit

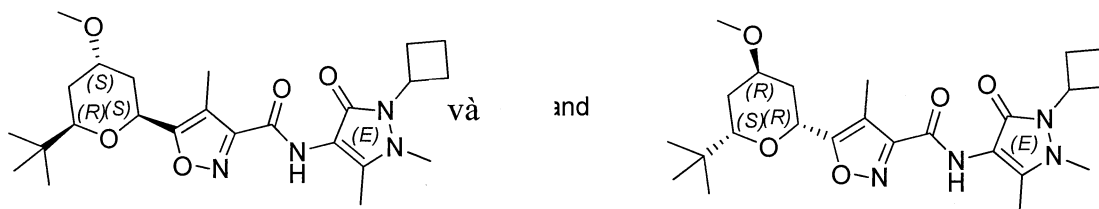
Thời gian lưu SFC= 2,85min

LCMS: Rt 1,42min MS m/z [M+H]⁺ 489,5; phương pháp 2minLowpHv03

Ví dụ 14:

Hỗn hợp đồng phân không đối quang gồm 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-

pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



Bước 1: Hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-(2,2,2-trifloacetoxyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-(2,2,2-trifloacetoxyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Thu etyl 5-formyl-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (100mg, 0,546mmol) và 2,2-đimetylhex-5-en-3-ol (Chất trung gian F) (70,0mg, 0,546mmol) trong DCM (12mL) và xử lý bằng sàng lọc phân tử sấy khô (100mg, 0,546mmol) và TFA (3,15mL, 40,9mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Thêm pivaldehyt (0,059mL, 0,546mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa và chiết xuất bằng DCM (x3). Làm khô dịch chiết hữu cơ thu được qua MgSO₄ và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 2: Hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Hòa tan natri (45,7mg, 1,988mmol) trong etanol và thêm dung dịch tạo thành ở nhiệt độ phòng vào hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-(2,2,2-trifloacetoxyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-(2,2,2-trifloacetoxyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-

metylisoxazol-3-cacboxylat (270mg, 0,663mmol) trong EtOH (5mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Thêm HCl 0,1M (aq)(50mL) và tách và chiết xuất lớp nước bằng EtOAc (x3). Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 4: Hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)-4-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)-4-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Xử lý hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (35mg, 0,112mmol) trong DCM (20mL) ở nhiệt độ phòng bằng chất phản ứng Dess-Martin (47,7mg, 0,112mmol) và khuấy trong 30min. Thêm dung dịch natri metabisulfit chứa nước bão hòa và khuấy hỗn hợp trong 15min. Tách các lớp tạo thành và rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa. Chiết phần chứa nước bằng DCM và Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-40% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4,78 (1H, dd), 4,38 (2H, q), 3,34 (1H, dd), 2,83 (1H, mult), 2,62-2,56 (1H, mults), 2,45-2,33 (2H, br mults), 2,21 (3H, s), 1,35 (3H, t), 0,90 (9H, s).

Bước 5: Hỗn hợp đồng phân không đối quang gồm hợp chất axit 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (1:1)

Làm lạnh hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)-4-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)-4-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (420mg, 1,358mmol) trong THF (20mL) đến -78°C và xử lý bằng L-Selectrit 1M trong THF (1,426mL, 1,426mmol) và khuấy ở -78°C

trong 3 giờ. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng axit axetic và rửa bằng HCl 1M (aq). Chiết phần chứa nước bằng EtOAc (x2). Gom tất cả các lớp hữu cơ, làm khan qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-50% EtOAc trong iso-hexan thu được nguyên liệu thô. Hòa tan nguyên liệu thô trong THF, xử lý bằng NaOH 2M (aq) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Axit hóa hỗn hợp tạo thành bằng cách sử dụng HCl 1M (aq) và chiết xuất bằng EtOAc. Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO_4 và lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;
LC-MS: Rt = 1,10min; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 284,3; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 6: Hỗn hợp đồng phân không đối quang gồm hợp chất methyl 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylat và methyl 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylat (1:1) và hợp chất methyl 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylat và methyl 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylat (1:1)

Thêm hỗn hợp đồng phân không đối quang gồm hợp chất axit 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylic và axit 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylic (1:1) (31mg, 0,109mmol) trong DMF (0,5mL) vào dung dịch natri hydrit (10,94mg, 0,274mmol) trong DMF (2mL) ở 0°C. Để hỗn hợp ấm lên nhiệt độ phòng, khuấy trong 2 giờ và thêm iodometan (0,068mL, 1,094mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng HCl 2M (aq) và chiết xuất bằng EtOAc. Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng LiCl 0,5M (aq), nước muối, làm khan qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-30% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 7: Hỗn hợp đồng phân không đối quang gồm axit 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylic và axit 5-

((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic

Xử lý hỗn hợp đồng phân không đối quang gồm hợp chất methyl 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và methyl 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (1:1) và hợp chất methyl 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và methyl 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (1:1) (14mg, 0,045mmol) trong THF (1mL) và xử lý MeOH (0,6mL) bằng NaOH 2M (aq) (0,090mL, 0,180mmol) ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Xử lý hỗn hợp tạo thành bằng HCl 2M (aq) (4mL) và chiết xuất bằng EtOAc (x2). Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO₄ và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 8: Xử lý hỗn hợp đồng phân không đối quang gồm 5-((2R,4R,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2R,4S,6S)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2S,4R,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2S,4S,6R)-6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (20mg, 0,067mmol) và 4-amino-2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian E) (12,80mg, 0,071mmol) trong DMF (0,5mL) bằng DIPEA (0,047mL, 0,269mmol) và HATU (33,2mg, 0,087mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Xử lý hỗn hợp tạo thành bằng nước và chiết xuất bằng EtOAc (x2). Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng liti clorua 0,5M (aq), nước muối, làm khan qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Hấp thu nguyên liệu thô vào silica và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

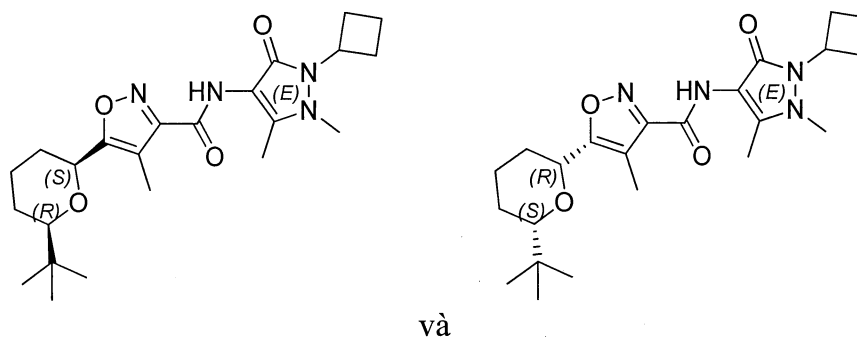
LC-MS: Rt = 1,38min; MS m/z [M+H]⁺ 461,6; phương pháp 2minLowpHv03

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,10 (1H, br s), 4,99 (1H, d), 4,63 (1H, mult), 3,82 (1H, mult), 3,51 (1H, d), 3,41 (3H, s), 3,28 (3H, s), 2,88-2,75 (2H, br mults), 2,41-2,31 (2H, br

mults), 2,28 (3H, s), 2,22 (3H, s), 2,14-2,06 (1H, br mult), 1,99-1,83 (3H, br mults), 1,83-1,72 (1H, br mult), 1,52 (1H, mult), 0,92 (9H, s).

Ví dụ 15:

5-(6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-cyclobutyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamit



Bước 1: Hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-4-bromo-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylat và etyl 5-((2S,6R)-4-bromo-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylat (1:1)

Thêm bromotrimethylsilan (0,405mL, 3,12mmol) vào bình phản ứng đã được làm lạnh bằng đá trong nitor chứa 2,2-dimethylhex-5-en-3-ol (Chất trung gian F) (400mg, 3,12mmol) và indi (III) bromua (55,4mg, 0,156mmol) trong DCM khô (31mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng với làm lạnh bằng đá trong 30min. Làm lạnh bình phản ứng thứ hai chứa dung dịch etyl 5-formyl-4-methylisoxazol-3-carboxylat (Chất trung gian C) (572mg, 3,12mmol) trong DCM khô (31mL) trong nitor bằng đá. Thêm từng giọt hỗn hợp này vào bình phản ứng thứ nhất trong 30min với đá lạnh. Khuấy hỗn hợp phản ứng với đá lạnh trong 1,5 giờ và ở nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm pivalaldehyt (0,085mL, 0,781mmol) vào hỗn hợp phản ứng và khuấy hỗn hợp này trong 2 giờ. Tiếp theo thêm pivalaldehyt (0,085mL, 0,781mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm dung dịch NaHCO₃ (aq) chứa nước bão hòa vào hỗn hợp tạo thành và khuấy mạnh hỗn hợp trong 2 phút. Đưa hỗn hợp tạo thành qua cột sắc ký tách pha và thu dung dịch rửa giải hữu cơ và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic

oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-30% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS; Rt = 1,68min; MS m/z [M+H]⁺ 376,4; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 2: Hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (1:1)

Thêm Pd/C 10% (26,5mg, 0,249mmol) vào hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-4-bromo-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-4-bromo-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (1:1) (233mg, 0,623mmol) trong EtOH (7,1mL) và EtOAc (0,7mL) trong khí nitơ và khuấy hỗn hợp trong khí quyển hydro ở nhiệt độ phòng trong 7 giờ. Thêm natri bicacbonat (209mg, 2,490mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng trong khí quyển hydro qua đêm. Tiếp theo, thêm Pd/C 10% (26,5mg, 0,249mmol) và khuấy liên tục trong khí quyển hydro qua đêm. Lọc hỗn hợp tạo thành qua cột sắc ký Celite®, rửa giải bằng EtOAc và loại bỏ dung môi hữu cơ trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-50% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,72min; MS m/z [M+H]⁺ 296,3; phương pháp 2minLowpHv03

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4,54 (1H, d), 4,66 (2H, q), 3,01 (1H, d), 2,19 (3H, s), 1,94 (1H, mult), 1,83-1,77 (1H, mult), 1,73-1,48 (3H, mults), 1,34 (3H, t), 1,35-1,26 (1H, mults), 0,84 (9H, s).

Bước 3: Hỗn hợp gồm axit 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (1:1)

Thêm NaOH 2M (aq) (0,209mL, 0,417mmol) vào dung dịch đã khuấy etyl 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (1:1) (112mg, 0,379mmol) trong THF (2mL) và MeOH (1,2mL) ở nhiệt độ phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm và pha loãng phần cặn bằng EtOAc và nước. Tách các lớp và rửa lớp chứa nước bằng EtOAc

(x2). Axit hóa lớp chứa nước bằng cách thêm HCl 2M (aq) và chiết xuất bằng EtOAc
 (x3). Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO₄ và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS; Rt 1,57min; MS m/z [M+H]⁺ 268,3; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 4: 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

Thêm oxalyl clorua (0,014mL, 0,165mmol) và DMF (0,023mL, 0,299mmol) vào dung dịch hỗn hợp gồm axit 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (1:1) (40mg, 0,150mmol) trong DCM khô (3mL) trong nitơ. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 5 phút và thêm 4-amino-2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian E) (27,1mg, 0,150mmol) và triethylamin (0,063mL, 0,449mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Thêm nước vào hỗn hợp tạo thành và khuấy mạnh trước khi đưa qua cột sắc ký tách pha. Thu phần hữu cơ và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Sau đó hấp thu nguyên liệu thô vào silica và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được nguyên liệu thô là hỗn hợp đồng phân đối ảnh.

Phân tách không đối xứng nguyên liệu sử dụng Sắc ký lỏng siêu tới hạn thu được đồng phân đối ảnh riêng lẻ:

Chi tiết phương pháp:

Cột:	Phenomenex LUX C2 250 x 10 mm cột, 5 um @ 35°C
Pha động:	50% Metanol + 0,1% v/v DEA / 50% CO ₂
Flow:	10mL/min
Detection:	UV @ 220 nm
Instrument:	Berger Minigram SFC System 2

Ví dụ 15a: 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xycllobutyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xycllobutyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit

SFC không đối xứng: Rt = 14,26min

LC-MS: Rt = 4,59min; MS m/z [M+H]⁺ 431,5; phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,28 (1H, br s), 4,69-4,59 (2H, mults), 3,32 (3H, s), 3,10 (1H, d), 2,83 (2H, mults), 2,41-2,34 (2H, mults), 2,29 (3H, s), 2,23 (3H, s), 2,03 (1H, br d), 1,96-1,60 (6H, mults), 1,45-1,33 (1H, mults), 0,93 (9H, s).

Ví dụ 15b: 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xycllobutyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xycllobutyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit

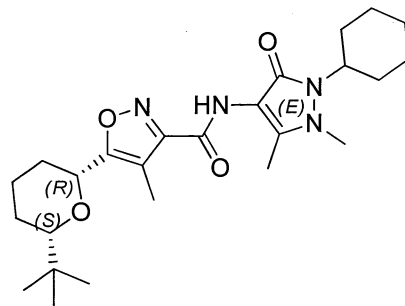
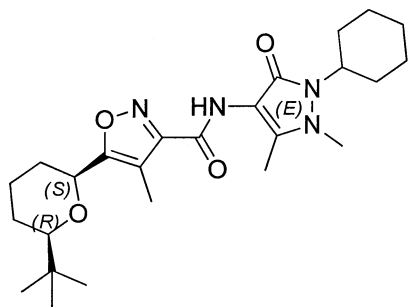
Chiral SFC: Rt = 18,40min

LC-MS : Rt = 4,58min; MS m/z [M+H]⁺ 431,5; phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,28 (1H, br s), 4,69-4,59 (2H, mults), 3,32 (3H, s), 3,10 (1H, d), 2,83 (2H, mults), 2,41-2,34 (2H, mults), 2,29 (3H, s), 2,23 (3H, s), 2,03 (1H, br d), 1,96-1,60 (6H, mults), 1,45-1,33 (1H, mults), 0,93 (9H, s).

Ví dụ 16:

5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit



Điều chế hợp chất tiêu đề bằng phương pháp tương tự phương pháp của ví dụ 15 bằng cách thay thế 4-amino-2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian E) trong bước 4 với 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D). Phân tách không đối xứng sử dụng Sắc ký lỏng siêu tới hạn thu được chất đồng phân đối ảnh riêng lẻ:

Chi tiết phương pháp:

Cột: Chiralpak OD-H 250x10mm, 5 μ m @ 35°C
 Pha động: sc-CO₂: Isopropanol + DEA 0,1%
 Flow: 10mL/min
 Detection: UV @ 220 nm
 Instrument: Berger Minigram SFC1

5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

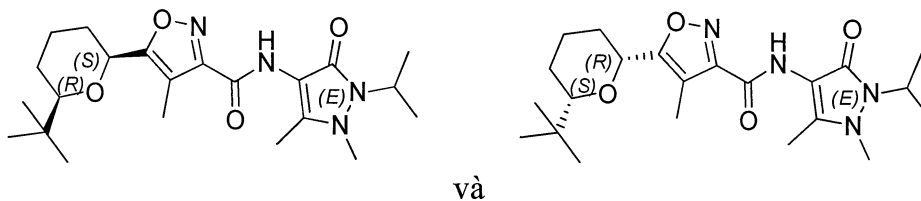
Chiral SFC Rt = 8,19 min;

LC-MS: Rt = 4,87min; MS m/z [M+H]⁺ 459,5; phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,99 (1H, s), 4,53 (1H, dd), 3,97 (1H, tt), 3,18 (3H, s), 3,01 (1H, dd), 2,20 (3H, s), 2,12 (3H, s), 1,96-1,86 (2H, mults), 1,83-1,74 (4H, mults), 1,72-1,49 (6H, mults), 1,35-1,22 (2H, mults), 1,21-1,11 (2H, mults), 0,84 (9H, s).

Ví dụ 17:

Hỗn hợp gồm 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-isopropyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-isopropyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



Bước 1: Hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)-4-iodotetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)-4-iodotetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (1:1)

Thêm từng giọt TMSCl (0,698mL, 5,46mmol) trong 10 giây vào dung dịch đã khuấy etyl 5-formyl-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (1g, 5,46mmol), 2,2-dimethylhex-5-en-3-ol (Chất trung gian F) (0,700g, 5,46mmol) và natri iđua (0,818g, 5,46mmol) trong MeCN khô (20mL) trong nitơ ở nhiệt độ phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm pivalaldehyt (0,593mL, 5,46mmol) vào hỗn hợp tạo thành và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 3 giờ. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng EtOAc và rửa bằng dung dịch natri thiosulfat 10% (aq) (x1) và nước (x1). Làm khan lớp hữu cơ qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Sau đó hấp thu nguyên liệu thô vào silica và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 0-50% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,76min; MS m/z [M+H]⁺ 422,3; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 2: Hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (1:1)

Thêm DBU (0,284mL, 1,885mmol) vào dung dịch hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)-4-iodotetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)-4-iodotetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (1:1) (794mg, 1,885mmol) trong toluen (3,8mL) và khuấy dung dịch ở nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm DBU (0,142mL, 0,94mmol) vào hỗn hợp tạo thành và khuấy hỗn hợp ở

nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng EtOAc và nước và tách các lớp. Chiết xuất lớp chứa nước bằng EtOAc. Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Sau đó hấp thu nguyên liệu thô vào silica và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-20% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: $R_t = 1,64\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 294,5; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 3: Hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Thêm Pd/C 10% (769mg, 0,723mmol) vào dung dịch hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)-5,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)-5,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (1:1) (212mg, 0,723mmol) trong etanol (14.5mL) trong nitơ. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong khí quyển hydro ở nhiệt độ phòng qua đêm. Lọc hỗn hợp tạo thành qua cột sắc ký Celite® trong nitơ, rửa giải bằng EtOAc. Loại bỏ dung môi hữu cơ trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: $R_t = 1,70\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 296,4; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 4: axit 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (1:1)

Thêm NaOH 2M (aq) (0,186mL, 0,372mmol) vào dung dịch hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (100mg, 0,339mmol) trong THF (3mL) và MeOH (1,8mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Cô đặc hỗn hợp tạo thành trong áp suất giảm và pha loãng phần cặn bằng EtOAc và nước. Chiết xuất lớp hữu cơ bằng 0,NaOH 1M (aq). Axit hóa các lớp chứa nước gom được bằng HCl 1M (aq) và chiết xuất bằng EtOAc (x3). Làm khan dịch chiết

hữu cơ gom được qua MgSO_4 và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: $R_t = 1,52\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 268,4; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 5: Hỗn hợp gồm 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-isopropyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamid và 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-isopropyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamid (1:1).

Thêm oxalyl clorua (0,026mL, 0,302mmol) và DMF (2,230 μL , 0,029mmol) vào dung dịch hỗn hợp gồm axit 5-((2R,6S)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylic và axit 5-((2S,6R)-6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylic (1:1) (77mg, 0,288mmol) trong DCM (2mL) trong nitơ. Thêm 4-amino-2-isopropyl-1,5-dimethyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian G) (48,7mg, 0,288mmol) và triethylamin (0,161mL, 1,152mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm NaOH 1M và DCM vào hỗn hợp tạo thành và đưa hỗn hợp qua cột sắc ký tách pha. Làm khan lớp hữu cơ qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Sau đó hấp thu nguyên liệu thô vào silica và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

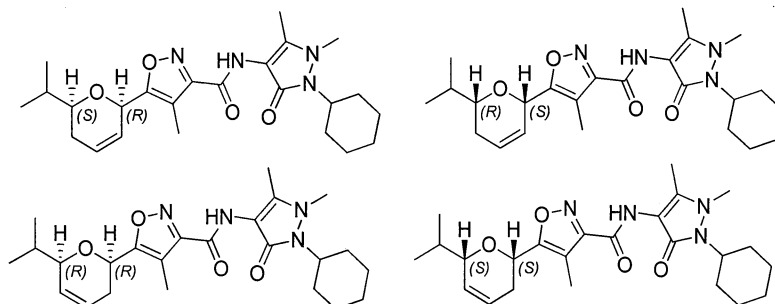
LC-MS: $R_t = 4,50\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 419,5; phương pháp 8minLowpHv01

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 9,50 (1H, s), 4,72 (1H, mult), 4,36 (1H, mult), 3,22 (3H, s), 3,16 (1H, d), 2,14 (3H, s), 2,04 (3H, s), 1,99-1,90 (1H, mult), 1,84-1,78 (1H, mult), 1,70-1,59 (3H, br mult), 1,35 (6H, d), 1,38-1,23 (1H, br mult), 0,88 (9H, s).

Ví dụ 18:

Hỗn hợp gồm N-(2-xyclohexyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2R,6R)-6-isopropyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamid và N-(2-xyclohexyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2R,6S)-6-isopropyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamid và N-(2-xyclohexyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2S,6R)-6-isopropyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamid và N-(2-xyclohexyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-

đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2S,6S)-6-isopropyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamit



Bước 1: Etyl 4-metyl-5-vinylisoxazol-3-cacboxylat

Điều chế hợp chất tiêu đề tương tự với chất trung gian C, bước 1.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 6,86 (1H, dd), 6,02 (1H, d), 5,69 (1H, d), 4,37 (2H, q), 2,19 (3H, s), 1,33 (3H, t).

Bước 2: axit 4-metyl-5-vinylisoxazol-3-cacboxylic

Hòa tan etyl 4-metyl-5-vinylisoxazol-3-cacboxylat (250mg, 0,993mmol) trong THF (5,3mL) và MeOH (3,2mL) và thêm NaOH 2M (aq) (497 μ L, 0,993mmol) vào hỗn hợp. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Cô đặc hỗn hợp tạo thành trong áp suất giảm và xử lý bằng HCl 2M (5mL) và nước (5mL). Thêm DCM vào dung dịch tạo thành chứa nước khi tạo thành nhũ tương. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Tạo huyền phù cặn tạo thành trong DCM (25mL) và đưa qua cột tách pha. Loại bỏ dung môi hữu cơ trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,04 min: MS m/z [M+H] $^+$ 154,1: Phương pháp 2minLowpHv03

Bước 3: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-vinylisoxazol-3-cacboxamit

Xử lý huyền phù axit 4-metyl-5-vinylisoxazol-3-cacboxylic (172mg, 0,809mmol) trong DCM (10mL) được làm lạnh đến 0°C bằng oxalyl clorua (0,142mL, 1,617mmol) và DMF (4 giọt). Khuấy hỗn hợp phản ứng bằng 0°C trong 1 giờ và ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm và hòa tan phần cặn trong DCM (8mL). Thêm 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (169mg, 0,809mmol)

(Chất trung gian D) và triethylamin (0,338mL, 2,426mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng nước (15mL) và chiết xuất bằng DCM (x2). Gom dịch chiết hữu cơ và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 20-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt 1,11min: MS m/z [M+H]⁺ 345,4: Phương pháp 2minLowpHv03

Bước 4: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-formyl-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

Thêm natri periodat (99mg, 0,462mmol) và Os EnCat™ (Microencapsulated OsO₄) (10,26mg, 3,08 μmol) vào dung dịch N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-vinylisoxazol-3-cacboxamit (53mg, 0,154mmol) trong THF (1mL) và nước (0,5mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Lọc hỗn hợp tạo thành qua nút lọc len cotton và cô đặc dung môi rửa giải trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 10,09 (1H, s), 8,34 (1H, br s), 4,07 (1H, mult), 3,32 (3H, s), 2,57 (3H, s), 2,23 (3H, s), 2,08-1,95 (2H, br mults), 1,94-1,80 (4H, br mults), 1,71 (1H, br mult), 1,44-1,30 (2H, br mults), 1,30-1,16 (1H, br mult).

Bước 5: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

Làm lạnh dung dịch N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-formyl-4-metylisoxazol-3-cacboxamit (53mg, 0,153mmol) trong THF (1,5mL) đến 0°C và thêm từng giọt alylmagie bromua 1M trong Et₂O (337μl, 0,337mmol) trong 15min. Làm ấm hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ phòng và thêm NH₄Cl (aq) bão hòa. Chiết xuất lớp chứa nước với DCM (x3). Đưa dịch chiết hữu cơ gom được qua cột sắc ký tách pha và loại bỏ dung môi hữu cơ trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 50-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 6: Hỗn hợp gồm N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2R,6R)-6-isopropyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit và N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2R,6S)-6-isopropyl-5,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit và N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2S,6R)-6-isopropyl-5,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit và N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2S,6S)-6-isopropyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit

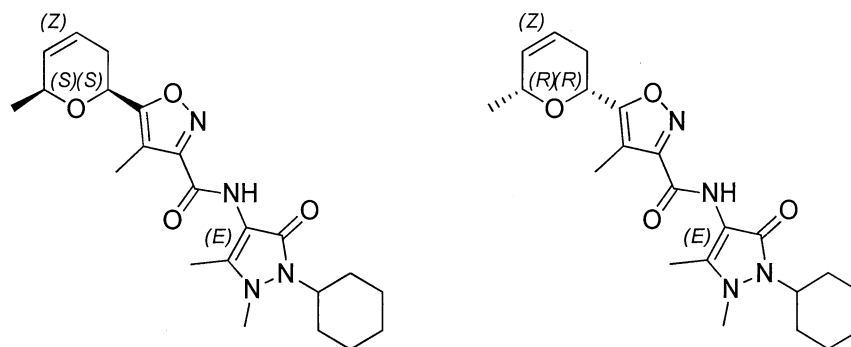
Làm lạnh dung dịch N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit (26mg, 0,054mmol) trong DCM (0,5mL) đến 0°C và thêm isobutyraldehyt (5,38μl, 0,059mmol) và TMSOTf (10,66μl, 0,059mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng bằng 0°C trong 1 giờ và ở nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm dung dịch NH₄Cl (aq) bão hòa vào hỗn hợp tạo thành và chiết xuất dung dịch này bằng DCM (x3). Đưa dịch chiết hữu cơ gom được qua cột sắc ký tách pha và loại bỏ dung môi hữu cơ trong áp suất giảm. Hòa tan nguyên liệu thô trong DMSO và tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký pha đảo tự động trực tiếp UV trong 9,5 phút Gradient của MeCN 30-70% trong nước (axit formic 0,1%) sử dụng cột Xselect CSH Prep C18 để thu được hợp chất tiêu đề là hỗn hợp alken, tỷ lệ sản phẩm dự kiến bởi NMR là 3:2 4-en:3-en; hóa học lập thể dự kiến là syn.

LC-MS: Rt = 1,40min; MS m/z [M+H]⁺ 443,3: Phương pháp 2minLowpHv03

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,13 – 8,07 (m, 2H), 6,08 – 6,03 (m, 1H), 5,936 – 5,92 (m, 1H), 5,80 – 5,73 (m, 2H), 5,46 – 5,42 (m, 1H), 4,85 (dd, J = 10,37, 3,3, 1H), 4,18 – 4,14 (m, 1H), 4,10 – 4,04 (m, 3H), 3,43 – 3,40 (m, 1H), 3,32 – 3,24 (m, 7H), 2,30 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,24 – 2,21 (m, 8H), 2,02 – 1,50 (m, 16H), 1,44 – 1,06 (m, 8H), 1,01 – 0,94 (m, 12H).

Ví dụ 19:

Hỗn hợp gồm N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2S,6S)-6-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit và N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,6R)-6-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit



và

Bước 1: Ethyl 5-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylat

Làm lạnh dung dịch boron triflorua diethyleat (54,1 μ l, 0,427mmol) trong DCM (0,3mL) đến -78°C . Trong bình phản ứng riêng biệt, làm lạnh dung dịch ethyl 5-formyl-4-methylisoxazol-3-carboxylat (Chất trung gian C) (68mg, 0,371mmol) và allyltrimethylsilan (59,0 μ l, 0,371mmol) trong DCM đến -78°C và thêm từng giọt dung dịch này vào dung dịch boron triflorua diethyleat. Khuấy hỗn hợp phản ứng bằng -78°C trong 1 giờ và ở nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm dung dịch NaHCO_3 (aq) bão hòa (5mL) vào hỗn hợp tạo thành và chiết xuất hỗn hợp này bằng DCM (x3). Đưa dịch chiết hữu cơ gom được qua cột sắc ký tách pha và cô đặc dung môi rửa giải trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-50% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,07min; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 226,1: Phương pháp 2minLowpHv03

Bước 2: Ethyl 4-methyl-5-(6-methyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-carboxylat

Xử lý dung dịch ethyl 5-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxylat (35mg, 0,155mmol) trong DCM (1mL) bằng axetaldehyt (8,72 μ l, 0,155mmol) và làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến 0°C . Thêm dung dịch TMSOTf (80,4 μ L, 0,465mmol) trong DCM (1,5mL) được làm lạnh đến 0°C và khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0°C trong 30 phút và ở nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm dung dịch amoni clorua (aq) bão hòa (2mL) vào hỗn hợp tạo thành và chiết xuất dung dịch bằng DCM (x3). Đưa dịch chiết hữu cơ gom được qua cột sắc ký tách pha và cô đặc dung môi rửa giải trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 0-100% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,32min: MS m/z [M+H]⁺ 252,2: Phương pháp 2minLowpHv03

Bước 3: axit 4-metyl-5-(6-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxylic

Thêm NaOH 2M (aq) (27,9 μ l, 0,056mmol) vào dung dịch etyl 4-metyl-5-(6-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxylat (14mg, 0,056mmol) trong MeOH (0,2mL) và THF (0,3mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Cô đặc hỗn hợp tạo thành trong áp suất giảm và thêm NaOH 2M (aq) (1mL) và nước (1mL). Chiết phần chứa nước bằng DCM (x3) và đưa dịch chiết hữu cơ gom được qua cột sắc ký tách pha. Cô đặc dung môi rửa giải trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 4: Hỗn hợp racemic gồm N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2S,6S)-6-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit và N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,6R)-6-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit

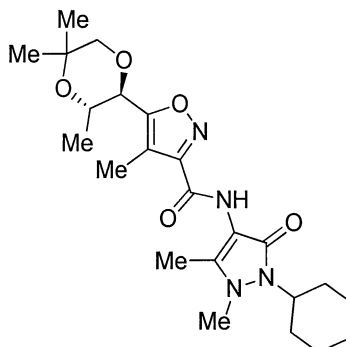
Thêm HATU (20,49mg, 0,054mmol) vào dung dịch axit 4-metyl-5-(6-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxylic (12,03mg, 0,054mmol) trong NMP (0,5mL). Thêm 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (11,28mg, 0,054mmol) và triethylamin (7,49 μ l, 0,054mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Tách hỗn hợp tạo thành giữa natri hydro cacbonat chứa nước bão hòa (10mL) và EtOAc (10mL). Rửa phần hữu cơ bằng nước muối (10mL), làm khan qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 40-100% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 3,65min: MS m/z [M+H]⁺ 415,3: Phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,98 (s, 1H), 5,86 – 5,77 (m, 1H), 5,68 – 5,60 (m, 1H), 4,77 (dd, J = 10,9, 3,3Hz, 1H), 4,37 (s, 1H), 4,04 - 3,93 (m, 1H), 3,31 (t, J = 7,0Hz, 1H), 3,26 (s, 3H), 2,67 - 2,54 (m, 1H), 2,31 (t, J = 8,1Hz, 1H), 2,19 – 2,08 (m, 7H), 2,02 - 1,87 (m, 2H), 1,86 - 1,72 (m, 2H), 1,64 - 1,59 (m, 1H), 1,36 – 1,05 (m, 7H).

Ví dụ 20:

N-(2-cyclohexyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-methyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimethyl-1,4-dioxan-2-yl)isoxazol-3-carboxamit



Bước 1: Etyl 5-((1R,2S)-2-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-1-hydroxypropyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Thêm từng giọt tertbutylđimetylsilyl clorua (6,3g, 41,5mmol) vào etyl 5-((1R,2S)-1,2-đihydroxypropyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian B) (8,65g, 37,7mmol), 4-đimetylaminopyridin (1,38g, 11,32mmol) và trietylamin (5,80mL) trong DMF (100mL) ở 0°C và để phản ứng ấm lên nhiệt độ phòng. Sau 18h, phân tách phản ứng giữa EtOAc và nước muối, rửa bằng amoni clorua chứa nước bão hòa, nước muối, làm khô qua Na₂SO₄ và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 15% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,59 min; MS m/z [M+H]⁺ 344,4; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 2: etyl 5-((1R,2S)-2-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-1-((2-metylalyl)oxy)propyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và 2-metylalyl 5-((1R,2S)-2-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-1-((2-metylalyl)oxy)propyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Thêm từng giọt NaH (700mg của 60wt% thể phân tán dạng dầu khoáng, 17,47mmol) vào etyl 5-((1R,2S)-2-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-1-hydroxypropyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (3,0g, 8,73mmol) trong THF (75mL) ở nhiệt độ phòng, sau đó thêm từng giọt 3-bromo-2-metylprop-1-en (8,81mL, 87mmol) trong 10 phút. Thêm tetrabutyl amoni iđua (2,58g, 6,99mmol) và gia nhiệt phản ứng tạo thành ở 58°C trong 2 giờ. Làm lạnh phản ứng đến nhiệt độ phòng và sau đó làm ngừng bằng nước muối

(75mL) và EtOAc (75mL), làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc trong áp suất giảm thu được hợp chất tiêu đề thô là hỗn hợp có tỷ lệ xấp xỉ 9:1;

LC-MS: $R_t = 1,90\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 398,5; phương pháp 2minLowpHv03

LC-MS: $R_t = 1,95\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 424,5; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 3: axit 5-((1R,2S)-2-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-1-((2-metylalyl)oxy)propyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic

Thêm từng giọt liti hydroxitmonohydrat (3,20g, 76mmol) vào hỗn hợp gồm etyl 5-((1R,2S)-2-((tert-butylđimetyl silyl)oxy)-1-((2-metylalyl)oxy)propyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và 2-metylalyl 5-((1R,2S)-2-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-1-((2-metylalyl)oxy)propyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat [4,5g dạng hỗn hợp có tỷ lệ xấp xỉ 9:1 chứa tetrabutyl amoni iodua gốc (25% trọng lượng/trọng lượng)] trong THF/nước (300mL, 1,5/1,0) và gia nhiệt từ từ hỗn hợp tạo thành lên 70°C . Sau đó làm lạnh về nhiệt độ phòng, tách các lớp và axit hóa lớp chứa nước còn lại bằng axit hydrochloric chứa nước 1M và chiết xuất bằng EtOAc. Gom dịch chiết hữu cơ và rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề thô;

LC-MS: $R_t = 1,75\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 370,5; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 4: 5-((1R,2S)-2-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-1-((2-metylalyl)oxy)propyl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

Thêm từng giọt 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (2,63g, 12,55mmol) vào axit 5-((1R,2S)-2-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-1-((2-metylalyl)oxy)propyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic (4,14g, ~70% trọng lượng/trọng lượng) trong DMF (100mL), sau đó thêm DIPEA (7,8mL, 44,8mmol) và HATU (4,8g, 12,55mmol). Sau đó khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18h, tách hỗn hợp phản ứng giữa EtOAc và nước muối. Chiết xuất pha chứa nước bằng EtOAc và rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 50-100% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,77min; MS m/z [M+H]⁺ 561,8; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 5: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((1R,2S)-2-hydroxy-1-((2-metylalyl)oxy)propyl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit

Thêm từng giọt tetrabutyl amoni florua (15,16mL, 15,16mmol) vào 5-((1R,2S)-2-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-1-((2-metylalyl)oxy)propyl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit (5,06g, 7,58mmol (giả sử độ tinh khiết 76%)) trong THF (160mL) và khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ phòng trong 18h. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng cách thêm từ từ nước (150mL) và EtOAc (200mL). Rửa chất hữu cơ bằng nước muối, làm khô qua Na₂SO₄ và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 50-100% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,12min; MS m/z [M+H]⁺ 447,5; phương pháp 2minLowpHv03

Bước 6: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimetyl-1,4-dioxan-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit

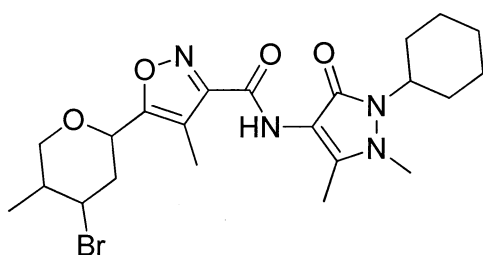
Thêm từng giọt thủy ngân trifloaxetat (3,92g, 9,19mmol) vào N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((1R,2S)-2-hydroxy-1-((2-metylalyl)oxy)propyl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit (3,59g, 8,03mmol) trong THF (160mL) ở nhiệt độ phòng. Thêm thủy ngân oxit đỏ (1,99g, 9,19mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành ở nhiệt độ phòng. Sau 1h, làm lạnh phản ứng đến -78°C và thêm từng giọt trietylboran (16,84mL, 16,84mmol), sau đó thêm từng giọt natri borohydrit (579mg, 15,31mmol). Sau 1h ở -78°C, để phản ứng ấm từ từ lên nhiệt độ phòng. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng cách thêm nước muối và EtOAc, tách, làm khô qua Na₂SO₄ và cô đặc trong áp suất giảm. Thêm DCM (200mL) và Biotage Si-Thiol (17g, 1,4mmol/g load, ~3 eq) và khuấy huyền phù tạo thành nhiệt độ phòng trong 18h. Lọc phản ứng, rửa bằng DCM và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 90-95% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề (>95% ee);

LC-MS: Rt = 1,16min; MS m/z [M+H]⁺ 447,5; phương pháp 2minLowpHv03

^1H NMR. ([400MHz], [DMSO] 9,55 (1H, s), 4,36 (1H, d), 4,09 (1H, m), 3,91 (1H, m), 3,65 (1H, d), 3,42 (1H, d), 3,21 (3H, s), 2,16 (3H, s), 2,03 (3H, s), 1,98 (2H, m), 1,78 (2H, m), 1,64 (3H, m), 1,37 (3H, s), 1,31 (2H, m), 1,17 (1H, m), 1,10 (3H, s), 0,87 (3H, d).

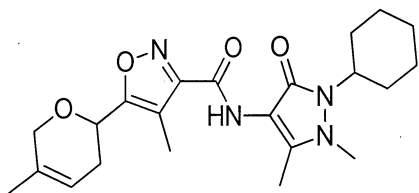
Ví dụ 21.1

[5-(4-bromo-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit]



và

Ví dụ 21.2: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(5-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit



Bước 1: [Etyl 5-(4-bromo-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat]

Thêm bromotrimetylsilan (0,213mL, 1,638mmol) vào hỗn hợp đã được làm lạnh bằng đá 2-metylbut-3-en-1-ol (Aldrich) (0,171mL, 1,638mmol), indi (III) bromua (28,3mg, 0,082mmol) và DCM khô (10mL) trong nitơ. Khuấy hỗn hợp phản ứng bằng đá lạnh trong 30min. Thêm dung dịch etyl 5-formyl-4-metylisoxazol-3-cacboxylat đã lạnh (Chất trung gian C) (300mg, 1,638mmol) trong DCM khô (2mL) vào hỗn hợp phản ứng trong thời gian 5 phút. Khuấy hỗn hợp phản ứng bằng đá lạnh và làm ấm lên nhiệt độ phòng qua cuối tuần. Xử lý hỗn hợp tạo thành bằng NaHCO_3 chứa nước bão hòa (10ml)

bằng cách khuấy ở 0°C. Đưa hỗn hợp tạo thành qua cột sắc ký tách pha và loại bỏ dung môi rửa giải trong áp suất giảm. Hòa tan nguyên liệu thô trong DMSO và tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký pha đảo tự động trực tiếp UV trong 9,5 phút Gradient MeCN 50 - 98% trong nước (axit formic 0,1%). Thêm phần sản phẩm vào EtOAc (50mL) và rửa bằng NaHCO₃ chứa nước bão hòa (50ml). Làm khan phần hữu cơ MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,47min; MS m/z [M+H]⁺ 332,2/334,2; Phương pháp 2minLowpHv03

Bước 2: [Kali 5-(4-bromo-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-carboxylat] và kali (R)-4-metyl-5-(5-metyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-carboxylat và kali (S)-4-metyl-5-(5-metyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-carboxylat

Thêm kali trimetylsilanolat (Aldrich) (107mg, 0,953mmol) vào dung dịch [etyl 5-(4-bromo-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-carboxylat] (211mg, 0,635mmol) trong THF khan (5mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng và nghiền bằng sóng âm. Sau đó thêm THF và khuấy hỗn hợp trong 3 giờ. Cô đặc hỗn hợp tạo thành trong áp suất giảm để thu được hỗn hợp hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,07min; MS m/z [M+H]⁺ 224,2; Rt = 1,20min; MS m/z [M+H]⁺ 306,2; Phương pháp 2minLowpHv03.

Bước 3: [5-(4-bromo-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit] và hỗn hợp gồm hợp chất (R)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(5-metyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit và (S)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(5-metyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit (1:1)

Thêm HATU (Flochem) (265mg, 0,697mmol), 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (133mg, 0,634mmol) và trietylamin (0,194mL, 1,395mmol) vào dung dịch đã khuấy kali 5-(4-bromo-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-carboxylat và kali 4-metyl-5-(5-metyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-

yl)isoxazol-3-carboxylat (hỗn hợp thô) (217mg, 0,634mmol) trong NMP khô (4mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm và tách giữa EtOAc (25mL) và NaOH 1M (25mL). Rửa phần hữu cơ bằng nước (30mL), nước muối (30mL), làm khan qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Hòa tan nguyên liệu thô trong DMSO và tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký pha đảo tự động trực tiếp UV qua 9,5 phút Gradient của MeCN 30 - 70% trong nước (axit formic 0,1%). Thêm phần sản phẩm vào EtOAc (50mL) và rửa bằng NaHCO_3 chứa nước bão hòa (50mL). Làm khan lớp hữu cơ qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề.

Ví dụ 21.1: [5-(4-bromo-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamit] LC-MS: $R_t = 1,30\text{min}$; MS m/z $[M+H]^+$ 497.5: Phương pháp 2minLowpHv03

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,88 (1H, s), 4,47 (1H, mult), 4,03-3,87 (2H, br mults), 3,80-3,72 (1H, mult), 3,14 (3H, s), 2,43-2,36 (1H, br mult), 2,13 (3H, s), 2,08 (3H, s), 2,01 (1H, br mult), 1,91-1,80 (3H, br mults), 1,79-1,68 (5H, br mults), 1,58 (1H, br mult), 1,31-1,18 (2H, br mults), 1,16-1,05 (1H, br mult), 0,95 (3H, d).

Ví dụ 21.2: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(5-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-carboxamit LC-MS: $R_t = 1,25\text{min}$; MS m/z $[M+H]^+$ 415,4: Phương pháp 2minLowpHv03

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,04 (1H, s), 5,63 (1H, mult), 4,78 (1H, dd), 4,26-4,00 (3H, br mults), 3,26 (3H, s), 2,72-2,61 (1H, br mult), 2,28 (3H, s), 2,21 (3H, s), 2,07-1,93 (3H, br mults), 1,92-1,81 (5H, br mults), 1,75-1,66 (2H, br mults), 1,67 (3H, s), 1,44-1,30 (2H, br mults), 1,30-1,18 (1H, br mult).

Ví dụ 22:

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,5R)-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-carboxamit

LC-MS: Rt 1,23min; MS m/z [M+H]⁺ 417,4; phương pháp 2minLowpHv03

Phân tách không đối xứng ở ví dụ 22 sử dụng sắc ký lỏng siêu tới hạn thu được hai chất đồng phân đối ảnh riêng lẻ của đồng phân không đối quang cis và hỗn hợp racemic gồm đồng phân không đối quang trans:

Cột: Chiralpak AD-H 250 x 10 mm, 5 μ m @ 35°C

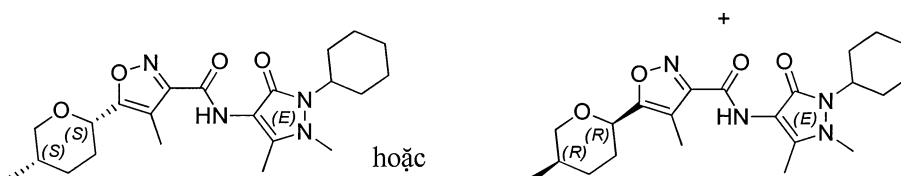
Pha động: 30% Metanol / 70% CO₂

Dòng: 10mL/min

Dò: UV @ 220 nm

Thiết bị: Berger Minigram SFC2

Ví dụ 22.a Đồng phân lập thể đơn của N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit

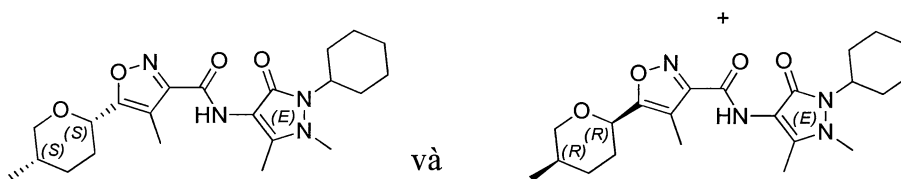


Thời gian lưu SFC = 9,74 min

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,04 (1H, br s), 4,80-4,75 (1H, br mult), 4,05 (1H, tt), 3,76-3,70 (1H, dd), 3,55-3,48 (1H, dd), 3,25 (3H, s), 2,28 (3H, s), 2,21 (3H, s), 2,07-1,93 (2H, br mults), 1,93-1,75 (8H, br mults), 1,71 (1H, br mult), 1,67-1,58 (1H, br mult), 1,44-1,30 (2H, br mults), 1,30-1,18 (1H, br mult), 1,05 (3H, d).

Ví dụ 22.b:

Đồng phân lập thể đơn của N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit

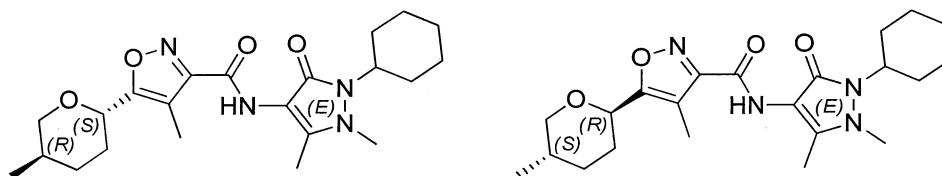


Thời gian lưu SFC = 8,12 min

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,10 (1H, br s), 4,79-4,76 (1H, br mult), 4,06 (1H, tt), 3,75-3,70 (1H, dd), 3,53-3,48 (1H, dd), 3,27 (3H, s), 2,28 (3H, s), 2,22 (3H, s), 2,03-1,95 (2H, mult), 1,92-1,77 (8H, br mults), 1,71 (1H, br mult), 1,66-1,59 (1H, br mult), 1,42-1,32 (2H, br mults), 1,27-1,20 (1H, br mult), 1,05 (3H, d).

Ví dụ 22.c:

Hỗn hợp gồm N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2S, 5R)-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit và N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R, 5S)-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit



Thời gian lưu SFC = 5,84 min

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,10 (1H, br s), 4,50 (1H, dd), 4,10-3,98 (2H, br mults), 3,26 (3H, s), 3,17 (1H, t), 2,27 (3H, s), 2,21 (3H, s), 2,09-1,92 (4H, br mults), 1,93-1,77 (7H, br mults), 1,71 (1H, br d), 1,42-1,17 (3H, br mults), 0,87 (3H, d).

Ví dụ 23:

Hỗn hợp gồm 5-((2R,4S)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và 5-((2S,4R)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



Bước 1: 2,2-đimetylbut-3-en-1-ol

Thêm 2,2'-(etan-1,2-điylbis(sulfanediyl))dietanol (5,57g, 30,6mmol) vào dung dịch 2,2-đimetylbut-3-yn-1-ol (PharmaBlocks) (3g, 30,6mmol) trong dietyl ete khô (40mL), sau đó thêm Pd 5% trên bari sulphat (Aldrich) (6,51g, 3,06mmol). Khử khí hỗn hợp hoàn toàn bằng cách nạp nitơ và khuấy trong khí quyển hydro ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ.

Lọc hỗn hợp tạo thành trong áp suất giảm, rửa chất xúc tác bằng diethyl ete. Cô đặc dịch lọc cẩn thận trong áp suất giảm để loại bỏ hầu hết dung môi. Lọc huyền phù tạo thành và cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5,71 (1H, dd), 5,05-4,97 (2H, mults), 3,27 (2H, s), 1,41 (1H, br mult), 0,95 (6H, s).

Bước 2: Hỗn hợp gồm etyl 5-((2R,4S)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,4R)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Thêm bromotrimethylsilan (0,425mL, 3,28mmol) vào hỗn hợp được làm lạnh bằng đá gồm 2,2-đimetylbut-3-en-1-ol (328mg, 3,28mmol), indi (III) bromua (56,6mg, 0,164mmol) và DCM khô (20mL) trong nitơ và khuấy hỗn hợp tạo thành bằng đá lạnh trong 30 phút. Thêm dung dịch etyl 5-formyl-4-metylisoxazol-3-cacboxylat được làm lạnh bằng đá (Chất trung gian C) (600mg, 3,28mmol) trong DCM khô (2mL) vào hỗn hợp phản ứng trong 15 phút và khuấy hỗn hợp phản ứng bằng đá lạnh trong 85 phút. Xử lý hỗn hợp tạo thành bằng NaHCO_3 chứa nước bão hòa (10mL) bằng cách khuấy ở 0°C . Đưa hỗn hợp lưỡng pha qua cột sắc ký tách pha và cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-60% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,48min; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 346,2/348,2: phương pháp 2minLowpHv03

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5,12 (1H, dd), 4,45 (2H, q), 4,10-4,01 (2H, mult), 2,73-2,65 (1H, mult), 2,46-2,39 (1H, mult), 2,27 (3H, s), 1,82 (3H, s), 1,80 (3H, s), 1,43 (3H, t).

Bước 3: Hỗn hợp gồm axit 5-((2R,4S)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2S,4R)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylic

Thêm NaOH 2M (aq) (1,277mL, 2,55mmol) vào dung dịch đã khuấy gồm hỗn hợp etyl 5-((2R,4S)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat và etyl 5-((2S,4R)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (442mg, 1,277mmol) trong THF (10mL) và MeOH (1mL).

Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng. Sau khi hoàn thành, thêm hỗn hợp phản ứng vào nước (20mL) và axit hóa đến pH 5 -6 bằng cách thêm HCl 1M (aq). Chiết phần chứa nước bằng EtOAc (40mL) và rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng nước muối (20mL), làm khan qua MgSO_4 và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,18min; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 318,4/320,5: Phương pháp 2minLowpHv03

Bước 4: Hỗn hợp gồm 5-((2R,4S)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit và 5-((2S,4R)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxamit

Thêm oxalyl clorua (0,045mL, 0,519mmol) vào hỗn hợp đã khuấy gồm DMF (0,073mL, 0,943mmol) trong DCM khô (15mL) trong nitơ ở 0°C. Sau 5 phút, thêm dung dịch hỗn hợp gồm axit 5-((2R,4S)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxylic và axit 5-((2S,4R)-4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoaxazol-3-cacboxylic (150mg, 0,471mmol) trong DCM khô (3mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 10 phút. Thêm dung dịch 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (109mg, 0,519mmol) trong DCM khô (2mL) và trietylamin (0,197mL, 1,414mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0°C trong 40 phút. Tách hỗn hợp tạo thành giữa DCM (30mL) và NaHCO_3 chứa nước (30mL). Đưa lớp hữu cơ qua cột tách pha và cô đặc dung môi rửa giải trong áp suất giảm. Hòa tan nguyên liệu thô trong DMSO và tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký pha đảo tự động trực tiếp UV qua 9,5 phút Gradient của MeCN 30 - 70% trong nước (axit formic 0,1%). Thêm phần sản phẩm vào EtOAc (50mL) và rửa bằng NaHCO_3 chứa nước bão hòa (50mL). Làm khan lớp hữu cơ qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

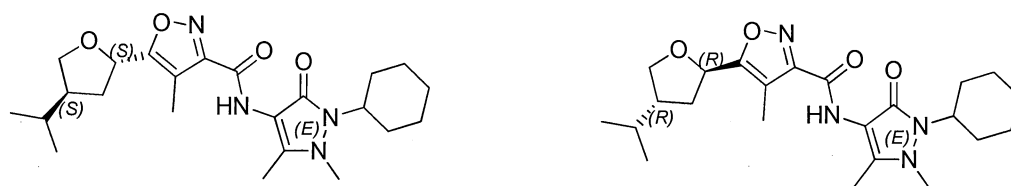
LC: Rt = 1,26min: Phương pháp 2minLowpHv03

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,06 (1H, br s), 5,19 (1H, t), 4,53 (1H, mult), 4,40 (1H, mult), 4,05 (1H, tt), 3,26 (3H, s), 2,92-2,77 (2H, br mult), 2,28 (3H, s), 2,21 (3H, s), 2,06-

1,94 (2H, br mults), 1,92-1,83 (4H, br mults), 1,72 (3H, s), 1,72-1,63 (1H, br mults), 1,64 (3H, s), 1,44-1,30 (2H, br mults), 1,29-1,19 (1H, br mult).

Ví dụ 24:

Hỗn hợp gồm N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2R,4R)-4-isopropyltetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2S,4S)-4-isopropyltetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



Thêm Pd-C (5,18mg, 0,049mmol) vào 5-(4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit (62mg, 0,122mmol) trong ethanol (10mL) trong khí nitơ. Khuấy hỗn hợp trong khí quyển hydro ở 0,35 bar và nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm NaHCO₃ (40,9mg, 0,487mmol) vào hỗn hợp phản ứng và khuấy hỗn hợp phản ứng trong khí quyển hydro ở 0,35 bar và nhiệt độ phòng trong 2,5 giờ. Lọc hỗn hợp tạo thành qua Celite®, rửa qua EtOH. Đưa dịch lọc qua cột sắc ký Biotage 1g Silica-TMT và loại bỏ dung môi rửa giải trong áp suất giảm. Tinh chế nguyên liệu thô bằng HPLC-MS dự bị trong 9,5 phút Gradient của MeCN 30-98% trong nước (TFA 0,1%). Hòa tan phần sản phẩm trong EtOAc (20mL) và rửa bằng NaHCO₃ chứa nước bão hòa (20mL). Rửa lớp hữu cơ bằng nước muối (10mL), làm khan qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,30min; MS m/z [M+H]⁺ 431,5: phương pháp 2minLowpHv03.

Phân tách không đối xứng của ví dụ 24 sử dụng Sắc ký lỏng siêu tới hạn thu được chất đồng phân đối ảnh đơn.

Chi tiết phương pháp:

Cột: Chiralpak IB, 250 x 10 mm, 5 μ m @ 35°C
 Pha động: 40% Isopropanol + 0,1% v/v DEA / 60% CO₂
 Dòng: 10mL/min
 Lò: UV @ 220 nm
 Thiết bị: Berger Minigram SFC1

Ví dụ 24.a: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2R,4R)-4-isopropyltetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2S,4S)-4-isopropyltetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

SFC Rt = 3,99min

LC-MS; Rt = 1,30min; MS m/z [M+H]⁺ 431,5; phương pháp 2minLowpHv03

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,99 (1H, br s), 5,09 (1H, mult), 4,09 (1H, t), 4,10-4,00 (1H, tt), 3,69 (1H, t), 3,24 (3H, s), 2,45-2,36 (1H, mult), 2,25 (3H, s), 2,21 (3H, s), 2,18-2,09 (1H, br mult), 2,06-1,93 (2H, br mults), 1,91-1,83 (5H, br mults), 1,71 (1H, br mult), 1,67-1,60 (1H, br mult), 1,44-1,30 (2H, br mults), 1,29-1,19 (1H, br mult), 1,00 (3H, d), 0,95 (3H, d).

Ví dụ 24.b: N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2R,4R)-4-isopropyltetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-((2S,4S)-4-isopropyltetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

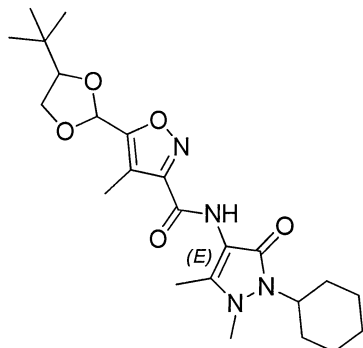
SFC Rt = 5,42min

LC-MS: Rt 1,30min; MS m/z [M+H]⁺ 431,6: Phương pháp 2minLowpHv03

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,06 (1H, br s), 5,12-5,06 (1H, mult), 4,12-4,01 (2H, mults), 3,69 (1H, t), 3,26 (3H, s), 2,44-2,36 (1H, mult), 2,26 (3H, s), 2,21 (3H, s), 2,18-2,08 (1H, mult), 2,05-1,95 (2H, br mults), 1,91-1,83 (5H, br mults), 1,71 (1H, br mult), 1,68-1,59 (1H, mult), 1,44-1,31 (2H, br mults), 1,30-1,19 (1H, br mult), 1,00 (3H, s), 0,95 (3H, s).

Ví dụ 25:

5-(4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



Bước 1: Etyl 5-(4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Thêm 3,3-đimetylbutan-1,2-điol (32,3mg, 0,273mmol) vào dung dịch etyl 5-formyl-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian C) (50mg, 0,273mmol) trong toluen (0,5mL) và gia nhiệt hỗn hợp ở 110°C trong 4,5 giờ. Tách hỗn hợp tạo thành giữa EtOAc và nước và làm khan lớp hữu cơ qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,42min; MS m/z [M+H]⁺ 284,3: Phương pháp 2minHighpHv03

Bước 2: Kali 5-(4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Thêm kali trimetylsilanolat (19,02mg, 0,148mmol) vào dung dịch etyl 5-(4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (42mg, 0,148mmol) trong THF (4mL) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ. Cô đặc hỗn hợp tạo thành trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề.

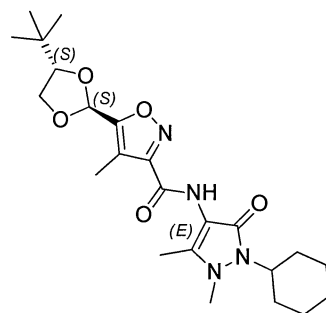
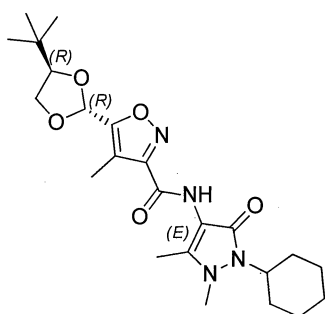
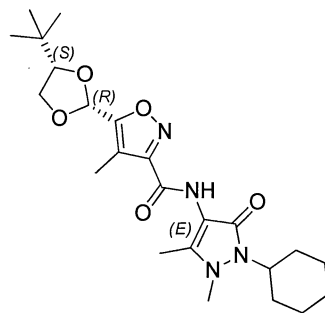
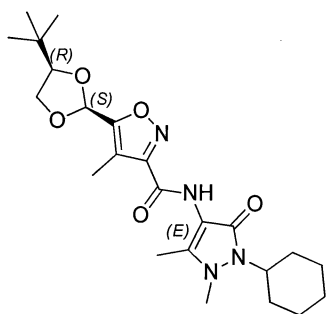
Bước 3: Hỗn hợp gồm 5-((2R,4R)-4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và 5-((2R,4S)-4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và 5-((2S,4R)-4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-

yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit và 5-((2S,4S)-4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

Thêm HATU (62,0mg, 0,163mmol), trietylamin (45,5μl, 0,326mmol) và 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (Chất trung gian D) (31,0mg, 0,148mmol) vào dung dịch kali 5-(4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (43,5mg, 0,148mmol) trong NMP (0,7mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Thêm nước và EtOAc vào hỗn hợp tạo thành. Rửa phần hữu cơ bằng nước muối (x2), làm khan qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-100% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề là hỗn hợp đồng phân không đối quang.

Ví dụ 25a-25d:

5-((2R,4R)-4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2R,4S)-4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2S,4R)-4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit hoặc 5-((2S,4S)-4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



Phân tách không đối xứng 5-(4-(tert-butyl)-1,3-dioxolan-2-yl)-N-(2-cyclohexyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamid sử dụng Sắc ký lỏng siêu tới hạn thu được đồng phân đối ảnh riêng lẻ.

Chi tiết phương pháp:

Cột: Chiralpak IB, 250 x 10 mm, 5 μ m @ 35°C

Pha động: 35% isopropanol + 0,1% v/v DEA / 65% CO₂

Dòng: 10mL/min

Dò: UV @ 220 nm

Thiết bị: Berger Minigram SFC1

Ví dụ 25a: Đồng phân lập thể đơn 5-(4-(tert-butyl)-1,3-dioxolan-2-yl)-N-(2-cyclohexyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-methylisoxazol-3-carboxamid SFC: Rt = 3,36min

LC-MS : Rt = 4,11min ; MS m/z [M+H]⁺ 447,6 : Phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,29 (1H, br s), 6,02 (1H, s), 4,14-4,00 (2H, mults), 3,97-3,87 (2H, mults), 3,36 (3H, s), 2,31 (3H, s), 2,23 (3H, s), 2,09-1,97 (2H, mults),

1,88 (3H, br t), 1,73 (1H, br d), 1,44-1,31 (2H, mults), 1,30-1,20 (2H, mults), 1,01 (9H, s).

Ví dụ 25b: Đồng phân lập thể đơn 5-(4-(tert-butyl)-1,3-dioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

SFC không đối xứng: Rt = 3,78min

LC-MS: Rt = 4,12min; MS m/z [M+H]⁺ 447,5; phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,06 (1H, br s), 6,19 (1H, s), 4,16-4,00 (3H, mults), 3,85 (1H, t), 3,30 (3H, s), 2,30 (3H, s), 2,22 (3H, s), 2,07-1,94 (2H, mults), 1,87 (3H, br t), 1,72 (1H, br d), 1,45-1,20 (4H, mults), 0,99 (9H, s).

Ví dụ 25c: Đồng phân lập thể đơn 5-(4-(tert-butyl)-1,3-dioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

SFC không đối xứng: Rt = 4,05 min

LC-MS: Rt = 4,09 min; MS m/z [M+H]⁺ 447,5; phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,99 (1H, br s), 6,02 (1H, s), 4,10-4,01 (2H, mults), 3,97-3,87 (2H, mults), 3,25 (3H, s), 2,32 (3H, s), 2,21 (3H, s), 2,06-1,93 (2H, mults), 1,88 (3H, br t), 1,71 (1H, br d), 1,44-1,30 (2H, mults), 1,30-1,20 (2H, mults), 1,00 (9H, s).

Ví dụ 25d: Đồng phân lập thể đơn 5-(4-(tert-butyl)-1,3-dioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit

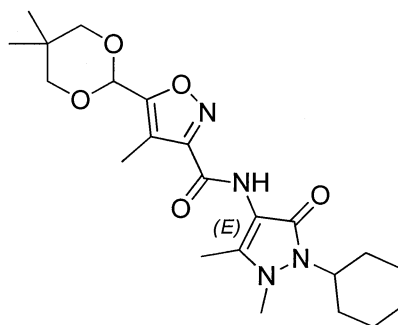
SFC không đối xứng: Rt = 5,95 min

LC-MS: Rt = 4,15min; MS m/z [M+H]⁺ 447,6; phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,00 (1H, br s), 6,20 (1H, s), 4,16-4,09 (2H, mults), 4,07-4,00 (2H, mults), 3,27 (3H, s), 2,30 (3H, s), 2,21 (3H, s), 2,07-1,94 (2H, mults), 1,87 (3H, br t), 1,72 (1H, br d), 1,45-1,20 (4H, mults), 0,99 (9H, s).

Ví dụ 26:

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(5,5-dimetyl-1,3-dioxan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit



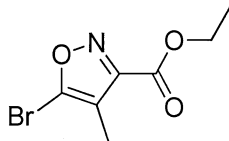
Điều chế hợp chất tiêu đề bằng phương pháp tương tự với phương pháp trong Ví dụ 25 bằng cách thay thế 3,3-dimetylbutan-1,2-diol (Bước 1) bằng 2,2-dimetylpropan-1,3-diol;

LC-MS: Rt = 3,68min; MS m/z [M+H]⁺ 433,4; phương pháp 8minLowpHv01

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,98 (1H, s), 5,58 (1H, s), 3,96 (1H, tt), 3,71 (2H, d), 3,55 (2H, d), 3,18 (3H, s), 2,26 (3H, s), 2,11 (3H, s), 1,97-1,86 (2H, mults), 1,80-1,74 (3H, mults), 1,62 (1H, br d), 1,33-1,11 (4H, mults), 1,23 (3H, s), 0,75 (3H, s).

Chất trung gian A:

Etyl 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylat



Bước 1: Etyl 4-metyl-5-oxo-4,5-dihiđroisoxazol-3-cacboxylat

Thêm hydroxylamin hydroclorua (124g, 1,78 mol) vào diethyl oxalyl propionat (300g, 1,48 mol) trong etanol (2l) và gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở 80°C trong 3 giờ. Làm lạnh hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ phòng và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Xử lý phần cặn bằng nước và DCM và chiết xuất bằng DCM. Làm khô chất hữu cơ gom được và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4,40 (2H, q), 2,09 (3H, s), 1,38 (3H, t).

Bước 2: Etyl 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

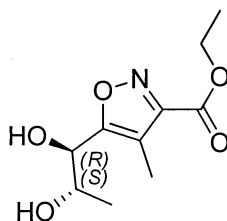
Khuấy etyl 4-metyl-5-oxo-4,5-dihiđroisoxazol-3-cacboxylat (42,5g, 248mmol) và phosphorous oxybromua (199g, 695mmol) cùng nhau và gia nhiệt lên 80°C. Thêm từng giọt triethylamin (34,6mL, 248mmol) trong 15min và khuấy hỗn hợp phản ứng bằng 80°C trong 3 giờ. Làm lạnh hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ phòng. Thêm DCM (400mL) và rót hỗn hợp vào đá (~400mL) kèm khuấy. Thêm NaOH 2M (aq) (1250mL) cho tới khi pH 7 và tách lớp tạo thành. Chiết xuất lớp chứa nước bằng DCM (2 x 300mL) và gom dịch chiết hữu cơ tạo thành, rửa bằng nước (400mL), natri thiosulfat (5% trọng lượng/thể tích dung dịch, 400mL), nước (400mL) và nước muối (400mL). Làm khan phần hữu cơ MgSO_4 và than, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 0-30% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: R_t = 1,02min: MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 234,0: Phương pháp 2minLowpH

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4,47 (2H, q), 2,21 (3H, s), 1,44 (3H, t).

Chất trung gian B:

Etyl 5-((1R,2S)-1,2-đihydroxypropyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat



Bước 1: (E)-etyl 4-metyl-5-(prop-1-en-1-yl)isoxazol-3-cacboxylat

Khử khí huyền phù kali *trans*-1-propenyltrifloborat (9,86g, 66,7mmol), sản phẩm cộng $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{DCM}$ (907mg, 1,11mmol), etyl 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian A) (13g) và trietylamin (7,7mL) trong EtOH (250mL) trong chân không và nạp lại bằng nitơ trước khi gia nhiệt ở 90°C trong 18h. Sau khi làm lạnh đến nhiệt độ phòng, tách phản ứng giữa EtOAc và nước muối, tách, làm khan qua MgSO_4 và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 5-10% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: $R_t = 1,30\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 196,2; phương pháp 2minLowpHv03

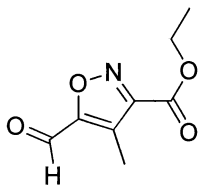
Bước 2: Etyl 5-((1R,2S)-1,2-đihydroxypropyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Thêm từng giọt (E)-etyl 4-metyl-5-(prop-1-en-1-yl)isoxazol-3-cacboxylat (500mg, 2,56mmol) trong *tert*-BuOH-nước (1mL) vào hỗn hợp AD-mix-beta (3,59g, 7,63mmol), metan sulfonamit (731mg, 7,68mmol), AD-mix- β (DHQD) $_2$ PHAL biến đổi (80mg, 0,102mmol) và osmi tetroxit (0,836mL 2,5% trọng lượng dung dịch trong *tert*-BuOH, 0,067mmol) trong *tert*-BuOH-nước (1:1, 19mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ. Thêm natri sulfit (3,9g) một phần và khuấy phản ứng trong 30min. Tách các pha và làm khô pha EtOAc qua Na_2SO_4 và cô đặc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 65-75% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề (96%*ee*);

LC-MS: $R_t = 0,78\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 230,2; phương pháp 2minLowpHv03

Chất trung gian C:

Etyl 5-formyl-4-metylisoxazol-3-cacboxylat



Bước 1: Ethyl 4-metyl-5-vinylisoxazol-3-cacboxylat

Etyl 5-bromo-4-metylisoxazol-3-cacboxylat (Chất trung gian A) (15g, 64,1mmol) và khuấy tributyl(vinyl)stannan (22,48mL, 77mmol) trong dioxan khô (250mL) và lọc bằng nitor trong 90 phút ở nhiệt độ phòng. Thêm tetrakis(triphenylphosphin)paladi (3,70g, 3,20mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng bằng 100°C qua đêm. Tách hỗn hợp phản ứng trong etyl axetat (250mL) và nước (250mL) và tách. Thêm dung dịch natri florua (~1M, 250ml) vào lớp hữu cơ và lọc huyền phù tạo thành qua Celite®. Tách các lớp và rửa chất hữu cơ bằng nước, nước muối, làm khan qua MgSO₄ và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 0-30% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,20min: MS m/z [M+H]⁺ 182,5: Phương pháp 2minLowpHv03

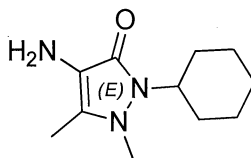
Bước 2: Etyl 5-formyl-4-metylisoxazol-3-cacboxylat

Thêm natri periodat (10,62g, 49,7mmol) và Osmi ENCAT 40 (828mg, 0,248mmol) vào etyl 4-metyl-5-vinylisoxazol-3-cacboxylat (3g, 16,56mmol) trong THF (40mL) và nước (20mL) ở nhiệt độ phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua cuối tuần. Lọc hỗn hợp tạo thành qua Celite® (5 g), rửa qua EtOAc. Tách các lớp và chiết xuất lớp chứa nước bằng EtOAc. Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Tạo huyền phù nguyên liệu thô trong DCM, nghiền bằng sóng âm và đưa qua cột sắc ký tách pha. Thu dung môi rửa giải và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

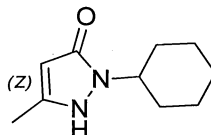
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 10,12 (1H, s), 4,50 (2H, q), 2,56 (3H, s), 1,46 (3H, s).

Chất trung gian D:

4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on



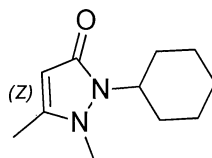
Bước 1: 2-cyclohexyl-5-methyl-1H-pyrazol-3(2H)-on



Thêm xyclohexylhydrazin hydroclorua (AK Scientific) (700g, 4643mmol) vào dung dịch đã khuấy DCM (3000mL) và dung dịch Xnatri hydroxit 1M đá lạnh (1778mL, 3556mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Tách pha tạo thành và chiết xuất lớp nước bằng DCM (4 x 2000mL). Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua natri sulphat khan, lọc và cô đặc trong áp suất giảm. Hòa tan chất rắn tạo thành trong nước (1300mL), thêm axit axetic (1300mL) và etyl axetoacetat (Fluka) (450mL, 3556mmol) vào dung dịch và khuấy hỗn hợp phản ứng bằng 85°C trong 1 giờ. Cô đặc hỗn hợp tạo thành dạng khô trong áp suất giảm và hòa tan phần cặn trong DCM (3000mL) và nước (1000mL). Điều chỉnh pH đến pH 9 sử dụng 2M K₂CO₃ (aq), tách các pha và chiết xuất chất hữu cơ bằng nước muối (1 x 2 L). Làm bão hòa lớp chứa nước thứ nhất bằng natri clorua và chiết xuất pha chứa nước gom được bằng DCM (4 x 2 L). Làm khan dịch chiết hữu cơ gom được qua natri sulfat khan, lọc và cô đặc trong áp suất giảm thu được chất rắn. Nghiền thành bột chất rắn thô, thêm TBME (2000mL) và khuấy hỗn hợp ở 50°C trong 1 giờ, sau đó là 1 giờ nhiệt độ phòng. Lọc huyền phù tạo thành, rửa chất rắn bằng TBME (4 x 500mL). Làm khô chất rắn phân lập được trong chân không ở 45°C trong 16 giờ để thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 10,62 (1H, br s), 5,06 (1H, s), 3,89 (1H, mult), 1,98 (3H, s), 1,81-1,55 (7H, mults), 1,36-1,22 (2H, mults), 1,18-1,05 (1H, mult).

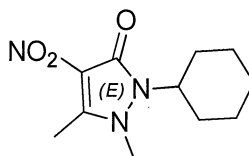
Bước 2: 2-cyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on



Gia nhiệt huyền phù 2-xyclohexyl-5-metyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (525g, 2834mmol) trong N,N-đimetylformamit (2200mL) lên 40°C và thêm metyl iotua (532mL, 8502mmol). Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng lên 70°C trong 20 giờ. Thêm tiếp metyl iotua (177mL, 2834mmol) và khuấy hỗn hợp ở 75°C trong 3,5 giờ, sau đó là 80°C trong 20 giờ. Cô đặc hỗn hợp tạo thành trong áp suất giảm và nghiền phần cặn bằng TBME (2000mL). Thu sản phẩm bằng cách lọc, rửa qua TBME (5x 500mL) để thu được. Tạo huyền phù chất rắn phân lập được trong DCM (2500mL) và nước (500mL) và điều chỉnh pH đến pH 9 sử dụng dung dịch K₂CO₃ 2M chứa nước (1700mL). Tách các pha và chiết xuất lớp chứa nước bằng DCM (3 x 500mL). Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng nước muối (1000mL) và cô đặc trong áp suất giảm. Hòa tan phần cặn tạo thành trong etyl axetat (2000mL), làm khô qua natri sulfat khan và lọc qua 200g gel silica (40-63µm), rửa giải bằng MeOH 10% trong EtOAc (7 x 300mL). Cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm và làm khô ở 65°C để thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 5,02 (1H, s), 3,84 (1H, tt), 3,14 (3H, s), 2,06 (3H, s), 1,98-1,86 (2H, mults), 1,78-1,53 (5H, mults), 1,33-1,20 (2H, mults), 1,18-1,04 (1H, mult).

Bước 3: 2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-4-nitro-1H-pyrazol-3(2H)-on

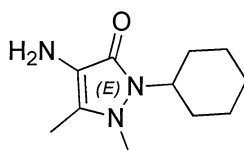


Thêm 2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on (535g, 2231mmol) vào axit trifloaxetic (1940mL) được làm lạnh đến -15°C và làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến 0°C. Thêm từng giọt axit nitric 90% (211mL, 4461mmol) trong 90 phút duy trì nhiệt độ dưới 15°C và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 30 phút ở 10°C. Rót từ từ hỗn hợp tạo thành vào nước đá (8 L) và khuấy trong 30 phút. Thu chất rắn bằng cách lọc và rửa bằng nước (2 x

2L), dung dịch natri bicacbonat bão hòa (1 x 2L), nước (2 x 2L), TBME (3 x 2L) và heptan (2 x 2L). Làm khô chất rắn phân lập được trong lò chân không để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 4,06 (1H, tt), 3,61 (3H, s), 2,57 (3H, t), 2,15-2,03 (2H, mults), 1,81-1,65 (4H, mults), 1,64-1,55 (1H, mult), 1,38-1,24 (2H, mults), 1,19-1,06 (1H, mult).

Bước 4: 4-amino-2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on



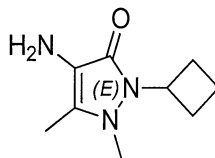
Thêm Pd/C 10% (70g) vào 2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-4-nitro-1H-pyrazol-3(2H)-on (415g, 1,73 mol) trong MeOH (4500mL) và THF (4500mL) và hydro hóa hỗn hợp phản ứng ở 0,1 bar và RT trong 57,5 giờ. Lọc hỗn hợp tạo thành qua bộ lọc áp suất và rửa bằng metanol (1x1 L) và THF (2x 1 L). Cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm để thu được dầu màu đỏ tối. Hòa tan trực tiếp dầu trong TBME (4 L), cô đặc trong áp suất giảm đến ca. 2L và tạo hạt (100mg). Khuấy huyền phù trong 2h ở RT và làm lạnh bằng bể đá trong 1 giờ. Cô đặc chất rắn bằng cách lọc và rửa bằng TBME đá lạnh từng phần cho tới khi mất màu dịch lọc và làm khô trong chân không để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt 0,55min; MS m/z 210,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; phương pháp (SRPb)

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 3,68 (1H, tt), 3,53 (2H, br s), 2,77 (3H, s), 1,96-1,83 (2H, mults), 1,92 (3H, s), 1,78-1,69 (2H, mults), 1,64-1,53 (3H, mults), 1,33-1,19 (2H, mults), 1,17-1,04 (1H, mult).

Chất trung gian E:

4-amino-2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on



Bước 1: tert-butyl 2-xyclobutylidenehydrazinacboxylat

Khuấy hỗn hợp gồm xyclobutanon (16,96mL, 227mmol) và tert-butyl hydrazinacboxylat (30g, 227mmol) trong isohexan (378mL), trong nitơ ở hồi lưu trong 1 giờ. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 1 giờ. Lọc huyền phù tạo thành, rửa giải chất rắn bằng iso-hexan (x2). Làm khô chất rắn trong chân không ở 30°C để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,16 (1H, br s), 3,02 (2H, mult), 2,81 (2H, mult), 2,10-2,00 (2H, mult), 1,53 (9H, s).

Bước 2: tert-butyl 2-xyclobutylhydrazinacboxylat

Thêm từng giọt dung dịch tert-butyl 2-xyclobutylidenehydrazinacboxylat (5,0g, 27,1mmol) trong THF (50mL) trong 1,5 giờ vào dung dịch phức boran tetrahydrofuran (33,9mL, 33,9mmol) trong khí quyển nitơ. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2,5 giờ. Thêm từng giọt boran tetrahydrofuran (3mL, 3mmol) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng qua đêm. Làm ngừng cẩn thận hỗn hợp tạo thành bằng cách thêm nước (50mL) và cô đặc hỗn hợp trong áp suất giảm. Pha loãng phần cặn bằng nước (30mL) và chiết xuất bằng EtOAc (2 x 200mL), sử dụng nước muối để hỗ trợ việc phân tách. Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng nước muối, làm khan qua MgSO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 0-10% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 3: 1-xyclobutyl-2-metylhydrazin

Thêm từng giọt dung dịch tert-butyl 2-xyclobutylhydrazinacboxylat (1,0g, 5,37mmol) trong THF (26,8mL) vào dung dịch liti nhôm hydrua 2,4M trong THF (11,63mL, 27,9mmol) trong khí quyển nitơ. Sau khi hoàn thành việc thêm, khuấy hỗn hợp phản ứng ở hồi lưu trong 20 giờ. Làm lạnh hỗn hợp tạo thành bằng cách sử dụng bể đá mà

được thêm nước (1mL), NaOH 15% (1mL) và nước (3mL). Khuấy huyền phù trong 15 phút và sau đó lọc qua Celite®. Thêm HCl (4M trong dioxan, 1,4mL, 5,6mmol) vào dịch lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm, đồng sôi bằng EtOH (x2). Nghiền nhỏ hỗn hợp bằng ete và lọc chất rắn tạo thành và rửa bằng ete. Làm khô chất rắn trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề.

Bước 4: (S)-metyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxobutanoat

Thêm dung dịch Dess-Martin periodinan (2,84g, 6,69mmol) trong DCM (50mL) vào dung dịch Boc-L-threonin methyl este (1,3g, 5,57mmol) trong DCM (20mL) ở nhiệt độ phòng và trong khí quyển nitơ. Khuấy huyền phù trắng ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng DCM (50mL) và làm ngừng bằng cách thêm NaHCO₃ bão hòa (aq) (50mL) chứa natri sulfit 0,5M (6,2g). Tách các pha và rửa lớp hữu cơ bằng NaHCO₃ nước (aq) (50mL) và nước, làm khan qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng 10-50% EtOAc trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5,72 (1H, br d), 5,07 (1H, d), 3,84 (3H, s), 2,38 (3H, s), 1,46 (9H, s).

Bước 5: tert-butyl (2-cyclobutyl-1,5-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)carbamate

Xử lý dung dịch (S)-metyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-oxobutanoat (400mg, 1,730mmol) trong EtOAc (6,407mL) bằng 1-cyclobutyl-2-methylhydrazin (284mg, 2,076mmol), sau đó là natri axetat (213mg, 2,59mmol). Khuấy huyền phù ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và ở 80°C trong 4 giờ. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng nước (10mL) và thêm EtOAc. Tách các lớp và chiết xuất lớp nước bằng EtOAc. Rửa các lớp hữu cơ gom được bằng nước muối, làm khan qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Hòa tan phần cặn trong EtOAc và thêm iso-hexan. Lọc huyền phù tạo thành và rửa giải chất rắn bằng iso-hexan. Cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm. Sau đó hấp thu nguyên liệu thô vào silica và tinh chế bằng sắc ký rửa giải bằng EtOAc 50-100% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 6,19 (1H, br s), 4,61 (1H, mult), 3,23 (3H, s), 2,85-2,72 (2H, mults), 2,39-2,30 (2H, mults), 2,17 (3H, s), 1,93-1,83 (1H, mult), 1,81-1,71 (1H, mult), 1,48 (9H, s).

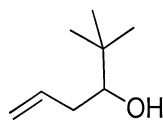
Bước 6: 4-amino-2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on

Thêm axit sulfuric (0,034mL, 0,634mmol) vào dung dịch tert-butyl (2-xyclobutyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)carbamate trong DCM (5mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Tiếp theo thêm axit sulfuric (0,068mL, 1,268mmol) vào hỗn hợp phản ứng và khuấy hỗn hợp trong 2 giờ. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng DCM và nước và tách các lớp. Bazơ hóa lớp chứa nước bằng cách thêm từng giọt NaOH 2M (aq). Chiết xuất lớp hữu cơ bằng DCM (x3) và đưa dịch chiết hữu cơ gom được qua cột sắc ký tách pha. Cô đặc dung môi rửa giải trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4,54 (1H, mult), 2,94 (3H, s), 2,72 (2H, mults), 2,43 (2H, br s), 2,36-2,26 (2H, mults), 2,04 (3H, s), 1,90-1,78 (1H, mult), 1,78-1,67 (1H, mult).

Chất trung gian F:

2,2-đimethylhex-5-en-3-ol

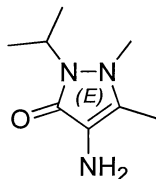


Thêm alylmagie bromua (100mL, 1M trong ete) vào dung dịch trimetylaxetaldehyt (10,2mL, 90,9mmol) trong diethyl ete (200mL) ở 0°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0°C trong 1 giờ. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng amoni clorua bão hòa và chiết xuất bằng diethyl ete. Rửa dịch chiết hữu cơ bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 và lọc. Loại bỏ dung môi cẩn thận trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5,95-5,83 (1H, mult), 5,18 (1H, mult), 5,15 (1H, mult), 3,28 (1H, mult), 2,45-2,35 (1H, mult), 2,06-1,95 (1H, mult), 1,62 (1H, s), 0,95 (9H, s).

Chất trung gian G:

4-amino-2-isopropyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on



Bước 1: Metyl 2-((((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-hydroxybutanoat

Thêm H_2SO_4 (0,781mL, 14,65mmol) vào dung dịch axit 2-((((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-hydroxybutanoic (5g, 14,65mmol) trong MeOH (50mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở hồi lưu qua đêm. Làm lạnh hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ phòng và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký sử dụng gradient của EtOAc 0-100% trong iso-hexan thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,27min; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 356,3: Phương pháp 2minLowpHv03

Bước 2: Metyl 2-((((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-oxobutanoat

Thêm từng phần Dess-Martin periodinan (1,790g, 4,22mmol) vào dung dịch metyl 2-((((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-hydroxybutanoat (1,5g, 4,22mmol) trong DCM (25mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Pha loãng hỗn hợp tạo thành bằng DCM và natri cacbonat 2M 1:1 (aq) và thêm dung dịch natri sulphit bão hòa (aq) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Tách các lớp và làm khan lớp hữu cơ qua MgSO_4 và lọc. Loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,36min; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 354,3: Phương pháp 2minLowpHv03

Bước 3: (9H-floren-9-yl)metyl (2-isopropyl-5-metyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)carbammat

Thêm isopropylhydrazin hydroclorua (1,298g, 11,74mmol) vào dung dịch metyl 2-((((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-oxobutanoat (2,766g, 7,83mmol) trong HCl 1,25M trong ethanol (25mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở hồi lưu. Sau khi hoàn thành,

làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ phòng và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký sử dụng gradien của EtOAc 0-100% trong iso-hexan và MeOH 10% trong EtOAc thu được nguyên liệu thô. Hòa tan nguyên liệu thô trong IPA, thêm nước để thu được hỗn hợp đục nghiền nhỏ bằng sóng âm và để yên ở nhiệt độ phòng. Lọc huyền phù tạo thành và làm khô chất rắn trong áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,14min; MS m/z [M+H]⁺ 378,3/379,3: Phương pháp 2minLowpHv03

Bước 4: (9H-floren-9-yl)metyl (2-isopropyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)carbamate

Thêm metyl iodua (2,80mL, 44,7mmol) vào dung dịch (9H-floren-9-yl)metyl (2-isopropyl-5-metyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)carbamate (2,109g, 5,59mmol) trong DMF (30mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng bằng 90°C qua đêm. Làm ngừng hỗn hợp tạo thành bằng IPA và nước và chiết xuất bằng EtOAc. Rửa dịch chiết hữu cơ gom được bằng nước muối, làm khan qua MgSO₄, lọc và loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký sử dụng gradien của MeOH 0-10% trong EtOAc thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: Rt = 1,20min; MS m/z [M+H]⁺ 392,4: Phương pháp 2minLowpHv03

Bước 5: 4-amino-2-isopropyl-1,5-đimetyl-1H-pyrazol-3(2H)-on

Thêm piperidin (2,59mL, 26,1mmol) vào dung dịch (9H-floren-9-yl)metyl (2-isopropyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)carbamate (2,047g, 5,23mmol) trong DMF (30mL) ở nhiệt độ phòng. Sau khi hoàn thành việc thêm, thêm hỗn hợp phản ứng vào nước (30mL). Pha loãng huyền phù tạo thành bằng nước (100mL) và chiết xuất bằng EtOAc. Chiết xuất hữu cơ gom được bằng HCl 2M (aq) và trung hòa dịch chiết chứa nước axit bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa và nạp vào cột sắc ký C18. Rửa giải cột bằng nước và tạo huyền phù đặc lớp chứa nước thu được bằng SCX-2 và lọc. Rửa nhựa bằng MeOH và amoniac 7M trong MeOH. Loại bỏ MeOH và dung môi lọc chứa nước trong áp suất giảm. Thêm MeOH (150mL) vào hỗn hợp tạo thành, nghiền nhỏ bằng sóng âm, lọc và cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm. Thêm EtOH vào hỗn hợp tạo thành và

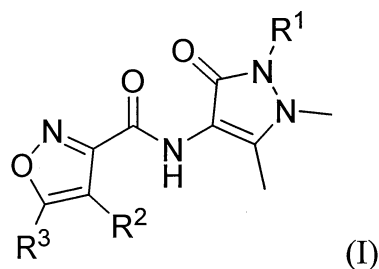
lọc. Cô đặc dịch lọc trong áp suất giảm. Nguyên liệu thô được hấp thu vào silic oxit và tinh chế bằng sắc ký sử dụng gradien của MeOH 0-10% trong DCM thu được nguyên liệu thô. Tạo huyền phù đặc nguyên liệu thô trong MeOH bằng SCX-2 (30g). Lọc huyền phù và rửa bằng MeOH. Sau đó rửa giải nhựa bằng NH_3 7M trong MeOH. Cô đặc amoniac metanolic trong áp suất giảm để thu được nguyên liệu thô. Sau đó hấp thu nguyên liệu thô vào silica và tinh chế bằng sắc ký sử dụng gradien của MeOH 0-10% trong DCM thu được hợp chất tiêu đề;

LC-MS: $R_t = 1,48\text{min}$; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 170,2: 8minHighpHv01

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 9,72 (2H, br s), 4,42 (1H, mult), 3,28 (3H, s), 2,25 (3H, s), 1,36 (6H, d).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I):



hoặc muối được dụng của nó, trong đó:

R^1 là (C_3-C_6) alkyl hoặc (C_3-C_6) xycloalkyl;

R^2 là metyl;

R^3 được chọn từ (C_6-C_{10}) alkyl phân nhánh, (C_6-C_{10}) alkenyl phân nhánh, (C_5-C_8) xycloalkenyl, (C_5-C_8) xycloalkyl, hoặc Het; trong đó (C_5-C_8) xycloalkenyl hoặc (C_5-C_8) xycloalkyl không được thế hoặc được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R^4 ; và trong đó Het được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R^4 ;

mỗi R^4 độc lập được chọn từ halo, (C_1-C_4) alkyl, halo (C_1-C_4) alkyl, (C_1-C_4) alkoxy, hoặc halo (C_1-C_4) alkoxy; hoặc,

hai nhóm R^4 , khi được gắn với cùng nguyên tử cacbon, có thể cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopentyl, tetrahydrofuran hoặc dioxolan; trong đó Het là vòng dị vòng no một phần hoặc no hoàn toàn có 5 hoặc 6 cạnh bao gồm a) 1 nguyên tử oxy ở vị trí 2- hoặc 3-, hoặc b) 2 nguyên tử oxy ở vị trí 2- và 5-, hoặc vị trí 2- và 6-, trong đó việc đánh số tương ứng với điểm gắn kết; và

(C_5-C_8) xycloalkyl có thể là vòng một vòng hoặc hệ vòng có cầu chứa 5, 6, 7 hoặc 8 nguyên tử cacbon.

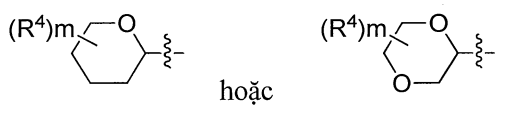
2. Hợp chất theo điểm 1 hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^1 là iso-propyl, xyclobutyl hoặc xyclohexyl.

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc điểm 2, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^3 được chọn từ 2,2-đimethylpentyl, 2,2-đimethylpent-2-enyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xyclohexenyl, tetrahydropyranyl, dihydropyranyl, dioxanyl, tetrahydrofuranlyl, dioxolanyl và bixyclo[2.2.2]octanyl; trong đó vòng xyclopentyl, xyclohexyl, xyclohexenyl, tetrahydropyranyl, dihydropyranyl, dioxanyl, tetrahydrofuranlyl, dioxolanyl hoặc bixyclo[2.2.2]octanyl không được thế hoặc được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R^4 ; và

mỗi R^4 độc lập được chọn từ halo, (C_1-C_4) alkyl, halo (C_1-C_4) alkyl, (C_1-C_4) alkoxy, hoặc halo (C_1-C_4) alkoxy; hoặc,

hai nhóm R^4 , khi được gắn với cùng nguyên tử cacbon, có thể cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng tetrahydrofuran hoặc dioxolan.

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^3 là:



và m là 1, 2, 3 hoặc 4.

5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, hoặc muối được dụng của nó, trong đó mỗi R^4 độc lập được chọn từ metyl, isopropyl, tert-butyl và metoxy.

6. Hợp chất theo điểm 1 được chọn từ nhóm bao gồm:

[N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-isopropylxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(6-etyl-4-metylxclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(6,6-đimetylxclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ;

[N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-etylxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

[5-(4-(tert-butyl)xyclohex-1-en-1-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

[N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(4-metylxyclohex-1-en-1-yl)isoxazol-3-cacboxamit];

5-(xyclohept-1-en-1-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

[N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(4-(triflometyl)xyclohex-1-en-1-yl)isoxazol-3-cacboxamit];

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(spiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

[N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit];

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-dimetylxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-dimetylxyclopent-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

[N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(2-oxaspiro[4.5]dec-7-en-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit];

[N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-isopropoxyxyclohex-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4,4-dimetylxyclohexyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

[N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-dimetylxyclopentyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-dimetylbutyl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

(Z)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-dimetylbut-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

(E)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3,3-dimetylbut-1-en-1-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

5-xyclohexyl-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

5-(6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ;

5-(6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclobutyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

5-(6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclobutyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

5-(6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ;

5-(6-(tert-butyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-isopropyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ;

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(6-isopropyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(6-metyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimetyl-1,4-dioxan-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

[5-(4-bromo-5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit];

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(5-metyl-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit;

N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(5-metyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit ;

5-(4-(2-bromopropan-2-yl)tetrahydrofuran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-dimetyl-3-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-

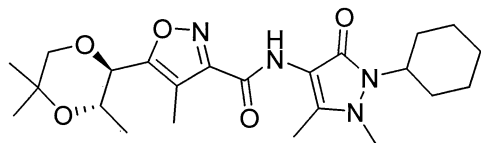
isopropyltetrahydrofuran-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit ;

5-(4-(tert-butyl)-1,3-đioxolan-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

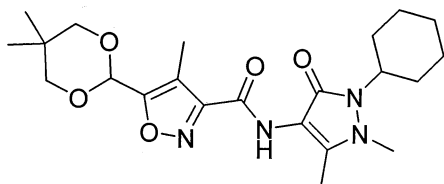
N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(5,5-đimetyl-1,3-đioxan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit;

hoặc muối được dụng của nó.

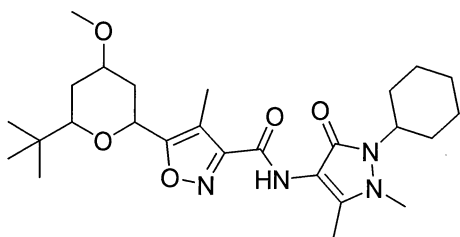
7. Hợp chất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-((2R,3S)-3,5,5-trimetyl-1,4-đioxan-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit có công thức sau:



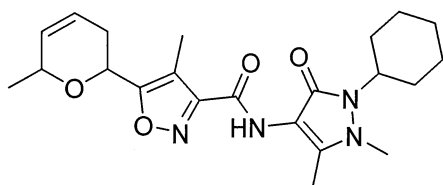
8. Hợp chất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-5-(5,5-đimetyl-1,3-đioxan-2-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit có công thức sau:



9. Hợp chất 5-(6-(tert-butyl)-4-metoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metylisoxazol-3-cacboxamit có công thức sau:



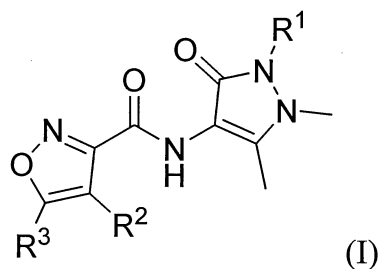
10. Hợp chất N-(2-xyclohexyl-1,5-đimetyl-3-oxo-2,3-đihydro-1H-pyrazol-4-yl)-4-metyl-5-(6-metyl-3,6-đihydro-2H-pyran-2-yl)isoxazol-3-cacboxamit có công thức sau:



11. Dược phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 hoặc muối dược dụng của nó và một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

12. Chế phẩm kết hợp chứa lượng có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 hoặc muối dược dụng của nó và một hoặc nhiều chất có hoạt tính điều trị; trong đó chất có hoạt tính điều trị được chọn từ hợp chất hóa học, peptit, kháng thể, mảnh kháng thể hoặc axit nucleic.

13. Hợp chất có công thức (I):



hoặc muối dược dụng của nó, trong đó:

R^1 là (C_3-C_6) alkyl hoặc (C_3-C_6) xycloalkyl;

R^2 là metyl;

R^3 được chọn từ (C_6-C_{10}) alkyl phân nhánh, (C_6-C_{10}) alkenyl phân nhánh, (C_5-C_8) xycloalkenyl, (C_5-C_8) xycloalkyl, hoặc Het; trong đó (C_5-C_8) xycloalkenyl hoặc (C_5-C_8) xycloalkyl không được thế hoặc được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R^4 ; và trong đó Het được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R^4 ;

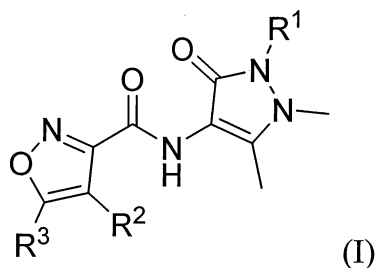
mỗi R^4 độc lập được chọn từ halo, (C_1-C_4) alkyl, halo (C_1-C_4) alkyl, (C_1-C_4) alkoxy, hoặc halo (C_1-C_4) alkoxy; hoặc

hai nhóm R^4 , khi được gắn với cùng nguyên tử cacbon, có thể cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopentyl, tetrahydrofuran hoặc dioxolan; trong đó Het là vòng dị vòng no một phần hoặc no hoàn toàn có 5 hoặc 6 cạnh bao gồm a) 1 nguyên tử oxy ở vị trí 2- hoặc 3-, hoặc b) 2 nguyên tử oxy ở vị trí 2- và 5-, hoặc vị trí 2- và 6-, trong đó việc đánh số tương ứng với điểm gắn kết; và

(C_5-C_8) xycloalkyl có thể là vòng một vòng hoặc hệ vòng có cầu chứa 5, 6, 7 hoặc 8 nguyên tử cacbon;

để sử dụng làm thuốc.

14. Hợp chất có công thức (I):



hoặc muối được dụng của nó, trong đó:

R^1 là (C_3-C_6) alkyl hoặc (C_3-C_6) xycloalkyl;

R^2 là metyl;

R^3 được chọn từ (C_6-C_{10}) alkyl phân nhánh, (C_6-C_{10}) alkenyl phân nhánh, (C_5-C_8) xycloalkenyl, (C_5-C_8) xycloalkyl, hoặc Het; trong đó (C_5-C_8) xycloalkenyl hoặc (C_5-C_8) xycloalkyl không được thế hoặc được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R^4 ; và trong đó Het được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R^4 ;

mỗi R^4 độc lập được chọn từ halo, (C_1-C_4) alkyl, halo (C_1-C_4) alkyl, (C_1-C_4) alkoxy, hoặc halo (C_1-C_4) alkoxy; hoặc

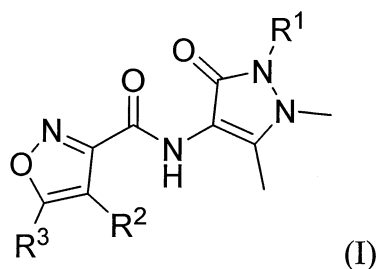
hai nhóm R^4 , khi được gắn với cùng nguyên tử cacbon, có thể cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopentyl, tetrahydrofuran hoặc dioxolan; trong đó Het là vòng dị vòng no một phần hoặc no hoàn toàn có 5 hoặc 6 cạnh bao gồm a) 1

nguyên tử oxy ở vị trí 2- hoặc 3-, hoặc b) 2 nguyên tử oxy ở vị trí 2- và 5-, hoặc vị trí 2- và 6-, trong đó việc đánh số tương ứng với điểm gắn kết; và

(C₅-C₈)xycloalkyl có thể là vòng một vòng hoặc hệ vòng có cầu chứa 5, 6, 7 hoặc 8 nguyên tử cacbon;

để sử dụng trong điều trị rối loạn hoặc bệnh được chọn từ tăng huyết áp phổi, bao gồm tăng huyết áp động mạch phổi (PAH), xơ, viêm khớp dạng thấp, và làm lành xương gãy.

15. Hợp chất có công thức (I):



hoặc muối được dụng của nó, trong đó:

R¹ là (C₃-C₆)alkyl hoặc (C₃-C₆)xycloalkyl;

R² là metyl;

R³ được chọn từ (C₆-C₁₀)alkyl phân nhánh, (C₆-C₁₀) alkenyl phân nhánh, (C₅-C₈)xycloalkenyl, (C₅-C₈)xycloalkyl, hoặc Het; trong đó (C₅-C₈)xycloalkenyl hoặc (C₅-C₈)xycloalkyl không được thế hoặc được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R⁴; và trong đó Het được thế bằng một, hai, ba hoặc bốn phần tử thế R⁴;

mỗi R⁴ độc lập được chọn từ halo, (C₁-C₄)alkyl, halo(C₁-C₄)alkyl, (C₁-C₄)alkoxy, hoặc halo(C₁-C₄)alkoxy; hoặc

hai nhóm R⁴, khi được gắn với cùng nguyên tử cacbon, có thể cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopentyl, tetrahydrofuran hoặc dioxolan; trong đó Het là vòng dị vòng no một phần hoặc no hoàn toàn có 5 hoặc 6 cạnh bao gồm a) 1 nguyên tử oxy ở vị trí 2- hoặc 3-, hoặc b) 2 nguyên tử oxy ở vị trí 2- và 5-, hoặc vị trí 2- và 6-, trong đó việc đánh số tương ứng với điểm gắn kết; và

(C₅-C₈)xycloalkyl có thể là vòng một vòng hoặc hệ vòng có cầu chứa 5, 6, 7 hoặc 8 nguyên tử cacbon;

để sử dụng trong điều trị rối loạn hoặc bệnh được chọn từ bệnh tăng nhãn áp, giãn mao mạch xuất huyết di truyền (HHT), nước tiểu có protein, làm lành vết thương, COPD và hen suyễn.