

# **HỢP CHẤT AMINO PYRAZOL ĐỂ ĐIỀU TRỊ RỐI LOẠN TĂNG SINH TỦY XƯƠNG MẠN TÍNH VÀ BỆNH UNG THƯ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ**

## **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến hợp chất amino pyrazol hữu ích để điều trị các rối loạn tăng sinh tủy xương mạn tính và bệnh ung thư, ví dụ u nguyên bào xốp, ung thư vú, đa u tủy, ung thư tuyến tiền liệt và bệnh bạch cầu. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này.

## **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Janus kinaza 2 (JAK2) là enzym thuộc họ tyrosin kinaza có liên quan đến quá trình truyền tín hiệu của cytokine. JAK2 có vai trò then chốt trong quá trình truyền tín hiệu erythropoietin (EPO), bao gồm quá trình biệt hóa hồng cầu và hoạt hóa Stat5.

Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng bệnh nhân bị rối loạn tăng sinh tủy xương mạn tính, như bệnh tăng hồng cầu vô căn, tăng tiểu cầu vô căn, và chứng xơ cứng tủy kèm theo dị sản tủy và các rối loạn huyết khối như chứng kháng protein C hoạt hóa, huyết khối tĩnh mạch nội tạng, hội chứng Budd-Chiari, và huyết khối tĩnh mạch cửa, thường có các đột biến hoạt hoá mắc phải trong JAK2. Đột biến trong đó thay thế valin thành phenylalanin ở vị trí axit amin 617 sẽ tạo ra hoạt tính phosphoryl hóa tyrosin cơ định theo cơ chế chưa được biết đến. Hoạt tính cơ định của JAK2 đột biến làm tăng mức JAK2, pSTAT5 được phosphoryl hóa, và hoạt tính phiên mã của STAT5, dẫn đến sinh bệnh học của các rối loạn tăng sinh tủy xương và bệnh bạch cầu, như bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính không điển hình. Ngoài ra, JAK2 còn được hoạt hóa bởi vòng tự tiết phụ thuộc vào interleukin-6 hoặc các biến đổi di truyền khác trong khối u rắn và khối u huyết học, ví dụ u nguyên bào xốp, ung thư vú, đa u tủy, ung thư tuyến tiền liệt, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính nguyên phát và thứ phát, bệnh bạch cầu dòng nguyên bào lympho T và B cấp tính.

Các hợp chất amino pyrazol khác nhau có tác dụng ức chế tyrosin kinaza đã được mô tả. Ví dụ, xem các công bố đơn quốc tế số WO2006/087538 và WO2007/064797.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu đối với các hợp chất khác có tác dụng ức chế các tyrosin kinaza như JAK2. Do đó, sáng chế đề xuất hợp chất amino pyrazol được thấy là có thể được sử dụng trên lâm sàng để điều trị các rối loạn tăng sinh tủy xương trong đó quá trình truyền tín hiệu JAK2 được hoạt hóa hoặc trong đó việc điều tiết quá trình truyền tín hiệu JAK/STAT bị rối loạn.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Cụ thể, sáng chế đề xuất hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hoặc muối dược dụng của nó.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hoặc muối dược dụng của nó để điều trị rối loạn tăng sinh tủy xương mạn tính được chọn từ nhóm bao gồm bệnh tăng hồng cầu vô căn, tăng tiểu cầu vô căn, và chứng xơ cứng tủy kèm theo dị sản tủy ở động vật có vú.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hoặc muối dược dụng của nó để điều trị bệnh u nguyên bào xóp, ung thư vú, đa u tủy, ung thư tuyến tiền liệt, và bệnh bạch cầu, như bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính không điển hình, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính nguyên phát và thứ phát, bệnh bạch cầu dòng nguyên bào lympho T và B cấp tính, hội chứng loạn sản tủy, và các rối loạn tăng sinh tủy xương ở bệnh nhân.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hoặc muối dược dụng của nó, và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hoặc muối được dụng của nó, để phối hợp với chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng, cùng với một thành phần trị liệu khác.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hoặc muối được dụng của nó dùng để làm thuốc. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hoặc muối được dụng của nó để sản xuất thuốc dùng để điều trị các rối loạn tăng sinh tủy xương mạn tính. Cụ thể, các rối loạn tăng sinh tủy xương mạn tính này được chọn từ nhóm bao gồm bệnh tăng hồng cầu vô căn, tăng tiểu cầu vô căn, và chứng xơ cứng tủy kèm theo dị sản tủy. Thêm vào đó, sáng chế đề xuất được phẩm dùng để điều trị các rối loạn tăng sinh tủy xương mạn tính được chọn từ nhóm bao gồm bệnh tăng hồng cầu vô căn, tăng tiểu cầu vô căn, và chứng xơ cứng tủy kèm theo dị sản tủy chứa 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hoặc muối được dụng của nó làm hoạt chất.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Chuyên gia trong lĩnh vực này hiểu rằng hợp chất theo sáng chế có khả năng tạo muối. Hợp chất theo sáng chế là amin, do đó nó phản ứng với axit vô cơ và axit hữu cơ bất kỳ để tạo thành muối cộng axit được dụng. Các muối cộng axit được dụng này và phương pháp chung để điều chế chúng là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem tài liệu: P. Stahl, et al., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE (VCHA/Wiley-VCH, 2002); L. D. Bighley, S. M. Berge, D. C. Monkhouse, trong tài liệu: “Encyclopedia of Pharmaceutical Technology”. Eds. J. Swarbrick và J. C. Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong

1995, trang 453-499; S. M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts, "Journal of Pharma-ceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, 01/1977.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Hợp chất thu được từ các ví dụ điều chế và ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây được định danh bằng cách sử dụng phần mềm ChemDraw Ultra, Version 10.0.

Sơ đồ 1

Ví dụ điều chế 1

1-(4-metoxymethyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-amin

Phương pháp 1:

Phối hợp 5-amino-3-methylpyrazol (22,8g, 234,8mmol) và N-methylpyrrolidon (200ml) trong bình đáy tròn có dung tích 1 lít. Làm lạnh bình đến 0°C và đưa vào môi trường nitơ. Thêm natri hydroxit (9,39g, 1,0 đương lượng) vào bình và khuấy trong 30 phút. Thêm nhỏ giọt dung dịch chứa alpha-clo-4-metoxytoluen (31ml, 1,0 đương lượng) trong N-methylpyrrolidon (100ml) vào bình. Để hỗn hợp phản ứng tăng nhiệt độ chậm đến nhiệt độ trong phòng qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng nước, và chiết bằng etyl axetat (EA). Rửa pha hữu cơ bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước. Cô trong chân không. Tinh chế trên nút silic oxit (hexan → 2:1 hexan:EA → 3:2 hexan:EA → 1:1 hexan:EA → 1:2 hexan:EA → EA). Cô các phân đoạn mong muốn để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (10,8g, 21%). Phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng – phổ khối (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – LCMS) (4 phút) = 218,0 (M+1).

Phương pháp 2:

A. (E)-tert-butyl 2-(4-metoxymethylidene)hydrazinocarboxylat

Thêm 4-metoxymethylaldehyt (400g, 2,94mol) vào dung dịch chứa tert-butyl carbamat (400g, 2,94mol) trong toluen (750ml) ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 20 phút. Đun nóng hồi lưu trong thời gian 1 giờ, thu hồi nước trong hỗn hợp

đồng sôi với toluen. Sau khi nước được thu hồi hết, làm nguội xuống nhiệt độ 60°C. Thêm hexan vào cho đến khi sản phẩm kết tủa ra khỏi dung dịch. Làm lạnh bồn làm mát xuống nhiệt độ 20°C. Thu hồi chất rắn bằng cách lọc và làm khô bằng cách sử dụng máy nén nitơ để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (750,5g, 91%). <sup>1</sup>H NMR [400MHz, dimetyl sulfoxit-d<sub>6</sub> (DMSO-d<sub>6</sub>)] δ 10,6-10,8 (bs, 1H), 7,88-8,0 (s, 1H), 7,5-7,55 (d, 2H), 6,95-7,0 (d, 2H), 1,45 (s, 9H). Phổ khối phân tử (Electrospray Mass Spectrometry – ES/MS) (m/z): 249 [M-H].

#### B. Tert-butyl 2-(4-metoxibenzyloxy)hydrazinocarboxylat

Thêm paladi 10% trên cacbon (làm ẩm bằng nước, 20g) dưới dạng được tạo huyền phù đặc trong EA (100ml) vào bình phản ứng chịu áp được đóng kín qua thiết bị truyền chân không. Rửa ống truyền bằng EA với lượng tối thiểu. Nạp (E)-tert-butyl 2-(4-metoxibenzyloxy)hydrazinocarboxylat (320g, 1,28mol) hòa tan trong tetrahydrofuran (THF, 1000ml) vào qua thiết bị truyền chân không và rửa ống truyền bằng THF với lượng tối thiểu. Gia áp bình phản ứng đến 50 PSI (khoảng 344,7 kPa) bằng H<sub>2</sub> và trộn các thành phần trong bình phản ứng ở nhiệt độ 20 ± 10°C. Cho phản ứng tiếp tục diễn ra, duy trì áp suất hydro ở mức 50 PSI (khoảng 344,7 kPa) cho đến khi không quan sát thấy hấp thụ hydro. Lọc dung dịch phản ứng để loại bỏ chất xúc tác và rửa bánh lọc chứa chất xúc tác bằng THF (500ml). Thêm dịch rửa vào dịch lọc hỗn hợp phản ứng. Cô dung dịch thu được trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (337g, 86%) dưới dạng dầu. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,1-8,3 (s, 1H), 7,1-7,3 (d, 2H), 6,8-6,9 (d, 2H), 4,4-4,6 (bs, 1H), 3,7-3,8 (s, 2H), 3,6-3,7 (s, 3H), 1,3-1,5 (s, 9H).

#### C. (4-metoxibenzyloxy)hydrazin dihydroclorua

Thêm từ từ tert-butyl 2-(4-metoxibenzyloxy)hydrazinocarboxylat (324g, 1,09mol) hòa tan trong dioxan với lượng tối thiểu vào dung dịch hydro clorua 4 N trong dioxan (2000ml, 8,00mol HCl) trong thời gian 1 giờ. Chất kết tủa dần được tạo ra. Khuấy dung dịch thu được trong 16 giờ ở nhiệt độ 20 ± 5°C. Thu hồi chất rắn bằng cách lọc. Tạo huyền phù đặc chất rắn thu được trong heptan

(2000ml) và tách chất rắn bằng cách lọc. Làm khô chất rắn này bằng cách sử dụng máy nén nitơ để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (242,3g, 1,08mol, 98%).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8,2-9,0 (bs, 5H), 7,3-7,4 (d, 2H), 6,8-7,0 (d, 2H), 4,0 (s, 2H), 3,7 (s, 3H).

D. 1-(4-metoxymethyl)-5-metyl-1H-pyrazol-3-amin và 1-(4-metoxymethyl)-3-metyl-1H-pyrazol-5-amin

Phối hợp kali tert-butoxit (191,89g, 1,71mol) và THF (2000ml) ở nhiệt độ 22°C. Trộn cho đến khi thu được dung dịch đồng nhất. Làm lạnh đến 5°C. Thêm dung dịch chứa axetonitril (84,25g, 2,05mol) và metyl axetat (126,7g, 1,71mol) đã trộn trước vào dung dịch kali tert-butoxit trong thời gian 45 phút trong khi giữ hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ thấp hơn 10°C. Sau khi thêm xong, để tăng nhiệt độ hỗn hợp phản ứng đến  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  và khuấy trong thời gian khoảng 2 giờ. Thêm từng phần (4-metoxymethyl)hydrazin dihydroclorua (250g) vào hỗn hợp phản ứng trong thời gian khoảng 5 phút, tiếp đó thêm dung dịch hydro clorua 4N trong dioxan (262,5g, 1,00mol) vào ở tốc độ sao cho duy trì hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ  $<30^\circ\text{C}$ . Khi thêm xong, khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  trong thời gian khoảng 16 giờ. Tách chất rắn bằng cách lọc và rửa bằng THF (500ml). Tạo huyền phù chất rắn thô thu được trong diclometan (DCM, 4 lít) và nước (2 lít), điều chỉnh đến độ pH  $>10$  bằng dung dịch NaOH 5 N. Để các lớp lắng xuống và thu hồi pha hữu cơ. Rửa pha nước bằng DCM (2 lít). Gộp các pha hữu cơ với nhau và làm khô bằng natri sulfat khan và cô dung dịch thành chất rắn trong chân không để thu được 165g sản phẩm thô. Đun nóng hồi lưu sản phẩm thô trong isopropyl axetat (660ml) để hòa tan chất rắn ở mức tối đa. Làm nguội hỗn hợp thu được xuống nhiệt độ 33°C và thêm từ từ hexan (600ml) vào trong thời gian 1 giờ. Làm lạnh hỗn hợp thu được đến nhiệt độ 10°C và giữ nhiệt độ ở 10°C trong thời gian 10 phút. Tách chất rắn bằng cách lọc, rửa bằng hexan (200ml), và làm khô bằng cách sử dụng máy nén nitơ để thu được hỗn hợp chứa hợp chất nêu ở đề mục này (91,5g, 0,4mol, 47%).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

$d_6$ )  $\delta$  7,2-7,3 (d, 2H), 6,7-6,9 (d, 2H), 5,1 (bs, 2H), 5,0 (s, 1H), 4,9 (s, 2H), 3,6-3,8 (s, 3H), 1,9 (s, 3H).

Lưu ý: Các hợp chất trung gian này có thể được tách ra bằng cách sắc ký; tuy nhiên, trong trường hợp này, chúng được tách ra dưới dạng hỗn hợp và có thể được sử dụng trong chuỗi phản ứng cuối dưới đây, chuỗi phản ứng này bao gồm bước loại bỏ nhóm bảo vệ benzyl để thu được sản phẩm tương đương.

Ví dụ điều chế 2

2-clo-1-(4-clo-2-flophenyl)etanon

Phối hợp 4'-clo-2'-floaxetophenon (40g, 231,8mmol), heptan (120ml), và metanol (16ml) trong bình đáy tròn có dung tích 1 lít. Làm lạnh đến 0°C và đưa vào môi trường nitơ. Hòa tan sulfuryl clorua (21,5ml, 1,15 đương lượng) trong heptan (120ml) và nạp vào phễu thêm nguyên liệu. Thêm nhỏ giọt dung dịch thu được vào hỗn hợp phản ứng trong thời gian 60 phút. Khuấy trong 2,5 giờ ở nhiệt độ 0°C; chất kết tủa màu trắng tạo ra trong thời gian này. Nạp dung dịch natri bicacbonat 1M vào phễu thêm nguyên liệu (400ml), tiếp đó thêm nhỏ giọt dung dịch này vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi hiện tượng thoát khí ngừng hoàn toàn, lọc huyền phù hai pha tạo ra để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (38,18g, 80%) dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng.  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  5,00 (d, 2H,  $J = 2,5$  Hz), 7,43 (m, 1H), 7,63 (m, 1H), 7,89 (t, 1H,  $J = 8,4$  Hz).

Ví dụ điều chế 3

(E)-N'-(6-clopyridazin-3-yl)-N,N-dimetylaxetimidamit

Phối hợp 3-clo-6-pyridazinamin (43,2g, 333,5mmol), toluen (500ml), và N,N-dimetylaxetamid dimetyl axetal (67,8ml, 1,25 đương lượng) trong bình đáy tròn có dung tích 2 lít. Lắp bộ ngưng tụ hồi lưu vào, rồi đun nóng hồi lưu trong thời gian 2 giờ. Để nguội đến nhiệt độ trong phòng. Cô trong chân không. Nghiền sản phẩm thô với hexan và lọc để tách được hợp chất nêu ở đề mục này (60,4g, 91%) dưới dạng chất rắn màu nâu vàng sáng. MS = 199,0 (M+1).

Ví dụ điều chế 4

(4-clo-2-flophenyl)(6-clo-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)metanon

Phối hợp (E)-N'-(6-clopyridazin-3-yl)-N,N-dimetylxetimidamit (36,61g, 184,3mmol), 2-clo-1-(4-clo-2-flophenyl)etanon (38,15g, 1 đương lượng), và dimetylformamit (150ml) trong bình đáy tròn. Đưa hỗn hợp thu được vào môi trường nitơ, rồi đun nóng ở nhiệt độ 120°C trong 4 giờ. Để nguội đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Pha loãng bằng EA (1 lít) và nước (500ml). Chiết pha hữu cơ ba lần bằng nước, tiếp đó bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước. Làm khô lớp hữu cơ bằng magie sulfat khan. Lọc và cô trong chân không. Tiến hành tinh chế bằng nút silic oxit (hexan → 4:1 hexan:EA → 3:1 hexan:EA → 2:1 hexan:EA → 1:1 hexan:EA) và tách được hợp chất nêu ở đề mục này (33,8g, 57%) dưới dạng chất rắn màu lục sáng. LCMS (4 phút = 324,0; 326,0; M+1).

Ví dụ điều chế 5

2-((6-clo-3-(4-clo-2-flobenzoyl)-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-8-yl)metyl)isoindolin-1,3-dion

Phối hợp (4-clo-2-flophenyl)(6-clo-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)metanon (5,6g, 17,3mmol), N-phtaloylglyxin (6,0g, 1,7 đương lượng), axetonitril (60ml), nước (15ml), axit trifloaxetic (0,26ml, 0,2 đương lượng), và bạc nitrat (294mg, 0,1 đương lượng) trong bình đáy tròn có gắn phễu thêm nguyên liệu và đưa vào môi trường nitơ. Đun nóng đến 70°C và giữ ở nhiệt độ này trong thời gian 15 phút. Hòa tan amoni persulfat (7,1g, 1,8 đương lượng) trong nước (15ml) và nạp vào phễu thêm nguyên liệu. Thêm nhỏ giọt dung dịch thu được vào bình phản ứng trong thời gian khoảng 20 phút. Đun nóng hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 70°C trong 1 giờ. Chất kết tủa tạo ra trong thời gian này; lọc qua phễu Buchner để tách được sản phẩm thô chứa hợp chất nêu ở đề mục này (7,3g, 87%) dưới dạng chất rắn màu trắng mờ. LCMS (4 phút) = 483,0; 485,0; M+1).

Ví dụ điều chế 6



(8-(aminometyl)-6-clo-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)(4-clo-2-flophenyl)metanon

Phối hợp 2-((6-clo-3-(4-clo-2-flobenzoyl)-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-8-yl)metyl)isoindolin-1,3-dion (7,30g, 15,1mmol), etanol (200ml), và hydrazin (1,45ml, 3 đương lượng) trong bình đáy tròn và đưa vào môi trường nitơ. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong thời gian 2 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Đun nóng trong 2 giờ ở nhiệt độ 50°C, rồi cô hỗn hợp phản ứng trong chân không. Pha loãng bằng EA. Rửa pha hữu cơ bằng dung dịch HCl 1N (trong nước) để kéo sản phẩm vào lớp nước. Bazơ hóa lớp nước bằng dung dịch NaOH 1N (trong nước) và chiết bằng EA. Rửa lớp EA bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước, và làm khô bằng magie sulfat khan. Lọc và cô trong chân không để thu được sản phẩm thô chứa hợp chất nêu ở đề mục này (1,2g, 23%) dưới dạng chất rắn màu lục sáng. MS = 355,0; 353,0 (M+1).

Ví dụ điều chế 7

(4-clo-2-flophenyl)(6-clo-2-metyl-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)metanon

Phối hợp (8-(aminometyl)-6-clo-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)(4-clo-2-flophenyl)metanon (1,15g, 3,3mmol), nước (12ml), kali cacbonat (495mg, 1,1 đương lượng), và 2-brometyl ete (0,47ml, 1,1 đương lượng) trong bình phản ứng vi sóng có dung tích 20ml. Đậy kín bằng nắp kẹp, rồi đun nóng trong thiết bị phản ứng vi sóng ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút. Tiếp đó, làm nguội hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng và phân bố giữa EA và nước. Rửa lớp EA bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước, và làm khô bằng magie sulfat khan. Lọc và cô trong chân không. Tinh chế trên silic oxit (4:1 hexan:EA → 2:1 hexan:EA → 1:1 hexan:EA) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (0,43g, 31%) dưới dạng bột màu vàng sáng. LCMS (4 phút) = 423,0; 425,0; M+1.

Ví dụ điều chế 8

(4-clo-2-flophenyl)(6-clo-2-metyl-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)metanon

Phối hợp (4-clo-2-flophenyl)(6-clo-2-metyl-8-(morpholinometyl)-imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)metanon (0,43g, 1,0mmol) và metanol (15ml) trong bình đáy tròn. Đưa hỗn hợp thu được vào môi trường nitơ và làm lạnh đến nhiệt độ 0°C. Thêm toàn bộ natri bohydrua (58mg, 1,5 đương lượng) vào cùng một lúc. Khuấy trong 5 phút ở nhiệt độ này, rồi lấy bồn làm lạnh ra và để tăng nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng. Sau thời gian 15 phút, tôi hỗn hợp phản ứng bằng nước rồi chiết bằng EA. Rửa pha hữu cơ bằng nước, tiếp đó bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước. Làm khô pha hữu cơ bằng magie sulfat khan. Lọc và cô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (0,4g, 93%). LCMS (4 phút) = 425,0; 427,0; M+1.

Ví dụ điều chế 9

4-((6-clo-3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-8-yl)metyl)morpholin

Phối hợp (4-clo-2-flophenyl)(6-clo-2-metyl-8-(morpholinometyl)-imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)metanol (0,4g, 0,94mmol), 1,2-dicloetan (25ml), trietylsilan (0,45ml, 3 đương lượng), và axit trifloaxetic (0,57ml, 8 đương lượng) trong bình đáy tròn và đưa vào môi trường nitơ. Đun nóng ở nhiệt độ 70°C qua đêm. Cô hỗn hợp phản ứng trong chân không. Nạp lên hộp lọc trao đổi ion SCX 10 gam Varian MegaElut<sup>®</sup> (đã được rửa trước bằng metanol). Giải hấp bằng metanol để loại bỏ các tạp chất không có tính bazơ. Sau đó, giải hấp bằng dung dịch amoniac 2M trong metanol. Cô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (0,36g, 94%). LCMS (4 phút) = 409,0; 411,0; M+1.

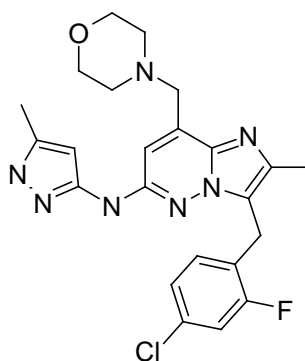
Ví dụ điều chế 10

3-(4-clo-2-flobenzyl)-N-(1-(4-metoxibenzyl)-5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-2-metyl-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin

Phối hợp 4-((6-clo-3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-8-yl)metyl)morpholin (0,36g, 0,88mmol), 1-(4-metoxibenzyl)-5-metyl-1H-pyrazol-3-amin (0,248g, 1,3 đương lượng), kali cacbonat (0,30g, 2,5 đương

lượng), 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimetylxanten (0,076g, 0,15 đương lượng), nước (2ml), và 1,4-dioxan (20ml) trong bình đáy tròn. Loại khí hoàn toàn bằng nitơ, rồi thêm bis(dibenzylidenaxeton)paladi (0,10g, 0,2 đương lượng) vào. Lắp bộ ngưng tụ hồi lưu vào và đưa vào môi trường nitơ. Đun nóng hồi lưu hỗn hợp phản ứng qua đêm. Cho hỗn hợp phản ứng qua nút Celite. Rửa nút này bằng EA. Chuyển hỗn hợp phản ứng vào phễu tách và rửa bằng nước. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch natri clorua trong nước, và làm khô bằng magie sulfat khan. Lọc và cô trong chân không. Tinh chế trên silicagel (EA → 10% metanol:EA) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (0,447g, 86%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. LCMS (4 phút) = 590,2; 591,2; M+1.

Ví dụ 1

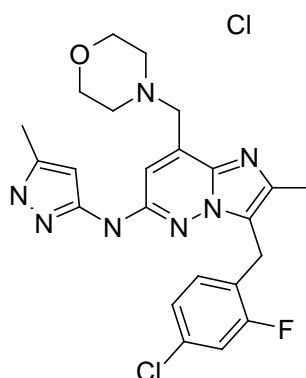


3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin

Phối hợp 3-(4-clo-2-flobenzyl)-N-(1-(4-metoxibenzyl)-5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-2-metyl-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin (0,447g, 0,76mmol) và axit trifloaxetic (10ml) trong ống nghiệm dùng cho thiết bị phản ứng vi sóng có dung tích 20ml. Đậy kín bằng nắp kẹp, rồi đun nóng trong thiết bị phản ứng vi sóng ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút. Phân bố giữa EA và nước đã được bazơ hóa bằng dung dịch NaOH trong nước với lượng dư. Rửa pha hữu cơ ba lần bằng dung dịch NaOH trong nước, tiếp đó bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước. Làm khô bằng magie sulfat khan. Lọc và cô trong chân không. Tinh chế trên silicagel (EA → 10% metanol:EA) để thu được

hợp chất nêu ở đề mục này (0,246g, 0,52mmol) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. LCMS (8 phút) = 470,0; M+1.

Ví dụ 2



3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hydroclorua

Phối hợp 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin (0,1g, 0,21mmol) và 1,4-dioxan (10ml) trong bình phản ứng hình quả lê và đưa vào môi trường nitơ. Thêm hydro clorua (dung dịch 4M trong 1,4-dioxan, 0,053ml, 1,0 đương lượng) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường nitơ trong thời gian 1,5 giờ. Cô hỗn hợp phản ứng trong chân không, tiếp đó làm bay hơi trong chân không từ etanol tuyệt đối hai lần. Làm khô qua đêm trong lò chân không (60°C) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (0,11g, 102%). LCMS (8 phút) = 470,0; M+1.

Sơ đồ 2

Ví dụ điều chế 11

(E)-N'-(6-clopyridazin-3-yl)-N,N-dimetylaxetimidamit

Phối hợp 6-clopyridazin-3-amin (1,500kg, 11,58mol); 1,1-dimetoxy-N,N-dimetyletanamin (2,313kg, 17,37mol) và xyclopentyl metyl ete (8,25 lít), rồi đun nóng đến 98°C trong khi chưng cất để loại bỏ sản phẩm phụ metanol tạo ra. Sau thời gian 4 giờ, làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ môi trường và thêm heptan (11,2 lít) vào dung dịch phản ứng để kết tinh sản phẩm. thu được hợp

chất nêu ở đề mục này bằng cách lọc và làm khô. (1,494kg, 64,95%; điểm nóng chảy = 73°C)

Ví dụ điều chế 12

2-clo-1-(4-clo-2-flophenyl)etanon

Khuấy hỗn hợp gồm heptan (1,5 lít), metanol (0,4 lít), và 1-(4-clo-2-flophenyl)etanon (1kg, 5,81mol) kết hợp làm lạnh đến nhiệt độ <math><5^{\circ}\text{C}</math>. Thêm nhỏ giọt sulfuryl clorua (0,608 lít, 1,02kg, 7,55mol) dưới dạng dung dịch trong heptan (1,5 lít) vào hỗn hợp hỗn hợp phản ứng trong khi giữ phản ứng ở nhiệt độ <math><15^{\circ}\text{C}</math> trong khi thêm. Sau thời gian 2 giờ, tôi hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ môi trường đến độ pH=6 bằng dung dịch natri hydroxit (5N, 2,0 lít). Chiết hỗn hợp phản ứng bằng metylen clorua (2 lít) và cô dịch chiết để tạo ra chất rắn màu trắng. Lọc và làm khô chất rắn này.

Ví dụ điều chế 13

(4-clo-2-flophenyl)(6-clo-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)metanon

Phối hợp 2-clo-1-(4-clo-2-flophenyl)etanon (1,5kg, 5,44mol), và (E)-N'-(6-clopyridazin-3-yl)-N,N-dimetylxetimidamit (1,19kg, 5,72mol) trong DMF (10,14 lít) và đun nóng ở nhiệt độ 120°C trong 5 giờ. Sau khi làm nguội, thêm nước (30 lít) vào và khuấy để kết tinh sản phẩm. Thu hồi sản phẩm bằng cách lọc và rửa bánh lọc bằng nước (2 x 12 lít) và heptan (2 x 10 lít), sau đó làm khô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục này. (1,490kg, 84,44%; điểm nóng chảy = 160°C,  $M^+ = 324$ ).

Ví dụ điều chế 14

(4-clo-2-flophenyl)(6-clo-2-metyl-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)metanon

Thêm etanol (12 lít), (4-clo-2-flophenyl)(6-clo-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)metanon (897,70g, 2,77mol) và bis(2,4-pentandionato)-oxovanadi (IV) (146,81g, 553,67mmol) vào bình phản ứng trong môi trường nito. Thêm nhỏ giọt dung dịch chứa 4-metylmorpholin 4-oxit (3,89kg, 33,21mol)

trong etanol (6 lít) vào trong thời gian 150 phút, trong khi giữ phản ứng ở nhiệt độ khoảng 23-33°C; sau đó đun nóng hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 48 giờ. Làm nguội hỗn hợp phản ứng và cô bằng cách loại bỏ dung môi (13 lít). Lọc hỗn hợp thu được, rửa bánh lọc bằng hexan (1 lít), rồi làm khô. (728g, 66,25%; điểm nóng chảy: 145-147°C; M<sup>+</sup> = 423).

Ví dụ điều chế 15

4-((6-clo-3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-8-yl)metyl)morpholin hydroclorua

Phối hợp triethylsilan (110g, 946mmol) và (4-clo-2-flophenyl)(6-clo-2-metyl-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)metanon (50,1g, 117,06mmol) ở nhiệt độ 26°C để tạo ra dung dịch. Thêm axit trifloaxetic (150ml, 1,98mol) vào hỗn hợp phản ứng, rồi đun nóng ở nhiệt độ 78°C trong thời gian 24 giờ. Làm nguội hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ môi trường và tách hỗn hợp thu được để loại bỏ lớp trên. Hòa tan lớp dưới đáy bằng etyl axetat (1 lít) và điều chỉnh đến độ pH=11 bằng dung dịch natri hydroxit (4 N, 500ml). Tách lớp hữu cơ và thêm dung dịch HCl (4M trong etyl ete) vào lớp hữu cơ để tạo ra muối HCl. Lọc và làm khô muối HCl. (100 g (96%); điểm nóng chảy = 237-238°C; M<sup>+</sup> = 409).

Ví dụ điều chế 16

3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hydroclorua và bazơ tự do

Điều chế chất xúc tác có hoạt tính bằng cách phối hợp paladi clorua (160mg, 0,90mmol) và 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimetylxanten (1,10g, 1,84mmol) trong DMF (25ml) và tăng nhiệt độ để tạo ra dung dịch. Thêm chất xúc tác đã tạo ra vào dung dịch chứa 3-metyl-1H-pyrazol-5-amin (3,0g, 29,65mmol), 4-((6-clo-3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metylimidazo[1,2-b]pyridazin-8-yl)metyl)morpholin hydroclorua (9,0g, 20,19mmol), kali bicacbonat (6,0g, 59,93mmol) trong DMF (65ml) và đun nóng đến nhiệt độ 150°C trong thời gian

1 giờ. Làm nguội hỗn hợp phản ứng đến 60°C và thêm silic oxit (500mg) đã được tạo chức năng bằng mercaptopropyl và khuấy trong thời gian 1 giờ, tiếp đó lọc để loại bỏ silic oxit. Làm nguội đến nhiệt độ môi trường, thêm 2-metyltetrahydrofuran (125ml) vào và chiết bằng nước để loại bỏ DMF. Thêm HCl vào dung dịch hữu cơ để tạo ra muối 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hydroclorua.

Thêm muối HCl này (1,1g) vào dung dịch natri hydroxit (10ml, 1N) trong n-butanol (10ml) và khuấy. Lọc hỗn hợp tạo ra để thu được 0,22g bazơ tự do, imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin, 3-[(4-clo-2-flophenyl)metyl]-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(4-morpholinylmetyl), (hiệu suất 22 %, M+1. = 470).

Ví dụ 3

Chế phẩm chứa 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin

Tùy ý cho 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin và tá dược qua rây thích hợp. Phối hợp và trộn 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin, tinh bột tiền gelatin hóa, và tinh bột tiền gelatin hóa chứa 5% dimethicon bằng cách sử dụng thùng trộn đảo thích hợp (có hoặc không có cần trộn tăng cường) hoặc thiết bị trộn thích hợp khác. Theo cách khác, thêm dimethicon vào trong quá trình trộn qua hệ thống thêm chất lỏng. Nạp bột đã trộn vào viên nang bằng cách sử dụng thiết bị đóng nang thích hợp. Tiến hành kiểm soát độ đồng đều về trọng lượng và các thông số thích hợp của quy trình trong quy trình đóng nang. Tùy ý khử bụi hoặc đánh bóng viên nang thành phẩm bằng quy trình thủ công hoặc tự động.

Thử nghiệm trên cơ sở tế bào JAK2 EPO-TF1/pSTAT5 – Cellomics ArrayScan® HCS

Thử nghiệm trên cơ sở tế bào JAK2 EPO-TF1/pSTAT5 mô phỏng quá trình hoạt hoá cơ định JAK2-STAT5 ở các tế bào tiền thân dòng hồng cầu, từ đó dẫn đến tình trạng sản sinh hồng cầu quá mức, một dấu hiệu của bệnh tăng hồng cầu vô căn (polycythemia vera – PV).

Giữ các tế bào TF-1 (bệnh bạch cầu dòng hồng cầu ở người) trong môi trường RPMI 1640 (môi trường RPMI-1640 được Moore và các cộng sự tại Roswell Park Memorial Institute phát triển). Môi trường này được tạo ra trên cơ sở loạt môi trường RPMI-1630 sử dụng hệ đệm bicacbonat và biến đổi lượng các axit amin và vitamin) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS), 0,075% natri bicacbonat, natri pyruvat với nồng độ 1mM, chất kháng sinh/chất chống nấm với nồng độ 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA) và 0,45% glucoza. Môi trường này được bổ sung thêm yếu tố kích thích quần thể bạch cầu hạt – đại thực bào (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – GM-CSF) ở nồng độ cuối là 2ng/ml. Giữ tế bào ở nhiệt độ 37°C trong môi trường chứa 5% CO<sub>2</sub>. Bỏ đói tế bào trong môi trường không chứa huyết thanh để loại bỏ các yếu tố sinh trưởng nội sinh. Đếm các tế bào TF-1 và thu hồi tế bào này để gieo 2x10<sup>7</sup> tế bào trên đĩa có 96 lỗ với mật độ 2 x10<sup>5</sup> tế bào mỗi lỗ. Rửa tế bào hai lần bằng môi trường RPMI 1640 không bổ sung (môi trường RPMI 1640 chứa 0,075% natri bicacbonat, natri pyruvat với nồng độ 1mM, chất kháng sinh/chất chống nấm với nồng độ 1x, và glucoza 0,45%) trước khi tạo hỗn dịch tế bào với nồng độ cuối là 5x10<sup>5</sup> tế bào/ml trong môi trường RPMI chứa 0,6% FBS. Thêm tế bào đã pha loãng trở lại bình nuôi cấy mô và ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Điều chế dung dịch chứa hợp chất thử nghiệm trong DMSO 100% với nồng độ 10mM. Các hợp chất được pha loãng liên tục theo bậc 1:3 bằng DMSO 100% trong khoảng nồng độ 10 điểm-200x – đáp ứng (4mM-200nM). Thêm 2,5µl dung dịch chứa hợp chất với nồng độ 200x vào 125µl môi trường RPMI 1640 toàn phần chứa 10% FBS trong một đĩa có 96 lỗ riêng rẽ để thu được đĩa chứa hợp chất với nồng độ 4x .



Để tiến hành thử nghiệm, các tế bào đóit huyết thanh được thu hồi và rửa một lần bằng môi trường RPMI 1640 không bổ sung. Tạo hỗn dịch tế bào trong môi trường RPMI toàn phần chứa 10% FBS để thu được nồng độ cuối là  $8 \times 10^5$  tế bào/ml. Thêm một phần phân ước chứa 250 $\mu$ l tế bào đã pha loãng ( $2 \times 10^5$  tế bào) vào mỗi lỗ trong đĩa chứa hợp chất với nồng độ 4x. Trộn các tế bào bằng cách ly tâm và ủ đĩa trong bồn nước ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút. Điều chế mới dung dịch xử lý 4x chứa Erythropoietin (EPO) với nồng độ 6,4 đơn vị/ml bằng cách sử dụng môi trường RPMI 1640 toàn phần chứa 10% FBS đã được làm ấm trước. Sau khi xử lý tế bào bằng hợp chất trong thời gian 10 phút, thêm 125 $\mu$ l môi trường chứa EPO vào mỗi lỗ và đĩa được ly tâm. Ủ tế bào trong bồn nước ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 20 phút và tiến hành trộn sau mỗi khoảng thời gian 5 phút trong suốt thời gian ủ. Khoảng nồng độ 10 điểm – đáp ứng cuối là 20 $\mu$ M-1nM với nồng độ cuối của DMSO là 0,5% và EPO là 1,6 đơn vị/ml. Sau khi xử lý tế bào, thêm 500 $\mu$ l dung dịch formaldehyt 1% (được điều chế mới bằng nước muối đệm phosphat (PBS) và giữ ấm ở nhiệt độ 37°C) vào mỗi lỗ. Đậy kín và lật ngược đĩa 8-10 lần để trộn. Đặt đĩa trong bồn nước ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Sau khi ủ, đĩa chứa tế bào được ly tâm với tốc độ 1.200 vòng/phút trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dịch nổi trên bề mặt được hút ra để thu được 100 $\mu$ l tế bào ( $2 \times 10^5$  tế bào). Các tế bào được ly tâm và rửa hai lần bằng 800 $\mu$ l PBS bằng cách lặp lại các bước ly tâm và thu được 100 $\mu$ l chứa khoảng  $2 \times 10^5$  tế bào sau khi rửa lần cuối. Thêm một phần phân ước chứa 800 $\mu$ l metanol 90% lạnh vào tế bào và để qua đêm ở nhiệt độ -20°C. Đĩa được ly tâm và metanol được loại bỏ. Rửa các tế bào bằng dung dịch đệm FACS (PBS chứa 5% FBS và 0,02% natri azit). Thêm một phần phân ước chứa 200 $\mu$ l dịch pha loãng 1 đến 10 chứa kháng pSTAT5 của chuột (pY694) Alexa Fluor 647<sup>®</sup> trong dung dịch đệm (FACS) phân loại tế bào đã được hoạt hóa huỳnh quang vào các tế bào. Tiếp đó, các tế bào được trộn kỹ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối trong thời gian 2 giờ. Rửa tế bào một lần bằng PBS và thu được 100 $\mu$ l tế bào. Điều chế dung dịch xử lý Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) có nồng độ 2  $\mu$ g/ml bằng PBS. Thêm một phần phân ước chứa 200 $\mu$ l

vào mỗi lỗ và ủ tế bào ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối trong thời gian 10 phút. Rửa tế bào bằng PBS, và thêm 50µl Cytotfix (BD Biosciences, San Jose, CA) vào tế bào. Chuyển tế bào sang đĩa nuôi cấy mô màu đen có 96 lỗ và đậy kín. Sau đó, đĩa được ly tâm. Dữ liệu về cường độ huỳnh quang trung bình được ghi và được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị Cellomics Arrayscan® VTI. Các mẫu được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm được so sánh với chất dẫn để xác định dữ liệu ức chế tính theo tỷ lệ phần trăm. Tỷ lệ có ý nghĩa tối thiểu (minimum significant ratio – MSR) giữa hai hợp chất thử nghiệm có IC<sub>50</sub> khác nhau xác định được là 2,2. IC<sub>50</sub> tương đối được tính bằng cách sử dụng phép phân tích khớp đường cong logistic 4 thông số bằng chương trình ActivityBase 4.0. Đối với hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin, IC<sub>50</sub> = 0,033µM, n = 4. Kết quả của thử nghiệm này chứng minh rằng hợp chất 3-(4-clo-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin là chất ức chế JAK2 hiệu nghiệm.

Thử nghiệm trên cơ sở tế bào JAK3 IL-2-NK-92/pSTAT5 – Cellomics ArrayScan® HCS

IL-2 hoạt hoá con đường JAK3 trong các tế bào diệt tự nhiên (natural killer – NK) để điều chỉnh quá trình tăng sinh của tế bào lympho NK và CD8. Do đó, thử nghiệm trên cơ sở tế bào NK92 /pSTAT5 được kích thích bởi IL-2 cho phép đánh giá hoạt tính đối với JAK3 trong tế bào của hợp chất có hoạt tính đối với JAK2 in vitro.

Giữ các tế bào (diệt tự nhiên) NK-92 (ATCC, Manassas, VA) trong môi trường thiết yếu tối thiểu (minimum essential medium – MEM) Alpha chứa 15% huyết thanh bào thai bò, 15% huyết thanh ngựa và chất kháng sinh/chất chống nấm ở nồng độ 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA). Môi trường này được bổ sung thêm IL-2 (R&D systems, Minneapolis, MN) đến nồng độ cuối là 4 ng/ml. Giữ các tế bào ở nhiệt độ 37°C trong môi trường chứa 5% CO<sub>2</sub>. Bỏ đói tế bào trong môi trường không chứa huyết thanh để loại bỏ các yếu tố sinh trưởng nội sinh.

Đếm tế bào NK-92 và thu hồi tế bào này để gieo  $2 \times 10^7$  tế bào trên đĩa có 96 lỗ ở mật độ  $2 \times 10^5$  tế bào mỗi lỗ. Rửa tế bào hai lần bằng MEM Alpha không bổ sung (MEM Alpha) trước khi tạo hỗn dịch tế bào với nồng độ cuối là  $8 \times 10^5$  tế bào/ml trong MEM Alpha chứa 0,6% huyết thanh (0,3% FBS, 0,3% huyết thanh ngựa). Thêm các tế bào đã pha loãng trở lại bình nuôi cấy mô và ủ qua đêm ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$ . Điều chế dung dịch chứa hợp chất thử nghiệm trong DMSO 100% với nồng độ 10mM. Các hợp chất được pha loãng liên tục theo bậc 1:3 bằng DMSO 100% trong khoảng nồng độ 10 điểm-200x – đáp ứng (4mM-200nM). Thêm  $2,5\mu\text{l}$  dung dịch chứa hợp chất với nồng độ 200x vào  $125\mu\text{l}$  môi trường RPMI 1640 toàn phần chứa 10% FBS trong một đĩa có 96 lỗ riêng rẽ để thu được đĩa chứa hợp chất với nồng độ 4x.

Để tiến hành thử nghiệm, các tế bào đối huyết thanh được thu hồi và rửa một lần bằng môi trường RPMI 1640 không bổ sung. Tạo hỗn dịch tế bào trong môi trường RPMI 1640 toàn phần chứa 10% FBS để thu được nồng độ cuối là  $8 \times 10^5$  tế bào/ml. Thêm một phần phân ước chứa  $250\mu\text{l}$  tế bào đã pha loãng ( $2 \times 10^5$  tế bào) vào mỗi lỗ trong đĩa chứa hợp chất với nồng độ 4x. Trộn các tế bào bằng cách ly tâm và ủ đĩa trong bồn nước ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  trong 10 phút. Điều chế mới dung dịch xử lý 4x chứa IL-2 với nồng độ 2 ng/ml bằng cách sử dụng môi trường RPMI 1640 toàn phần chứa 10% FBS đã được làm ấm trước. Sau khi xử lý tế bào bằng hợp chất trong thời gian 10 phút, thêm  $125\mu\text{l}$  môi trường chứa IL-2 vào mỗi lỗ. Tiếp đó, các tế bào được trộn bằng cách ly tâm. Ủ tế bào trong bồn nước ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  trong thời gian 20 phút và tiến hành trộn sau mỗi khoảng thời gian 5 phút trong suốt thời gian ủ. Khoảng nồng độ 10 điểm – đáp ứng cuối là  $20\mu\text{M}$ -1nM với nồng độ cuối của DMSO là 0,5% và IL-2 là 0,5 ng/ml. Sau khi xử lý tế bào, thêm  $500\mu\text{l}$  dung dịch formaldehyt 1% (được điều chế mới bằng nước muối đệm phosphat (PBS) và giữ ấm ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$ ) vào mỗi lỗ. Đậy kín và lật ngược đĩa 8-10 lần để trộn. Đặt đĩa trong bồn nước ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  trong thời gian 10 phút. Sau khi ủ, đĩa chứa tế bào được ly tâm với tốc độ 1.200 vòng/phút trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dịch nổi trên bề mặt được hút ra để thu được  $100\mu\text{l}$  tế bào ( $2 \times 10^5$  tế bào). Các tế bào được

ly tâm và rửa hai lần bằng 800 $\mu$ l PBS bằng cách lặp lại các bước ly tâm và thu được 100 $\mu$ l chứa khoảng  $2 \times 10^5$  tế bào sau khi rửa lần cuối. Thêm một phần phân ước chứa 800 $\mu$ l metanol 90% lạnh vào tế bào và để qua đêm ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$ . Đĩa được ly tâm và metanol được loại bỏ. Rửa các tế bào bằng dung dịch đệm FACS (PBS chứa 5% FBS và 0,02% natri azit). Thêm một phần phân ước chứa 200 $\mu$ l dịch pha loãng 1 đến 10 chứa kháng pSTAT5 của chuột (pY694) Alexa Fluor 647<sup>®</sup> trong dung dịch đệm (FACS) phân loại tế bào đã được hoạt hóa huỳnh quang vào các tế bào. Tiếp đó, các tế bào được trộn kỹ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối trong thời gian 2 giờ. Rửa tế bào một lần bằng PBS và thu được 100 $\mu$ l tế bào. Điều chế dung dịch xử lý Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) có nồng độ 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bằng PBS. Thêm một phần phân ước chứa 200 $\mu$ l vào mỗi lỗ và ủ tế bào ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối trong thời gian 10 phút. Rửa tế bào bằng PBS, và thêm 50 $\mu$ l Cytotfix<sup>®</sup> (BD Biosciences, San Jose, CA) vào tế bào. Chuyển tế bào sang đĩa nuôi cấy mô màu đen có 96 lỗ và đậy kín. Sau đó, đĩa được ly tâm. Dữ liệu về cường độ huỳnh quang trung bình được ghi và được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị Cellomics Arrayscan<sup>®</sup> VTi. Các mẫu được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm được so sánh với chất dẫn để xác định dữ liệu ức chế tính theo tỷ lệ phần trăm. MSR xác định được là 2,06.  $\text{IC}_{50}$  tương đối được tính bằng cách sử dụng phép phân tích khớp đường cong logistic 4 thông số bằng chương trình ActivityBase 4.0. Đối với hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin,  $\text{IC}_{50} = 0,94\mu\text{M}$ ,  $n = 4$ . Kết quả của thử nghiệm trên cơ sở tế bào JAK3 IL2-NK92-pSTAT5 chứng minh rằng hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo-[1,2-b]pyridazin-6-amin là chất ức chế JAK3 ít hiệu nghiệm hơn (khi so sánh với kết quả của thử nghiệm trên cơ sở tế bào JAK2 EPO-TF1/pSTAT5 với  $\text{IC}_{50} = 0,033\mu\text{M}$ ). Từ các kết quả này, tỷ lệ JAK3/JAK2,  $\text{IC}_{50}$  xác định được là 28,5 lần, điều đó chứng minh rằng hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-

(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin là chất ức chế JAK2 chọn lọc so với JAK3.

Thử nghiệm trên cơ sở tế bào Ba/F3JAK2V617F Cellomics ArrayScan® HCS

Mức độ ức chế đích JAK2 đã được đánh giá ở Ba/F3 biểu hiện JAK2 V617F bằng phương pháp thấm tách Tây như đã được Wernig và các đồng tác giả mô tả (Wernig G, et al., *Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera*, Cancer Cell, Apr; 13(4):311-20). Thử nghiệm Cellomics về năng suất trung bình đã được thiết lập để đánh giá mức độ ức chế đích JAK2 ở các tế bào Ba/F3 biểu hiện JAK2V617F. Thử nghiệm này cho phép phát hiện các tác nhân điều trị hữu hiệu để điều trị các rối loạn liên quan đến đột biến JAK2V617F.

Giữ các tế bào Ba/F3 (pro-B của chuột) biểu hiện JAK2V617F trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS), 0,07% natri bicacbonat, natri pyruvat với nồng độ 1mM, chất kháng sinh/chất chống nấm với nồng độ 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA) và 0,45% glucoza (Sigma, St Louis, MO). Giữ các tế bào ở nhiệt độ 37°C trong môi trường chứa 5% CO<sub>2</sub>. Điều chế dung dịch chứa hợp chất thử nghiệm trong DMSO 100% với nồng độ 10mM. Các hợp chất được pha loãng liên tục theo bậc 1:3 bằng DMSO 100% trong khoảng nồng độ 10 điểm-200x – đáp ứng (4mM-200nM). Thêm 2,5µl dung dịch chứa hợp chất với nồng độ 200x vào 125µl môi trường RPMI 1640 toàn phần chứa 10% FBS trong một đĩa có 96 lỗ riêng rẽ để thu được đĩa chứa hợp chất với nồng độ 4x.

Để tiến hành thử nghiệm, các tế bào được thu hồi và rửa hai lần bằng môi trường RPMI 1640 không bổ sung. Tiếp đó, tạo hỗn dịch tế bào trong môi trường RPMI toàn phần chứa 10% FBS để thu được nồng độ cuối là 4x10<sup>5</sup>/ml. Tiếp đó, chuyển 500µl tế bào (2x10<sup>5</sup> tế bào) sang đĩa có 96 lỗ sâu. Cuối cùng, thêm 2,5µl dung dịch gốc chứa hợp chất (dịch pha loãng với tỷ lệ 1:200) vào tế bào và ủ với tế bào trong bồn nước ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 60 phút.

Sau khi xử lý tế bào, thêm 500µl dung dịch formaldehyt 1% (được điều chế mới bằng nước muối đệm phosphat (PBS) và giữ ấm ở nhiệt độ 37°C) vào mỗi lỗ. Đậy kín và lật ngược đĩa 8-10 lần để trộn. Đặt đĩa trong bồn nước ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Sau khi ủ, đĩa chứa tế bào được ly tâm với tốc độ 1.200 vòng/phút trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dịch nổi trên bề mặt được hút ra để thu được 100µl tế bào ( $2 \times 10^5$  tế bào). Các tế bào được ly tâm và rửa hai lần bằng 800µl PBS bằng cách lặp lại các bước ly tâm và thu được 100µl chứa khoảng  $2 \times 10^5$  tế bào sau khi rửa lần cuối. Thêm một phần phân ước chứa 800µl metanol 90% lạnh vào tế bào và để qua đêm ở nhiệt độ -20°C. Đĩa được ly tâm và metanol được loại bỏ. Rửa các tế bào bằng dung dịch đệm FACS (PBS chứa 5% FBS và 0,0% natri azit). Thêm một phần phân ước chứa 200µl dịch pha loãng 1 đến 10 chứa kháng pSTAT5 của chuột (pY694) Alexa Fluor 647<sup>®</sup> trong dung dịch đệm (FACS) phân loại tế bào đã được hoạt hóa huỳnh quang vào các tế bào. Tiếp đó, các tế bào được trộn kỹ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối trong thời gian 2 giờ. Rửa tế bào một lần bằng PBS và thu được 100µl tế bào. Điều chế dung dịch xử lý Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) có nồng độ 2 µg/ml bằng PBS. Thêm một phần phân ước chứa 200µl vào mỗi lỗ và ủ tế bào ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối trong thời gian 10 phút. Rửa tế bào bằng PBS, và thêm 50µl Cytotfix<sup>®</sup> (BD Biosciences, San Jose, CA) vào tế bào. Chuyển tế bào sang đĩa nuôi cấy mô màu đen có 96 lỗ và đậy kín. Sau đó, đĩa được ly tâm. Dữ liệu về cường độ huỳnh quang trung bình được ghi và được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị Cellomics Arrayscan<sup>®</sup> VTI. Các mẫu được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm được so sánh với chất dẫn để xác định dữ liệu ức chế tính theo tỷ lệ phần trăm. IC<sub>50</sub> tương đối được tính bằng cách sử dụng phép phân tích khớp đường cong logistic 4 thông số bằng chương trình ActivityBase 4.0. Đối với hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin, IC<sub>50</sub> = 0,03µM. Kết quả của thử nghiệm này chứng minh rằng hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-

(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin có tác dụng ức chế hữu hiệu đích JAK2V617F ở các tế bào Ba/F3 biểu hiện gen JAK2V617F.

Tốt hơn nếu hợp chất theo sáng chế được bào chế dưới dạng dược phẩm để sử dụng qua nhiều đường khác nhau. Tốt nhất nếu dược phẩm này được bào chế để sử dụng qua đường miệng. Các dược phẩm như vậy và quy trình bào chế chúng là đã được rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem tài liệu: REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, et al., eds., 19<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., 1995).

Nói chung, hợp chất theo sáng chế có tác dụng hữu hiệu trong khoảng liều rộng. Ví dụ, tổng liều dùng hằng ngày thường nằm trong khoảng từ 1mg đến 1000mg, tốt hơn nếu tổng liều hằng ngày nằm trong khoảng từ 500mg đến 1000mg, tốt hơn nữa nếu tổng liều hằng ngày nằm trong khoảng từ 600mg đến 1000mg. Trong một số trường hợp, mức liều thấp hơn giới hạn dưới của khoảng liều nêu trên có thể là thích hợp hơn, trong khi trong các trường hợp khác, mức liều lớn hơn có thể được sử dụng. Khoảng liều nêu trên không dùng để giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Cần hiểu rằng lượng hợp chất được sử dụng trên thực tế sẽ được người thầy thuốc xác định, trên cơ sở các yếu tố có liên quan, bao gồm tình trạng bệnh lý cần điều trị, đường dùng thuốc được lựa chọn, hợp chất hoặc các hợp chất được sử dụng trên thực tế, lứa tuổi, thể trọng và mức độ đáp ứng của bệnh nhân cụ thể, và mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng xuất hiện ở bệnh nhân.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin, hoặc muối dược dụng của nó.
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin.
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là 3-(4-clo-2-flobenzyl)-2-metyl-N-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinometyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amin hydroclorua.
4. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1, 2 hoặc 3, hoặc muối dược dụng của nó, và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng thích hợp.



## **TÓM TẮT**

Sáng chế đề xuất hợp chất amino pyrazol hữu ích để điều trị các rối loạn tăng sinh tủy xương mạn tính và các bệnh ung thư khác nhau, ví dụ, u nguyên bào xốp, ung thư vú, đa u tủy, ung thư tuyến tiền liệt và bệnh bạch cầu. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa hợp chất này.