



(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)



1-0028085

(51)⁸ C07D 487/04; A61P 11/02; A61P 17/00; (13) B
A61P 19/02; A61P 29/00; A61P 35/02;
A61P 37/02; A61P 37/06; A61P 37/08;
A61P 43/00; A61K 31/519; A61P 35/00

(21) 1-2017-02645

(22) 29/01/2016

(86) PCT/JP2016/052733 29/01/2016

(87) WO2016/121954 04/08/2016

(30) 2015-017387 30/01/2015 JP

(45) 25/04/2021 397

(43) 27/11/2017 356A

(73) TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)

1-27, Kandanishiki-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8444, Japan

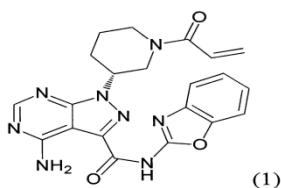
(72) OSHIUMI, Hiromi (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) MUỐI FUMARAT CỦA (R)-1-(1-ACRYLOYLPYPERIDIN-3-YL)-4-AMINO- N-(BENZO[D]OXAZOL-2-YL)-1H-PYRAZOLO[3,4-D]PYRIMIDIN-3-CARBOXAMIT, CHẤT ỨC CHẾ BTK, DƯỢC PHẨM VÀ TÁC NHÂN CHỐNG KHỐI U CHỨA MUỐI NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến muối có khả năng chọn lọc cao đối với BTK và hữu dụng làm thành phần hoạt tính của dược phẩm.

Đã phát hiện ra rằng, fumarat của (R)-1-(1-acryloylpyperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit (hợp chất A) có công thức (1):



không có đặc tính kênh hydrat và có độ ổn định và đặc tính hấp thu tốt, so với hợp chất A và các muối khác của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến muối của hợp chất có hoạt tính ức chế đối với tyrosin kinaza của Bruton (Bruton's tyrosine kinase - BTK), và tinh thể của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết rằng, các protein kinaza khác nhau tồn tại trong cơ thể và có liên quan trong việc điều chỉnh nhiều chức năng. Men tyrosin kinaza của Bruton (Bruton's tyrosine kinase - BTK) là một protein kinaza thuộc họ kinaza Tec, và là tyrosin kinaza không thụ thể đóng vai trò quan trọng liên quan đến việc kiểm soát, ví dụ, sự tăng sinh, sống sót, biệt hóa và hoạt hóa của các tế bào B ở vùng xuôi dòng của tín hiệu thụ thể tế bào B (BCR) (tài liệu phi sáng chế 1). Chất ức chế có khả năng kiểm soát hoạt tính BTK được xem là hữu dụng làm chế phẩm điều trị đối với các bệnh liên quan đến sự gia tăng hoạt động bất thường của con đường truyền tín hiệu BTK (ví dụ, ung thư).

Liên quan đến hợp chất có hoạt tính ức chế BTK, PCI-32765 (tài liệu phi sáng chế 2) và các hợp chất được mô tả trong các tài liệu sáng chế 1 và 2 là đã biết.

Hợp chất bộc lộ trong các tài liệu sáng chế 1 và 2 cũng được biết là thể hiện hoạt tính ức chế mạnh đối với thụ thể yếu tố tăng trưởng thượng bì (Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR) và JAK3 (Janus kinase 3) ngoài BTK. Tuy nhiên, vì chất ức chế nhiều kinaza như vậy sẽ ức chế, ví dụ, sự tăng sinh tế bào bằng cách ức chế các con đường truyền tín hiệu khác nhau, do đó e rằng có nhiều tác dụng phụ. Ví dụ, đã biết rằng, EGFR liên kết với phối tử của nó, ví dụ, yếu tố tăng trưởng

thượng bì (EGF), và tham gia vào quá trình tăng sinh và sống sót (ví dụ, ức chế quá trình chết rụng tế bào) của nhiều tế bào khác nhau (tài liệu phi sáng chế 3). Tuy nhiên, đã biết rằng, các chất ức chế nhằm đích EGFR gây ra các tác dụng phụ như các rối loạn về da và rối loạn chức năng dạ dày ruột nói chung, và được giả thiết rộng rãi rằng, các tác dụng phụ này có thể liên quan đến sự ức chế con đường truyền tín hiệu EGFR kiểu tự nhiên (tài liệu phi sáng chế 4).

Do đó, PCI-45292 được biết là hợp chất mà hợp chất này có hoạt tính ức chế đối với BTK với hoạt tính ức chế yếu đối với EGFR (tài liệu phi sáng chế 5).

Danh mục tài liệu viện dẫn

Tài liệu sáng chế:

Tài liệu sáng chế 1: WO 2011/090760

Tài liệu sáng chế 2: WO 2009/158571

Các tài liệu phi sáng chế:

Tài liệu phi sáng chế 1: Curr. Opin. Immunol., 2000 Jun; 12(3): 282-8

Tài liệu phi sáng chế 2: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2010 Jul 20; 107(29):13075-80

Tài liệu phi sáng chế 3: Nature Rev. Cancer, Vol. 6, pp. 803-811 (2006)

Tài liệu phi sáng chế 4: Nature Rev. Clin. Oncol., Vol. 6, pp. 98-109 (2012)

Tài liệu phi sáng chế 5: American College of Rheumatology Annual Meeting, Atlanta, GA, 6-11 November, 2010)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

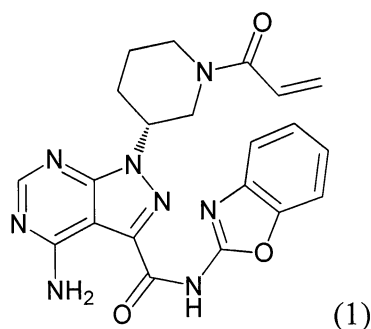
Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất muối mà muối này là chất ức chế BTK với khả năng chọn lọc cao, có hoạt tính ức chế mạnh đối với BTK và có hoạt tính ức chế

yếu đối với các kinaza khác như EGFR, và muối này hữu dụng làm thành phần thuốc của dược phẩm.

Giải pháp kỹ thuật

Nhờ kết quả của việc nghiên cứu nghiêm túc để giải quyết vấn đề, tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, hợp chất (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit (hợp chất A) có công thức (1) sau có hoạt tính ức chế mạnh đối với BTK, với hoạt tính ức chế yếu đối với các kinaza khác như EGFR, và hữu dụng làm thuốc để điều trị các bệnh ung thư, các bệnh tự miễn dịch, hoặc các bệnh dị ứng:



Sau đó, trong một nghiên cứu về các đặc tính lý hóa của hợp chất A nhằm mục đích phát triển chế phẩm phối chế chứa hợp chất A, tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, (1) hợp chất A khó có thể sử dụng làm thành phần thuốc trong dược phẩm, vì có đặc tính là kênh hydrat hấp thụ độ ẩm trong không khí khi dạng tự do của hợp chất A tiếp xúc với môi trường độ ẩm cao, và giải phóng độ ẩm khi tiếp xúc với môi trường độ ẩm thấp, (2) muối cộng axit được tạo ra duy nhất với axit tartaric, axit phosphoric, hoặc axit fumaric, liên quan đến muối cộng axit của hợp chất A, và (3) thậm chí bất ngờ hơn nữa, trong số các muối cộng axit này, chỉ duy nhất fumarat là không có đặc tính kênh hydrat, và đã hoàn thành sáng chế.

Cụ thể hơn nữa, trong sản xuất dược phẩm trên quy mô công nghiệp, đòi hỏi thành phần thuốc phải có tính ổn định, v.v.. Tuy nhiên, tính ổn định, v.v.. phụ thuộc

vào thuộc tính của mỗi một hợp chất. Do đó, trong một phức chất, khó có thể dự đoán muối có các đặc tính thích hợp làm thành phần thuốc cho dược phẩm, và do đó, đối với mỗi một hợp chất, mong muốn tìm ra được các muối khác nhau hữu dụng trong các dược phẩm. Từ quan điểm như vậy, tác giả sáng chế đã tổng hợp các muối khác nhau của hợp chất A và đã nghiên cứu các đặc tính, tính ổn định, v.v.v của nó. Kết quả, nghiên cứu của tác giả sáng chế đã thành công trong việc tạo ra muối của fumarat, tartrat, phosphat và muối magie. Tuy nhiên, trong số các muối này và dạng tự do, tartrat và dạng tự do có đặc tính kênh hydrat và tính ổn định ở trạng thái rắn kém; phosphat không duy trì được dạng tinh thể ban đầu của nó trong thử nghiệm hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm và ngoài ra, có tính ổn định ở trạng thái rắn kém; và muối magie có độ tinh khiết tinh thể thấp, vì bao gồm nhiều chất tương tự. Đã phát hiện ra rằng, chỉ duy nhất fumarat có thể tránh được đặc tính kênh hydrat, và đồng thời, tuyệt vời vì có được khả năng thực thi và khả năng tái sinh, và ổn định và tuyệt vời về đặc tính hấp thụ, và do đó, sáng chế đã được hoàn thành.

Tức là, sáng chế đề cập đến các điểm từ 1) đến 7) dưới đây:

- 1) fumarat của (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit (Hợp chất A).
- 2) (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit (Hợp chất A)·hemifumarat.
- 3) (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit (Hợp chất A)·monofumarat.
- 4) Chất ức chế BTK chứa fumarat của hợp chất A làm thành phần hoạt tính.
- 5) Dược phẩm chứa fumarat của hợp chất A.
- 6) Tác nhân chống khối u hoặc tác nhân phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh di

ứng, các bệnh tự miễn dịch hoặc các bệnh viêm chứa fumarat của hợp chất A làm thành phần hoạt tính.

7) Tác nhân chống khối u đối với u máu hoặc tác nhân phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh dị ứng phấn hoa, bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm khớp dạng thấp hoặc bệnh lupus ban đỏ hệ thống, chế phẩm này chứa fumarat của hợp chất A làm thành phần hoạt tính.

Bản mô tả bộc lộ các mục từ 8 đến 11 sau đây:

8) Mô tả việc sử dụng fumarat của hợp chất A để sản xuất chất ức chế BTK.

9)) Mô tả việc sử dụng fumarat của hợp chất A để sản xuất dược phẩm.

10)) Mô tả việc sử dụng fumarat của hợp chất A để sản xuất tác nhân chống khối u hoặc tác nhân phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh dị ứng, các bệnh tự miễn dịch hoặc các bệnh viêm.

11)) Mô tả việc sử dụng fumarat của hợp chất A để sản xuất tác nhân chống khối u đối với u máu hoặc tác nhân phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh dị ứng phấn hoa, bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm khớp dạng thấp hoặc bệnh lupus ban đỏ hệ thống.

Sáng chế đề cập đến các điểm từ 12 đến 15 sau đây:

12) Fumarat của hợp chất A để sử dụng trong ức chế BTK.

13) Fumarat của hợp chất A để sử dụng làm thuốc.

14) Fumarat của hợp chất A để sử dụng trong tác nhân phòng ngừa và/hoặc điều trị khối u, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm.

15) Fumarat của hợp chất A để sử dụng trong phòng ngừa hoặc điều trị u máu, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh dị ứng phấn hoa, bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm khớp dạng

thấp hoặc bệnh lupus ban đỏ hệ thống.

Bản mô tả còn bộc lộ các mục từ 16 đến 18 sau đây:

16) Phương pháp ức chế BTK, bao gồm việc dùng một lượng hiệu quả của fumarat của hợp chất A cho đối tượng cần được điều trị.

17) Phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị khối u, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm bao gồm việc dùng một lượng hiệu quả của fumarat của hợp chất A cho đối tượng cần được điều trị.

18) Phương pháp điều trị u máu, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh dị ứng phấn hoa, bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm khớp dạng thấp hoặc bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bao gồm việc dùng một lượng hiệu quả của fumarat của hợp chất A cho đối tượng cần được điều trị.

Các ưu điểm của sáng chế

Fumarat của hợp chất A theo sáng chế có tính ổn định ở trạng thái rắn tuyệt vời làm thành phần thuốc của dược phẩm, và có khả năng tránh được đặc tính kênhydrat, so với hợp chất A hoặc các muối không phải fumarat của hợp chất A, và tuyệt vời vì có khả năng thực thi và khả năng tái sinh. Ngoài ra, fumarat của hợp chất A theo sáng chế thể hiện đặc tính hấp thu theo đường uống tuyệt vời, và đặc biệt hữu dụng làm dược phẩm hoặc làm thành phần thuốc của dược phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình vẽ trên Fig. 1 minh họa phổ nhiễu xạ bột tia X của monofumarat của hợp chất A (vô định hình) tổng hợp trong ví dụ 1 (trục tung biểu diễn cường độ (cps), và trục hoành biểu diễn góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$)).

Hình vẽ trên Fig. 2 minh họa phổ nhiễu xạ bột tia X của hemifumarat của hợp chất A (tinh thể) tổng hợp trong ví dụ 2 (trục tung biểu diễn cường độ (cps), và

trục hoành biểu diễn góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$)).

Hình vẽ trên Fig. 3 minh họa đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC) của hemifumarat của hợp chất A (tinh thể) tổng hợp trong ví dụ 2.

Hình vẽ trên Fig. 4 minh họa phổ nhiễu xạ bột tia X của monofumarat của hợp chất A (tinh thể) tổng hợp trong ví dụ 3 (trục tung biểu diễn cường độ (cps), và trục hoành biểu diễn góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$)).

Hình vẽ trên Fig. 5 minh họa đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC) của monofumarat của hợp chất A (tinh thể) tổng hợp trong ví dụ 3.

Hình vẽ trên Fig. 6 minh họa đường đẳng nhiệt hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm của hợp chất A.

Hình vẽ trên Fig. 7 minh họa đường đẳng nhiệt hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm của monofumarat của hợp chất A (tinh thể).

Hình vẽ trên Fig. 8 minh họa đường đẳng nhiệt hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm của hemifumarat của hợp chất A (tinh thể).

Hình vẽ trên Fig. 9 minh họa đường đẳng nhiệt hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm của hemitartrat của hợp chất A.

Hình vẽ trên Fig. 10 minh họa đường đẳng nhiệt hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm của monophosphat của hợp chất A.

Hình vẽ trên Fig. 11 minh họa tác dụng của monofumarat của hợp chất A (tinh thể) ở mẫu chuột bị bệnh viêm khớp gây ra bằng collagen.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết.

"Hợp chất A" đơn giản được mô tả trong bản mô tả này đề cập đến (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit ở dạng tự do.

"Fumarat của hợp chất A" đơn giản được mô tả trong bản mô tả này có thể là một muối bất kỳ trong số các dạng muối của hợp chất A với axit fumaric, bao gồm monofumarat và hemifumarat. Thuật ngữ được sử dụng thêm với ý nghĩa liên quan đến cả tinh thể fumarat của hợp chất A và dạng vô định hình fumarat của hợp chất A. Fumarat của hợp chất A tốt hơn là monofumarat của hợp chất A (có thể được viết tắt là "Hợp chất A·monofumarat") và hemifumarat của hợp chất A (có thể được viết tắt là "Hợp chất A·hemifumarat"); tốt hơn nữa là monofumarat của hợp chất A (tinh thể), hemifumarat của hợp chất A (tinh thể) và monofumarat của hợp chất A (vô định hình); và tốt nhất là monofumarat của hợp chất A (tinh thể) và hemifumarat của hợp chất A (tinh thể).

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ "tinh thể" và "vô định hình" được sử dụng theo nghĩa thông thường.

Các dạng đa tinh thể mà khác nhau về sự sắp xếp nguyên tử theo thứ tự trong không gian và về các đặc tính lý hóa (các dạng đa hình) xuất hiện trong một số trường hợp. Muối của sáng chế có thể là dạng đa hình bất kỳ trong số các dạng đa hình này, và có thể là hỗn hợp của hai hoặc nhiều dạng đa hình, hoặc hỗn hợp của tinh thể và dạng vô định hình.

Sáng chế cũng đề cập đến dạng đánh dấu của fumarat của hợp chất A, tức là, hợp chất có một hoặc nhiều nguyên tử của hợp chất A hoặc fumarat được thể bằng nguyên tố đồng vị phóng xạ hoặc nguyên tố không đồng vị phóng xạ.

Về mặt này, trong phổ nhiễu xạ bột tia X, góc nhiễu xạ hoặc mô hình chung là yếu tố quan trọng để nhận dạng tính đồng nhất của các tinh thể, đối với bản chất của dữ liệu. Cường độ tương đối của phổ nhiễu xạ bột tia X có thể thay đổi chút ít tùy thuộc vào chiều của sự phát triển tinh thể, kích thước hạt, hoặc điều kiện đo, và do đó, không thể được diễn giải một cách hoàn toàn.

Giá trị số thu được từ các mẫu khác nhau có thể kèm theo bởi sai số nhỏ do chiều của sự phát triển tinh thể, kích thước hạt, hoặc điều kiện đo của nó. Do đó, trong bản mô tả này, thuật ngữ góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$) trong phổ nhiễu xạ bột tia X để chỉ giá trị mà giá trị này có thể nằm trong khoảng $\pm 0,1^\circ$ của giá trị.

Thuật ngữ "ở vùng xung quanh" mà được sử dụng cùng với nhiệt độ đỉnh của đỉnh thu nhiệt trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) để chỉ giá trị mà giá trị này xấp xỉ với nhiệt độ, tốt hơn để chỉ giá trị mà có thể nằm trong khoảng $\pm 5^\circ\text{C}$ của giá trị. Tốt hơn nữa, giá trị này để chỉ giá trị có thể nằm trong khoảng $\pm 2^\circ\text{C}$ của giá trị.

Tốt hơn, monofumarat của hợp chất A (tinh thể) có phổ nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 4 và/hoặc có đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC) như được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 5.

Ở đây, các đỉnh đặc trưng của monofumarat của hợp chất A (tinh thể) trong phổ nhiễu xạ bột tia X có thể bao gồm $7,2^\circ$, $12,4^\circ$, $15,6^\circ$, $25,9^\circ$ và $27,6^\circ$, tốt hơn nữa là $7,2^\circ$, $12,4^\circ$, $14,4^\circ$, $15,0^\circ$, $15,6^\circ$, $19,0^\circ$, $22,3^\circ$, $22,6^\circ$, $23,4^\circ$, $25,5^\circ$, $25,9^\circ$ và $27,6^\circ$, về phương diện góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$).

Monofumarat của hợp chất A (tinh thể) theo sáng chế là tinh thể có ít nhất 2 hoặc nhiều hơn 2 đỉnh được chọn từ các đỉnh ưu tiên hơn mô tả ở trên, tốt hơn tinh thể có ít nhất 3 hoặc nhiều hơn 3 đỉnh được chọn từ các đỉnh, tốt hơn nữa tinh thể có

ít nhất 5 hoặc nhiều hơn 5 đỉnh được chọn từ các đỉnh, thậm chí tốt hơn nữa tinh thể có ít nhất 8 hoặc nhiều hơn 8 đỉnh được chọn từ các đỉnh, và tốt nhất là tinh thể có tất cả các đỉnh được mô tả ở trên.

Đỉnh thu nhiệt trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) của monofumarat của hợp chất A (tinh thể) có thể bao gồm các đỉnh ở vùng xung quanh nằm trong khoảng từ 219°C đến 224°C, và tốt hơn ở vùng xung quanh 223°C.

Phương thức ưu tiên khác của monofumarat của hợp chất A (tinh thể) theo sáng chế có thể là tinh thể, trong đó góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$) có ít nhất 2 hoặc nhiều hơn 2, tốt hơn ít nhất 3 hoặc nhiều hơn 3, và tốt hơn nữa ít nhất 5 hoặc nhiều hơn 5 đỉnh được chọn từ 7,2°, 12,4°, 15,6°, 25,9° và 27,6° trong phổ nhiễu xạ bột tia X; và nhiệt độ đỉnh trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở vùng xung quanh trong khoảng từ 219 đến 224°C, và tốt hơn ở vùng xung quanh 223°C. Thậm chí phương thức ưu tiên hơn nữa có thể là tinh thể, trong đó góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$) trong phổ nhiễu xạ bột tia X có ít nhất hai hoặc nhiều hơn 2, tốt hơn ít nhất 3 hoặc nhiều hơn 3, tốt hơn nữa ít nhất 5 hoặc nhiều hơn 5, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất 8 hoặc nhiều hơn 8, và tốt hơn nữa tất cả các đỉnh được chọn từ 7,2°, 12,4°, 14,4°, 15,0°, 15,6°, 19,0°, 22,3°, 22,6°, 23,4°, 25,5°, 25,9° và 27,6°; và đồng thời, nhiệt độ đỉnh trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở vùng xung quanh trong khoảng từ 219°C đến 224°C, và tốt hơn ở vùng xung quanh 223°C.

Tốt hơn, hemifumarat của hợp chất A (tinh thể) có phổ nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 2 và/hoặc có đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) như được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 3.

Ở đây, các đỉnh đặc trưng của hemifumarat của hợp chất A (tinh thể) trong phổ nhiễu xạ bột tia X có thể bao gồm 4,5°, 5,8°, 16,6°, 20,2° và 26,4°, và tốt hơn

nữa là $4,5^\circ$, $5,8^\circ$, $11,2^\circ$, $12,1^\circ$, $12,4^\circ$, $13,4^\circ$, $16,6^\circ$, $17,3^\circ$, $18,2^\circ$, $20,2^\circ$, $26,4^\circ$ và $27,1^\circ$, về phương diện góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$).

Hemifumarat của hợp chất A (tinh thể) theo sáng chế là tinh thể có ít nhất 2 hoặc nhiều hơn 2 đỉnh được chọn từ các đỉnh ưu tiên hơn mô tả ở trên, tốt hơn tinh thể có ít nhất 3 hoặc nhiều hơn 3 đỉnh được chọn từ các đỉnh, tốt hơn nữa tinh thể có ít nhất 5 hoặc nhiều hơn 5 đỉnh được chọn từ các đỉnh, thậm chí tốt hơn nữa tinh thể có ít nhất 8 hoặc nhiều hơn 8 đỉnh được chọn từ các đỉnh, và tốt nhất là tinh thể có tất cả các đỉnh.

Đỉnh thu nhiệt trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) của hemifumarat (tinh thể) của hợp chất A có thể bao gồm các đỉnh ở vùng xung quanh nằm trong khoảng từ 197°C đến 199°C , và tốt hơn ở vùng xung quanh 198°C .

Các phương thức ưu tiên khác của hemifumarat của hợp chất A (tinh thể) theo sáng chế có thể bao gồm tinh thể, trong đó góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$) có ít nhất 2 hoặc nhiều hơn 2, tốt hơn ít nhất 3 hoặc nhiều hơn 3, và tốt hơn nữa ít nhất 5 hoặc nhiều hơn 5 đỉnh được chọn từ $4,5^\circ$, $5,8^\circ$, $16,6^\circ$, $20,2^\circ$ và $26,4^\circ$ trong phổ nhiễu xạ bột tia X; và nhiệt độ đỉnh trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở vùng xung quanh trong khoảng từ 197 đến 199°C , và tốt hơn ở vùng xung quanh 198°C . Các phương thức khác nữa có thể bao gồm tinh thể, trong đó góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$) trong phổ nhiễu xạ bột tia X có ít nhất 2 hoặc nhiều hơn 2, tốt hơn ít nhất 3 hoặc nhiều hơn 3, tốt hơn nữa ít nhất 5 hoặc nhiều hơn 5, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất 8 hoặc nhiều hơn 8, và tốt hơn nữa tất cả các đỉnh được chọn từ $4,5^\circ$, $5,8^\circ$, $11,2^\circ$, $12,1^\circ$, $12,4^\circ$, $13,4^\circ$, $16,6^\circ$, $17,3^\circ$, $18,2^\circ$, $20,2^\circ$, $26,4^\circ$ và $27,1^\circ$; và đồng thời, nhiệt độ đỉnh trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở vùng xung quanh trong khoảng từ 197°C đến 199°C , và tốt hơn ở vùng xung quanh 198°C .

Cũng có thể thu được fumarat của hợp chất A theo sáng chế ở dạng vô định hình. Cụ thể, dạng vô định hình của fumarat của hợp chất A theo sáng chế có hình ảnh nhiễu xạ thể hiện mô hình halo rộng và không rõ ràng trong phổ nhiễu xạ bột tia X, và tốt hơn nữa có phổ nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 1.

Hợp chất A có thể được tổng hợp, ví dụ, theo các ví dụ tham chiếu 1 và 2 sẽ được mô tả sau. Phương pháp tổng hợp hợp chất A không chỉ giới hạn ở các ví dụ tham chiếu 1 và 2 sẽ được mô tả sau.

Cụ thể hơn, metansulfonyl clorua được cho phản ứng với (S)-N-Boc-3-piperidinol với sự có mặt của amin bậc ba như triethylamin, để thu được (S)-tert butyl 3-(metylsulfonyloxy)piperidin-1-carboxylat. Sau đó, hợp chất này được cho phản ứng với 3-iodo-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amin với sự có mặt của bazơ như kali cacbonat, để thu được (R)-tert-butyl 3-(4-amino-3-iodo-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat. Tiếp theo, hợp chất này được cho phản ứng với chất xúc tác paladi và bazơ với sự có mặt của benzo[d]oxazol-2-amin, trong môi trường cacbon monoxit, để thu được (R)-tert-butyl 3-(4-amino-3-((benzo[d]oxazol-2-yl)carbamoyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat. Sau đó, nhóm bảo vệ Boc được loại ra khỏi hợp chất này, sau đó được cho phản ứng với acryloyl clorua, để bằng cách đó thu được hợp chất A.

Monofumarat của hợp chất A theo sáng chế (vô định hình) có thể được tạo ra, ví dụ, theo phương pháp sau.

Bổ sung tetrahydrofuran (THF) vào hợp chất A với lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 300 lần, và tốt hơn 150 lần của nó, và nước với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1 lần, tốt hơn 0,1 lần của nó. Axit fumaric với lượng mol tương đương với hợp chất A được bổ sung vào hỗn hợp và được hòa tan.

Dung môi được chưng cất bằng cách chưng cất hỗn hợp theo kiểu đồng sôi với THF vài lần, tốt hơn 2 đến 5 lần. Do đó, có thể thu được dạng vô định hình của monofumarat của hợp chất A là bột màu trắng.

Monofumarat của hợp chất A (tinh thể) theo sáng chế có thể thu được là bột màu trắng, ví dụ, bằng cách tạo huyền phù monofumarat của hợp chất A (vô định hình) trong axetonitril với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 50 lần, tốt hơn 20 lần của nó, và tiến hành gia nhiệt huyền phù trong thời gian từ 12 đến 72 giờ, tốt hơn trong thời gian 24 giờ.

Hemifumarat của hợp chất A (tinh thể) theo sáng chế có thể thu được là bột màu trắng, ví dụ, bằng cách tạo huyền phù monofumarat của hợp chất A (vô định hình) trong metyl etyl keton với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 100 lần, tốt hơn 60 lần của nó, và tiến hành gia nhiệt huyền phù trong thời gian từ 12 đến 72 giờ, tốt hơn trong thời gian 24 giờ.

Theo fumarat của hợp chất A theo sáng chế, có thể tránh được đặc tính kênh hydrat của hợp chất A.

Nói chung, trong dược phẩm hoặc thành phần thuốc của dược phẩm mà được điều chế bằng hợp chất với đặc tính tránh được kênh hydrat, có thể thấy rằng, các vấn đề về bảo quản và kiểm soát chất lượng về độ ẩm trong điều kiện bảo quản của nó được giảm thiểu; và tương tự, khi chế phẩm rắn như viên nén hoặc viên nang được tạo ra, có thể giảm thiểu được các vấn đề trong điều chế do sự thay đổi về trọng lượng của thành phần hoạt tính.

Như vậy, có thể nói rằng, với fumarat của hợp chất A theo sáng chế, có thể kỳ vọng việc bảo quản ổn định và kiểm soát chất lượng dễ dàng, và tương tự, về phương diện điều chế, fumarat của hợp chất A theo sáng chế là hợp chất tuyệt vời khả năng xử lý dễ dàng.

Fumarat của hợp chất A theo sáng chế là tuyệt vời vì có khả năng thực thi và khả năng tái sinh, so với các muối khác của hợp chất A. Cụ thể, ví dụ, muối của hợp chất A với axit clohydric, axit sulfuric, axit succinic, axit malic, axit citric, hoặc axit acetic không được tạo ra bằng phương pháp nghiên cứu được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, khi tạo ra muối natri của hợp chất A, sự phân hủy diễn ra rõ rệt. Khi muối hemi magie của hợp chất A được tổng hợp, lượng các chất tương tự tăng lên và hơn nữa, thao tác thu muối phức tạp, và muối khó có thể được tái hòa tan, do độ hòa tan thấp của nó trong nước và trong dung môi hữu cơ.

Fumarat của hợp chất A theo sáng chế dễ dàng xử lý làm thành phần thuốc của dược phẩm, và góp phần trong sản xuất dược phẩm trên quy mô công nghiệp có chất lượng ổn định.

Fumarat của hợp chất A theo sáng chế tuyệt vời về tính ổn định ở trạng thái rắn. Điều quan trọng đối với một hợp chất dự định để được phát triển thành dược phẩm là có tính ổn định ở trạng thái rắn, trong thao tác trên quy mô công nghiệp và trong duy trì chất lượng. Do đó, fumarat của hợp chất A theo sáng chế có các đặc tính tuyệt vời cần thiết cho dược phẩm hoặc thành phần thuốc của dược phẩm.

Fumarat của hợp chất A theo sáng chế tuyệt vời về đặc tính hấp thu theo đường uống, và góp phần trong việc tạo ra dược phẩm tuyệt vời có chất lượng cao.

Trong số các muối của hợp chất A, fumarat của hợp chất A theo sáng chế là tuyệt vời vì có được khả năng thực thi, khả năng tái sinh, tính ổn định ở trạng thái rắn, và đặc tính hấp thu theo đường uống, trong khi tránh được đặc tính kênh hydrat mà hợp chất A sở hữu và duy trì được tính hòa tan đầy đủ làm thành phần thuốc của dược phẩm.

Fumarat của hợp chất A theo sáng chế có hoạt tính ức chế BTK mạnh, và hữu dụng làm chế phẩm phòng ngừa và/hoặc điều trị, ví dụ, các bệnh ung thư, khối

u, và các bệnh miễn dịch khác nhau (ví dụ, các bệnh dị ứng, các bệnh tự miễn dịch, và các bệnh viêm). Ngoài ra, fumarat có khả năng chọn lọc cao đối với BTK, và cũng có lợi thế là ít tác dụng phụ xuất phát từ sự ức chế các kinaza khác (ví dụ, EGFR).

Fumarat của hợp chất A theo sáng chế có hoạt tính ức chế BTK mạnh. "BTK" theo sáng chế bao gồm các BTK của người hoặc của động vật có vú không phải người, và BTK tốt hơn là BTK của người. Một cách ngẫu nhiên, thuật ngữ "BTK" bao gồm cả các dạng tương đồng (isoform) của nó.

Ngoài ra, nhờ bởi hoạt tính ức chế BTK mạnh của nó, fumarat của hợp chất A theo sáng chế hữu dụng làm thuốc để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh liên quan đến BTK. "Các bệnh kết hợp với BTK" bao gồm các bệnh mà trải qua sự suy giảm về tỷ lệ mắc và sự thuyên giảm, sự giảm nhẹ và/hoặc sự bình phục hoàn toàn các triệu chứng, là kết quả của sự phá hủy, kiểm chế và/hoặc ức chế các chức năng của BTK. Ví dụ về các bệnh này bao gồm các bệnh ung thư hoặc khối u, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn dịch, bệnh viêm, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ không có giới hạn, và tốt hơn là các bệnh ung thư, khối u, bệnh dị ứng và bệnh tự miễn dịch.

Không có giới hạn cụ thể nào về các bệnh ung thư và khối u đích và ví dụ về các bệnh này bao gồm các bệnh ung thư biểu mô (ví dụ, các bệnh ung thư thuộc hệ hô hấp, các bệnh ung thư thuộc hệ dạ dày - ruột, các bệnh ung thư thuộc hệ sinh sản và các bệnh ung thư thuộc hệ bài tiết), ung thư mô liên kết (sarcoma), các khối u hệ tạo huyết, các khối u hệ thần kinh trung ương và các khối u thần kinh ngoại biên. Các ví dụ ưu tiên là các khối u hệ tạo huyết (ví dụ, bệnh bạch cầu, bệnh đa u tủy, và u lympho ác tính). Ngoài ra, không có giới hạn cụ thể về loại cơ quan phát triển khối u và ví dụ về các cơ quan bao gồm ung thư biểu mô đầu và cổ, ung thư thực quản, ung thư dạ dày, ung thư đại tràng, ung thư trực tràng, ung thư gan, ung thư tử

mật/ống mật, ung thư đường mật, ung thư tụy, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư cổ tử cung, ung thư tử cung, ung thư thận, ung thư bàng quang, ung thư tiền liệt tuyến, khối u tinh hoàn, ung thư xương/mô mềm, u máu, bệnh đa u tủy, ung thư da, khối u não và ung thư u trung biểu mô. Ví dụ ưu tiên về các khối u hệ tạo huyết bao gồm bệnh bạch cầu cấp, bệnh bạch cầu cấp dòng tiền tủy bào, bệnh bạch cầu cấp dòng lympho, bệnh bạch cầu nguyên bào tủy mãn tính, u lympho bào lympho, các khối u tăng sinh tủy, bệnh bạch cầu lympho bào mãn tính, u lympho bào tế bào lympho loại nhỏ, hội chứng rối loạn sinh tủy, u lympho thể nang, u lympho MALT, u lympho vùng rìa, u lympho tương bào, macroglobulin huyết Waldenstroem, u lympho tế bào vỏ, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho Burkitt, u lympho tế bào NK/T ngoài hạch, u lympho Hodgkin, và bệnh đa u tủy. Các ví dụ ưu tiên đặc biệt bao gồm các u máu như bệnh bạch cầu/u lympho tế bào lympho B, u lympho thể nang, u lympho tế bào vỏ, u lympho vùng rìa nang hạch, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho Burkitt, bệnh bạch cầu lympho bào mãn tính, u lympho tế bào lympho loại nhỏ, macroglobulin huyết Waldenstroem, u lympho tế bào NK/T ngoài hạch, u lympho Hodgkin, hội chứng rối loạn sinh tủy, bệnh bạch cầu cấp thể tủy, và bệnh bạch cầu cấp thể lympho.

Không có giới hạn cụ thể về các bệnh dị ứng đích, và ví dụ về các bệnh này bao gồm, ví dụ, bệnh hen phế quản, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh dị ứng phấn hoa, bệnh viêm da cơ địa, dị ứng thức ăn, phản vệ, dị ứng thuốc, chứng phát ban, và bệnh viêm kết mạc. Ví dụ ưu tiên về các bệnh này bao gồm bệnh hen phế quản, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh dị ứng phấn hoa, và bệnh viêm da cơ địa; và ví dụ ưu tiên đặc biệt về các bệnh này bao gồm bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh dị ứng phấn hoa và bệnh viêm da cơ địa.

Không có giới hạn cụ thể về các bệnh tự miễn dịch đích, và ví dụ về các bệnh này bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh xơ

cứng bì, bệnh viêm đa cơ, hội chứng Sjögren, và bệnh Behcet. Ví dụ ưu tiên về các bệnh này bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp và bệnh lupus ban đỏ hệ thống, và ví dụ đặc biệt ưu tiên là bệnh viêm khớp dạng thấp.

Không có giới hạn cụ thể về các bệnh viêm dịch, và ví dụ về các bệnh này bao gồm bệnh viêm ruột thừa, bệnh viêm mi mắt, bệnh viêm tiểu phế quản, bệnh viêm phế quản, bệnh viêm túi thanh mạc, bệnh viêm cổ tử cung, bệnh viêm đường mật, bệnh viêm túi mật, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, hội chứng ruột kích thích, bệnh viêm bàng quang, bệnh viêm tuyến lệ, bệnh viêm da tiếp xúc, bệnh viêm da cơ, bệnh viêm não, bệnh viêm nội tâm mạc, bệnh viêm nội mạc tử cung, bệnh viêm mào tinh hoàn, bệnh viêm cân mạc, bệnh viêm mô xơ, bệnh viêm dạ dày ruột, bệnh viêm gan, bệnh áp xe tuyến mồ hôi, bệnh viêm thanh quản, bệnh viêm vú, bệnh viêm màng não, bệnh viêm tủy, bệnh viêm cơ tim, bệnh viêm thận, bệnh viêm buồng trứng, bệnh viêm tinh hoàn, bệnh viêm tụy, bệnh viêm tuyến mang tai, bệnh viêm ngoại tâm mạc, bệnh viêm phúc mạc, bệnh viêm hầu họng, bệnh viêm màng phổi, bệnh viêm tĩnh mạch, bệnh viêm phổi, bệnh viêm trực tràng, bệnh viêm tiền liệt tuyến, bệnh viêm thận - bể thận, bệnh viêm vòi trứng, bệnh viêm mũi - xoang, bệnh viêm miệng, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm màng hoạt dịch, bệnh viêm gân, bệnh viêm hạnh nhân, bệnh viêm màng mạch nhỏ, bệnh viêm âm đạo, bệnh viêm mạch, và bệnh viêm âm hộ. Ví dụ ưu tiên có thể bao gồm bệnh viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, hội chứng ruột kích thích, bệnh viêm da tiếp xúc, bệnh viêm bàng quang, và bệnh viêm xương khớp. Ví dụ ưu tiên đặc biệt có thể bao gồm bệnh viêm da tiếp xúc, bệnh viêm bàng quang, và bệnh viêm xương khớp.

Khi fumarat của hợp chất A theo sáng chế được sử dụng làm dược phẩm, các dạng bào chế khác nhau có thể được sử dụng theo mục đích phòng ngừa hoặc điều trị bằng cách kết hợp các chất mang dược dụng khi cần thiết. Ví dụ, dạng bào chế có thể là dạng bất kỳ trong số các dạng chế phẩm uống, chế phẩm tiêm, chế phẩm đặt, mỡ

bôi, và tấm dán. Dạng bất kỳ trong số các dạng bào chế này có thể được sản xuất bằng phương pháp phối chế là phương pháp đã biết và thường được sử dụng bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực. Cụ thể, viên nén để sử dụng theo đường uống, viên nén bọc, viên tròn, chế phẩm hạt, chế phẩm bột, và chế phẩm viên nang chứa tinh thể fumarat của hợp chất A làm thành phần thuốc trong sản xuất là thuận lợi ở dạng chế phẩm rắn ổn định.

Đối với các chất mang được dụng, các nguyên liệu chất mang hữu cơ hoặc vô cơ khác nhau mà thông thường được sử dụng làm các nguyên liệu phối chế được sử dụng, và các chất mang được dụng được kết hợp, ví dụ, làm tá được, chất kết dính, chất phân hủy, chất làm trơn, và chất bọc trong các chế phẩm rắn; và làm dung môi, chất hỗ trợ hòa tan, chất tạo huyền phù, chất tạo đẳng trương, chất điều chỉnh độ pH, chất đệm, và chất làm giảm đau trong các chế phẩm lỏng. Ngoài ra, nếu cần thiết, các chất phụ gia phối chế như chất sát trùng, chất chống oxy hóa, chất tạo màu, chất tạo mùi vị/hương vị, và chất ổn định cũng có thể được sử dụng.

Ví dụ về tá được bao gồm lactoza, sucroza, D-manitol, tinh bột, xenluloza tinh thể, và canxi silicat.

Ví dụ về chất kết dính bao gồm hydroxypropyl xenluloza, metyl xenluloza, polyvinylpyrrolidon, đường bột, và hypromeloza.

Ví dụ về chất phân hủy bao gồm natri tinh bột glycolat, carmeloza canxi, croscarmeloza natri, crospovidon, hydroxypropyl xenluloza được thể thấp, và tinh bột được gelatin hóa một phần.

Ví dụ về chất làm trơn bao gồm bột talc, magie stearat, các este của axit béo với sucroza, axit stearic, và natri stearyl fumarat.

Ví dụ về chất bọc bao gồm etyl xenluloza, copolyme aminoalkyl metacrylat RS, hypromeloza, và sucroza.

Ví dụ về dung môi bao gồm nước, propylen glycol, và nước muối sinh lý.

Ví dụ về chất hỗ trợ hòa tan bao gồm polyetylen glycol, etanol, α -cyclodextrin, Macrogol 400, và Polysorbate 80.

Ví dụ về chất tạo huyền phù bao gồm carageenan, xenluloza tinh thể, carmeloza natri, và dầu thầu dầu được hydro hóa bằng polyoxyetylen.

Ví dụ về chất tạo đẳng trương bao gồm natri clorua, glyxerin, và kali clorua.

Ví dụ về chất điều chỉnh độ pH và chất đệm bao gồm natri xitrat, axit clohydric, axit lactic, axit phosphoric, và natri dihydro phosphat.

Ví dụ về chất làm giảm đau bao gồm procaine hydroclorua và lidocaine.

Ví dụ về chất sát trùng bao gồm etyl para-oxybenzoat, cresol, và benzalkoni clorua.

Ví dụ về chất chống oxy hóa bao gồm natri sulfít, axit ascorbic, và vitamin E tự nhiên.

Ví dụ về chất tạo màu bao gồm titan oxít, sắt sesquioxít, chất màu Edible Blue No. 1, và đồng clorophyll.

Ví dụ về chất tạo mùi vị/hương vị bao gồm aspartam, sacarin, sucraloza, l-menthol, và hương vị bạc hà.

Ví dụ về chất ổn định bao gồm natri pyrosulfít, natri edetat, axit erythorbic, magie oxít, và dibutylhydroxytoluen.

Khi điều chế chế phẩm rắn uống, tá dược, chất kết dính, chất phân hủy, chất làm trơn, chất tạo màu, và chất tạo mùi vị/hương vị tùy ý được bổ sung vào fumarat của hợp chất A, và sau đó, ví dụ, viên nén, viên nén bọc, chế phẩm hạt, chế phẩm bột, hoặc chế phẩm viên nang có thể được sản xuất bằng phương pháp thông thường.

Khi điều chế chế phẩm tiêm, chất điều chỉnh độ pH, chất đệm, chất ổn định, chất tạo đẳng trương, và chất gây tê tại chỗ được bổ sung vào fumarat của hợp chất A, và các chế phẩm tiêm dưới da, trong cơ và tĩnh mạch có thể được sản xuất bằng các phương pháp thông thường.

Lượng của fumarat của hợp chất A để kết hợp vào trong các dạng bào chế đơn vị khác nhau có thể thay đổi tùy thuộc vào các triệu chứng của bệnh nhân mà fumarat này cần được áp dụng, hoặc tùy thuộc vào dạng phối chế; tuy nhiên, thông thường tốt hơn điều chỉnh lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1,000 mg trong chế phẩm uống, từ 0,01 đến 500 mg trong chế phẩm tiêm, và từ 1 đến 1,000 mg trong chế phẩm đặt, cho mỗi dạng bào chế đơn vị.

Ngoài ra, liều lượng hàng ngày của thuốc có dạng bào chế được mô tả ở trên có thể thay đổi, ví dụ, theo các triệu chứng, thể trọng, tuổi tác và giới tính của bệnh nhân, và không thể được xác định một cách bừa bãi. Tuy nhiên, liều lượng thông thường có thể được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5,000 mg, và tốt hơn từ 0,1 đến 1,000 mg, cho mỗi ngày đối với người trưởng thành (thể trọng: 50 kg), và tốt hơn là sử dụng lượng này mỗi ngày một lần, hoặc được phân ra thành các phần trong khoảng hai đến ba lần mỗi ngày.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn thông qua các ví dụ, nhưng sáng chế không chỉ dự định giới hạn ở các ví dụ này. Mặc dù sáng chế được mô tả đầy đủ thông qua phần ví dụ, nhưng nên hiểu rằng, những thay đổi hoặc biến đổi khác nhau có thể được thực hiện bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực. Do đó, những thay đổi hoặc biến đổi như vậy được bao gồm trong sáng chế, trừ khi những thay đổi hoặc biến đổi đó đi trệch ra khỏi phạm vi của sáng chế.

Đối với các chất phản ứng khác nhau được sử dụng trong các ví dụ, trừ khi

được thông báo cụ thể theo cách khác, các sản phẩm có sẵn trên thị trường được sử dụng. Đối với phương pháp sắc ký cột trên silicagel, SI PURIF-PACK (nhãn hiệu đăng ký) được sản xuất bởi Schott Moritex Corp., cột nạp sẵn silic oxit KP-Sil (nhãn hiệu đăng ký) được sản xuất bởi Biotage AB, hoặc cột nạp sẵn silic oxit HP-Sil (nhãn hiệu đăng ký) được sản xuất bởi Biotage AB được sử dụng. Đối với phương pháp sắc ký cột trên silicagel cơ bản, NH PURIF-PACK (nhãn hiệu đăng ký) được sản xuất bởi Moritex Corp., hoặc cột nạp sẵn KP-NH (nhãn hiệu đăng ký) được sản xuất bởi Biotage AB được sử dụng. Đối với phương pháp sắc ký lớp mỏng để cắt phân đoạn, KIESELGEL TM60F254, Art. 5744 được sản xuất bởi Merck KGaA, hoặc đĩa NH₂ silicagel 60F254 được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd. được sử dụng. Phổ NMR được đo bằng phổ kế kiểu AL400 (400 MHz; JEOL, Ltd.), MERCURY400 (400 MHz; Agilent Technologies, Inc.) hoặc INOVA400 (400 MHz; Agilent Technologies, Inc.) được trang bị phổ kế loại đầu dò 400MNMR (Protasis Corp.) và với tetrametylsilan làm tiêu chuẩn nội tham chiếu trong trường hợp dung môi đơteri hóa chứa tetrametylsilan, trong khi ở các trường hợp khác, với dung môi NMR làm tiêu chuẩn nội tham chiếu. Tất cả các giá trị δ được biểu diễn bằng phần triệu (ppm).

Phổ LCMS được đo bằng phổ kế ACQUITY SQD (kiểu tứ cực) được sản xuất bởi Waters Corp. trong các điều kiện mô tả dưới đây.

Cột: YMC-TRIART C18 được sản xuất bởi YMC Co., Ltd., $2,0 \times 50$ mm, 1,9 μ m

Phát hiện MS: ESI dương tính

Phát hiện UV: 254 nm và 210 nm

Tốc độ dòng của cột: 0,5 mL/phút

Pha động: nước/axetonitril (axit formic 0,1%)

Lượng bơm: 1 μ L

Gradient (Bảng 1)

Bảng 1

Thời gian (phút)	Nước	Axetonitril
0-0,1	95%	5%
0,1-2,1	95% đến 5%	5% đến 95%
2,1-3,1	5%	95%

Ngoài ra, phương pháp tinh chế bằng HPLC điều chế pha đảo được thực hiện bằng hệ thống điều chế được sản xuất bởi Waters Corp. trong các điều kiện mô tả dưới đây.

Cột: YMC-ACTUS TRIART C18 được sản xuất bởi YMC Co., Ltd., 20 $\times$ 50 mm, 5 μ m, được kết nối với YMC-ACTUS TRIART C18 được sản xuất bởi YMC Co., Ltd. 20 $\times$ 10 mm, 5 μ m, được sử dụng.

Phát hiện UV: 254 nm

Phát hiện MS: ESI dương tính

Tốc độ dòng của cột: 25 mL/phút

Pha động: nước/axetonitril (axit formic 0,1%)

Lượng bơm: 0,1 đến 0,5 mL

Ý nghĩa của các chữ viết tắt được đưa ra dưới đây.

s:	Vạch đơn
d:	Vạch đôi
t:	Vạch ba
q:	Vạch bốn
dd:	Vạch đôi kép

dt:	Vách ba kép
td:	Ba vách đôi
tt:	Ba vách ba
ddd:	Vách đôi kép hai lần
ddt:	Vách ba kép hai lần
dtd:	Vách đôi ba lần kép
tdd:	Vách đôi kép của vách ba
m:	Đa vách
br:	Rộng
brs:	Vách đơn rộng
CDI:	Cacbonyldiimidazol
DMSO-d ₆ :	Dimetyl sulfoxit đoteri hóa
CDCl ₃ :	Cloroform đoteri hóa
CD ₃ OD:	Metanol đoteri hóa
THF:	Tetrahydrofuran
DMF:	N,N-dimetylformamit
DMA:	N,N-dimetylxetamit
NMP:	1-metyl-2-pyrolidinon
DMSO:	Dimetyl sulfoxit
TFA:	Axit trifloaxetic
WSC:	1-(3-Dimetylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimit hydroclorua
HOBt:	1-Hydroxybenzotriazol monohydrat
HATU:	(Dimetylamino)-N,N-dimetyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)metanimin hexaflophosphat
DIAD:	Diisopropyl azodicarboxylat
TBAF:	Tetrabutylamoni florua

DIPEA:	Diisopropyletylamin
Boc:	Tert-butoxycacbonyl
Boc ₂ O:	Di-tert-butyl dicacbonat
DMAP:	Dimetylaminopyridin

Đo nhiễu xạ bột tia X

Nhiễu xạ bột tia X được đo tuân theo các điều kiện thử nghiệm sau, sau khi chất thử nghiệm được nghiền nhẹ nhàng thành bột khi cần thiết trong một cối mã não.

Thiết bị: Rigaku MiniFlexII

Đích Cu

Thiết đặt thông số đầu ra tia X: 15 mA, 30 kV

Vùng quét: từ 2,0 đến 40,0°

Kích thước bước: 0,010°

Tốc độ quét: 5,00°/phút.

Khe phân kỳ: 1,25°

Khe tán xạ: Mở

Khe tiếp nhận ánh sáng: Mở

Việc xử lý các thiết bị bao gồm cả việc xử lý dữ liệu được dựa trên phương pháp và quy trình được chỉ rõ trong mỗi một thiết bị.

Các giá trị số thu được từ các phổ khác nhau có thể dao động chút ít theo chiều của sự phát triển tinh thể, kích thước hạt, hoặc điều kiện đo của nó. Do đó, các giá trị số này không thể được diễn giải một cách hoàn toàn.

Phương pháp đo phân tích nhiệt (phương pháp đo nhiệt quét vi sai (phương pháp đo DSC))

Phương pháp đo DSC được đo tuân theo các điều kiện thử nghiệm sau.

Thiết bị: TA Instrument Q1000

Mẫu: Khoảng 1 mg

Đồ chứa mẫu: Làm từ nhôm

Tốc độ gia tăng nhiệt độ: Gia tăng 5°C/phút, lên tới 250°C

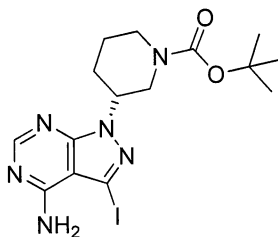
Khí khí quyển: Nito

Tốc độ dòng của khí nitơ: 50 mL/phút.

Việc xử lý các thiết bị bao gồm cả việc xử lý dữ liệu được dựa trên phương pháp và quy trình được chỉ rõ trong mỗi một thiết bị.

Ví dụ tham chiếu 1

Tổng hợp (R)-tert-butyl 3-(4-amino-3-iodo-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat



(Bước 1) Tổng hợp (S)-tert-butyl 3-(metylsulfonyloxy)piperidin-1-carboxylat

20g (S)-N-Boc-3-piperidinol được hòa tan trong 100mL toluen, và 21mL triethylamin và 9,2mL metansulfonyl clorua được bổ sung vào đó ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 1 giờ trong điều kiện làm lạnh bằng nước đá, sau đó ethyl axetat và nước được bổ sung vào đó, và lớp hữu cơ được tách riêng. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước bão hòa chứa natri hydro cacbonat, dung dịch nước bão hòa chứa amoni clorua và nước, và sau đó, được làm khô trên natri sulfat khan. Dung môi được chưng cất trong điều kiện áp suất giảm, và do đó, thu được 26,8g

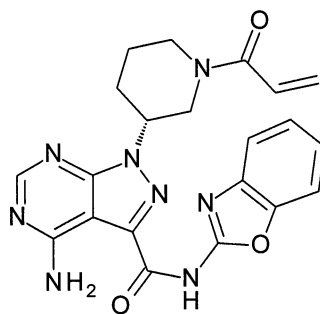
hợp chất nêu ở tiêu đề là chất rắn không màu.

(Bước 2) Tổng hợp (R)-tert-butyl 3-(4-amino-3-iodo-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat

Dung dịch huyền phù chứa 14,6g 3-iodo-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amin tổng hợp theo phương pháp được mô tả trong tài liệu WO 2007/126841, 25g (S)-tert-butyl 3-(metylsulfonyloxy)piperidin-1-carboxylat thu được trong bước 1, và 69g kali cacbonat trong 150mL DMA được gia nhiệt đến nhiệt độ 100°C, và được khuấy trong thời gian 10 giờ. Dung dịch huyền phù được làm mát xuống nhiệt độ trong phòng, và sau đó, 300mL nước được bổ sung vào đó. Chất rắn thu được theo cách như vậy được tập hợp bằng cách lọc và được rửa bằng nước, và chất rắn được làm khô. Do đó, thu được 26,9g hợp chất nêu ở tiêu đề là chất rắn màu vàng.

Ví dụ tham chiếu 2

Tổng hợp (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit (Hợp chất A)



(Bước 1) Tổng hợp (R)-tert-butyl 3-(4-amino-3-((benzo[d]oxazol-2-yl)carbamoyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat

300mg (R)-tert-butyl 3-(4-amino-3-iodo-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat thu được trong ví dụ tham chiếu 1 được hòa tan trong 3mL

NMP. 118mg benzo[d]oxazol-2-amin, 20mg xantphos, và 0,15mL N-metylmorpholin được bổ sung vào đó, và thao tác khử khí được thực hiện. Sau đó, 7,6mg paladi axetat được bổ sung vào đó, và trong môi trường cacbon monoxit, hỗn hợp được gia nhiệt đến nhiệt độ 110°C và được khuấy trong thời gian 2 giờ. Sau khi hỗn hợp được làm lạnh, 4,5mL metanol và 0,45mL dung dịch nước 5N chứa natri hydroxit được bổ sung vào đó, và hỗn hợp được khuấy trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, độ pH được hiệu chỉnh tới 5,3 bằng HCl 2N, và chất rắn thu được theo cách như vậy được tập hợp bằng cách lọc. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cột silicagel (cloroform-metanol), và do đó, thu được 257mg hợp chất nêu ở tiêu đề là chất rắn màu trắng.

(Bước 2) Tổng hợp hợp chất A

5,0g (R)-tert-butyl 3-(4-amino-3-((benzo[d]oxazol-2-yl)carbamoyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat thu được trong bước 1 được tạo huyền phù trong 50mL axetonitril, và bổ sung 7,85g natri iodua vào hỗn hợp. 6,65mL trimetylsilyl clorua được bổ sung từng giọt vào đó cùng với khuấy ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được khuấy trong thời gian 1 giờ. 87,5mL nước và 12,5mL dung dịch nước 5N của natri hydroxit được bổ sung vào đó, và sau đó, hệ được làm lạnh bằng nước đá. Dung dịch được điều chế bằng cách hòa tan 0,895mL acryloyl clorua vào 4,1mL axetonitril được bổ sung từng giọt vào đó, và hỗn hợp được khuấy trong thời gian 1 giờ trong điều kiện làm lạnh bằng nước đá. 50mL nước được bổ sung vào đó, và chất rắn tạo ra theo cách như vậy được tập hợp bằng cách lọc, được rửa bằng nước, và làm khô trong điều kiện áp suất giảm. Do đó, thu được 4,13g hợp chất nêu ở tiêu đề là chất rắn màu trắng (Hợp chất A).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δppm 1,53-1,68 (m, 1H), 1,86-1,98 (m, 1H), 2,08-2,21 (m, 1H), 2,25-2,39 (m, 1H), 2,82-2,95 (m, 0,5H), 3,10-3,22 (m, 0,5H), 3,23-

3,37 (m, 0,5H), 3,68-3,78 (m, 0,5H), 4,04-4,14 (m, 0,5H), 4,22-4,38 (m, 1H), 4,52-4,65 (m, 0,5H), 4,67-4,81 (m, 1H), 5,58-5,74 (m, 1H), 6,03-6,19 (m, 1H), 6,68-6,92 (m, 1H), 7,28-7,40 (m, 2H), 7,59-7,71 (m, 2H), 8,22 (brs, 2H), 8,28 (s, 1H), 12,15 (brs, 1H)

Ví dụ tham chiếu 3

Nghiên cứu về (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit (Hợp chất A) và các muối cộng axit hoặc bazo

(1) Nghiên cứu về các muối cộng axit của hợp chất A

Nghiên cứu được thực hiện về sự hình thành muối với axit clohydric, axit sulfuric và axit phosphoric trong số các axit vô cơ. Cụ thể, hợp chất A được hòa tan trong dung môi thích hợp, và mỗi một loại axit với lượng thích hợp (từ 0,5 đến 1,5 đương lượng) được bổ sung vào đó, và việc khuấy được thực hiện trong thời gian qua đêm, để bằng cách đó xác định xem sự hình thành muối có xuất hiện hay không. Về kết quả, khi bổ sung axit clohydric hoặc axit sulfuric vào hợp chất A, sự phân hủy bắt đầu một cách rõ rệt, và do đó, nghiên cứu được ngưng lại. Khi bổ sung axit phosphoric vào hợp chất A, monophosphat của hợp chất A thu được (Ví dụ tham chiếu 4).

Ngoài ra, nghiên cứu được thực hiện về sự hình thành muối với axit fumaric, axit succinic, axit tartaric, axit malic, axit citric và axit axetic. Cụ thể, hợp chất A được hòa tan trong dung môi thích hợp, và mỗi một loại axit với lượng mol tương đương với hợp chất A được bổ sung vào đó, và sau đó, dung môi được chưng cất để bằng cách đó điều chế dạng vô định hình của mỗi một loại axit hữu cơ. Sau đó, dạng vô định hình này được tạo huyền phù cùng với gia nhiệt trong dung môi hữu cơ (ví dụ, metyletylketon, etanol, etyl axetat và butyl axetat), bằng cách đó khẳng định sự

hình thành muối có xuất hiện hay không. Do đó, không có muối nào được tạo ra với axit malic, axit xitric hoặc axit axetic. Từ dạng vô định hình của axit suxinic, mặc dù chất kết tinh thu được, nhưng không thể thu được suxinat với lượng tương đương với lượng theo lý thuyết. Từ axit fumaric, monofumarat của hợp chất A (vô định hình) thu được, và từ axit tartaric, hemitartrat của hợp chất A thu được (Ví dụ 1 và Ví dụ tham chiếu 5).

(2) Nghiên cứu về các muối cộng bazơ của hợp chất A

Nghiên cứu được thực hiện về sự hình thành muối với natri và magie, trong số các bazơ vô cơ. Cụ thể, hợp chất A được hòa tan trong dung môi thích hợp, và mỗi một loại bazơ được bổ sung vào đó (từ 0,5 đến 1,5 đương lượng), và thao tác khuấy được thực hiện trong thời gian qua đêm, bằng cách đó khẳng định sự hình thành muối có xuất hiện hay không. Do đó, khi hình thành muối với natri, sự phân hủy bắt đầu một cách rõ rệt, và do đó, nghiên cứu được ngưng lại. Từ trường hợp của magie, thu được muối hemi magie của hợp chất A (Ví dụ tham chiếu 6). Tuy nhiên, trong muối hemi magie của hợp chất A, lượng các chất tương tự gia tăng và hơn nữa, thao tác để thu được muối phức tạp và khó hòa tan lại vào dung môi hữu cơ khó khăn, do độ hòa tan thấp của nó, và do đó, có thể thấy rằng, muối không thích hợp trong sản xuất thực tiễn.

Ví dụ tham chiếu 4

Tổng hợp (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit · monophosphat (monophosphat của hợp chất A)

Bổ sung THF (18 mL) vào hợp chất A thu được ở trên (150 mg) và sau khi hỗn hợp được gia nhiệt đến nhiệt độ 70°C, axit phosphoric (27,3 µL) được bổ sung vào đó. Sau đó, hỗn hợp được khuấy ở cùng nhiệt độ trong thời gian 72 giờ, và chất

rắn kết tủa được tập hợp bằng cách lọc, sau đó làm khô trong điều kiện áp suất giảm, và thu được hợp chất nêu ở tiêu đề là chất rắn màu trắng. Lượng thu được: 158 mg, Tỷ lệ hiệu suất: 85,9%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ ppm 1,51-1,69 (m, 1H), 1,87-1,97 (m, 1H), 2,09-2,21 (m, 1H), 2,25-2,41 (m, 1H), 2,84-2,95 (m, 0,5H), 3,09-3,22 (m, 0,5H), 3,22-3,38 (m, 0,5H), 3,67-3,83 (m, 0,5H), 4,04-4,17 (m, 0,5H), 4,23-4,40 (m, 1H), 4,54-4,65 (m, 0,5H), 4,66-4,83 (m, 1H), 5,58-5,76 (m, 1H), 6,05-6,22 (m, 1H), 6,70-6,96 (m, 1H), 7,32-7,48 (m, 2H), 7,61-7,75 (m, 2H), 8,15-8,26 (brs, 2H), 8.30 (s, 1H)

Ví dụ tham chiếu 5

Tổng hợp (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit-hemi-L-(+)-tartrat (hemitartrat của hợp chất A)

Hợp chất A thu được ở trên (600 mg) được hòa tan trong hỗn hợp của THF (90 mL) và nước (60 μ L), và trong dung dịch tạo ra, L-(+)-tartrat (209 mg) được rót vào đó và được hòa tan hoàn toàn. Dung môi được chưng cất bằng cách chưng cất theo kiểu đồng sôi hỗn hợp với THF hai lần, bằng cách đó thu được chất rắn màu trắng. Metyletylketon (1,5 mL) được bổ sung vào chất rắn màu trắng này (130 mg) và việc gia nhiệt huyền phù được thực hiện ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 21 giờ. Chất rắn được tập hợp bằng cách lọc, sau đó làm khô trong điều kiện áp suất giảm, và thu được ở dạng chất rắn màu trắng. Lượng thu được: 96 mg, tỷ lệ hiệu suất: 85,9%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ ppm 1,55-1,68 (m, 1H), 1,89-1,97 (m, 1H), 2,10-2,21 (m, 1H), 2,25-2,40 (m, 1H), 2,85-2,95 (m, 0,5H), 3,15-3,65 (m, 1H), 3,68-3,80 (m, 0,5H), 4,05-4,15 (m, 0,5H), 4,24-4,36 (m, 1H), 4,30 (s, 2H), 4,53-4,62 (m, 0,5H), 4,67-4,79 (brs, 1H), 5,67 (dd, $J = 9,99$ Hz, 1H), 6,08-6,18 (m, 1H), 6,71-6,92

(m, 1H), 7,30-7,41 (m, 2H), 7,61-7,73 (m, 2H), 8,22 (brs, 2H), 8,29 (s., 1H)

Ví dụ tham chiếu 6

Tổng hợp (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit·muối hemi magie (muối hemi magie của hợp chất A)

Bổ sung THF (3 mL) và metanol (1 mL) vào hợp chất A thu được ở trên (159,8 mg) để tạo huyền phù. Sau đó, dung dịch nước 2M chứa natri hydroxit (185 μ L) được bổ sung vào đó và hợp chất A được hòa tan hoàn toàn trong đó. Sau đó, magie clorua (17,6 mg) được rót vào trong đó và hỗn hợp được khuấy, bằng cách đó thu được chất rắn màu trắng. Sau khi nước (2 mL) được bổ sung vào đó, chất rắn được tập hợp bằng cách lọc. Chất rắn được rửa bằng nước (1 mL) hai lần, và làm khô trong điều kiện áp suất giảm bằng cách đó thu được chất rắn màu trắng. Metyletylketon (1 mL) được bổ sung vào chất rắn màu trắng này (50 mg) và việc gia nhiệt huyền phù được thực hiện ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 24 giờ. Chất rắn được tập hợp bằng cách lọc, sau đó làm khô trong điều kiện áp suất giảm, và thu được ở dạng chất rắn màu trắng. Lượng thu được: 44,7 mg, Tỷ lệ hiệu suất: 57,3%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ ppm 1,52-1,67 (m, 1H), 1,88-2,01 (m, 1H), 2,19-2,41 (m, 2H), 2,75-2,89 (m, 0,5H), 3,07-3,21 (m, 1H), 3,57-3,71 (m, 0,5H), 4,15-4,23 (m, 0,5H), 4,36-4,55 (m, 1H), 4,69-4,88 (m, 2H), 5,60-5,80 (m, 1H), 6,08-6,22 (m, 1H), 6,79-6,96 (m, 1H), 7,08-7,23 (m, 2H), 7,47-7,56 (m, 2H), 8,13-8,22 (brs, 2H), 8,49 (s, 1H), 10,42-10,50 (brs, 1H)

Ví dụ 1

Tổng hợp (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit·monofumarat (monofumarat của hợp chất A (vô định hình))

Hợp chất A thu được trong ví dụ tham chiếu 2 (1,4 g) được hòa tan trong THF (210 mL) và nước (140 μ L) ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó, axit fumaric (376 mg) được rót và được hòa tan hoàn toàn trong đó. Dung môi được chưng cất bằng cách chưng cất theo kiểu đồng sôi hỗn hợp với THF hai lần, bằng cách đó thu được monofumarat của hợp chất A (dạng vô định hình) là bột màu trắng. Lượng thu được: 1,57 g, Tỷ lệ hiệu suất: 90,1%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ ppm 1,53-1,68 (m, 1H), 1,86-1,98 (m, 1H), 2,08-2,21 (m, 1H), 2,25-2,39 (m, 1H), 2,82-2,95 (m, 0,5H), 3,10-3,22 (m, 0,5H), 3,23-3,37 (m, 0,5H), 3,68-3,78 (m, 0,5H), 4,04-4,14 (m, 0,5H), 4,22-4,38 (m, 1H), 4,52-4,65 (m, 0,5H), 4,67-4,81 (m, 1H), 5,58-5,74 (m, 1H), 6,03-6,19 (m, 1H), 6,62 (s, 2H), 6,68-6,92 (m, 1H), 7,28-7,40 (m, 2H), 7,59-7,71 (m, 2H), 8,22 (brs, 2H), 8,28 (s, 1H), 12,15 (brs, 1H)

Phổ nhiễu xạ bột tia X: Được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 1.

Ví dụ 2

Tổng hợp (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit-hemifumarat (hemifumarat của hợp chất A (tinh thể))

Monofumarat của hợp chất A thu được trong ví dụ 1 (vô định hình) (450 mg) được tạo huyền phù trong metyletylketon (27 mL), và việc gia nhiệt huyền phù được thực hiện ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 24 giờ. Thông qua việc tập hợp bằng cách lọc, và sau đó làm khô trong điều kiện áp suất giảm, hemifumarat của hợp chất A (tinh thể) thu được là bột màu trắng. Lượng thu được: 279 mg, Tỷ lệ hiệu suất: 62,0%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ ppm 1,53-1,68 (m, 1H), 1,86-1,98 (m, 1H), 2,08-2,21 (m, 1H), 2,25-2,39 (m, 1H), 2,82-2,95 (m, 0,5H), 3,10-3,22 (m, 0,5H), 3,23-

3,37 (m, 0,5H), 3,68-3,78 (m, 0,5H), 4,04-4,14 (m, 0,5H), 4,22-4,38 (m, 1H), 4,52-4,65 (m, 0,5H), 4,67-4,81 (m, 1H), 5,58-5,74 (m, 1H), 6,03-6,19 (m, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,68-6,92 (m, 1H), 7,28-7,40 (m, 2H), 7,59-7,71 (m, 2H), 8,22 (brs, 2H), 8,28 (s, 1H), 12,15 (brs, 1H)

Phổ nhiễu xạ bột tia X: Được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 2.

Góc nhiễu xạ đặc trưng ($2\theta \pm 0,1^\circ$): $4,5^\circ$, $5,8^\circ$, $11,2^\circ$, $12,1^\circ$, $12,4^\circ$, $13,4^\circ$, $16,6^\circ$, $17,3^\circ$, $18,2^\circ$, $20,2^\circ$, $26,4^\circ$, $27,1^\circ$

Đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC): Được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 3.

Đỉnh thu nhiệt trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC): ở vùng xung quanh trong khoảng từ 197°C đến 199°C

Ví dụ 3

Tổng hợp (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit-monofumarat (monofumarat của hợp chất A (tinh thể))

Monofumarat của hợp chất A thu được trong ví dụ 1 (vô định hình) (500 mg) được tạo huyền phù trong axetonitril (10 mL), và việc gia nhiệt huyền phù được thực hiện ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 24 giờ. Thông qua việc tập hợp bằng cách lọc, và sau đó, làm khô trong điều kiện áp suất giảm, monofumarat của hợp chất A (tinh thể) thu được là bột màu trắng. Lượng thu được: 448 mg, tỷ lệ hiệu suất: 89,6%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δppm 1,53-1,68 (m, 1H), 1,86-1,98 (m, 1H), 2,08-2,21 (m, 1H), 2,25-2,39 (m, 1H), 2,82-2,95 (m, 0,5H), 3,10-3,22 (m, 0,5H), 3,23-3,37 (m, 0,5H), 3,68-3,78 (m, 0,5H), 4,04-4,14 (m, 0,5H), 4,22-4,38 (m, 1H), 4,52-4,65 (m, 0,5H), 4,67-4,81 (m, 1H), 5,58-5,74 (m, 1H), 6,03-6,19 (m, 1H), 6,62 (s,

2H), 6,68-6,92 (m, 1H), 7,28-7,40 (m, 2H), 7,59-7,71 (m, 2H), 8,22 (brs, 2H), 8,28 (s, 1H), 12,15 (brs, 1H)

Phổ nhiễu xạ bột tia X: Được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 4.

Góc nhiễu xạ đặc trưng ($2\theta \pm 0,1^\circ$): $7,2^\circ$, $12,4^\circ$, $14,4^\circ$, $15,0^\circ$, $15,6^\circ$, $19,0^\circ$, $22,3^\circ$, $22,6^\circ$, $23,4^\circ$, $25,5^\circ$, $25,9^\circ$ và $27,6^\circ$

Đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC): Được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 5.

Đỉnh thu nhiệt trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC): ở vùng xung quanh trong khoảng từ 219°C đến 224°C

Ví dụ so sánh 1

Tổng hợp (R)-1-(3-(4-amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (Hợp chất so sánh 1)

Việc tổng hợp được thực hiện tuân theo phương pháp được mô tả trong tài liệu WO 2008/121742 để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề là chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δppm 1,21-1,28 (m, 1H), 1,42-1,71 (m, 1H), 1,91 (brs, 1H), 2,04-2,36 (m, 2H), 2,91-3,10 (m, 1H), 3,13-3,27 (m, 1H), 3,59-3,76 (m, 1H), 4,04-4,26 (m, 2H), 4,47-4,80 (m, 2H), 5,51-5,78 (m, 1H), 5,96-6,21 (m, 1H), 6,64-6,95 (m, 1H), 7,14 (dd, $J = 11,46, 8,54\text{ Hz}$, 6H), 7,40-7,47 (m, 2H), 7,63-7,70 (m, 2H), 8,26 (s, 1H)

Các tác dụng của fumarat của hợp chất A theo sáng chế được khẳng định bằng các ví dụ thử nghiệm sau. Trong phần này, đối với hợp chất A và muối của hợp chất này trong các ví dụ thử nghiệm, các tinh thể của chúng được sử dụng, trừ khi được mô tả theo cách khác.

Ví dụ thử nghiệm 1

Thử nghiệm về sự hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm

Thử nghiệm về sự hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm được thực hiện đối với hợp chất A, monofumarat của hợp chất A, hemifumarat của hợp chất A, hemitartrat của hợp chất A và monophosphat của hợp chất A, để nghiên cứu sự có mặt hoặc không có đặc tính kênh hydrat.

Trong thử nghiệm về sự hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm, các phép đo được thực hiện theo các điều kiện sau.

Mâm giữ bằng thạch anh chuyên dụng được nạp bằng từ 5 đến 10 mg mẫu và trọng lượng của mẫu tại mỗi một độ ẩm được đo và được ghi theo cách liên tục trong các điều kiện sau. Việc xử lý các thiết bị bao gồm cả việc xử lý dữ liệu được dựa trên phương pháp và quy trình được chỉ rõ trong mỗi một thiết bị.

Thiết bị: VTI SA+ (sản xuất bởi TA Instruments Inc.)

Nhiệt độ làm khô: 60°C

Tốc độ gia tăng nhiệt độ: 1°C/phút.

Cân bằng khi làm khô: Khẳng định rằng, không xuất hiện sự giảm 0,01% trọng lượng trong 5 phút, nằm trong khoảng không vượt quá 300 phút.

Nhiệt độ đo: 25°C

Cân bằng khi làm ẩm: Khẳng định rằng, không xuất hiện sự gia tăng 0,01% trọng lượng trong 5 phút, nằm trong khoảng không vượt quá 120 phút.

Chương trình độ ẩm tương đối: Gia tăng theo mức 5% RH từ 5% RH đến 95% RH, và giảm theo mức 5% RH từ 95% RH xuống 5% RH.

Các đồ thị thu được bởi các thử nghiệm này được thể hiện trong các hình vẽ từ Fig. 6 đến Fig. 10. Những thay đổi về trọng lượng nằm trong phạm vi điều kiện đo

được thể hiện trong các bảng từ Bảng 2-1 đến Bảng 2-5.

Bảng 2-1

Kết quả của thử nghiệm về sự hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm của hợp chất A

	Tỷ lệ thay đổi trọng lượng (%)	
Độ ẩm tương đối (%)	Sự hấp thụ	Sự giải hấp thụ
5	0,42	0,67
20	3,08	3,20
40	3,60	3,65
60	3,88	3,88
80	4,09	4,11
95	4,39	4,39

Bảng 2-2

Kết quả của thử nghiệm về sự hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm của monofumarat của hợp chất A

	Tỷ lệ thay đổi trọng lượng (%)	
Độ ẩm tương đối (%)	Sự hấp thụ	Sự giải hấp thụ
5	0,01	0,05
20	0,14	0,17
40	0,30	0,33
60	0,37	0,41
80	0,45	0,49
95	0,60	0,60

Bảng 2-3

Kết quả của thử nghiệm về sự hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm của hemifumarat của hợp chất A

	Tỷ lệ thay đổi trọng lượng (%)	
Độ ẩm tương đối (%)	Sự hấp thụ	Sự giải hấp thụ
5	0,00	0,04
20	0,07	0,11
40	0,16	0,23
60	0,28	0,40
80	0,42	0,54
95	0,81	0,81

Bảng 2-4

Kết quả của thử nghiệm về sự hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm của hemitartrat của hợp chất A

	Tỷ lệ thay đổi trọng lượng (%)	
Độ ẩm tương đối (%)	Sự hấp thụ	Sự giải hấp thụ
5	0,01	-0,28
20	1,25	1,17
40	1,56	1,32
60	1,67	1,45
80	1,64	1,72
95	3,31	3,31

Bảng 2-5

Kết quả của thử nghiệm về sự hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm của monophosphat của hợp chất A

Độ ẩm tương đối (%)	Tỷ lệ thay đổi trọng lượng (%)	
	Sự hấp thụ	Sự giải hấp thụ
5	0,01	5,76
20	0,19	8,06
40	0,36	9,29
60	0,61	10,38
80	1,29	12,12
95	17,90	17,90

Như được thể hiện trong các bảng từ Bảng 2-1 đến Bảng 2-5, khi hợp chất A được làm ẩm tại độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 5 đến 95% mà khoảng này nằm trong khoảng điều kiện đo, sự thay đổi về trọng lượng của nó tối đa khoảng 4,4%. Cũng khẳng định rằng, khi độ ẩm được hạ thấp từ độ ẩm tương đối 95%, hợp chất A hầu như trở lại tình trạng ban đầu. Tức là, khẳng định rằng, hợp chất A có đặc tính kênh hydrat mà nó hấp thụ/giải hấp thụ hơi ẩm tùy thuộc vào độ ẩm.

Tương tự, hemitartrat của hợp chất A thể hiện sự thay đổi về trọng lượng tối đa khoảng 3,3%, khi được làm ẩm tại độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 5 đến 95%. Cũng khẳng định rằng, khi độ ẩm được hạ thấp từ độ ẩm tương đối 95%, hợp chất A hầu như trở lại tình trạng ban đầu. Tức là, khẳng định rằng, hemitartrat của hợp chất A cũng có đặc tính kênh hydrat mà nó hấp thụ/giải hấp thụ hơi ẩm tùy thuộc vào độ ẩm.

Cũng khẳng định rằng, trong monophosphat của hợp chất A, dạng tinh thể sau khi thử nghiệm về sự hấp thụ/giải hấp thụ độ ẩm đã không duy trì được dạng tinh thể ban đầu.

Ngược lại, trong cả monofumarat của hợp chất A và hemifumarat của hợp chất A theo sáng chế, sự thay đổi về khối lượng được duy trì khoảng dưới 1% gia tăng về độ ẩm tương đối 95%, và khẳng định rằng, hợp chất A hầu như trở lại trạng thái ban đầu, khi độ ẩm được làm giảm. Như vậy, khẳng định rằng, fumarat của hợp chất A theo sáng chế có khả năng tránh được đặc tính kênh hydrat, và có các đặc tính tuyệt vời làm được phẩm hoặc thành phần thuốc của dược phẩm.

Ví dụ thử nghiệm 2

Thử nghiệm về tính ổn định ở trạng thái rắn (thử nghiệm nhanh)

Tính ổn định ở trạng thái rắn được đo trong các điều kiện sau, đối với monofumarat của hợp chất A, hemifumarat của hợp chất A, hemitartrat của hợp chất A và monophosphat của hợp chất A mà chúng thu được trong các ví dụ và ví dụ tham chiếu, khi chúng được bảo quản trong thời gian 2 tuần hoặc 4 tuần trong điều kiện nhiệt độ 40°C/độ ẩm tương đối 75% (điều kiện gắn kín và điều kiện mở).

Điều kiện bảo quản: nhiệt độ 40°C /độ ẩm tương đối 75% (Gắn kín và để mở) (Để mở để cập đến điều kiện trong đó, đồ chứa thủy tinh có nắp đậy được bỏ ra và được đậy bằng giấy KimWipe).

Các thời điểm đo: 2 tuần và 4 tuần

Lượng bảo quản: Khoảng 30 mg

Đồ chứa bảo quản: Đồ chứa thủy tinh màu nâu

Phương pháp điều chế dung dịch mẫu: Mẫu được hòa tan trong axetonitril 50% sao cho nồng độ của mẫu là 0,4 mg/mL.

Khối lượng của chất tương tự trong dung dịch mẫu được đo bằng phân tích HPLC. Việc xử lý các thiết bị bao gồm cả việc xử lý dữ liệu được dựa trên phương pháp và quy trình được chỉ rõ trong mỗi một thiết bị. (Thiết bị: Shimadzu Corporation SIL-HTc/LC-20AB)

Cột: InertSustain C18, $4,6 \times 150$ mm, 3 μ m, được sản xuất bởi GL Sciences Inc.

Phát hiện MS: ESI dương tính

phát hiện UV: 220 nm

Nhiệt độ cột: 40°C

Tốc độ dòng của cột: 1,0 mL/phút

Pha động: A; 10 mmol/L dung dịch đệm phosphat (pH 6,0): dung dịch hỗn hợp axetonitril (tỷ lệ 17:3), B; axetonitril

Lượng bơm: 5 μ L

Gradient: Bảng 3

Bảng 3

Thời gian (phút)	A	B
0-18	100% đến 90%	0% đến 10%
18-30	90% đến 55%	10% đến 45%
30-35	55% đến 45%	45% đến 55%
35-45	45%	55%
45-55	100%	0%

Bảng 4 thể hiện các kết quả đánh giá về khối lượng đo được của chất tương tự. Trong bảng, A, B và C để chỉ các tỷ lệ % của tổng khối lượng của chất tương tự.

lần lượt dưới 0,1%, 0,1% hoặc cao hơn và dưới 0,5%, và 0,5% hoặc cao hơn. Một cách ngẫu nhiên, các giá trị đánh dấu bằng * được đo tại thời điểm 2 tuần và các giá trị khác được đo tại thời điểm 4 tuần.

Bảng 4

	Nhiệt độ 40°C/độ ẩm tương đối 75%	
	Đẻ mở	Đóng kín
monofumarat của hợp chất A	A	A
hemifumarat của hợp chất A	A	A
hemitartrat của hợp chất A	B	B
monophosphat của hợp chất A	C*	C*

Kết quả của bảng này, khẳng định rằng, monofumarat của hợp chất A và hemifumarat của hợp chất A tạo ra lượng chất tương tự nhỏ và thể hiện tính ổn định ở trạng thái rắn tuyệt vời so với hemitartrat của hợp chất A hoặc monophosphat của hợp chất A. Do đó, khẳng định rằng, fumarat của hợp chất A theo sáng chế thể hiện tính ổn định ở trạng thái rắn tuyệt vời.

Ví dụ thử nghiệm 3

Thử nghiệm về tính ổn định ở trạng thái rắn (Thử nghiệm khát khe)

Tính ổn định ở trạng thái rắn được đo trong các điều kiện sau, đối với monofumarat của hợp chất A, hemitartrat của hợp chất A và monophosphat của hợp chất A mà chúng thu được trong các ví dụ và ví dụ tham chiếu, khi chúng được bảo quản trong thời gian 2 tuần hoặc 4 tuần ở nhiệt độ 60°C.

Điều kiện bảo quản: 60°C (Đóng kín)

Thời điểm đo: 2 tuần và 4 tuần

Lượng bảo quản: Khoảng 30 mg

Đồ chứa bảo quản: Đồ chứa thủy tinh màu nâu

Phương pháp điều chế dung dịch mẫu: Mẫu được hòa tan trong axetonitril 50% sao cho nồng độ của mẫu là 0,4 mg/mL.

Theo cách tương tự như trong ví dụ thử nghiệm 2, Bảng 5 thể hiện các kết quả đánh giá về khối lượng của chất tương tự trong dung dịch mẫu, được đo bằng phương pháp phân tích HPLC. Trong bảng, A và B để chỉ các tỷ lệ % của tổng khối lượng của chất tương tự lần lượt dưới 0,1%, và 0,1% hoặc cao hơn và dưới 0,5%. Một cách ngẫu nhiên, giá trị được đánh dấu bằng ký hiệu * được đo tại thời điểm 2 tuần và các giá trị khác được đo tại thời điểm 4 tuần.

Bảng 5

	60°C
monofumarat của hợp chất A	A
hemitartrat của hợp chất A	B
monophosphat của hợp chất A	B*

Kết quả, khẳng định rằng, monofumarat của hợp chất A tạo ra lượng chất tương tự nhỏ và thể hiện tính ổn định ở trạng thái rắn tuyệt vời so với hemitartrat của hợp chất A hoặc monophosphat của hợp chất A. Do đó, khẳng định rằng, fumarat của hợp chất A theo sáng chế thể hiện tính ổn định ở trạng thái rắn tuyệt vời.

Ví dụ thử nghiệm 4

Thử nghiệm đo nồng độ trong máu

Đối với hợp chất A, hemifumarat của hợp chất A và monofumarat của hợp chất A thu được trong các ví dụ, các huyền phù 50 mg/10 mL/kg về phương diện trọng lượng phân tử của hợp chất A được điều chế bằng 0,5% HPMC. Các dung dịch này được sử dụng theo đường uống cho chuột (Balb/ cA) mà các chuột này đã được

nuôi trong điều kiện cho ăn, với liều lượng 10mL trên 1 kg thể trọng, bằng ống sòng để sử dụng theo đường uống. Sau khi sử dụng, chuột được đưa trở lại lồng nuôi và các điều kiện được kiểm tra. Trong lồng được cung cấp điều kiện trong đó, nước và thức ăn có thể tiếp cận tùy thích. Sau thời gian 0,25, 0,5, 1, 2, 4 và 6 giờ từ khi sử dụng, chuột được gây mê bằng isoflurane, và 60 μ L máu được tập hợp từ ổ mắt bằng ống tập hợp máu mao mạch.

Máu tập hợp được làm lạnh bằng nước đá và huyết tương máu được tách bằng thao tác ly tâm. Chuột sau khi tập hợp máu được đưa trở lại lồng nuôi động vật và các điều kiện sau khi phục hồi sau gây mê được kiểm tra. Khi kết thúc lần tập hợp máu cuối cùng, chuột được gây chết nhẹ nhàng bằng cách làm trật khớp cổ, sau khi kiểm tra mức nồng độ gây mê isoflurane.

$AUC_{0-6\text{giờ}}$, C_{max} và T_{max} được tính toán theo phương pháp dạng thang log tuyến tính bằng phần mềm Phoenix WinNonlin (v6.3,0) mà phần mềm này được sản xuất bởi Pharsight Corporation, từ nồng độ của hợp chất A trong mỗi một huyết tương máu được đo bằng phương pháp MRM bằng LC-MS/MS.

Kết quả được trình bày trong bảng 6. Từ thử nghiệm, khẳng định rằng, đối với C_{max} (nồng độ tối đa trong máu), hemifumarat của hợp chất A thể hiện giá trị tương đương với giá trị của hợp chất A, và monofumarat của hợp chất A thể hiện giá trị gấp khoảng hai lần giá trị của của hợp chất A; và đối với $AUC_{0-6\text{giờ}}$ (vùng dưới đường cong nồng độ trong máu - thời gian, 0-6 giờ tính từ lúc sử dụng), hemifumarat của hợp chất A thể hiện giá trị gấp khoảng hai lần giá trị của hợp chất A, và monofumarat của hợp chất A thể hiện giá trị cao hơn 1,3 lần so với giá trị của hợp chất A. Do đó, khẳng định rằng, fumarat của hợp chất A theo sáng chế thể hiện đặc tính hấp thu theo đường uống tuyệt vời.

Bảng 6

Thông số	Sử dụng qua đường miệng		
	Hợp chất A	monofumarat của hợp chất A	hemifumarat của hợp chất A
AUC _{0-6 giờ} ($\mu\text{M}\cdot\text{giờ}$)	5,45	7,33	10,32
C _{max} (μM)	3,98	7,63	4,22
T _{max} (h)	0,25	0,25	0,5

Ví dụ thử nghiệm 5

Đo hoạt tính ức chế BTK (in vitro)

Trong một tập hợp điều kiện của phương pháp đo hoạt tính ức chế in vitro của các hợp chất đối với hoạt tính BTK kinaza, FL-Peptide 2 được sử dụng làm nền, vì nó được mô tả trong danh sách giá của loạt mẫu LabChip (nhãn hiệu đăng ký) có thể tiêu thụ của PerkinElmer Co., Ltd. rằng, FL-Peptide 2 tương ứng với nền peptit để đo hoạt tính BTK kinaza. Protein BTK người tái tổ hợp tinh chế sử dụng trong thử nghiệm được mua từ Carma Biosciences, Inc.

Đối với việc đo hoạt tính ức chế của các hợp chất, trước tiên, monofumarat của hợp chất A được pha loãng từng bước bằng dimethyl sulfoxit (DMSO). Sau đó, protein BTK, peptit nền (nồng độ cuối là 1 μM), magie clorua (nồng độ cuối là 10 mM), ATP (nồng độ cuối là 45 μM), và dung dịch DMSO của các hợp chất thử nghiệm (nồng độ cuối của DMSO là 5%) được bổ sung vào dung dịch đệm của phản ứng kinaza (20 mM HEPES (pH 7,5), 2 mM dithiothreitol, 0,01% Triton X-100), và sau khi dung dịch được ủ trong thời gian 40 phút ở nhiệt độ 25°C, phản ứng kinaza được thực hiện. Phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung EDTA vào đó sao cho thu được nồng độ cuối là 30 mM. Sau cùng, peptit nền mà nó không được

phosphoryl hóa (S) và peptit phosphoryl hóa (P) được tách riêng và được phát hiện bằng phương pháp điện di mao quản vi kênh với đầu đọc LabChip EZ Reader II (PerkinElmer, Inc.). Lượng của phản ứng phosphoryl hóa được xác định từ các độ cao đỉnh riêng biệt của S và P, và nồng độ hợp chất mà tại đó, phản ứng phosphoryl hóa có thể được ức chế tới 50% được xác định làm giá trị IC₅₀ (nM). Kết quả được thể hiện trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Hợp chất thử nghiệm	Giá trị IC ₅₀ của hoạt tính ức chế BTK (nM)
monofumarat của hợp chất A	1,19

Từ kết quả thử nghiệm, khẳng định rằng, fumarat của hợp chất A theo sáng chế có hoạt tính ức chế BTK in vitro.

Ví dụ thử nghiệm 6

Khả năng chọn lọc ức chế BTK so với hoạt tính ức chế kinaza EGFR (in vitro)

1) Đo hoạt tính ức chế BTK

Hoạt tính ức chế BTK được đo theo cách tương tự như trong ví dụ thử nghiệm 5.

2) Đo hoạt tính ức chế EGFR

Đối với việc thiết đặt các điều kiện của phương pháp đo hoạt tính ức chế của hợp chất đối với hoạt tính kinaza EGFR in vitro, việc thiết đặt này được mô tả trong danh mục giá của nguồn cung cấp chất phản ứng có thể tiêu thụ được đối với loạt LabChip (nhãn hiệu đăng ký) của PerkinElmer, Inc. rằng, FL-PEPTIDE 22 tương ứng với peptit nền để đo hoạt tính kinaza EGFR. Do đó, peptit biotin hóa (biotin-EEPLYWSFPAKKK) được tạo ra bằng cách dựa vào trình tự axit amin của peptit. Protein EGFR người tái tổ hợp tinh chế sử dụng trong thử nghiệm được mua từ

Carna Biosciences, Inc.

Đối với việc đo hoạt tính ức chế của các hợp chất, trước tiên, monofumarat của hợp chất A được pha loãng từng bước bằng dimethyl sulfoxit (DMSO). Sau đó, protein EGFR, peptit nền (nồng độ cuối là 250 nM), magie clorua (nồng độ cuối là 10 mM), mangan clorua (nồng độ cuối là 10 mM), ATP (nồng độ cuối là 1,5 μ M), và dung dịch DMSO của các hợp chất thử nghiệm (nồng độ cuối của DMSO là 2,5%) được bổ sung vào dung dịch đệm của phản ứng kinaza (20 mM HEPES (pH 7,5), 2 mM dithiothreitol, 0,01% Triton X-100), và sau khi dung dịch được ủ trong thời gian 120 phút ở nhiệt độ 25°C, phản ứng kinaza được thực hiện. Phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung EDTA vào đó sao cho thu được nồng độ cuối là 24 mM. Sau đó, chất lỏng phát hiện chứa Eu-labeled kháng thể kháng phosphotyrosin đánh dấu bằng Eu PT66 (PerkinElmer, Inc.) và SURELIGHT APC-SA (PerkinElmer, Inc.) được bổ sung vào đó, và hệ được để yên trong thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn ở nhiệt độ trong phòng. Sau cùng, lượng huỳnh quang khi chiếu xạ bằng ánh sáng kích thích có bước sóng 337 nm được đo tại hai bước sóng 620 nm và 665 nm, bằng thiết bị đọc PHERAstar FS (BMG Labtech GmbH). Lượng của phản ứng phosphoryl hóa được xác định từ tỷ lệ của các lượng huỳnh quang tại hai bước sóng, và nồng độ hợp chất mà tại đó, phản ứng phosphoryl hóa có thể được ức chế tới 50% được xác định làm giá trị IC₅₀ (nM).

3) Khả năng chọn lọc ức chế BTK

"Giá trị IC₅₀ của hoạt tính ức chế EGFR (nM)/giá trị IC₅₀ của hoạt tính ức chế BTK (nM)" được tính toán dựa trên các kết quả thu được trong các phần 1) và 2) ở trên, và nhờ đó khả năng chọn lọc ức chế BTK của hợp chất thử nghiệm được xác định.

Bảng 8

Hợp chất thử nghiệm	Giá trị IC50 của hoạt tính ức chế EGFR (nM)/giá trị IC50 của hoạt tính ức chế BTK (nM)
monofumarat của hợp chất A	16,90
Hợp chất so sánh 1	1,3

Từ các kết quả ở trên, khẳng định rằng, khả năng chọn lọc ức chế BTK đối với EGFR kinaza của monofumarat của hợp chất A theo sáng chế cao hơn 13 lần so với khả năng chọn lọc của hợp chất so sánh 1 in vitro, và monofumarat của hợp chất A theo sáng chế có khả năng chọn lọc ức chế BTK tuyệt vời. Từ các kết quả này, có thể chứng minh rằng, fumarat của hợp chất A theo sáng chế có thể có ít tác dụng phụ hơn so với các chất ức chế BTK hiện hữu.

Ví dụ thử nghiệm 7

Thử nghiệm để đo hoạt tính ức chế tăng sinh đối với các dòng tế bào biểu hiện BTK và EGFR (in vitro), và việc so sánh về khả năng chọn lọc của nó

Tế bào TMD8, chúng thuộc dòng tế bào u lympho tế bào B lớn lan tỏa biểu hiện BTK, được tạo huyền phù trong môi trường RPMI1640 (sản xuất bởi Life Technologies Corp.) chứa 10% huyết thanh thai bò. Tế bào A431, các tế bào này biểu hiện quá mức EGFR, dòng tế bào ung thư biểu mô người hoạt hóa cao, được tạo huyền phù trong DMEM, môi trường nồng độ glucoza cao (sản xuất bởi Life Technologies Corp.) chứa 10% huyết thanh thai bò. Các huyền phù tế bào được cấy vào mỗi một lỗ của các vi đĩa đáy bằng 384 lỗ, và tế bào được nuôi cấy trong thời gian 1 ngày ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ chứa 5% khí cacbon dioxit. Monofumarat của hợp chất A và hợp chất ví dụ so sánh 1 được hòa tan trong DMSO, và các dung dịch được pha loãng tới nồng độ 500 lần nồng độ cuối của hợp chất thử nghiệm, sử dụng DMSO. Dung dịch DMSO chứa các hợp chất thử nghiệm được pha loãng bằng môi

trường sử dụng trong huyền phù chứa mỗi một tế bào, và hỗn hợp này được bổ sung vào mỗi một lỗ của các đĩa nuôi cấy tế bào sao cho nồng độ cuối của DMSO sẽ là 0,2%. Tế bào được nuôi cấy thêm trong thời gian 3 ngày ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ chứa 5% khí cacbon dioxid. Việc đếm số lượng tế bào trước khi bổ sung các hợp chất và sau khi nuôi cấy trong thời gian 3 ngày với sự có mặt của các hợp chất, được thực hiện bằng thiết bị CELLTITER GLO (sản xuất bởi Promega Corp.) trên cơ sở phương thức được khuyến cáo bởi Promega Corp. Tỷ lệ ức chế tăng sinh được tính toán bằng công thức sau, và nồng độ của hợp chất thử nghiệm ức chế 50% (GI50 (nM)) được xác định.

$$\text{Tỷ lệ ức chế tăng sinh (\%)} = (C - T)/(C - C0) \times 100$$

T: Cường độ phát quang của lỗ chứa hợp chất thử nghiệm

C: Cường độ phát quang của lỗ không có hợp chất thử nghiệm

C0: Cường độ phát quang của lỗ được đo trước khi bổ sung hợp chất thử nghiệm

Với việc so sánh giữa hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào đối với các tế bào A431 mà chúng phụ thuộc vào sự truyền tín hiệu tăng sinh EGFR và hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào đối với các tế bào TMD8 mà chúng phụ thuộc vào sự truyền tín hiệu tăng sinh BTK, có thể đánh giá được sự ảnh hưởng của các kinaza tương ứng ở mức tế bào. Tức là, bằng cách tính toán "tỷ lệ ức chế tăng sinh tế bào A431/tỷ lệ ức chế tăng sinh tế bào TMD8", có thể dự đoán rằng, khi giá trị của tỷ lệ tăng lên, thì khả năng chọn lọc với BTK trên EGFR trong tế bào tăng lên. Các giá trị của "tỷ lệ ức chế tăng sinh tế bào A431/tỷ lệ ức chế tăng sinh tế bào TMD8" được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9

Hợp chất thử nghiệm	Tỷ lệ ức chế tăng sinh tế bào A431/tỷ lệ ức chế tăng sinh tế bào TMD8
monofumarat của hợp chất A	7643
Hợp chất so sánh 1	117,9

Từ các kết quả thử nghiệm, khẳng định rằng, khả năng chọn lọc ức chế BTK đối với EGFR kinaza của monofumarat của hợp chất A theo sáng chế trong tỷ lệ ức chế tăng sinh tế bào in vitro cao hơn 65 lần so với khả năng của hợp so sánh 1. Do đó, khẳng định rằng, fumarat của hợp chất A theo sáng chế có khả năng chọn lọc ức chế BTK tuyệt vời, không chỉ ở kinaza mà còn cả ở trong các tế bào. Từ các kết quả, đã chứng minh rằng, fumarat của hợp chất A theo sáng chế có thể có ít tác dụng phụ so với các chất ức chế BTK hiện hữu.

Ví dụ thử nghiệm 8

Mẫu chuột viêm khớp gây ra bằng collagen (tác dụng phòng ngừa)

Thử nghiệm được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong tài liệu phi sáng chế (Brand DD, et al., Nat Protoc. 2007; 2, 1269-1275, Xu D. et al., JPET, 2012 Apr; 341(1): 90-103). Chuột đực 7 tuần tuổi DBA/1 (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.) được tiêm theo đường trong da ở vùng lưng với lượng 100 μ L/chuột của dung dịch kết hợp lượng tương đương (nhũ tương) 4 mg/mL dung dịch collagen bò typ 2 (Collagen Research Center) và chất bổ trợ freund hoàn chỉnh (DIFCO Inc.) (gây miễn dịch lần đầu). Sau 21 ngày tính từ thời gian đó, chuột được tiêm theo đường trong da ở vùng sống lưng với lượng 100 μ L/chuột của dung dịch kết hợp lượng tương đương (nhũ tương) 4 mg/mL dung dịch collagen bò typ 2 (Collagen Research Center) và chất bổ trợ freund hoàn chỉnh (DIFCO) để thực hiện gây miễn dịch bổ sung. Việc sử dụng theo đường uống 1 lần mỗi ngày ngày được

tiếp tục trong thời gian 17 ngày thiết đặt ngày khởi đầu sử dụng (ngày 0) là ngày thứ 8 tính từ khi gây miễn dịch bổ sung. Các triệu chứng của viêm khớp tại ngày 0, ngày 3, ngày 7, ngày 10, ngày 14 và ngày 17 được ghi điểm về mặt đại thể (0: Không thay đổi, 1: Sung một ngón chân, 2: Sung hai ngón hoặc nhiều hơn, 3: Sung phần mu bàn chân, 4: Sung toàn bộ các ngón kéo dài đến cổ chân/mắt cá), và tổng điểm của 4 chân thu được là điểm của mỗi cá thể (tối đa 16 điểm). Kết quả được thể hiện ở hình vẽ trên Fig. 11.

Hình vẽ trên Fig. 11 chứng minh rằng, nhóm sử dụng prednisolone (3 mg/kg) mà nó được thiết đặt làm hợp chất đối chứng dương của hệ thử nghiệm, chỉ duy nhất ở mức duy trì điểm ghi cao về viêm khớp, trong khi nhóm sử dụng monofumarat của hợp chất A theo sáng chế (0,381 mg/kg) làm giảm điểm ghi về viêm khớp một cách hiệu quả. Từ các kết quả này, đã khẳng định rằng, fumarat của hợp chất A theo sáng chế có tác dụng điều trị tuyệt vời đối với bệnh viêm khớp dạng thấp mà bệnh này đã xuất hiện rồi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Muối fumarat của (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit.
2. Muối theo điểm 1, trong đó muối này là (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit · hemifumarat.
3. Muối theo điểm 2, trong đó muối này là tinh thể có góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$) với ít nhất hai, tốt hơn là ít nhất năm, hoặc nhiều hơn năm đỉnh được chọn từ $4,5^\circ$, $5,8^\circ$, $11,2^\circ$, $12,1^\circ$, $12,4^\circ$, $13,4^\circ$, $16,6^\circ$, $17,3^\circ$, $18,2^\circ$, $20,2^\circ$, $26,4^\circ$ và $27,1^\circ$, trong phổ nhiễu xạ bột tia X.
4. Muối theo điểm 2 hoặc 3, trong đó muối này là tinh thể có góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$) với các đỉnh $4,5^\circ$, $5,8^\circ$, $11,2^\circ$, $12,1^\circ$, $12,4^\circ$, $13,4^\circ$, $16,6^\circ$, $17,3^\circ$, $18,2^\circ$, $20,2^\circ$, $26,4^\circ$ và $27,1^\circ$, trong phổ nhiễu xạ bột tia X, tốt hơn là muối này là tinh thể có phổ nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trên Fig. 2.
5. Muối theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó muối này là tinh thể có nhiệt độ đỉnh trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC) với đỉnh thu nhiệt ở vùng xung quanh nằm trong khoảng từ 197°C đến 199°C .
6. Muối theo điểm 1, trong đó muối này là (R)-1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-carboxamit · monofumarat.
7. Muối theo điểm 6, trong đó muối này là tinh thể có góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$) với ít nhất hai, tốt hơn là ít nhất năm, hoặc nhiều hơn năm đỉnh được chọn từ $7,2^\circ$, $12,4^\circ$, $14,4^\circ$, $15,0^\circ$, $15,6^\circ$, $19,0^\circ$, $22,3^\circ$, $22,6^\circ$, $23,4^\circ$, $25,5^\circ$, $25,9^\circ$ và $27,6^\circ$, trong phổ nhiễu xạ bột tia X.

8. Muối theo điểm 6 hoặc 7, trong đó muối này là tinh thể có góc nhiễu xạ ($2\theta \pm 0,1^\circ$) với các đỉnh ở $7,2^\circ$, $12,4^\circ$, $14,4^\circ$, $15,0^\circ$, $15,6^\circ$, $19,0^\circ$, $22,3^\circ$, $22,6^\circ$, $23,4^\circ$, $25,5^\circ$, $25,9^\circ$ và $27,6^\circ$, trong phổ nhiễu xạ bột tia X, tốt hơn là muối này là tinh thể có phổ nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trên Fig. 4.
9. Muối theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, trong đó tinh thể này có nhiệt độ đỉnh trên đường cong phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) với đỉnh thu nhiệt ở vùng xung quanh nằm trong khoảng từ 219°C đến 224°C .
10. Muối theo điểm 6, trong đó muối này ở dạng vô định hình thể hiện mô hình halo trong phổ nhiễu xạ bột tia X.
11. Muối theo điểm 6 hoặc 10, trong đó muối này ở dạng vô định hình, có phổ nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trên Fig. 1.
12. Chất ức chế BTK chứa muối theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 làm thành phần hoạt tính.
13. Dược phẩm chứa muối theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 11 làm thành phần hoạt tính.
14. Tác nhân chống khối u, tốt hơn là chống khối u máu, hoặc phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh dị ứng, bệnh tự miễn, hoặc bệnh viêm, tốt hơn là bệnh viêm mũi dị ứng, dị ứng phấn hoa, viêm da cơ địa, bệnh viêm khớp dạng thấp và bệnh lupus ban đỏ hệ thống, tác nhân này chứa muối theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 11 làm thành phần hoạt tính.

FIG.1

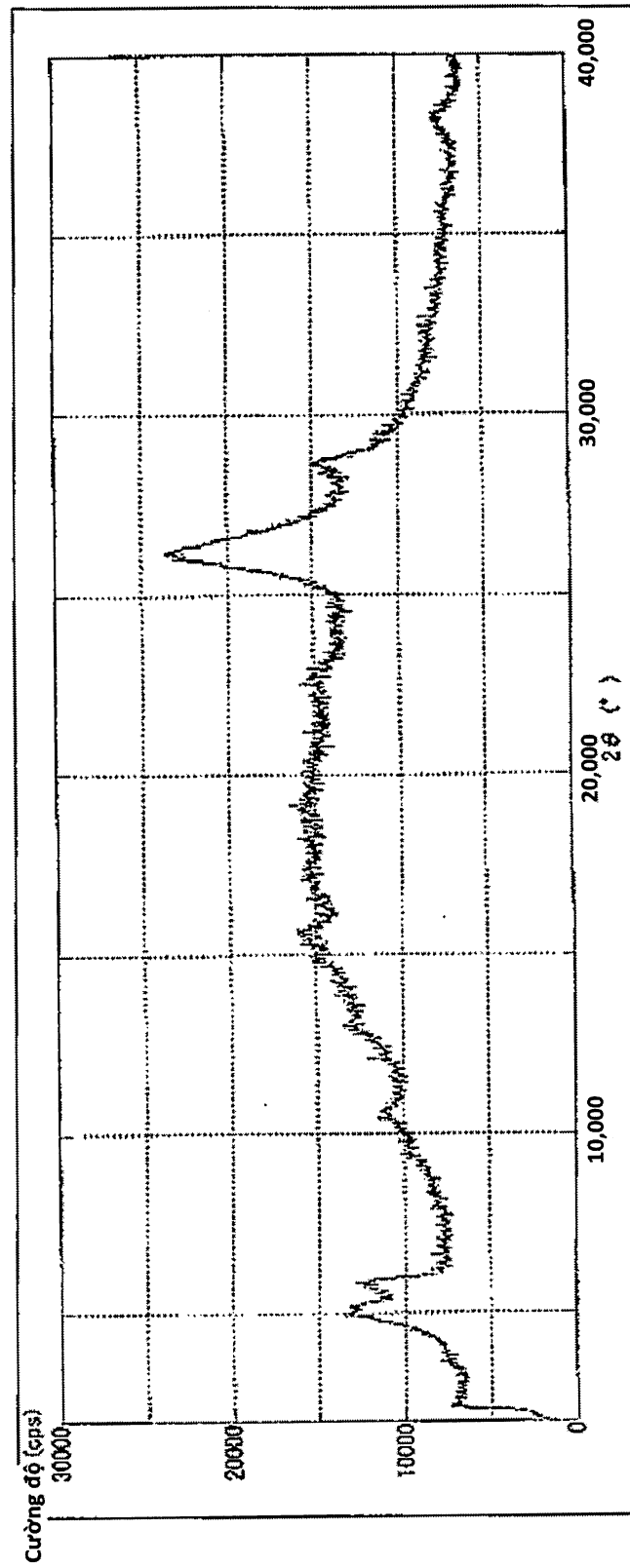


FIG.2

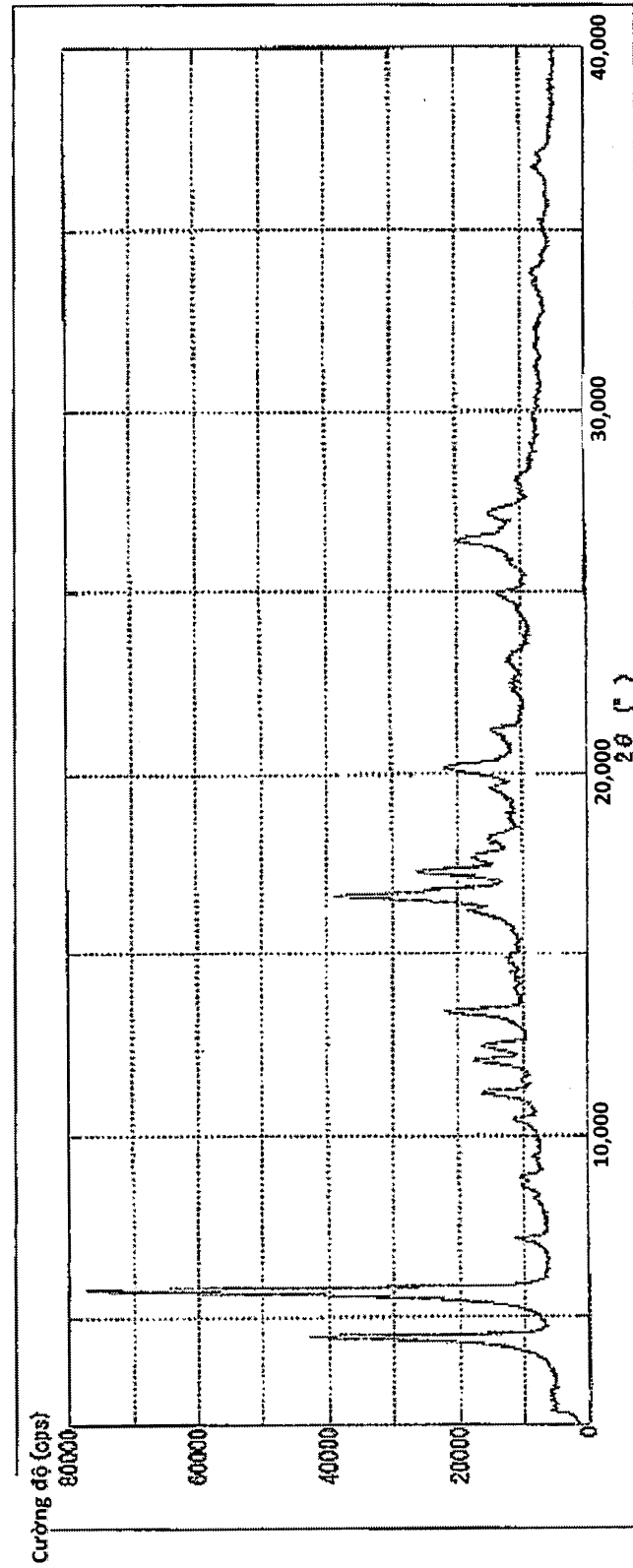


FIG.3

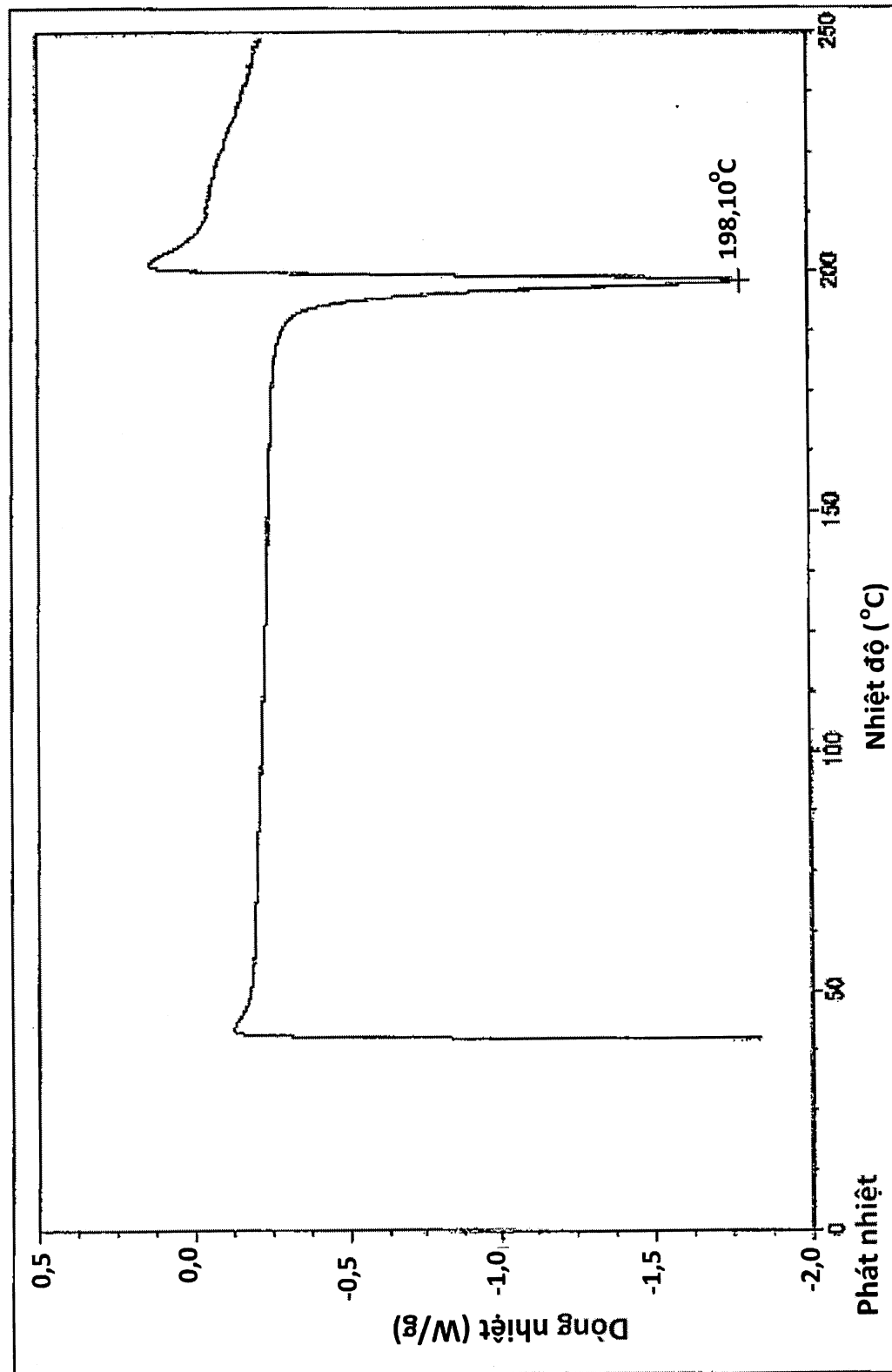


FIG.4

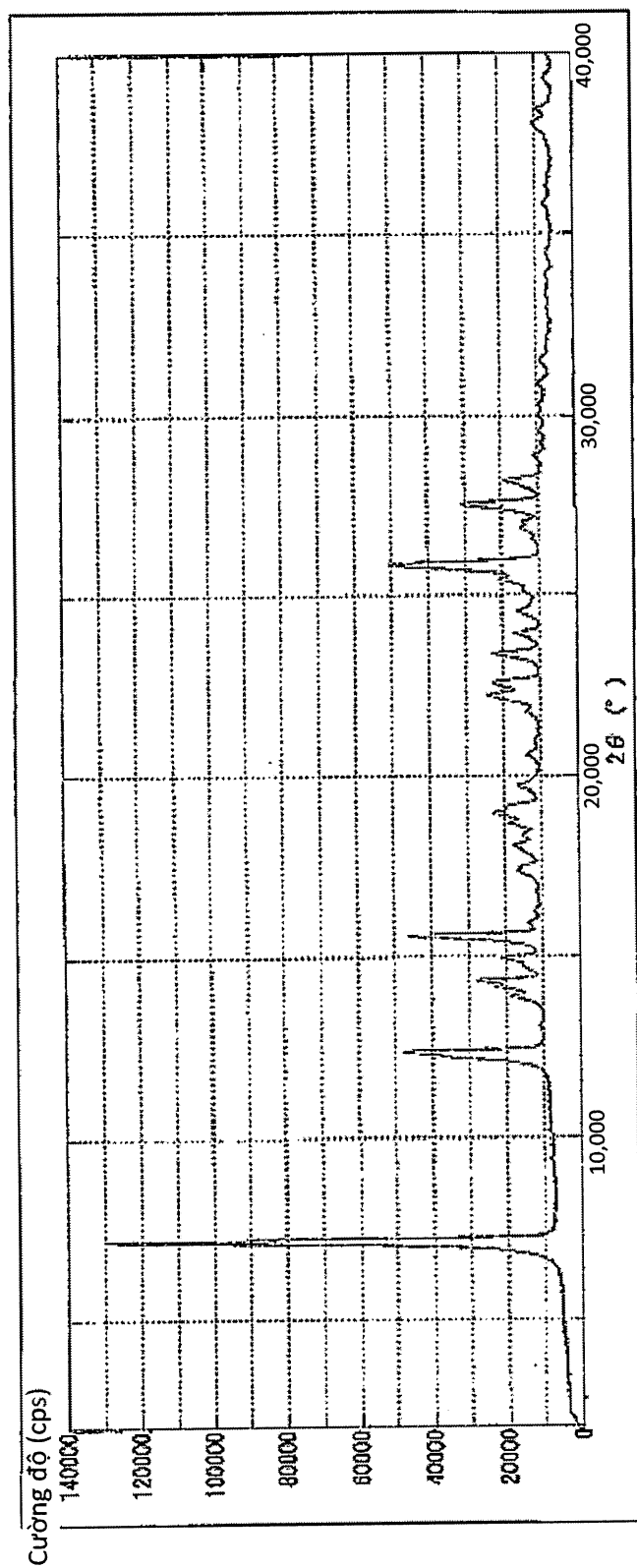


FIG.5

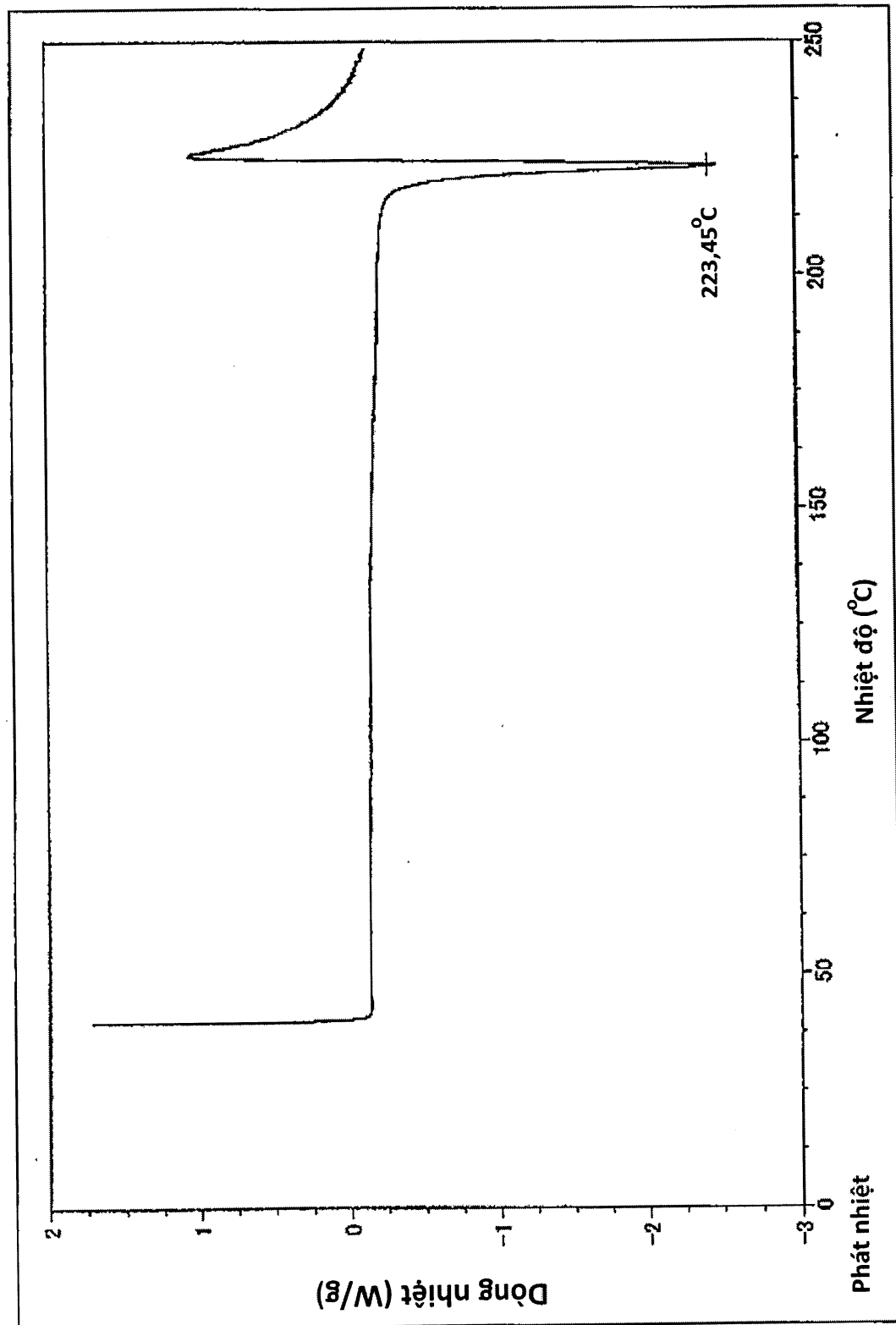


FIG.6

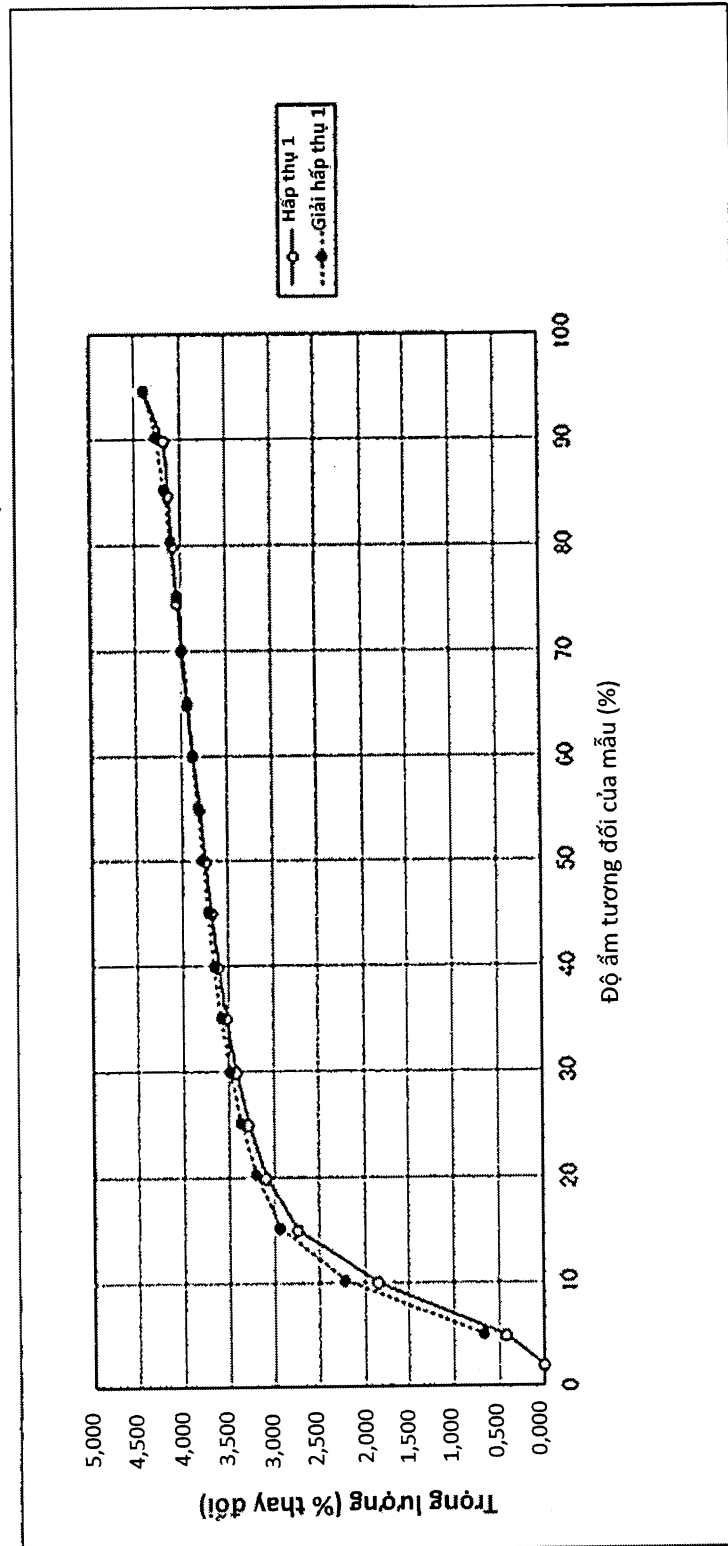


FIG.7

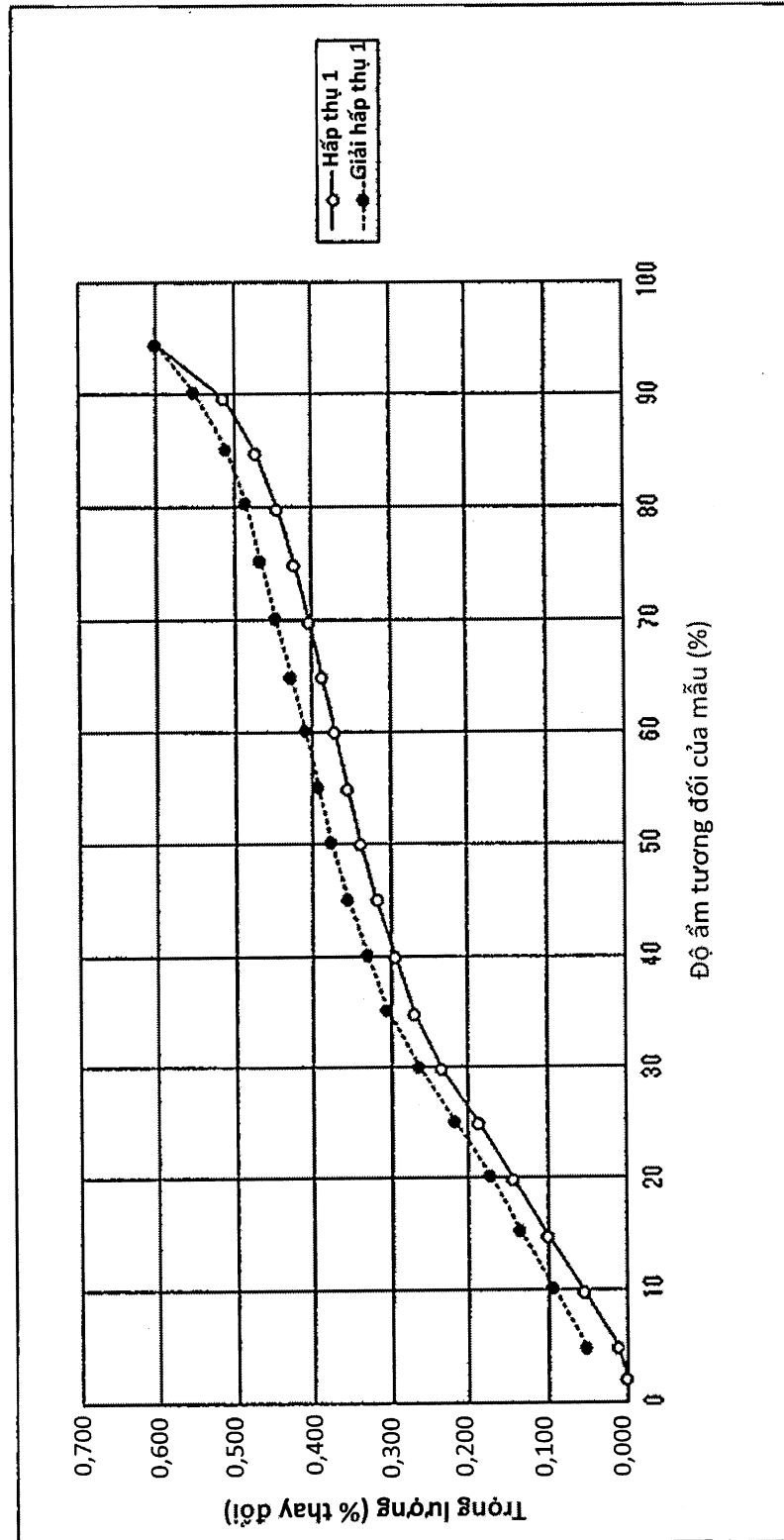


FIG.8

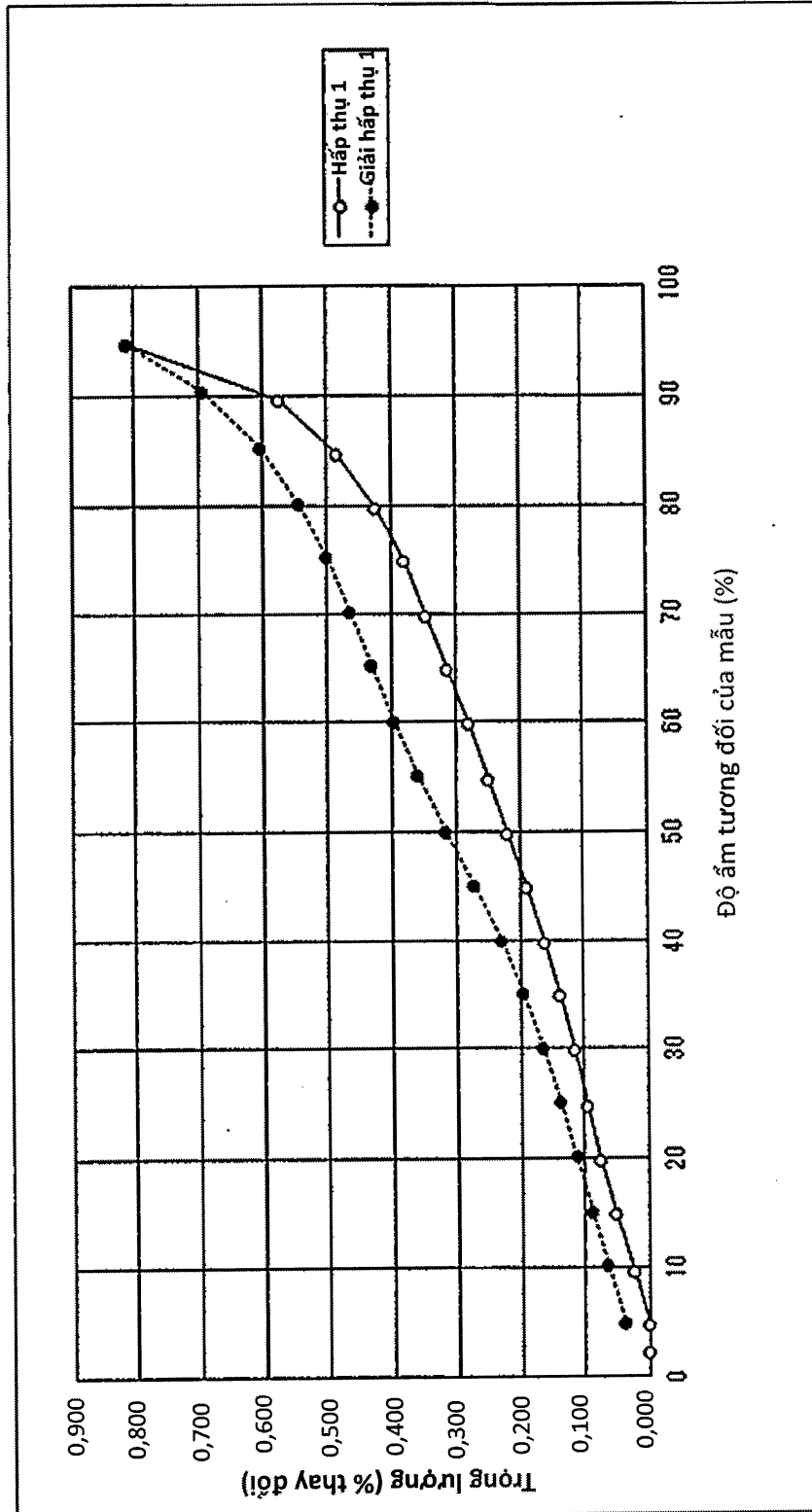


FIG.9

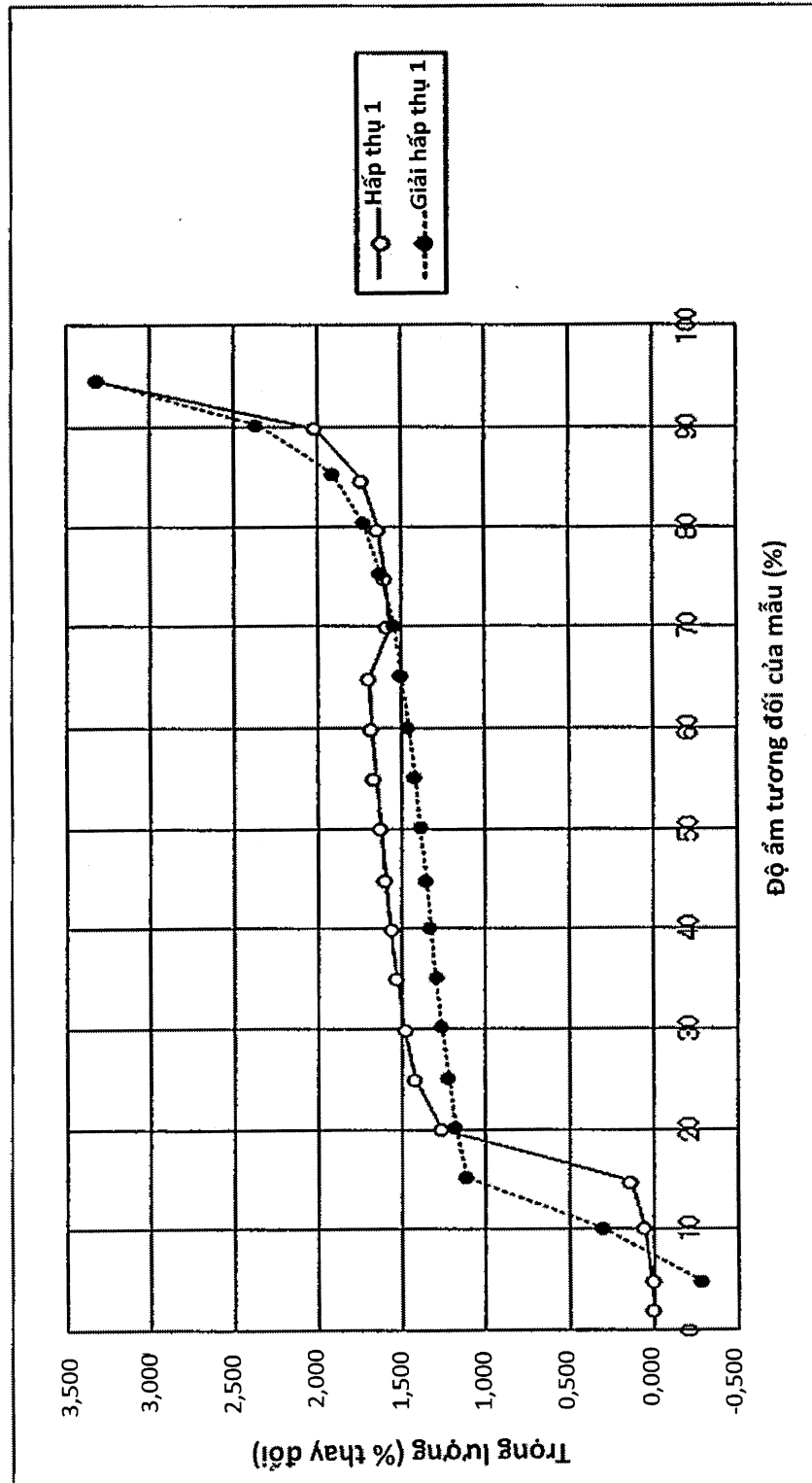


FIG.10

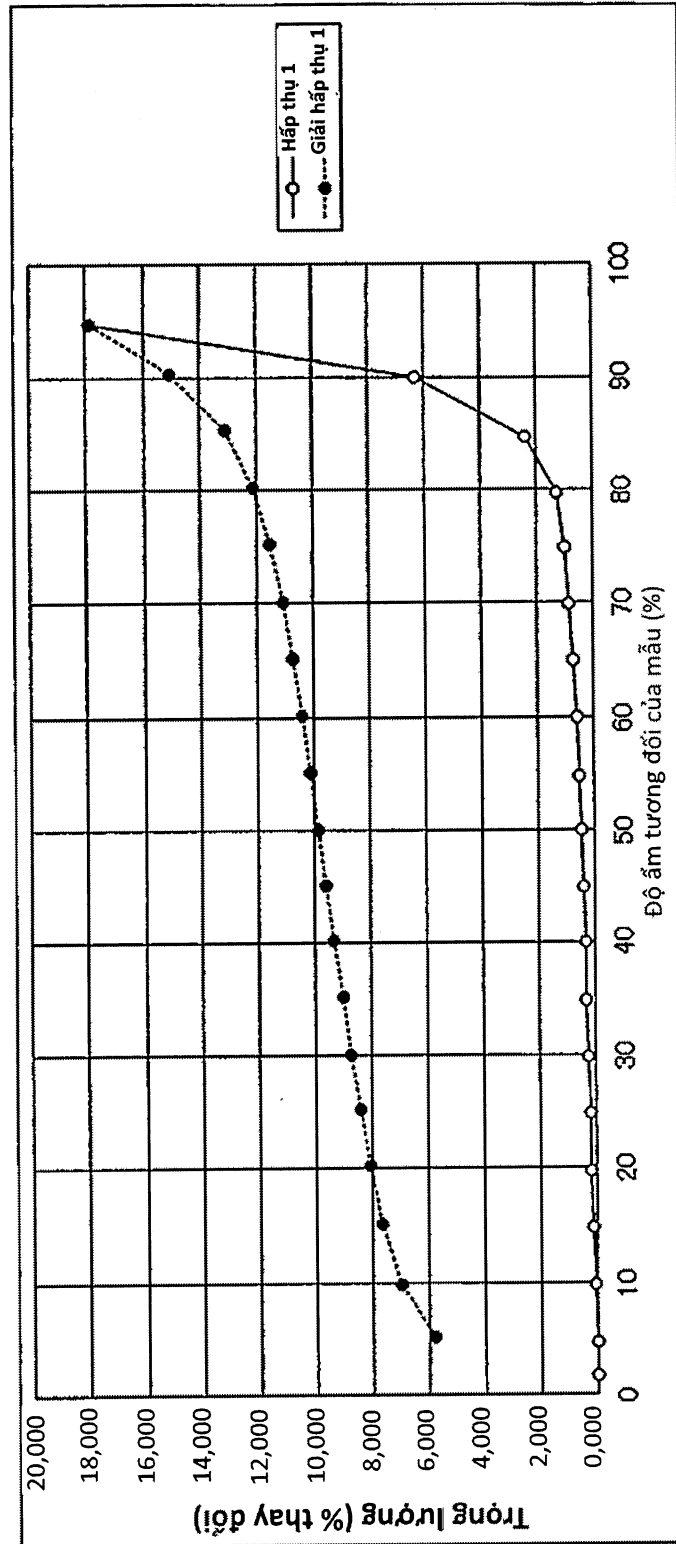


FIG.11

