



(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)



1-0035014

(51)⁷ C07D 498/04; A61K 31/5365; A61P
35/00

(13) B

(21) 1-2019-03126

(22) 08/12/2017

(86) PCT/US2017/065246 08/12/2017

(87) WO2018/111707 21/06/2018

(30) 62/435,283 16/12/2016 US

(45) 27/03/2023 420

(43) 26/08/2019 377A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

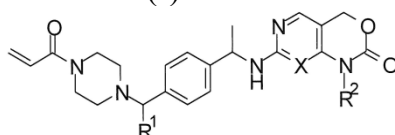
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) BAUER, Renato Alejandro (US); BOULET, Serge Louis (US); BURKHOLDER, Timothy Paul (US); GILMOUR, Raymond (US); HAHN, Patric James (US); RANKOVIC, Zoran (GB).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT 7-PHENYLETYLAMINO-4H-PYRIMIDO[4,5-D][1,3]OXAZIN-2-ON LÀM CHẤT ỨC CHẾ IDH (ISOXITRAT DEHYDROGENAZA) 1 VÀ IDH2 ĐỘT BIẾN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất như được xác định trong bản mô tả hoặc dược phẩm chứa hợp chất này, dùng trong điều trị ung thư đột biến IDH (isoxitrat dehydrogenaza) 1 hoặc IDH2 và có công thức cấu trúc (I):



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất 7-phenyletylamino-4H-pyrimido[4,5-D][1,3]oxazin-2-on và dược phẩm chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein isoxitrat dehydrogenaza (IDH) là một enzym quan trọng trong chu trình axit xitric (axit tricarboxylic hoặc Krebs). Chu trình axit xitric là chu trình cực kỳ quan trọng đối với nhiều con đường sinh hóa và là một trong những thành phần thiết lập sớm nhất của sự chuyển hóa tế bào.

Các men isoxitrat dehydrogenaza xúc tác cho quá trình loại nhóm carboxyl oxy hóa của isoxitrat thành α -ketoglutarat (2-oxoglutarat). Các enzym này thuộc hai phân nhóm riêng biệt, một trong số đó sử dụng nicotinamit adenin dinucleotit (NAD(+)) làm chất nhận điện tử và nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP(+)) khác. Ba loại isoxitrat dehydrogenaza ở động vật có vú đã được thông báo: một isoxitrat dehydrogenaza phụ thuộc NAD(+), enzym nhiều tiểu đơn vị mà nó khu trú ở chất nền của ti thể, và hai loại isoxitrat dehydrogenaza phụ thuộc NADP(+), một trong số đó nằm ở ty thể và enzym còn lại chủ yếu nằm ở dịch bào tương. Mỗi một isozym phụ thuộc NADP(+) là một dime. Protein mã hóa bởi gen IDH1 là isoxitrat dehydrogenaza phụ thuộc NADP(+) được phát hiện trong tương bào và các peroxisom. Enzym tương bào đóng vai trò quan trọng trong sản xuất NADPH tương bào. IDH1 được biểu hiện ở nhiều loài và ở nhiều sinh vật mà còn thiếu chu trình axit xitric đầy đủ.

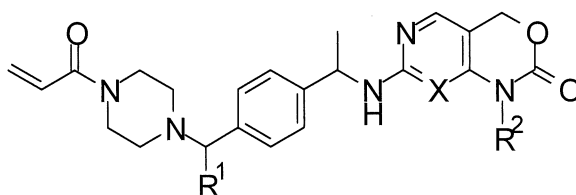
Gần đây, các đột biến ở IDH1, và isoform IDH2 liên quan đã được phát hiện ở nhiều loại ung thư. Các đột biến được phát hiện xuất hiện tại các axit amin đặc trưng dọc theo trình tự protein và được biểu hiện theo kiểu dị hợp tử, phù hợp với sự lấy lại chức năng. Các đột biến này xuất hiện ở các gốc được bảo tồn về mặt chức năng và

các nghiên cứu sinh hóa về các dạng đột biến của IDH1 và IDH2 đã chứng minh được sự mất chức năng bình thường, sự chuyển đổi có thể đảo ngược của isoxitrat thành α -ketoglutarat. Kết quả của các đột biến này là cho phép sự chuyển đổi mới (hoặc kiểu hình mới) của α -ketoglutarat (α KG) thành 2-hydroxyglutarat (2HG). Do đó, các tế bào ung thư mà chứa các dạng đột biến của IDH1 hoặc IDH2 cơ bản tạo ra các nồng độ 2HG cao hơn. Các mức 2HG cao dẫn đến sự phong bế biệt hóa tế bào mà có thể được đảo ngược bằng sự ức chế IDH1 hoặc IDH2 đột biến.

Đơn PCT/US2016/043264 bộc lộ về các chất ức chế đồng hóa trị của IDH1 đột biến. Nhu cầu vẫn cần có được các hợp chất mà chúng ức chế theo cách chọn lọc enzym IDH1 và IDH2 đột biến trong điều trị các loại ung thư khác nhau. Vẫn có nhu cầu thêm về các hợp chất mà chúng ức chế theo cách chọn lọc enzym IDH1 và IDH2 đột biến thể hiện hoạt tính gen kiểu hình mới mạnh hơn IDH1 và IDH2 kiểu tự nhiên trong điều trị các loại ung thư khác nhau. Sáng chế này đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc Ia mà chúng là các chất ức chế IDH1 và IDH2 đột biến. Hợp chất có công thức I hoặc Ia là các chất ức chế đồng hóa trị mà chúng ức chế theo cách chọn lọc IDH1 và IDH2 đột biến.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến hợp chất ức chế enzym IDH1 và IDH2 đột biến có công thức:



I

trong đó:

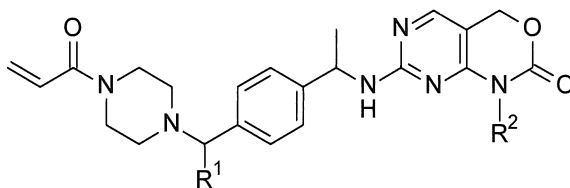
R^1 là $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, hoặc $-\text{CH}_2$ -xyclopropyl;

R^2 là $-\text{CH}_3$ hoặc $-\text{CH}_2\text{CH}_3$;

X là N hoặc CH; hoặc

muối được dụng của hợp chất này.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến hợp chất ức chế enzym IDH1 và IDH2 đột biến có công thức:



Ia

trong đó,

R^1 là $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, hoặc $-\text{CH}_2$ -xyclopropyl;

R^2 là $-\text{CH}_3$ hoặc $-\text{CH}_2\text{CH}_3$; hoặc

muối được dụng của hợp chất này.

Khía cạnh khác của sáng chế này đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc Ia, hợp chất này là:

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on;

7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on;

1-etyl-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)propyl]phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 1;

1-etyl-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)propyl]phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 2;

hoặc muối được dụng của hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất này.

Khía cạnh khác của sáng chế này đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc Ia mà là
 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on hoặc muối được dụng của hợp chất này.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến được phẩm chứa hợp chất ức chế IDH1 đột biến có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này, và chất mang được dụng.

Phần mô tả cũng mô tả phương pháp điều trị ung thư biểu hiện IDH1 đột biến hoặc IDH2 đột biến mà ung thư này là u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u tế bào hình sao, u tế bào thần kinh đệm ít gai, u cận hạch, sarcom xơ, u lympho tế bào T nguyên bào mạch máu - miễn dịch (angioimmunoblastic T-cell lymphoma - AITL), hội chứng loạn sản tủy xương (myelodysplastic syndrome - MDS), bệnh bạch cầu lympho bào B cấp tính (B cell acute lymphoblastic leukemia - B-ALL), ung thư tuyến giáp, ung thư đại trực tràng, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (acute myeloid leukemia - AML), u hắc sắc tố, ung thư tiền liệt tuyến, sarcom sụn hoặc ung thư đường mật ở bệnh nhân bao gồm bước dùng cho bệnh nhân cần được điều trị một lượng có tác dụng điều trị của hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này.

Phần mô tả cũng mô tả phương pháp điều trị ung thư biểu thị IDH1 đột biến hoặc IDH2 đột biến mà ung thư này là sarcom xơ, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, u thần kinh đệm, hoặc u nguyên bào thần kinh đệm ở bệnh nhân bao gồm bước dùng cho bệnh nhân cần được điều trị một lượng có tác dụng điều trị của hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này.

Khía cạnh nữa của sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này, để sử dụng trong liệu pháp điều trị.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này, để sử dụng trong điều trị ung thư biểu thị IDH1 đột biến hoặc IDH2 đột biến mà ung thư này là u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u tế bào hình sao, u tế bào thần kinh đệm ít gai, u cận hạch, sarcom xơ, u lympho tế bào T nguyên bào mạch máu - miễn dịch (AITL), hội chứng loạn sản tủy xương (MDS), bệnh bạch cầu lympho bào B cấp tính (B-ALL), ung thư tuyến giáp, ung thư đại trực tràng, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (AML), u hắc sắc tố, ung thư tiền liệt tuyến, sarcom sụn hoặc ung thư đường mật.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này, để sử dụng trong điều trị ung thư biểu thị IDH1 đột biến hoặc IDH2 đột biến mà ung thư này là sarcom xơ, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, u thần kinh đệm, hoặc u nguyên bào thần kinh đệm.

Phần mô tả cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này, để sản xuất thuốc trong điều trị ung thư biểu thị IDH1 đột biến hoặc IDH2 đột biến mà ung thư này là u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u tế bào hình sao, u tế bào thần kinh đệm ít gai, u cận hạch, sarcom xơ, u lympho tế bào T nguyên bào mạch máu - miễn dịch (AITL), hội chứng loạn sản tủy xương (MDS), bệnh bạch cầu lympho bào B cấp tính (B-ALL), ung thư tuyến giáp, ung thư đại trực tràng, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (AML), u hắc sắc tố, ung thư tiền liệt tuyến, sarcom sụn hoặc ung thư đường mật.

Phần mô tả cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này, để sản xuất thuốc trong điều trị ung thư biểu thị IDH1 đột biến hoặc IDH2 đột biến mà ung thư này là sarcom xơ, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, u thần kinh đệm, hoặc u nguyên bào thần kinh đệm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “bệnh nhân” nghĩa là động vật có vú và “động vật có vú” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở người.

"Lượng có tác dụng điều trị" có nghĩa là liều lượng của hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này, hoặc dược phẩm chứa hợp chất, hoặc muối được dụng của hợp chất này, cần thiết để ức chế IDH1 đột biến hoặc IDH2 đột biến ở bệnh nhân ung thư, dẫn tới giải phóng sự phong bế biệt hóa bằng sự ức chế sinh ra đối với sự phát triển tế bào khối u và loại trừ hoặc làm chậm hoặc làm ngừng sự tiến triển của ung thư ở bệnh nhân. Liều lượng trừ tính trước của hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này nằm trong khoảng từ 1 mg/bệnh nhân/ngày đến 2000 mg/bệnh nhân/ngày. Liều lượng ưu tiên được dự tính nằm trong khoảng từ 5 mg/bệnh nhân/ngày đến 1800 mg/bệnh nhân/ngày. Liều lượng ưu tiên nhất được dự tính nằm trong khoảng từ 40 mg/bệnh nhân/ngày đến 1600 mg/bệnh nhân/ngày. Liều lượng chính xác cần thiết để điều trị cho bệnh nhân và khoảng thời

gian điều trị sẽ được xác định bởi thầy thuốc khi xem xét giai đoạn và mức độ nặng của bệnh cũng như nhu cầu và đáp ứng cụ thể của từng bệnh nhân. Mặc dù được biểu thị bằng liều lượng trên cơ sở mỗi ngày, chế độ sử dụng có thể được điều chỉnh để thu được lợi ích điều trị tối ưu cho bệnh nhân và kiểm soát và cải thiện độc tính bất kỳ liên quan đến thuốc. Ngoài việc định liều hàng ngày, việc định liều hai lần một ngày (B.I.D.); việc định liều ba lần một ngày (T.I.D.); định liều kiểu cách ngày (Q2D); định liều theo kiểu cách ngày trong giai đoạn 5 ngày tiếp theo bằng hai ngày không định liều (T.I.W.); hoặc định liều kiểu cứ mỗi ba ngày (Q3D) có thể là thích hợp.

Các thuật ngữ "việc điều trị," "để điều trị," và "điều trị," dự định bao gồm phổ can thiệp đầy đủ đối với ung thư mà bệnh nhân đang phải chịu đựng, như việc dùng hợp chất hoạt tính để làm giảm, làm chậm hoặc làm đảo ngược một hoặc nhiều triệu chứng và để trì hoãn sự tiến triển của ung thư thậm chí ngay cả ung thư trên thực tiễn không loại bỏ được.

Thuật ngữ $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ nghĩa là 2-methylpropyl, thuật ngữ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ nghĩa là 2-metoxyletyl, và thuật ngữ $-\text{CH}_2\text{-xyclopropyl}$ nghĩa là xyclopropyletyl.

Hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của hợp chất này, tốt hơn được phối chế thành được phẩm sử dụng chất mang được dụng và được dùng theo nhiều đường dùng. Tốt hơn là, các được phẩm này là để dùng theo đường miệng. Các được phẩm này và các quy trình bào chế chúng là đã được biết rõ trong lĩnh vực. Ví dụ, xem trong, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, L.V. Allen, Editor, 22nd Edition, Pharmaceutical Press, 2012.

Theo một phương án cụ thể, được phẩm chứa hợp chất 7- $\{[(1S)\text{-}1\text{-}\{4\text{-}[(1S)\text{-}1\text{-}(4\text{-acryloylpiperazin-1-yl})\text{-}2\text{-xyclopropyletyl}]\text{phenyl}\}\text{etyl}\}\text{amino}\}\text{-}1\text{-etyl-}1,4\text{-dihydro-}2\text{H-pyrimido}[4,5\text{-d}][1,3]\text{oxazin-}2\text{-on}$ hoặc muối được dụng của hợp chất này, cùng với chất mang được dụng và tùy ý các thành phần trị liệu khác đặc biệt trong điều trị ung thư nói chung hoặc loại ung thư đặc trưng.

Hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng, có thể được dùng đồng thời với, hoặc trước, hoặc sau một hoặc nhiều tác nhân trị liệu khác. Hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng, khi được dùng cùng với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu khác, có thể được dùng riêng biệt, theo cùng đường dùng hoặc theo đường

dùng khác hoặc cùng trong dược phẩm dưới dạng (các) tác nhân trị liệu khác. Trong trường hợp một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung được dùng, việc dùng mỗi một tác nhân trị liệu có thể là đồng thời, riêng biệt, hoặc tuần tự.

Hợp chất có công thức I hoặc Ia có khả năng phản ứng với nhiều axit vô cơ và hữu cơ để tạo ra muối cộng axit dược dụng. Các muối dược dụng như vậy và các phương pháp thông thường để điều chế chúng là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, xem trong, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, “Pharmaceutical Salts,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, January 1977.

Hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối dược dụng của hợp chất này, có thể được điều chế bằng nhiều phương thức đã biết trong lĩnh vực, cũng như các phương thức mô tả dưới đây. Các bước tổng hợp cụ thể có thể được kết hợp theo thứ tự khác khác để điều chế hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối dược dụng của hợp chất này.

Ngoài ra, các hợp chất trung gian nhất định được mô tả trong các quá trình điều chế dưới đây có thể chứa một hoặc nhiều nhóm bảo vệ nitơ. Cần hiểu rằng các nhóm bảo vệ có thể thay đổi khi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thấy cần thiết, phụ thuộc vào điều kiện phản ứng cụ thể và vào các quá trình chuyển hóa cụ thể được thực hiện. Các điều kiện bảo vệ và khử bảo vệ đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được mô tả trong các tài liệu chuyên ngành (xem, ví dụ, “*Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis*”, Fifth Edition, của Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2014).

Hợp chất có công thức I hoặc Ia được gọi tên theo danh pháp IUPAC, và cũng có thể được gọi tên theo danh pháp CAS, và các tên khác có thể được sử dụng để nhận dạng một cách rõ ràng hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối dược dụng của hợp chất này.

Sẽ được hiểu rằng, hợp chất có công thức I hoặc Ia có thể được mô tả ở dạng chất đồng phân lập thể đơn. Có hai tâm không đối xứng dẫn tới phát sinh 4 chất đồng

phân không đối quang. Theo sử dụng ở đây, tham chiếu tới chất đồng phân lập thể đơn được dự định cũng bao gồm các hỗn hợp đồng phân lập thể bao gồm cả hợp chất có công thức I hoặc Ia được gọi tên hoặc được mô tả. Ở đây, các định danh Cahn-Ingold-Prelog về (R)- và (S)- có thể được sử dụng để chỉ các chất đồng phân lập thể cụ thể. Các chất đồng phân lập thể có thể được điều chế bằng cách tổng hợp đặc hiệu lập thể bằng cách sử dụng các nguyên liệu ban đầu tinh khiết hoặc được làm giàu chất đồng phân đối ảnh. Các chất đồng phân lập thể cụ thể của các nguyên liệu khởi đầu, các hợp chất trung gian, hoặc hỗn hợp triệt quang bao gồm hợp chất có công thức I hoặc Ia có thể được tách bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực, như các kỹ thuật được tìm thấy trong tài liệu *Stereochemistry of Organic Compounds*, E. I. Eliel and S. H. Wilen (Wiley 1994) and *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, J., Jacques, A. Collet, and S. H. Wilen (Wiley 1991), bao gồm phương pháp sắc ký trên các pha tĩnh không đối xứng, các phương pháp tách bằng enzym, hoặc các phương pháp kết tinh phân đoạn hoặc phương pháp sắc ký của các chất đồng phân không đối quang được tạo ra cho mục đích đó, như các muối đồng phân không đối quang. Đối với hợp chất có công thức I hoặc Ia có cấu hình với tất cả các tâm lập thể được thể hiện, “cơ bản tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh” nghĩa là độ tinh khiết đồng phân lớn hơn 90% lượng dư chất đồng phân đối ảnh. Theo phương án khác, hợp chất có công thức I hoặc Ia có độ tinh khiết đồng phân lớn hơn 95% lượng dư chất đồng phân đối ảnh. Theo phương án khác nữa, hợp chất có công thức I hoặc Ia có độ tinh khiết đồng phân lớn hơn 98% lượng dư chất đồng phân đối ảnh. Theo phương án khác nữa, hợp chất có công thức I hoặc Ia có độ tinh khiết đồng phân lớn hơn 99% lượng dư chất đồng phân đối ảnh. Tất cả các chất đồng phân lập thể, riêng biệt và bao gồm cả các hỗn hợp đồng phân không đối quang của các hợp chất có công thức I hoặc Ia được dự định trong phạm vi bảo hộ của sáng chế này. Các ký hiệu “chất đồng phân 1” và “chất đồng phân 2” và “chất đồng phân không đối quang 1” và “chất đồng phân không đối quang 2” để chỉ các hợp chất mà lần lượt rửa giải từ phương pháp sắc ký không đối xứng thứ nhất và thứ hai, và nếu phương pháp sắc ký không đối xứng được khởi đầu sớm trong quá trình tổng hợp, thì ký hiệu tương tự được áp dụng cho các hợp chất trung gian và hợp chất ví dụ sau đó.

Các hợp chất được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu trong quá trình tổng hợp hợp chất có công thức I hoặc Ia là đã biết rõ và trong trường hợp chưa có sẵn trên thị trường, có thể được tổng hợp một cách dễ dàng sử dụng các tài liệu tham khảo cụ thể, bằng các phương thức chuẩn được sử dụng phổ biến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hoặc được tìm thấy trong các tài liệu tham khảo chung.

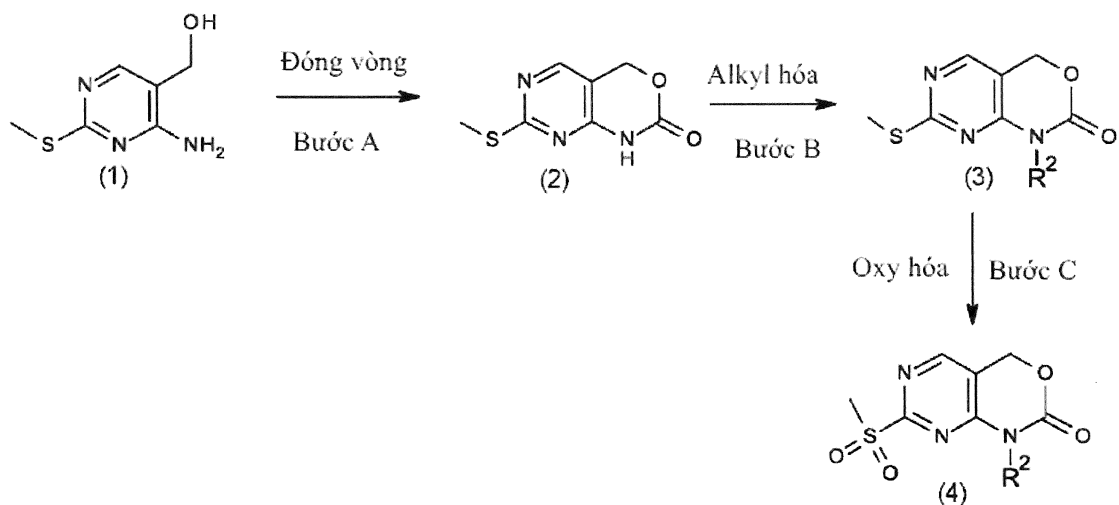
Ví dụ về các quy trình và phương pháp đã biết bao gồm các quy trình và phương pháp được mô tả trong tài liệu tham khảo chung như Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, Volumes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure, 5th Edition, Michael B. Smith and Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 4th Edition, Part B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey and Richard J. Sundberg, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2000, etc., và các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong đó.

Các ký hiệu viết tắt nhất định được định nghĩa dưới đây: “ACN” nghĩa là axetonitril; “ α KG” nghĩa là Alpha-ketoglutarat hoặc 2-ketoglutarat; “alloc” nghĩa là allyloxycarbonyl; “ATCC” nghĩa là American Type Culture collection; “BCA” nghĩa là axit bicinehonic; “BSA” nghĩa là albumin huyết thanh bò; “CDI” nghĩa là 1,1'-carbonyldiimidazol; “DCC” nghĩa là 1,3-dicyclohexylcarbodiimide; “DCM” nghĩa là diclometan; “DEAD” nghĩa là diethyl azodicarboxylat; “DIAD” nghĩa là diisopropyl azodicarboxylat; “DIC” nghĩa là diisopropylcarbodiimide; “DIPEA” nghĩa là diisopropyletylamin hoặc N-etyl-N-isopropyl-propan-2-amin; “DMAP” nghĩa là dimetylaminopyridin; “DMF” nghĩa là dimetylformamit; “DMSO” nghĩa là dimetyl sulfoxit; “DTT” nghĩa là dithiothreitol; “EDC” nghĩa là EDAC, EDCI, hoặc 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimide hydroclorua; “EDTA” nghĩa là axit etylendiamintetraaxetic; “EGTA” nghĩa là axit etylen glycol tetraaxetic; “EtOAc” nghĩa là etyl axetat; “EtOH” nghĩa là etanol hoặc rượu etylic; “Ex” nghĩa là ví dụ; “HATU” nghĩa là (dimetylamino)-N,N-dimetyl(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-yloxy)metaniminium hexaflophosphat; “HBTU” nghĩa là 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylluronium hexaflophosphat; “2HG” nghĩa là 2-hydroxyglutarat; “d₅-3HG” nghĩa là axit 3-hydroxy-1,5-pentandioic-2,2,3,4,4-d₅; “HILIC” nghĩa là phương

pháp sắc ký lỏng tương tác ưa nước; “HOAt” nghĩa là 1-hydroxy-7-azobenzotriazol; “HOBT” nghĩa là 1-hydroxylbenzotriazol hydrat; “HPLC” nghĩa là phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao; “IC₅₀” nghĩa là nồng độ của một chất mà tạo ra 50% đáp ứng ức chế tối đa có thể đối với chất đó; “*m*CPBA” nghĩa là axit *meta*-cloperbenzoic; “MeOH” nghĩa là metanol hoặc rượu metylic; “NADP⁺ và NADPH” nghĩa là dạng oxy hóa và khử của nicotinamit adenin dinucleotit phosphat tương ứng; “NMP” nghĩa là N-metyl-2-pyrrolidon; “PG” nghĩa là nhóm bảo vệ; “Prep” nghĩa là điều chế; “PyBOP” nghĩa là benzotriazol-1-yloxytripyrrolidino-phosphonium hexaflorophosphat; “PyBrop” nghĩa là bromo-tris-pyrrolidino phosphonihexaflorophosphat; “rpm” nghĩa là vòng/phút; “(R)-RUCY®-XylBINAP” nghĩa là RuCl[(R)-daipena][(R)-xylbinap; “S_NAr” nghĩa là phản ứng thế ái nhân thơm; “TEA” nghĩa là trietylamin; “TFA” nghĩa là axit trifloaxetic; “THF” nghĩa là tetrahydrofuran; và “Tris” nghĩa là tris(hydroxymetyl)aminometan.

Hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của chúng, có thể được điều chế bằng nhiều phương thức đã biết trong lĩnh vực, một số trong số này được minh họa trong các sơ đồ, quy trình điều chế, và ví dụ dưới đây. Các bước tổng hợp cụ thể đối với mỗi một con đường được mô tả có thể được kết hợp theo các cách khác nhau, hoặc cùng với các bước từ các sơ đồ khác, để điều chế hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc các muối được dụng của chúng. Sản phẩm của mỗi một bước trong các sơ đồ dưới đây có thể được thu hồi bằng các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực, bao gồm phương pháp chiết, làm bay hơi, kết tủa, sắc ký, lọc, nghiền tinh chế, và kết tinh. Trong các sơ đồ dưới đây, tất cả các phần tử thay thế, trừ khi có quy định khác, là như được định nghĩa ở trên. Các chất phản ứng và nguyên liệu ban đầu đều dễ dàng kiếm được đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực.

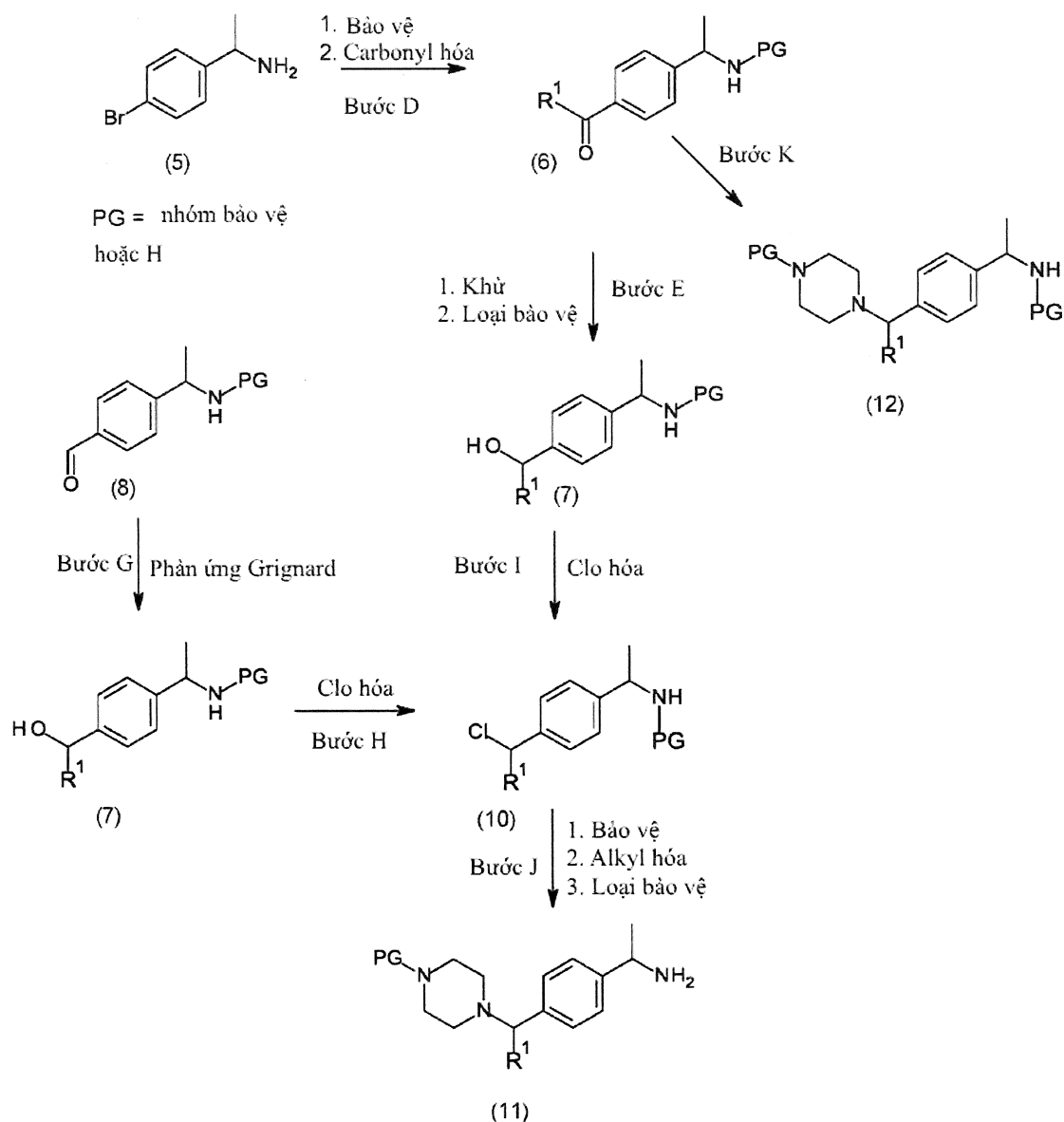
Sơ đồ 1



Trong sơ đồ 1, hàng loạt phản ứng dẫn tới hợp chất 7-(methylsulfonyl)-1,4-dihydro-2H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on được thể ở vị trí 1, (4), sản phẩm của bước C trong đó R² như được xác định ở trên. “PG” là nhóm bảo vệ được triển khai đối với nhóm amino hoặc nhóm oxy như đối với các nhóm carbamat, amit hoặc este. Ví dụ, 5-hydroxy methyl 4-amino-2-methylsulfonyl-pyrimidin có thể được đóng vòng trong điều kiện carbamoyl hóa chuẩn thành oxazin-2-on sử dụng triphosgen và bazơ hữu cơ như DIPEA hoặc TEA ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -30 đến -35°C để thu được hợp chất (2), sản phẩm của bước A. Theo cách khác, dihalogenua carbonyl hoặc di-pseudohalogenua carbonyl như CDI, phosgen, hoặc diphosgen có thể được sử dụng thay cho triphosgen để hoàn tất quá trình carbamoyl hóa. Amin của oxazin có thể được alkyl hóa bằng alkyl halogenua được thể thích hợp như chất phản ứng iodo trong dung môi như NMP và bazơ vô cơ như K₂CO₃ ở nhiệt độ nằm trong khoảng 50-65°C để thu được hợp chất (3), sản phẩm của bước B. Theo cách khác, phản ứng Mitsunobu có thể được hoàn thành để alkyl hóa amin của oxazin sử dụng rượu thích hợp như MeOH. Các phản ứng Mitsunobu là đã biết trong lĩnh vực và có thể chuyển đổi nhóm hydroxyl thành nhóm rời chuyển mà nhóm này được dịch chuyển bởi nhiều chất ái nhân như carbamat sử dụng triphenylphosphin và azodicarboxylat như DIAD hoặc DEAD trong dung môi như THF để thu được hợp chất (3). Sulfite có thể được oxy hóa thành sulfon trong các điều kiện đã biết rõ trong lĩnh vực như *m*CPBA hoặc kali peroxymonosulfat

ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 25°C trong dung môi như ACN hoặc DCM để thu được hợp chất (4), sản phẩm của bước C.

Sơ đồ 2

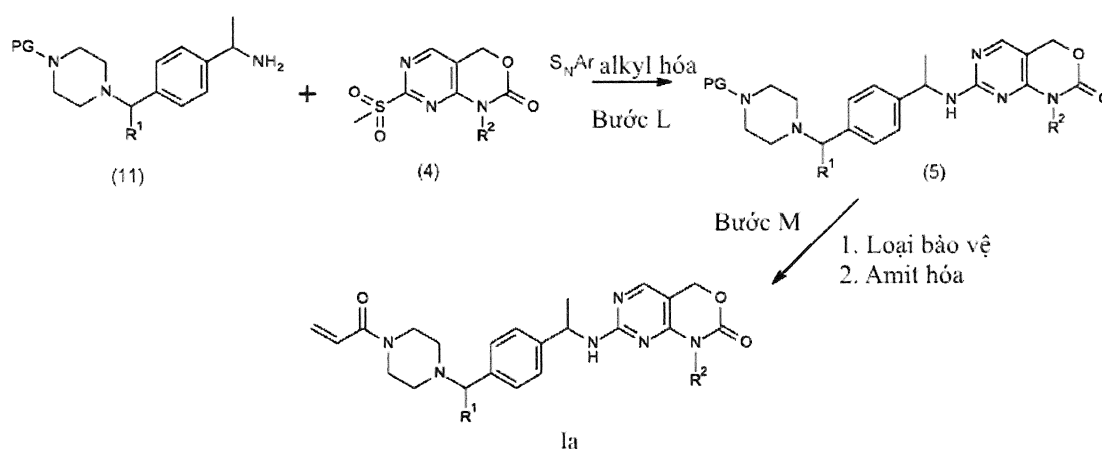


Trong sơ đồ 2, hợp chất (4-(1-aminoethyl)phenyl)methanol (7) có thể được tạo ra qua một số bước từ aryl halogenua như bromua (5) sử dụng các phương thức đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Amin có thể được bảo vệ trong bước phụ 1, bước D, trong đó “PG” là nhóm bảo vệ được khai triển đối với nhóm amino như amit. Aryl bromua được bảo vệ (5) có thể được chuyển đổi thành

keton trong điều kiện lithi carbonyl hóa để thu được aryl keton (6) trong bước phụ 2, bước D. Sau đó, keton có thể được khử sử dụng tác nhân khử như natri bohydrua trong dung môi như MeOH trong bước phụ 1, bước E. Amin có thể được loại bỏ bảo vệ ở bước này (phân bước 2, bước E) hoặc tại thời điểm sau trong quá trình tổng hợp để thu được hợp chất (7). Theo cách khác, hợp chất (6) có thể được chuyển đổi trực tiếp thành hợp chất (12) trong phản ứng amin khử sử dụng titan(IV) isopropoxit trong dung môi như THF và với việc gia nhiệt tới khoảng 60°C, tiếp theo bằng cách làm lạnh và bổ sung MeOH và tác nhân khử như natri xyanobo hydrua để thu được hợp chất (12). Hợp chất (7) có thể được chuyển đổi thành benzyl halogenua như clorua trong điều kiện halogen hóa chuẩn sử dụng chất halogen hóa như thionyl clorua hoặc POCl₃ trong dung môi như DCM để thu được hợp chất (10), bước I. Hợp chất (10) có thể được bảo vệ nếu cần thiết và được alkyl hóa trong bước J. Ví dụ, amin (10) có thể được bảo vệ trong bước phụ 1 của bước J sử dụng nhóm bảo vệ như trifloaxetyl hoặc CBZ. Các nhóm bảo vệ như vậy là biết rõ và hiểu rõ trong lĩnh vực này. Theo cách khác, hợp chất 10 có thể được điều chế từ aldehyt, hợp chất (8). Hợp chất (8) có thể được điều chế bằng phản ứng oxy hóa của rượu benzylic trong các điều kiện như Dess-Martin periodinan trong dung môi như DCM để thu được aldehyt (8). Phản ứng Grignard có thể được hoàn thành trong bước G trên aldehyt để thu được hợp chất (7). Hợp chất (7) từ bước G có thể được clo hóa trong bước H để thu được hợp chất (10) như đã thảo luận ở trên trong bước I. Clorua của hợp chất (10) có thể được chuyển đổi bằng piperazin được bảo vệ một lần trong theo phương thức 2 bước, một bình. Không phải lúc nào cũng nhất thiết phải bảo vệ 1-phenyletylamin nhưng nếu như việc bảo vệ được lựa chọn, thì tốt hơn là sử dụng nhóm bảo vệ khác trên 1-phenyletylamin so với sản phẩm piperazin amin (11), bước J, bước phụ 1, để loại bỏ bảo vệ một cách chọn lọc nhóm bảo vệ này hoặc nhóm bảo vệ khác tại bước mong muốn. Ví dụ, 1-phenyletylamin có thể được phản ứng với anhydrit trifloaxetic sử dụng bazơ hữu cơ như TEA trong dung môi như DCM ở nhiệt độ nằm trong khoảng 0-5°C để thu được sản phẩm amin bảo vệ của bước phụ 1, bước J. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu là các nhóm bảo vệ khác có thể được sử dụng trên amin như CBZ. Sau đó, việc chuyển đổi clorua có thể được hoàn thành trong các điều kiện đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, halogenua có thể được chuyển đổi

bằng piperazin được bảo vệ hoặc không được bảo vệ sử dụng bazơ vô cơ như K_2CO_3 và sử dụng KI, hoặc NaI làm chất xúc tác ái nhân để thúc đẩy nhanh phản ứng. Hỗn hợp có thể được gia nhiệt tới nhiệt độ khoảng 60-80°C trong dung môi như ACN để thu được hợp chất được bảo vệ (11) của bước phụ 2, bước J. Nhóm bảo vệ trên 1-phenyletylamin có thể được loại bỏ bằng bazơ như nước kali hydroxit để thu được hợp chất (11) của bước phụ 3, bước J.

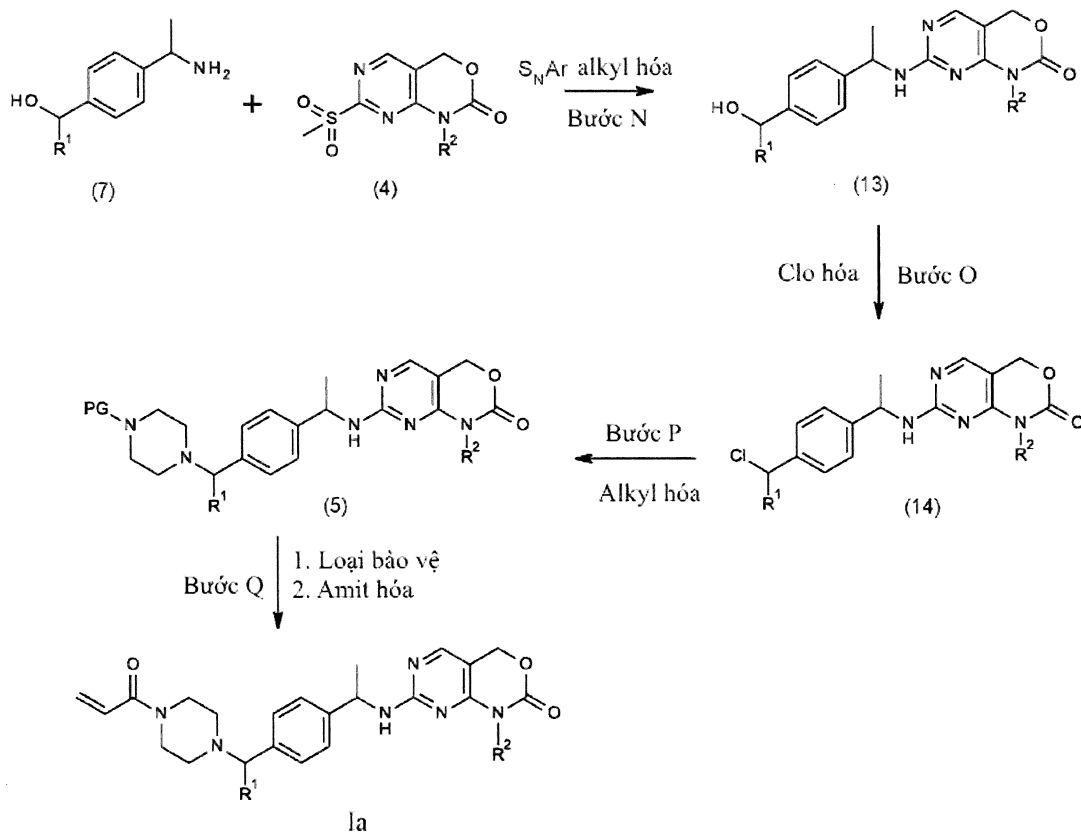
Sơ đồ 3



Trong sơ đồ 3, hợp chất (11) có thể được phản ứng với hợp chất (4), sơ đồ 1, trong phản ứng S_NAr sử dụng bazơ hữu cơ như DIPEA, CsF để thúc đẩy phản ứng, dung môi như DMSO, và nhiệt độ nằm trong khoảng 70-80°C để thu được sản phẩm của bước L. Trong bước M, bước phụ 1, piperazin được bảo vệ bởi *tert*-butoxy có thể được loại bỏ bảo vệ sử dụng axit như HCl trong dioxan và MeOH hoặc TFA trong DCM, trong khi đó piperazin được bảo vệ bởi alloc có thể được loại bỏ bảo vệ với sự có mặt của nguồn paladi như tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) xúc tác trong dung môi như THF sử dụng chất ái nhân mềm như dimedon để thu được piperazin được loại bỏ bảo vệ của bước phụ 1, bước M. Trong bước phụ 2, bước M, piperazin có thể được amit hóa bằng acryloyl clorua ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -50 đến -78 °C có hoặc không cần bazơ hữu cơ như TEA nếu như amin là muối axit trong dung môi như DCM để thu được hợp chất có công thức Ia. Theo cách khác, liên kết amit có thể được hoàn thành bằng axit acrylic và amin thích hợp trong dung môi như DMF cùng với tác nhân phản ứng liên kết như EDC và chất hỗ trợ như HOBt. Người có hiểu biết trung bình

trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ rằng có nhiều phương pháp và tác nhân phản ứng để tạo ra amit xuất phát từ phản ứng giữa các axit carboxylic và các amin. Ví dụ, phản ứng của amin thích hợp và axit acrylic với sự có mặt của chất phản ứng liên kết có hoặc không cần bazơ hữu cơ như DIPEA hoặc TEA có thể tạo ra hợp chất có công thức Ia. Các chất phản ứng liên kết khác bao gồm carbodiimide, như DCC, DIC, hoặc carbonyldiimidazol như CDI. Các chất hỗ trợ liên kết amit khác, như HOAt cũng có thể được sử dụng để tăng cường phản ứng. Ngoài ra, muối uroni hoặc phosphoni của các anion không ái nhân, như HBTU, HATU, PyBOP, và PyBrOP có thể được sử dụng thay cho các chất phản ứng kết hợp truyền thống hơn. Chất hỗ trợ như DMAP có thể được sử dụng để tăng cường phản ứng amit hóa mong muốn.

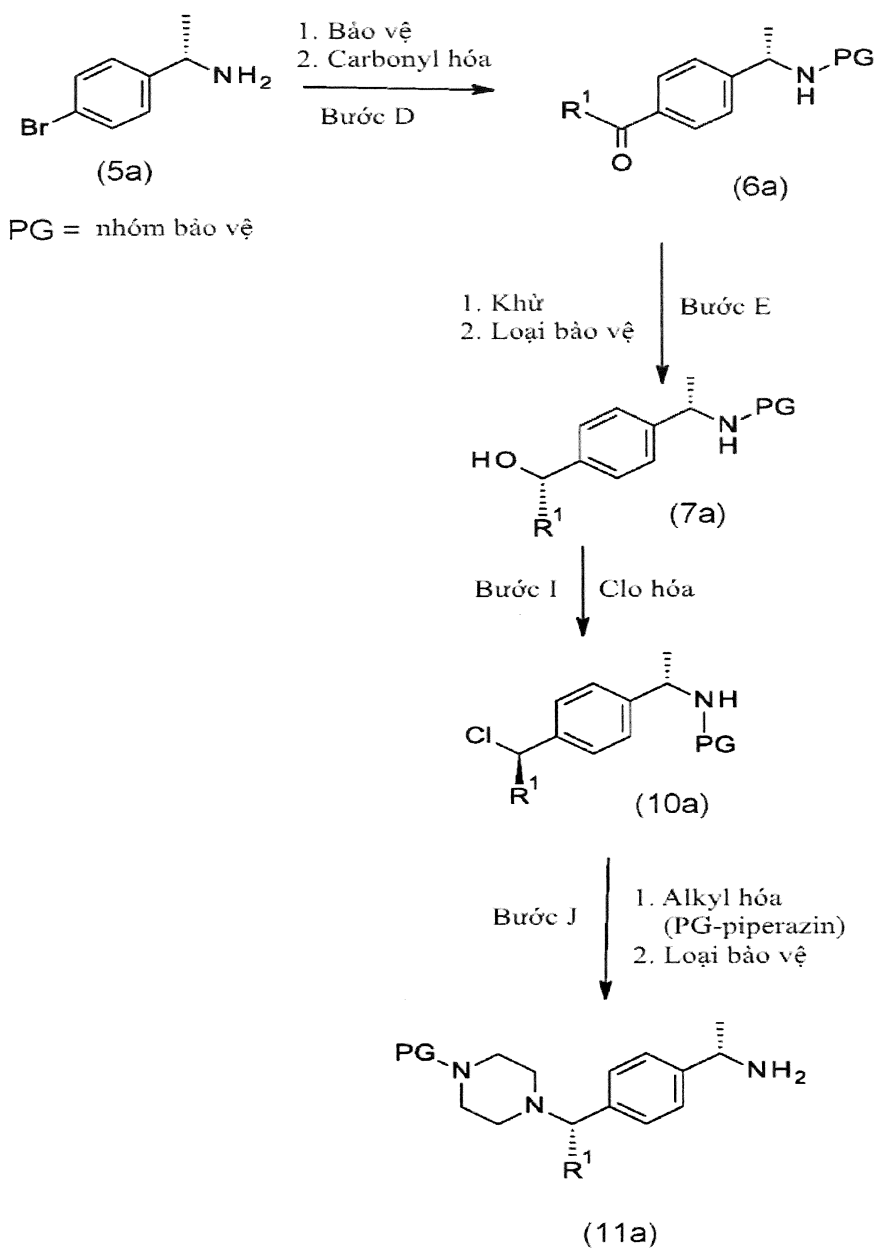
Sơ đồ 4



Theo cách khác trong sơ đồ 4, amin của sản phẩm được loại bỏ bảo vệ của hợp chất (7), sơ đồ 2 có thể được phản ứng với hợp chất (4) như được mô tả trong sơ đồ 3, bước L theo phản ứng S_NAr alkyl hóa để thu được hợp chất 13. Hydroxyl có thể được clo hóa như được mô tả trong bước I, sơ đồ 2 để thu được hợp chất 14, bước O. Clo

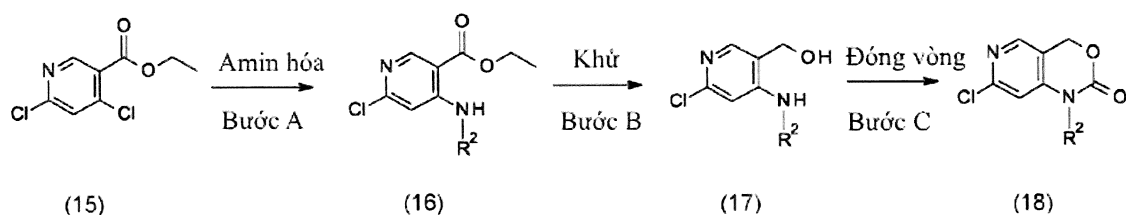
của hợp chất (14) có thể được chuyển đổi trong phản ứng alkyl hóa bằng piperazin như được mô tả trong sơ đồ 2, bước 11, bước phụ 2 để thu được hợp chất (5). Piperazin được bảo vệ có thể được loại bỏ bảo vệ và sau đó, piperazin được amit hóa như được mô tả trong sơ đồ 3, bước M để thu được hợp chất có công thức Ia.

Sơ đồ 5



Trong sơ đồ 5, hợp chất (4-(1-aminoethyl)phenyl)metanol không đối xứng (7a) có thể được tạo ra qua một số bước từ aryl halogenua không đối xứng như bromua (5a) sử dụng các phương thức đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Amin có thể được bảo vệ trong bước phụ 1, bước D, trong đó “PG” là nhóm bảo vệ được khai triển đối với nhóm amino như amit. Aryl bromua (5a) có thể được chuyển đổi thành keton trong điều kiện lithi carbonyl hóa để thu được aryl keton (6a) trong bước phụ 2, bước D. Sau đó, keton có thể được khử theo kiểu không đối xứng sử dụng tác nhân khử không đối xứng như (*R*)-RUCY-XylBINAP trong dung môi như EtOH để tạo ra hợp chất 7a trong bước phụ 1, bước E. Hợp chất (7a) có thể được chuyển đổi thành benzyl halogenua không đối xứng như clorua trong điều kiện halogen hóa chuẩn sử dụng chất halogen hóa như benzoyl clorua trong dung môi như *t*-butyl ete để thu được hợp chất (10a), bước I. Hợp chất (10a) trước tiên được phản ứng với piperazin được bảo vệ (PG-piperazin) với sự có mặt của bazơ như natri bicarbonat trong dung môi như axetonitril để thu được dạng được bảo vệ trong bước phụ 1, bước J. Dạng được bảo vệ sau đó được loại bỏ bảo vệ bằng bazơ như nước kali hydroxit trong dung môi như EtOH để tạo ra hợp chất (11a), bước phụ 2, bước J.

Sơ đồ 6



Trong sơ đồ 6, hàng loạt phản ứng dẫn tới hợp chất 7-clo-4H-pyrido[4,3-d][1,3]oxazin-2-on được thể tại vị trí 1 (18), sản phẩm của bước C trong đó, R² như được xác định ở trên. Ví dụ, ethyl 4,6-diclopyridin-3-carboxylat (15) có thể được phản ứng với amin trong các điều kiện chuẩn để thu được 6-clo-4-(amino)pyridin-3-carboxylat (16) trong dung môi như axetonitril. Quá trình khử nhóm este trong hợp

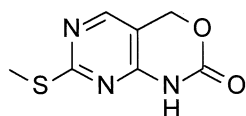
chất (16) sử dụng chất phản ứng hydrua như lithi nhôm hydrua trong dung môi như THF thu được (4-amino-6-clo-3-pyridyl)metanol (17). Hợp chất như 17 có thể được đóng vòng trong các điều kiện carbamoyl hóa chuẩn thành oxazin-2-on sử dụng triphosgen và bazơ hữu cơ như DIPEA hoặc TEA ở nhiệt độ khoảng -20°C để thu được hợp chất (18), sản phẩm của bước C. Theo cách khác, dihalogenua carbonyl hoặc di-pseudohalogenua carbonyl như CDI, phosgen, hoặc diphosgen có thể được sử dụng thay cho triphosgen để hoàn tất quá trình carbamoyl hóa. Hợp chất 11, được điều chế như thể hiện ở trên trong các sơ đồ 2 hoặc 5, hoặc như được mô tả trong các phương án khác với hai sơ đồ trên, có thể được phản ứng với hợp chất 18 trong các điều kiện alkyl hóa chuẩn. Sau đó, hợp chất trung gian thu được được loại bỏ bảo vệ và amit hóa như được mô tả ở trên trong các sơ đồ 3 hoặc 4 để thu được hợp chất có công thức I trong đó, X là CH.

Trong một bước tùy ý, muối được dụng của hợp chất có công thức I hoặc Ia có thể được tạo ra bằng phản ứng của bazơ tự do thích hợp có công thức I hoặc Ia với axit được dụng thích hợp trong dung môi thích hợp trong các điều kiện chuẩn. Ngoài ra, sự tạo ra các muối này có thể diễn ra đồng thời khi khử bảo vệ nhóm bảo vệ nitơ. Sự tạo ra các muối này đã được biết rõ và được hiểu rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem trong tài liệu Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*, 4: 427-435 (2000); và Berge, S.M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977). Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực sẽ hiểu rõ rằng, hợp chất có công thức I hoặc Ia dễ dàng được chuyển đổi thành và có thể được tách ở dạng muối được dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ điều chế 1

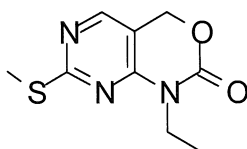
7-Metylsulfanyl-1,4-dihydropyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on



Triphosgen (859 g, 2,9 mol) được bổ sung vào dung dịch của (4-amino-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl)metanol (900 g, 5,26 mol) trong THF (22,5 L) trong 15 phút ở nhiệt độ -30°C . DIPEA (2,449 g, 18,92 mol) được bổ sung trong 1 giờ, trong khi duy trì nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ -35 đến -30°C . Sau đó, hỗn hợp phản ứng được rót lên nước đá (30 L) và 2-metyltetrahydrofuran (10 L) được bổ sung. Rửa pha hữu cơ bằng nước và nước muối. Làm khô pha hữu cơ bằng Na_2SO_4 và cô đặc tới trạng thái khô. Sản phẩm thô được tạo huyền phù đặc bằng ete dầu mỏ / EtOAc (1:1), lọc và cô đặc để thu được chất rắn màu vàng mà nó được tiếp tục không cần tinh chế thêm (890,5 g, 1,62 mol, độ tinh khiết 83%, hiệu suất 86%). MS (m/z): 198 (M+H).

Ví dụ điều chế 2

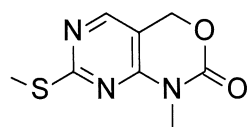
1-ethyl-7-(methylthio)-1,4-dihydro-2H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on



Bổ sung K_2CO_3 (294,2 g, 2,13 mol) và etyl iodua (336,3 g, 1,99 mol) ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch của 7-methylsulfanyl-1,4-dihydropyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on (280 g, 1,42 mol) trong NMP (2,24 L). Khuấy hỗn hợp trong 16 giờ ở nhiệt độ 50°C và tiếp theo, pha loãng bằng DCM (3 L) và nước (6 L). Pha hữu cơ được tách và rửa bằng nước và nước muối và được cô đặc tới trạng thái khô để thu được hợp chất thô nêu ở tiêu đề (286 g, 1,27 mol, độ tinh khiết 83%, hiệu suất 91%). MS (m/z): 226 (M+H).

Ví dụ điều chế 3

1-Metyl-7-methylsulfanyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on

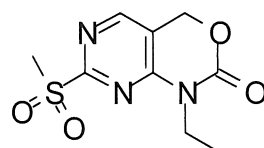


Bổ sung MeOH (0,248 mL, 6,08 mmol) tiếp theo bằng cách bổ sung từng giọt DIAD (1,21 mL, 6,08 mmol) ở nhiệt độ môi trường vào dung dịch của

triphenylphosphin (1,61 g, 6,08 mmol) và 7-metylsulfanyl-1,4-dihydropyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on (1,00 g, 5,07 mmol) trong THF (25 mL). Sau khi khuấy qua đêm, dung môi được loại bỏ trong chân không và dầu màu vàng tạo ra được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silicagel (40-50% EtOAc/hexan) để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng chất rắn màu trắng (1,08 g, 5,11 mmol, định lượng). MS (m/z): 212 (M+H).

Ví dụ điều chế 4

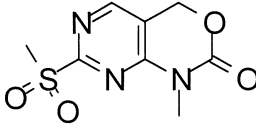
1-etyl-7-(metylsulfonyl)-1,4-dihydro-2H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on



Bổ sung kali peroxymonosulfat (1526 g, 2,48 mol) ở dạng rắn trong thời gian 20 phút vào dung dịch được khuấy của 1-etyl-7-(metylthio)-1,4-dihydro-2H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on (286 g, 1,24 mol) trong ACN (2,8 L) và nước (1,4 L) và hỗn hợp tạo ra được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ 10-20 °C. Hỗn hợp phản ứng được lọc và bánh lọc thu được được rửa bằng DCM. Dịch lọc kết hợp và DCM được rửa bằng 5% Na₂SO₃, nước và nước muối. Làm khô pha hữu cơ bằng Na₂SO₄ và cô đặc để tạo ra hợp chất nêu ở tiêu đề (133,8 g, độ tinh khiết 93%, hiệu suất 41%). MS (m/z): 258 (M+H).

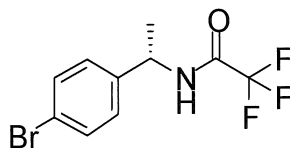
Hợp chất sau cơ bản được điều chế bằng phương của ví dụ điều chế 4.

Bảng 1

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
5	1-Metyl-7-metylsulfonyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on		244

Ví dụ điều chế 6

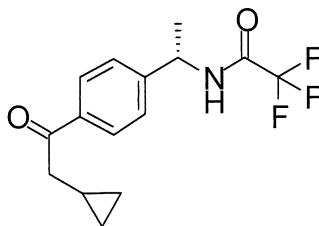
N-[(1*S*)-1-(4-Bromophenyl)ethyl]-2,2,2-triflo-axetamit



Anhydrit trifloaxetic (165 mL, 1,17 mol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch của (1*S*)-1-(4-bromophenyl)etanamin (213 g, 1,06 mol) trong ACN (1,3 L) ở nhiệt độ 5°C tiếp theo bằng cách bổ sung từng giọt TEA (326 mL, 2,34 mol) trong 1 giờ. Sau 30 phút, nước (3 L) và nước muối (1 L) được bổ sung dẫn đến sự hình thành chất kết tủa không màu. Huyền phù đặc được khuấy trong 15 phút và sau đó, chất rắn được lọc, được rửa bằng nước và hexan, và làm khô bằng dòng không khí tiếp theo bằng cách làm khô ở nhiệt độ 40°C trong chân không để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (290 g, 92%). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 1,44 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 4,98 (dddd, 1H, *J* = 7,6, 7,1, 7,1, 7,1 Hz), 7,30 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,55 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 9,91 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz).

Ví dụ điều chế 7

N-[(1*S*)-1-[4-(2-xyclopropylaxetyl)phenyl]ethyl]-2,2,2-triflo-axetamit

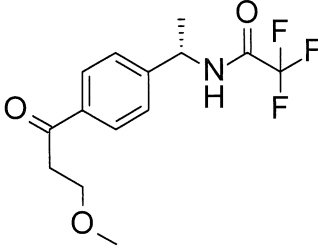


n-Butyl lithi (2,5 M trong hexan, 53 mL, 130 mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch của *N*-[(1*S*)-1-(4-bromophenyl)ethyl]-2,2,2-triflo-axetamit (18,00 g, 60,79 mmol) trong THF (600 mL) ở nhiệt độ -78°C nhằm để duy trì nhiệt độ bên trong ở dưới -70°C. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp trong 45 phút ở nhiệt độ -78°C và sau đó, 2-xyclopropyl-*N*-metoxy-*N*-metyl-axetamit (11,4 g, 79,6 mmol) được bổ sung ở dạng dung dịch trong THF (10 mL). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ -78°C trong 45 phút, dung dịch nước amoni clorua bão hòa được bổ sung, và làm ấm hỗn hợp

lên nhiệt độ trong phòng. Các lớp được tách và làm khô lớp hữu cơ bằng natri sulfat khan, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung một lượng nhỏ DCM vào chất rắn và gia nhiệt hỗn hợp nhanh để hòa tan các chất rắn. Cô đặc hỗn hợp ngay trước khi kết tủa và sau đó, bổ sung hexan (150 mL) từng giọt kết hợp với khuấy mạnh để thu được chất rắn không màu. Chất rắn được tập hợp bằng cách lọc, rửa bằng một lượng nhỏ hexan, và làm khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (13,82 g, 76%) ở dạng chất rắn không màu. MS (m/z): 298,3 (M-H).

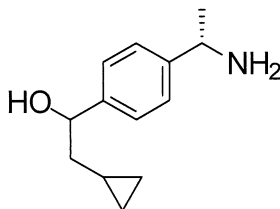
Hợp chất sau cơ bản được điều chế bằng phương của ví dụ điều chế 7.

Bảng 2

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
8	2,2,2-Triflo-N-[(1S)-1-[4-(3-metoxypropanoyl)phenyl]ethyl]axetamit,		304

Ví dụ điều chế 9

1-[4-[(1S)-1-Aminoethyl]phenyl]-2-cyclopropyl-ethanol

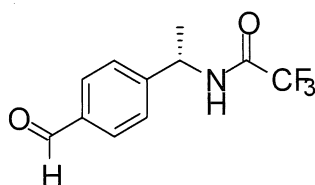


Natri bohđrua (0,1411 g, 2 đương lượng, 3,729 mmol,) được bổ sung vào dung dịch của N-[(1S)-1-[4-(2-cyclopropylaxetyl)phenyl]etyl]-2,2,2-triflo-axetamit (558 mg, 1,86 mmol) trong MeOH (15 mL) được làm lạnh trong chậu nước đá. Khuấy hỗn

hợp trong khoảng 2,5 giờ, và sau đó, bổ sung kali hydroxit (800 mg, 14,2 mmol) trong nước (3 mL). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 20 giờ. Cô đặc hỗn hợp và phân tách thành DCM và nước. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (354 mg, 1,38 mmol, 74%) ở dạng chất rắn màu trắng. Chất liệu này được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. ES/MS (m/z): 189,0 (M-OH).

Ví dụ điều chế 10

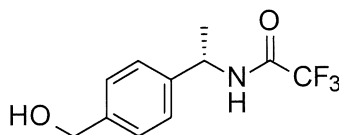
2,2,2-Triflo-N-[(1S)-1-(4-formylphenyl)ethyl]axetamit



Dess-Martin periodinan (20,9 g, 49,3 mmol) được bổ sung vào dung dịch ở nhiệt độ 0°C của 2,2,2-triflo-N-[(1S)-1-[4-(hydroxymethyl)phenyl]ethyl]axetamit (11,1 g, 44,9 mmol) trong DCM (450 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm và để làm ấm lên nhiệt độ trong phòng. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM bổ sung và rửa bằng dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa, dung dịch nước Na₂S₂O₃ bão hòa, và nước muối. Làm khô các phần hữu cơ kết hợp (Na₂SO₄), lọc và cô đặc để thu được phần cặn còn lại mà phần này được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silicagel, rửa giải bằng gradient EtOAc/hexan 0-50% để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng chất rắn màu trắng (9,5 g, 39 mmol, 86%). ES/MS (m/z): 244 (M-H).

Ví dụ điều chế 10a

2,2,2-Triflo-N-[(1S)-1-[4-(hydroxymethyl)phenyl]ethyl]axetamit

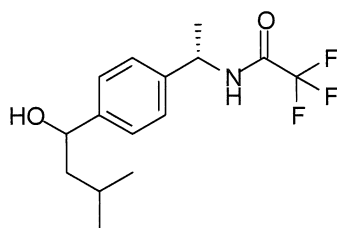


Anhydrit trifloaxetic (12 mL, 85,4 mmol) được bổ sung vào dung dịch ở nhiệt độ 0°C của [4-[(1S)-1-aminoethyl]phenyl]metanol (10,8 g, 71,4 mmol) trong CH₂Cl₂ (150 mL). Sau 10 phút, triethylamin (24 mL, 172 mmol) trong CH₂Cl₂ (8 mL) được bổ

sung từng giọt trong 30 phút, chậu làm lạnh được loại bỏ và phản ứng được khuấy qua đêm. Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong chân không, pha loãng bằng CH_2Cl_2 bổ sung thêm, và rửa bằng dung dịch nước HCl 1N và nước. Làm khô pha hữu cơ (Na_2SO_4), lọc và cô đặc. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silicagel, rửa giải bằng gradient EtOAc/hexan 0-50% để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng chất rắn màu trắng (11,1 g, 44,9 mmol, 63%). ES/MS (m/z): 246 (M-H).

Ví dụ điều chế 11

2,2,2-Triflo-N-[(1S)-1-[4-(1-hydroxy-3-metyl-butyl)phenyl]etyl]axetamit



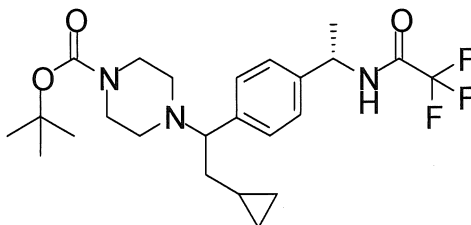
Bổ sung isobutylmagie bromua (2 M trong dietyl ete, 7,0 mL, 14,0 mmol) vào dung dịch của 2,2,2-triflo-N-[(1S)-1-(4-formylphenyl)etyl]axetamit (1,72 g, 7,01 mmol) trong THF (35 mL) làm lạnh trong chậu nước đá và khuấy trong khoảng 30 phút. Làm dừng hỗn hợp bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa và phân tách thành EtOAc và nước. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng dầu (1,40 g, 4,15 mmol, 59%) dầu này được sử dụng không cần tinh chế thêm. ES/MS (m/z): 302,0 (M-H).

Hợp chất sau cơ bản được điều chế bằng phương của ví dụ điều chế 11.

Bảng 3

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
12	2,2,2-triflo-N-[(1S)-1-[4-(1-hydroxypropyl)phenyl]etyl]axetamit		293 (M+NH ₄)

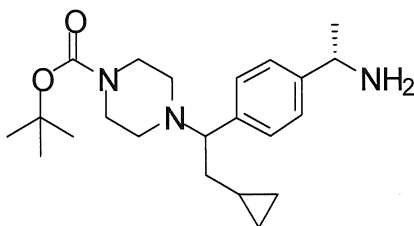
Ví dụ điều chế 13

tert-Butyl4-[2-xyclopropyl-1-[4-[(1*S*)-1-[(2,2,2-trifloaxetyl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat

Titan(IV) isopropoxit (60 mL, 200 mmol) được bổ sung vào dung dịch của *N*-[(1*S*)-1-[4-(2-xyclopropylaxetyl)phenyl]etyl]-2,2,2-triflo-axetamit (12,0 g, 40,1 mmol) và *tert*-butyl piperazin-1-carboxylat (17,9 g, 96,1 mmol) trong THF (80 mL) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 60°C qua đêm. Làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng và MeOH (80 mL) được bổ sung, tiếp theo bằng cách bổ sung từng phần natri xyanobohydrua (5,3 g, 80 mmol). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 8 giờ và sau đó, bổ sung nước và MeOH và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Lọc hỗn hợp để lấy ra chất rắn và rửa chất rắn bằng MeOH và nước. Cô đặc một phần dịch lọc để loại bỏ hầu hết MeOH và chiết phần cặn còn lại bằng EtOAc (2×). Làm khô các phần chiết hữu cơ kết hợp trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Nguyên liệu thô được tinh chế thông qua phương pháp sắc ký cột, rửa giải bằng gradient EtOAc 0% đến 30% trong dung môi B, trong đó dung môi B là hexan:DCM tỷ lệ 1:1 để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (10,5 g, 56%) ở dạng chất rắn không màu. MS (*m/z*): 470,3 (*M*+*H*).

Ví dụ điều chế 14

tert-Butyl4-[1-[4-[(1*S*)-1-aminoetyl]phenyl]-2-xyclopropyl-etyl]piperazin-1-carboxylat

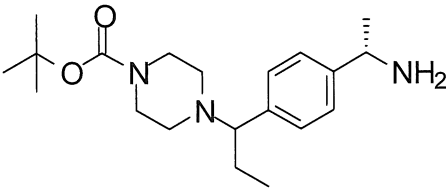


Dung dịch nước kali hydroxit (5 M, 69 mL, 350 mmol) được bổ sung vào dung dịch của *tert*-butyl 4-[2-xyclopropyl-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifloaxetyl)amino]etyl]phenyl]etyl] piperazin-1-carboxylat (32,24 g, 68,67 mmol) trong EtOH (350 mL) và hỗn hợp tạo ra được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. EtOH được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm và bổ sung dung dịch nước natri bicarbonat bão hòa vào phần cặn còn lại và chiết hỗn hợp bằng DCM. Làm khô các phần chiết hữu cơ kết hợp trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (24,33 g, độ tinh khiết 96,5% chứa 3,5% DCM dư, hiệu suất 92%) ở dạng dầu nhớt không màu. MS (m/z): 374,3 (M+H).

Hợp chất sau cơ bản được điều chế bằng phương của ví dụ điều chế 14.

Bảng 4

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
15	<i>tert</i> -Butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-aminoetyl]phenyl]-3-metyl-butyl]piperazin-1-carboxylat		376
16	<i>tert</i> -Butyl 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-aminoetyl]phenyl]propyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân 1		348

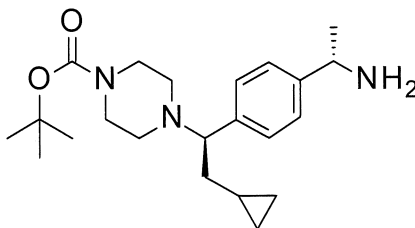
Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
17	<i>tert</i> -Butyl 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-aminoethyl]phenyl]propyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân 2		348

Ví dụ điều chế 14 khác

Dung dịch của kali hydroxit (1,28 g, 22,9 mmol) trong nước (4 mL) được bổ sung vào dung dịch của *tert*-butyl 4-[2-xyclopropyl-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifloaxetyl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat (2,15 g, 4,58 mmol) trong EtOH (23 mL) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng. Sau khoảng 6 giờ, cô đặc hỗn hợp. Phân tách phần cặn còn lại thành DCM và dung dịch natri bicarbonat bão hòa. Rửa lớp hữu cơ bằng nước và dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng dầu mà dầu này được sử dụng không cần tinh chế (1,73 g, 4,49 mmol, 98%). ES/MS (m/z): 374,2 (M+H).

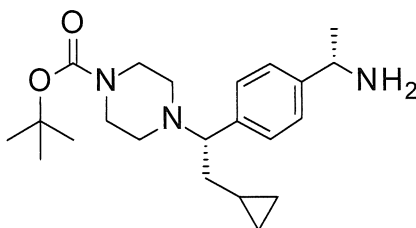
Ví dụ điều chế 18

tert-Butyl 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-aminoethyl]phenyl]-2-xyclopropyl-etyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 1



Ví dụ điều chế 19

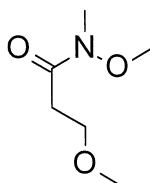
tert-Butyl 4-[(1*S*)-1-[4-[(1*S*)-1-aminoethyl]phenyl]-2-xyclopropyl-ethyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 2



Hỗn hợp tỷ lệ 1:1 của *tert*-butyl 4-[(1*R*)-1-[4-[(1*S*)-1-aminoethyl]phenyl]-2-xyclopropyl-ethyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 1 và *tert*-butyl 4-[(1*S*)-1-[4-[(1*S*)-1-aminoethyl]phenyl]-2-xyclopropyl-ethyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 2 (3,23 g) được hòa tan trong MeOH (40 mL) và được phân tách thành các chất đồng phân không đối quang riêng biệt bằng phương pháp HPLC điều chế không đối xứng sử dụng các điều kiện sau: cột Chiralpak AD, 20 μ m, (8 x 33 cm); thể tích bơm 10 mL; dung môi rửa giải 100% MeOH với 0,2% DMEA; bước sóng phát hiện 220 nm; tốc độ dòng 400 mL/phút. Ví dụ điều chế 12, *tert*-butyl 4-[(1*R*)-1-[4-[(1*S*)-1-aminoethyl]phenyl]-2-xyclopropyl-ethyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 1, thu được từ đỉnh rửa giải thứ nhất ở dạng dầu nhớt trong suốt (1,50 g, 46%, >99% de). MS (*m/z*): 374,3 (*M*+*H*). Ví dụ điều chế 13, *tert*-butyl 4-[(1*S*)-1-[4-[(1*S*)-1-aminoethyl]phenyl]-2-xyclopropyl-ethyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 2, thu được từ đỉnh rửa giải thứ hai ở dạng dầu nhớt trong suốt (1,46 g, 45%, >98,2% de). MS (*m/z*): 374,3 (*M*+*H*).

Ví dụ điều chế 20

N,3-Dimethoxy-*N*-metyl-propanamit

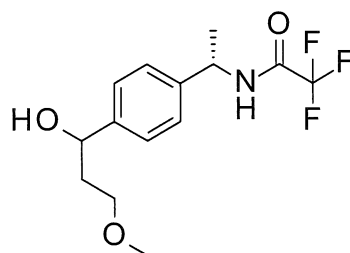


Dung dịch của axit 3-metoxypromanoic (62 g, 577,7 mmol) trong DCM (1200

mL) được xử lý từng phần từ từ bằng 1,1'-carbonyldiimidazol (103 g, 635,2 mmol) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. *N,O*-dimethylhydroxylamin hydroclorua (62 g, 635,6 mmol) được bổ sung và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Rửa hỗn hợp bằng nước (2×), dung dịch nước HCl 0,1M (2×), và bằng dung dịch nước natri bicarbonat bão hòa (2×), làm khô trên magie sulfat, lọc và cô đặc tới trạng thái khô để thu được nguyên liệu thô. Nguyên liệu thô được tiến hành sắc ký trên silicagel, rửa giải bằng gradient axeton 20-40% trong hexan. Làm khô dầu thu được qua đêm trong chân không để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (69,5g, 81,7%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 2,72 (t, 2H), 3,2 (s, 3H), 3,38 (s, 3H), 3,7 (m, 5H).

Ví dụ điều chế 21

2,2,2-Triflo-*N*-[(1*S*)-1-[4-(1-hydroxy-3-metoxi-propyl)phenyl]etyl]axetamit

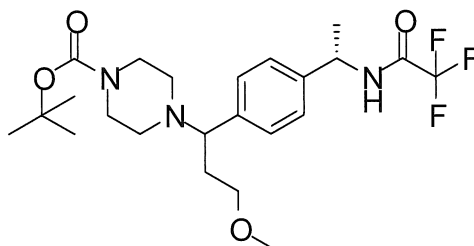


Hòa tan 2,2,2-triflo-*N*-[(1*S*)-1-[4-(3-metoxipropanoyl)phenyl]etyl]axetamit (23,62 g, 73,98 mmol, 95% khối lượng) trong MeOH (700 mL) và xử lý bằng natri bohydrua (5,6 g, 150 mmol). Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa và MeOH được làm bay hơi. Phân tách nguyên liệu thu được thành nước và EtOAc, tách riêng và làm khô các phần hữu cơ kết hợp trên Na_2SO_4 , lọc và cô đặc tới trạng thái khô. Nguyên liệu thô được tiến hành sắc ký trên silicagel, rửa giải bằng EtOAc 40% trong hexan để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng chất rắn màu trắng (17,82g, 79%). MS (m/z): 306 ($M+H$).

Ví dụ điều chế 22

tert-Butyl

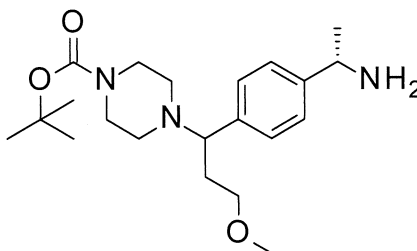
4-[3-metoxi-1-[4-[(1*S*)-1-[(2,2,2-trifloaxetyl)amino]etyl]]phenyl]propyl]piperazin-1-carboxylat



Hòa tan 2,2,2-triflo-*N*-[(1*S*)-1-[4-(1-hydroxy-3-metoxi-propyl)phenyl]etyl]axetamit (21,76g, 71,27 mmol) trong DCM (350mL) và làm lạnh xuống -10°C. Bổ sung thionyl clorua (26,12 g, 16 mL, 219,6 mmol) từng giọt và khuấy phản ứng trong 2 giờ. Cô đặc hỗn hợp tới trạng thái khô, hòa tan lại trong DCM, và lại được cô đặc. Hòa tan nguyên liệu thô trong ACN (300 mL) và bổ sung *t*-butyl piperazin-1-carboxylat (26,55 g, 142,6 mmol), kali carbonat (39,5 g, 286 mmol) và kali iodua (12,0 g, 72,3 mmol) vào đó. Gia nhiệt hỗn hợp đến 80°C trong 72 giờ. Lọc chất rắn màu trắng thu được và rửa bằng EtOAc. Rửa các phần dịch lọc kết hợp bằng dung dịch nước amoni clorua, làm khô trên magie sulfat, lọc và cô đặc. Nguyên liệu thô được tiến hành sắc ký trên silicagel, rửa giải bằng gradient EtOAc 40-80% trong hexan để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng bột màu trắng (29,63g, 88%). MS (*m/z*): 474 (*M*+*H*).

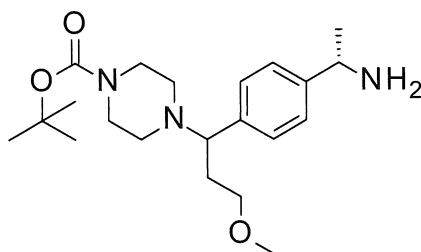
Ví dụ điều chế 23

tert-Butyl 4-[1-[4-(1*S*)-1-aminoetyl]phenyl]-3-metoxi-propyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 1



Ví dụ điều chế 24

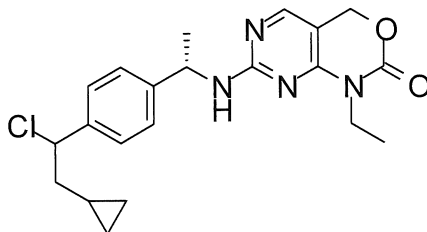
tert-Butyl 4-[1-[4-(1S)-1-aminoethyl]phenyl]-3-metoxy-propyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 2



Bổ sung dung dịch nước kali hydroxit (63 mL, 5 M) vào dung dịch của *tert*-butyl 4-[3-metoxy-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifluoroacetyl)amino]-ethyl]propyl]piperazin-1-carboxylat (29,60 g, 62,5 mmol) trong EtOH (310 mL). Khuấy dung dịch trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó, cô đặc hỗn hợp tới trạng thái khô. Phần cặn thô còn lại được xử lý bằng nước và dung dịch nước natri bicarbonat bão hòa và chiết bằng DCM (3×). Làm khô các phần chiết hữu cơ kết hợp trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (23,6g), hợp chất này được hòa tan trong MeOH (236 mL) và tách riêng thành các chất đồng phân không đối quang riêng biệt bằng phương pháp sắc ký SFC không đối xứng sử dụng các điều kiện sau: cột: Lux Cellulose- 1, (5 x 25 cm); thể tích bơm: 1 mL cứ mỗi 2,5 phút, dung môi rửa giải 15% MeOH/CO₂, bước sóng phát hiện 230 nm; tốc độ dòng 300 g/phút; nhiệt độ cột: 40°C; điểm thiết đặt BPR: 100 bar; nhiệt độ BPR: 40°C. Hợp chất nêu ở tiêu đề của ví dụ điều chế 28 thu được từ đỉnh rửa giải thứ nhất ở dạng dầu nhớt màu vàng trong suốt (10,1 g, 42,8%, 96,6% de). MS (m/z): 378 (M+H). Hợp chất của ví dụ điều chế 29 được phân lập tại đỉnh rửa giải thứ hai ở dạng dầu nhớt màu vàng trong suốt (10,3 g, 43,6%, 95,2% de). MS (m/z): 378 (M+H).

Ví dụ điều chế 25

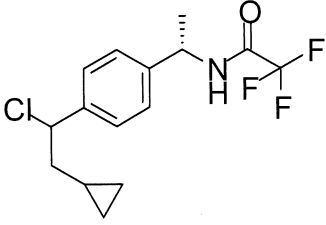
7-[[[(1S)-1-[4-(1-clo-2-xyclopropyl-etyl)phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on

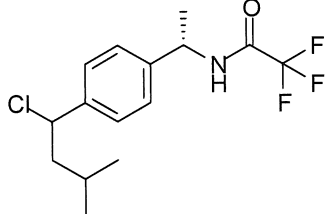
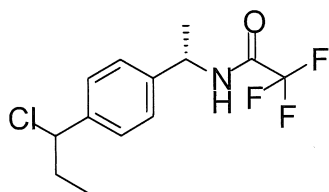


Thionyl clorua (0,23 mL, 3,219 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp của 7-[[[(1S)-1-[4-(2-xyclopropyl-1-hydroxy-etyl)phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on (432 mg, 1,03 mmol) và kali carbonat (741 mg, 5,37 mmol) trong DCM (20 mL) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Lọc hỗn hợp qua đất tảo cát và cô đặc để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (518 mg, 1,07 mmol, 100%) ở dạng bột màu trắng, hợp chất này được sử dụng không cần tinh chế thêm. ES/MS (m/z): 401,2/403,2 (M+H).

Các hợp chất sau được điều chế cơ bản theo phương pháp trong ví dụ điều chế 25.

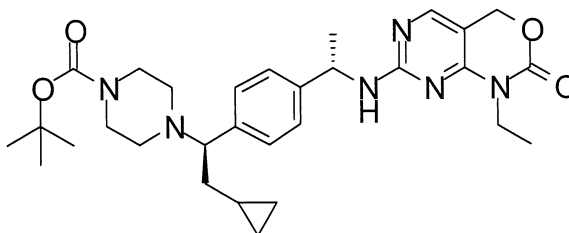
Bảng 5

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
26	N-[(1S)-1-[4-(1-clo-2-xyclopropyl-etyl)phenyl]etyl]-2,2,2-triflo-axetamit		318

27	N-[(1S)-1-[4-(1-clo-3-metyl-butyl)phenyl]etyl]-2,2,2-triflo-axetamit		320
28	N-[(1S)-1-[4-(1-clopropyl)phenyl]etyl]-2,2,2-triflo-axetamit		311 (M+NH ₄)

Ví dụ điều chế 29

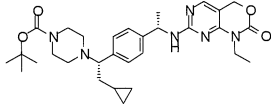
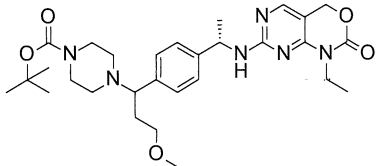
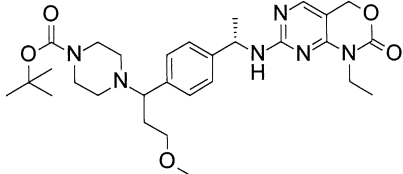
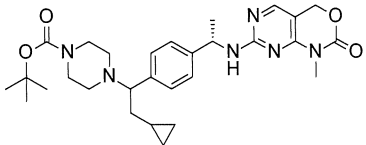
tert-Butyl 4-[(1R)-2-xyclopropyl-1-[4-[(1S)-1-[(1-etyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat

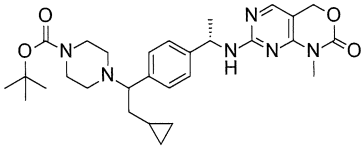
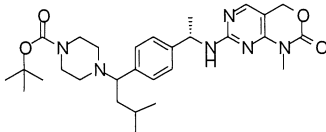
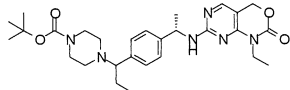
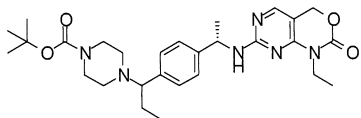
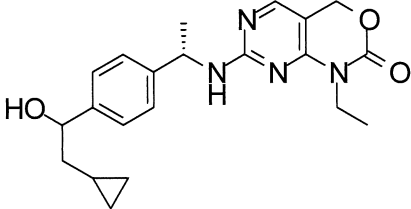


Bổ sung CsF (1,39 g, 9,15 mmol) và DIPEA (0,80 mL, 4,6 mmol) vào dung dịch của *tert*-butyl 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-aminoetyl]phenyl]-2-xyclopropyl-etyl]piperazin-1-carboxylat (864 mg, 3,35 mmol), và 1-etyl-7-(metylsulfonyl)-1,4-dihydro-2H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on (1,14 g, 3,05 mmol), trong DMSO (15 mL). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 60°C trong 1,5 giờ. Làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng, pha loãng bằng EtOAc, và rửa bằng nước (2×). Chiết các phần nước rửa kết hợp bằng EtOAc và làm khô các phần chiết hữu cơ kết hợp (Na₂SO₄), lọc và cô đặc tới trạng thái khô. Sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silicagel, rửa giải bằng gradient EtOAc 55% đến 95% trong hexan để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (1,47 g, 88%). MS (m/z): 551,3 (M+H).

Các hợp chất sau được điều chế cơ bản theo phương pháp trong ví dụ điều chế 29.

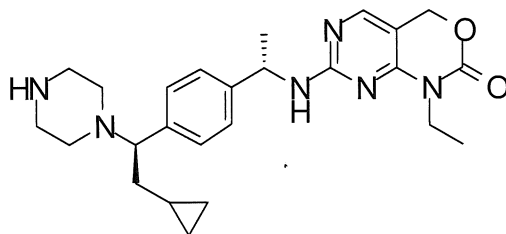
Bảng 6

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
30	<i>tert</i> -Butyl 4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-[4-[(1S)-1-[(1-etyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat,		551
31	<i>tert</i> -Butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-etyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]-3-metoxypropyl]piperazin-1-carboxylat (chất đồng phân không đối quang 1)		555
32	<i>tert</i> -Butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-etyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]-3-metoxypropyl]piperazin-1-carboxylat (chất đồng phân không đối quang 2)		555
33	<i>tert</i> -Butyl 4-[2-xyclopropyl-1-[4-[(1S)-1-[(1-metyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat (chất đồng phân không đối quang 1)		537

34	<i>tert</i> -Butyl 4-[2-xyclopropyl-1-[4-[(1 <i>S</i>)-1-[(1-metyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat (chất đồng phân không đối quang 2)		537
35	<i>tert</i> -Butyl 4-[1-[4-[(1 <i>S</i>)-1-[(1-etyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]-3-metyl-butyl]piperazin-1-carboxylat		553
36	<i>tert</i> -Butyl 4-[(1 <i>R/S</i>)-1-[4-[(1 <i>S</i>)-1-[(1-etyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]propyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân 1		525
37	<i>tert</i> -Butyl 4-[(1 <i>R/S</i>)-1-[4-[(1 <i>S</i>)-1-[(1-etyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]propyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân 2		525
38	7-[[[(1 <i>S</i>)-1-[4-(2-xyclopropyl-1-hydroxy-etyl)phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on		383

Ví dụ điều chế 39

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-xyclopropyl-1-piperazin-1-yl-etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on



Axit clohydric (95 mL, 5,5 M trong isopropanol, 520 mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch của *tert*-butyl 4-[(1R)-2-xyclopropyl-1-[4-[(1S)-1-[(1-etyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat (29,45 g, 53,48 mmol) trong EtOAc (570 mL) ở 40°C. Khuấy hỗn hợp 3 giờ, ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó bổ sung nước (300 mL) vào đó. Tách riêng các lớp và chiết lớp hữu cơ bằng nước (2 × 150 mL). Độ pH của các phần chiết nước kết hợp được điều chỉnh tới pH 10 bằng cách bổ sung NaOH 5N dẫn đến sự hình thành chất rắn không màu. Chất rắn được tập hợp bằng cách lọc, được rửa bằng nước, và làm khô bằng không khí để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (25,18 g, 99%) ở dạng chất rắn không màu. MS (m/z): 451,2 (M+H).

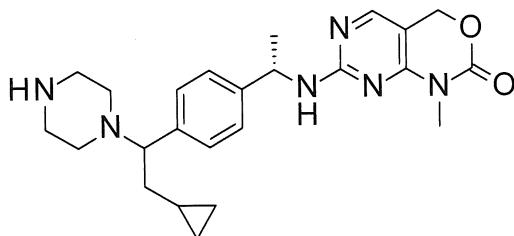
Hợp chất sau cơ bản được điều chế bằng phương của ví dụ điều chế 39.

Bảng 7

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
40	7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-piperazin-1-yl-etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on		451

Ví dụ điều chế 41

7-[[[(1S)-1-[4-(2-xyclopropyl-1-piperazin-1-yl-etyl)phenyl]etyl]amino]-1-metyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân không đối quang 1

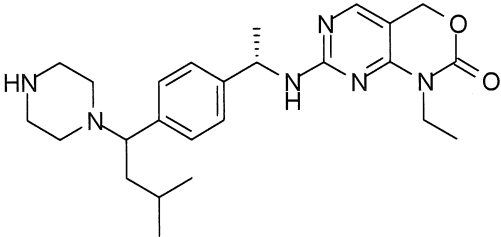
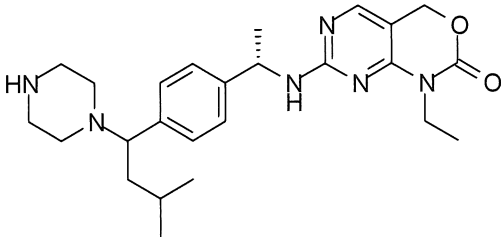
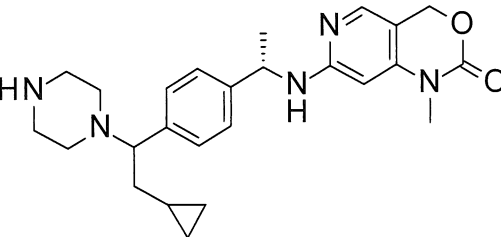
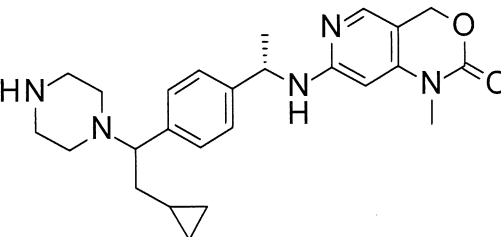
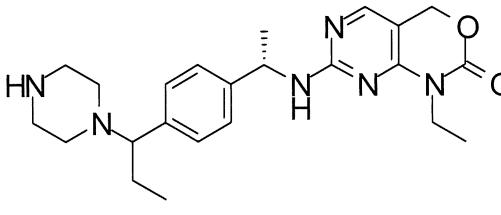


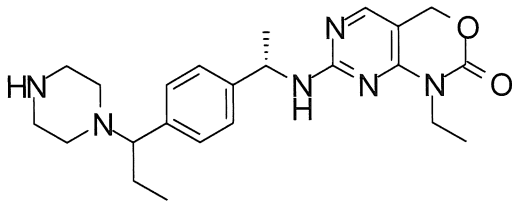
tert-Butyl 4-[2-xyclopropyl-1-[4-[(1S)-1-[(1-metyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 1 (245 mg, 0,46 mmol) được hòa tan trong DCM (2,5 mL). TFA (0,7 mL, 9 mmol) được bổ sung và phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 90 phút. Làm dừng hỗn hợp bằng dung dịch nước K₂CO₃ 20% và chiết bằng DCM (3×). Làm khô các phần chiết hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄, lọc và cô đặc tới trạng thái khô trong môi trường chân không cao qua đêm để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng bột màu trắng, (196 mg, 88,5%). MS (m/z): 437 (M+H).

Các hợp chất sau được điều chế cơ bản theo phương pháp trong ví dụ điều chế 41.

Bảng 8

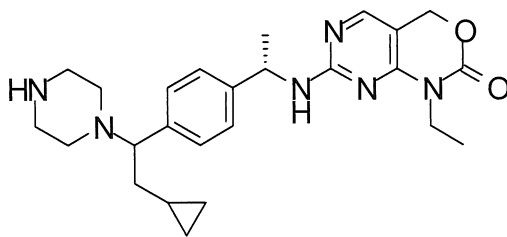
Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
42	7-[[[(1S)-1-[4-(2-xyclopropyl-1-piperazin-1-yl-etyl)phenyl]etyl]amino]-1-metyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân không đối quang 2		437

43	1-etyl-7-[[[(1S)-1-[4-(3-metyl-1-piperazin-1-yl-butyl)phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 1		453
44	1-etyl-7-[[[(1S)-1-[4-(3-metyl-1-piperazin-1-yl-butyl)phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 2		453
45	7-[[[(1S)-1-[4-(2-xyclopropyl-1-piperazin-1-yl-etyl)phenyl]etyl]amino]-1-metyl-4H-pyrido[4,3-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 1		436
46	7-[[[(1S)-1-[4-(2-xyclopropyl-1-piperazin-1-yl-etyl)phenyl]etyl]amino]-1-metyl-4H-pyrido[4,3-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 2		436
47	1-etyl-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-piperazin-1-ylpropyl]phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 1		425

48	1-ethyl-7-[[[(1S)-1-[4- [(1R/S)-1-piperazin-1-ylpropyl]phenyl]ethyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 2		425
----	--	--	-----

Ví dụ điều chế 49

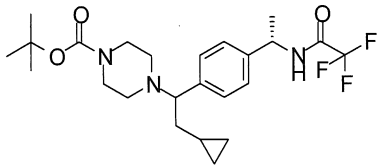
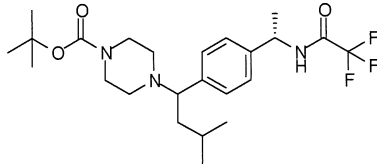
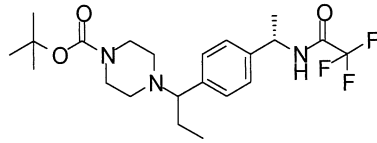
7-[[[(1S)-1-[4-(2-cyclopropyl-1-piperazin-1-yl-ethyl)phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on



Hỗn hợp của 7-[[[(1S)-1-[4-(1-clo-2-cyclopropyl-ethyl)phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on (518 mg, 1,07 mmol), kali carbonat (445 mg, 3,217 mmol), natri iodua (161 mg, 1,07 mmol) và piperazin (277 mg, 3,22 mmol) trong ACN (3 mL) được gia nhiệt trong một lọ gắn kín tới 70°C. Sau ~8 giờ, làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng, pha loãng bằng EtOAc, lọc qua đất tảo cát, và cô đặc. Nguyên liệu thô được tinh chế trên silicagel, rửa giải bằng gradient NH₃/MeOH từ 1% đến 7% 3M trong DCM để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (306 mg, 0,66 mmol, 62%) ở dạng chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 451,2 (M+H).

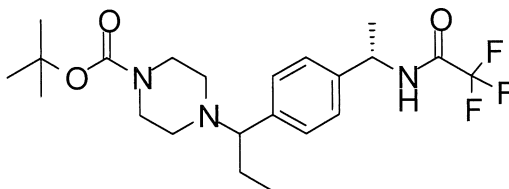
Các hợp chất sau được điều chế cơ bản theo phương pháp trong ví dụ điều chế 49 sử dụng piperazin được bảo vệ thích hợp.

Bảng 9

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
50	<i>tert</i> -Butyl 4-[2-xyclopropyl-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifloaxetyl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat		470
51	<i>tert</i> -Butyl 4-[3-metyl-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifloaxetyl)amino]etyl]phenyl]butyl]piperazin-1-carboxylat		472
52	<i>tert</i> -Butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifloaxetyl)amino]etyl]phenyl]propyl]piperazin-1-carboxylat		444

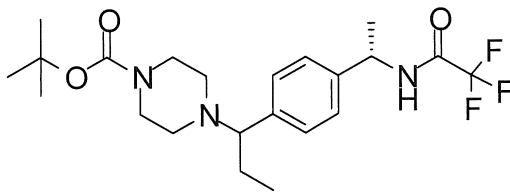
Ví dụ điều chế 53

tert-Butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifloaxetyl)amino]etyl]phenyl]propyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân 1



Ví dụ điều chế 54

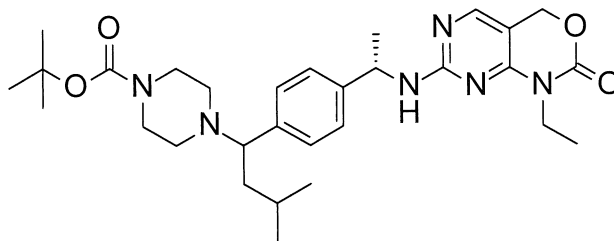
tert-Butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifloaxetyl)amino]etyl]phenyl]propyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân 2



Hòa tan *tert*-butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifluoroacetyl)amino]ethyl]-phenyl]propyl]piperazin-1-carboxylat (29,2 g, 65,8 mmol) trong MeOH (584 mL) và phân tách bằng phương pháp sắc ký SFC không đối xứng sử dụng các điều kiện sau: cột: Chiralpak AD-H, 5x25 cm; dung môi rửa giải 85/15 CO₂/MeOH với 0,5% dimetyletylamin; tốc độ dòng 300 g/phút; bước sóng phát hiện 230 nm; nhiệt độ cột 40°C; điểm thiết đặt BPR 100 bar; nhiệt độ dung môi 40°C. Chất đồng phân 1 được phân tách làm đỉnh rửa giải thứ nhất (14,15 g, 31,9 mmol). ES/MS (m/z): 444 (M+H). Chất đồng phân 2 được phân tách làm đỉnh rửa giải thứ hai (13,87 g, 31,3 mmol). ES/MS (m/z): 444 (M+H).

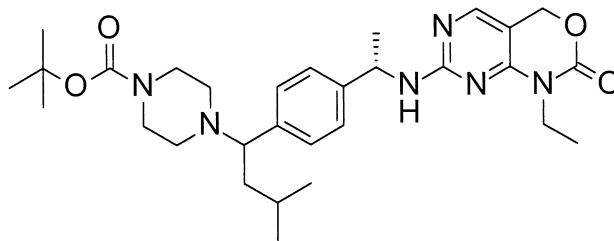
Ví dụ điều chế 55

tert-Butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-ethyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]ethyl]phenyl]-3-methyl-butyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân 1



Ví dụ điều chế 56

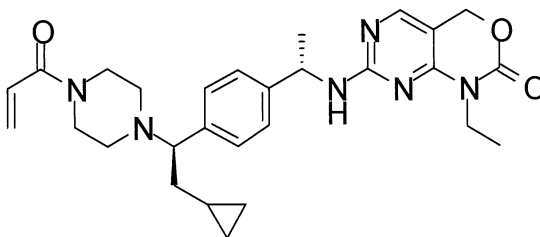
tert-Butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-ethyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]ethyl]phenyl]-3-methyl-butyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân 2



tert-Butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-ethyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]ethyl]phenyl]-3-methyl-butyl]piperazin-1-carboxylat (2,6 g, 4,70 mmol) được hòa tan trong hỗn hợp isopropanol:cloroform tỷ lệ 4:1 (50 mL) và phân tách bằng phương pháp sắc ký SFC không đối xứng sử dụng các điều kiện sau: cột: Chiralpak AD-H, 5x25 cm; thể tích bơm 1 mL; dung môi rửa giải 75/25 CO₂/IPA với 0,5% dimetyletylamin; tốc độ dòng 280 g/phút; bước sóng phát hiện 240 nm; nhiệt độ cột 40°C; điểm thiết đặt BPR 100 bar; nhiệt độ dung môi 40°C. Hợp chất trong ví dụ điều chế 45 được phân tách làm đỉnh rửa giải thứ nhất (1,02 g, 1,89 mmol). ES/MS (m/z): 553,4 (M+H). Hợp chất trong ví dụ điều chế 46 được phân tách làm đỉnh rửa giải thứ hai (1,05 g, 1,90 mmol). ES/MS (m/z): 553,4 (M+H).

Ví dụ 1

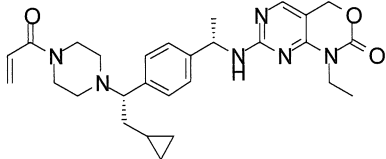
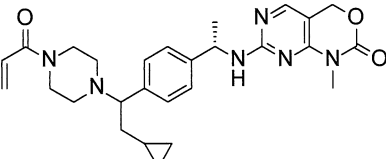
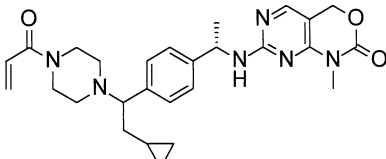
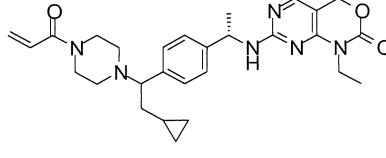
7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-cyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on

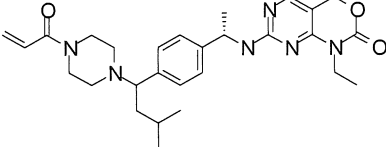
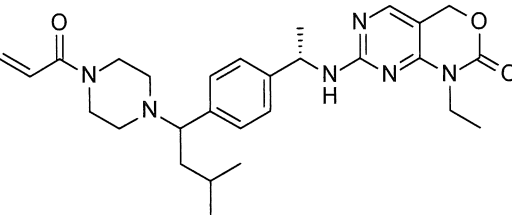
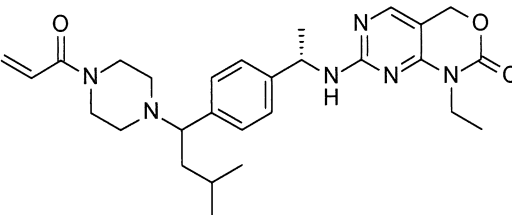
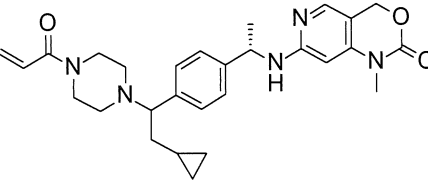
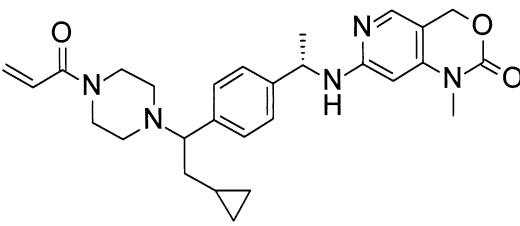


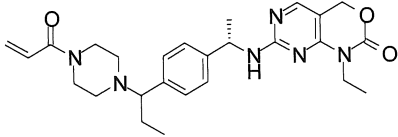
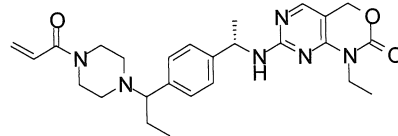
Acryloyl clorua (305 μ L, 3,75 mmol, trong 2 mL DCM) được bổ sung từng giọt vào dung dịch của 7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-cyclopropyl-1-piperazin-1-yl]ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on (1,73 g, 3,26 mmol) trong DCM ở nhiệt độ -78°C. Sau 2 phút ở nhiệt độ -78°C, bổ sung vài giọt MeOH, tiếp theo bằng dung dịch nước natri bicarbonat bão hòa và hỗn hợp được làm ấm lên nhiệt độ trong phòng. Bổ sung DCM, tách riêng các lớp, và chiết lớp nước bằng DCM. Làm khô các phần chiết hữu cơ kết hợp (Na₂SO₄), lọc và cô đặc tới trạng thái khô. Sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silicagel (dung môi A 25% đến 40% trong dung môi B, trong đó dung môi A là 10% MeOH/axeton và dung môi B là hexan) để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (1,16 g, 70%). MS (m/z): 505,3 (M+H).

Các hợp chất sau được điều chế cơ bản theo phương pháp nêu trong ví dụ 1.

Bảng 11

Ví dụ số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
2	7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on		505
3	7-[[[(1S)-1-[4-[2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-metyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân không đối quang 1		491
4	7-[[[(1S)-1-[4-[2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-metyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân không đối quang 2		491
5	7-[[[(1S)-1-[4-[2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on		505

6	1-etyl-7-[[[(1S)-1-[4-[3-metyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)butyl]phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on		507
7	1-etyl-7-[[[(1S)-1-[4-[3-metyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)butyl]phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 1		507
8	1-etyl-7-[[[(1S)-1-[4-[3-metyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)butyl]phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 2		507
9	7-[[[(1S)-1-[4-[2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-metyl-4H-pyrido[4,3-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 1		490
10	7-[[[(1S)-1-[4-[2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-metyl-4H-pyrido[4,3-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 2		490

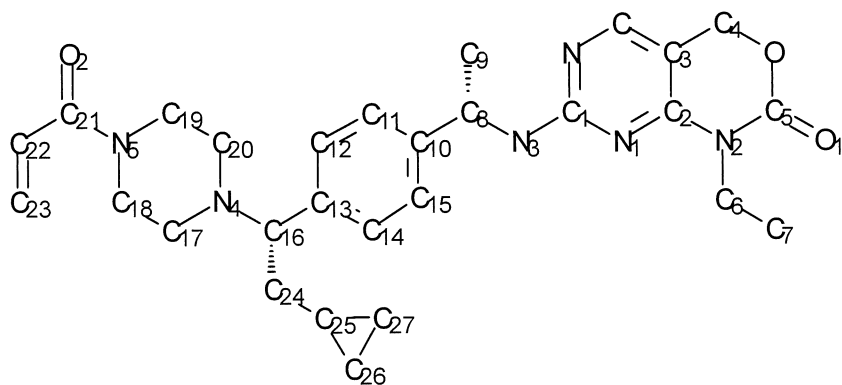
11	1-etyl-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)propyl]phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 1		479
12	1-etyl-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)propyl]phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 2		479

Xác định cấu trúc tinh thể tia X của IDH1 trong phức hợp với 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on.

Cấu trúc tinh thể của IDH1 trong phức hợp với 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on được xác định từ dữ liệu về nhiễu xạ tia X được tập hợp tại đường chùm tia synchrotron APS 31-ID được vận hành tại trung tâm Advanced Photon Source ở Argonne National Laboratory, Argonne, IL 60439. Protein IDH1 với đột biến R132H là có sẵn trên thị trường từ nhiều nguồn. Theo cách khác, protein IDH1 R132H có thể được phân tách từ dòng tế bào có sẵn trên thị trường chứa đột biến bằng các kỹ thuật đã biết và thường được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Các tinh thể thu được từ sự thiết đặt các khay nhỏ giọt được cân bằng ở nhiệt độ 21°C với protein IDH1 có đột biến R132H ở nồng độ 15 mg/ml trong hệ đệm chứa 10 mM HEPES pH 7,5, 150 mM natri clorua, 10% glyxerol, 5 mM dithiothreitol và 2 mM 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, và kết hợp

với một thể tích tương đương của dung dịch chứa 100mM Bis Tris pH 5, 5% DMSO, 22% PEG 3350 và 200mM amoni sulfat. Ngâm các tinh thể qua đêm trong dung dịch chứa 3 mM hợp chất 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, trước khi được chuyển sang dung dịch có bổ sung 22% etylen Glycol và làm đông lạnh nhanh để tập hợp dữ liệu. Dữ liệu về nhiễu xạ đối với độ phân giải 2,8 Å được tập hợp bằng chiếu xạ tia X ở bước sóng 0,9793 Å. Các tinh thể thuộc nhóm không gian $P4_32_12$ với các thông số ô $a=82,74$ Å, $b=82,74$ Å, $c=299,4$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. Cấu trúc được xác định bằng sự thay thế phân tử và chứa một phân tử dime của IDH1. Ánh xạ mật độ điện tử chênh lệch được tính toán sau khi mô hình hóa protein IDH1 có mật độ rõ ràng đối với hai phân tử liên kết của 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on.

Hóa học lập thể của 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on được xác định từ mật độ điện tử, và cả hai phân tử của 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on được mô hình hóa và đồng cấu trúc phức được tinh chỉnh thành các hệ số R là R hoạt động=0,192 và R tự do=0,228.



Bảng 12

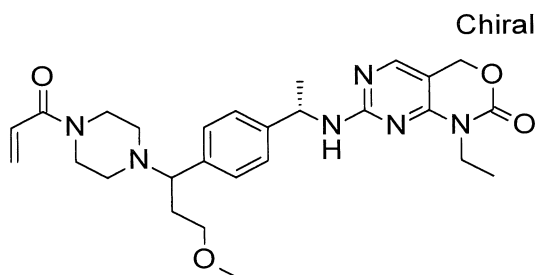
Sự sắp xếp của hợp chất 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on.

Nguyên tử	X	Y	Z
O2	48,364	1,353	-2,648
C21	49,136	0,711	-1,964
C22	48,932	-0,779	-1,799
C23	47,694	-1,239	-2,530
N5	50,174	1,294	-1,330
C18	50,422	2,738	-1,428
C17	51,848	3,008	-1,849
C19	51,126	0,603	-0,449
C20	52,568	0,906	-0,834
N4	52,797	2,388	-0,868
C16	54,242	2,810	-1,061
C24	55,094	2,321	0,113
C25	56,411	3,091	0,050
C27	57,062	3,523	1,306
C26	56,432	4,534	0,413
C13	54,761	2,408	-2,428
C12	55,212	1,125	-2,730
C11	55,701	0,819	-3,988
C14	54,812	3,365	-3,432
C15	55,295	3,057	-4,691
C10	55,742	1,778	-4,997
C8	56,243	1,464	-6,405
C9	55,107	1,279	-7,400
N3	57,128	0,291	-6,469
C1	58,372	0,310	-5,968
N	59,104	-0,809	-6,086
N1	58,775	1,474	-5,441
C2	60,041	1,523	-5,009

N2	60,425	2,651	-4,254
C6	59,506	3,796	-4,105
C7	58,569	3,631	-2,901
C5	61,546	2,595	-3,438
O1	61,736	3,358	-2,523
O	62,437	1,605	-3,629
C4	62,347	0,684	-4,739
C3	60,923	0,429	-5,132
C	60,369	-0,717	-5,655

Ví dụ 13

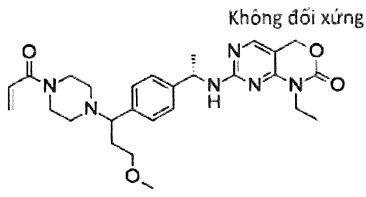
1-ethyl-7-[[[(1S)-1-[4-[3-metoxi-1-(4-prop-2-enoyl)piperazin-1-yl)propyl]phenyl]etyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân không đối quang 1



tert-Butyl 4-[(1S)-1-[4-[(1S)-1-[(1-ethyl-2-oxo-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]-3-metoxi-propyl]piperazin-1-carboxylat (1,372 g, 2,473 mmol) được hòa tan trong DCM (15 mL) và TFA (10 mL, 15,08 g, 132,3 mmol) được bổ sung. Phản ứng được khuấy trong 1 giờ và sau đó, được cô đặc tới trạng thái khô. Nguyên liệu thô được hòa tan trong DCM (12 mL) và DIPEA (1,25 mL, 7,17 mmol) và làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ -78 độ. Bổ sung từng giọt acryloyl clorua (0,18 mL, 0,20 g, 2,2 mmol). Sau 10 phút, bổ sung vài giọt metanol để làm dừng acryloyl clorua còn lại và phản ứng được cô đặc tới trạng thái khô (lạnh). Nguyên liệu thô được tiến hành sắc ký trên silicagel, rửa giải bằng gradient axeton 50-70% trong hexan để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề ở dạng bột màu trắng (867mg, 73%). MS (m/z): 509 (M+H)

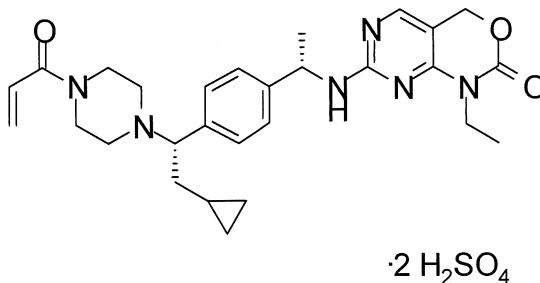
Hợp chất sau được điều chế cơ bản theo phương pháp nêu trong ví dụ 13.

Bảng 13

Ví dụ số	Tên hóa học	Công thức cấu tạo	ES/MS (m/z) (M+H)
14	1-ethyl-7-[[[(1S)-1-[4-[3-methoxy-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)propyl]phenyl]ethyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân không đối quang 2		509

Ví dụ 15

7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on disulfat

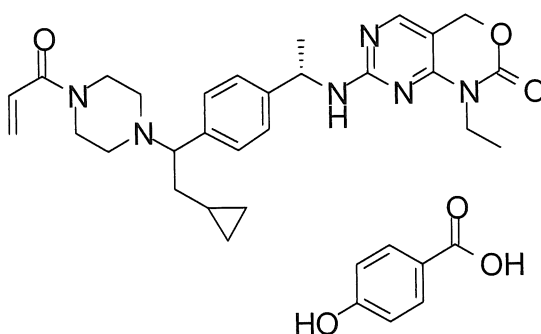


7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on (188 mg) được đặt vào trong 5 mL axeton trong khi khuấy với tốc độ 1000 vòng phút/60°C. Mẫu là dung dịch trong suốt. Bổ sung từng giọt 45 µL axit sulfuric (được pha loãng vào trong 2 mL axeton). Huyền phù đặc màu trắng sinh ra sau một vài giọt. Sau khi bổ sung một nửa axit sulfuric, độ đặc của huyền phù đặc thay đổi. Việc bổ sung nửa axit sulfuric còn lại được thực hiện từ từ, từng giọt. Huyền phù đặc gom hóa nhẹ trước khi chuyển đổi thành huyền phù chảy tự do màu trắng sáng của chất rắn. Ngắt nhiệt trên tấm sau 30 phút, và mẫu được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng, thu được huyền phù đặc

của chất rắn màu trắng. Chất rắn màu trắng được phân tách bằng cách lọc chân không. Bánh lọc thu được là chất rắn màu trắng sáng. Mẫu được làm khô tại chỗ trên dụng cụ lọc dưới dòng khí trong 20 phút, sau đó trong lò chân không ở nhiệt độ 70°C qua đêm. Thu được 266 mg (hiệu suất 96,9%).

Ví dụ 16

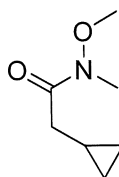
Axit 7-[[[(1S)-1-[4-[2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on 4-hydroxybenzoic



Axit 4-hydroxybenzoic (0,023 g, 0,165 mmol) được bổ sung vào dung dịch của 7-[[[(1S)-1-[4-[2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on (84 mg, 0,165 mmol) trong diclometan (5 ml). Sau khi khuấy 5 phút, dung môi được làm bay hơi từ từ dưới dòng nitơ. Chất rắn tạo ra được làm khô thêm trong chân không để thu được 7-[[[(1S)-1-[4-[2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)etyl]phenyl]etyl]amino]-1-etyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on 4-hydroxybenzoat (105 mg, 0,1617 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng. MS (m/z): 423,2 (M+H).

Ví dụ điều chế 57

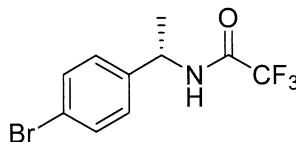
2-xyclopropyl-N-metoxy-N-metylaxetamit



Tiến hành nạp diclometan (160 mL, 8 thể tích) và 1,1'-carbonyldiimidazol (35,63g, 1,1 đương lượng) vào bình thót cổ đáy tròn thể tích 500 mL được khuấy. Hỗn hợp không đồng nhất được làm lạnh xuống 15°C và nạp dung dịch của axit 2-xyclopropylaxetic (20,0g, 1,0 đương lượng) trong diclometan (40 mL, 2 thể tích) vào vào hỗn hợp ở tốc độ kiểm soát nhiệt độ bên trong dưới 20°C. Dung dịch tạo ra được làm ấm lên 25°C và khuấy trong 2 giờ. Sau đó, làm lạnh dung dịch xuống 15°C và tiến hành nạp *N,O*-dimetyl hydroxylamin hydroclorua (21,43g, 1,1 đương lượng) theo từng phần vào dung dịch, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 20°C. Hỗn hợp không đồng nhất tạo ra được làm ấm lên 25°C và khuấy trong 15 giờ. Tiếp theo, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng nước (160 mL, 8 thể tích) và khuấy trong 15 phút. Dừng khuấy và tách riêng lớp nước ở dưới. Chiết lớp nước tạo ra bằng diclometan hai lần nữa (100 mL, 5 thể tích x 2) và các lớp hữu cơ được kết hợp. Rửa lớp hữu cơ kết hợp hai lần bằng 1,5 N HCl (100 mL, 5 thể tích x 2). Sau đó, rửa lớp hữu cơ hai lần bằng dung dịch nước natri bicarbonat 10% (100 mL, 5 thể tích x 2). Sau đó, rửa lớp hữu cơ bằng nước (100 mL, 5 thể tích), tiếp theo bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa (100 mL, 5 thể tích). Làm khô lớp hữu cơ bằng natri sulfat khan (1,0% khối lượng/khối lượng). Lọc khối tạo ra và rửa bằng diclometan (20 mL, 1 thể tích) và sau đó cô đặc trong chân không. Làm khô chất rắn tạo ra trong chân không cao trong 5 giờ để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (25,9g, hiệu suất 90,5%). ES/MS *m/z* 144,1 (M+H).

Tổng hợp hợp chất trong ví dụ điều chế 6 theo cách khác

(*S*)-*N*-(1-(4-bromophenyl)etyl)-2,2,2-trifloaxetamit

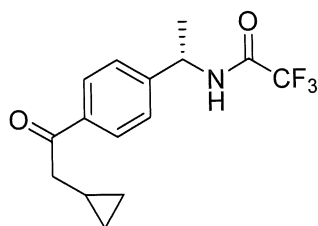


Tiến hành nạp diclometan (100 mL, 10 thể tích), tiếp theo bằng (*S*)-(-)-1-(4-bromophenyl)etylamin (10,0g, 1,0 đương lượng) vào bình thót cổ đáy tròn thể tích 250 mL được khuấy. Làm lạnh dung dịch xuống 0°C và tiến hành nạp anhydrit trifloaxetic (13,12g, 1,25 đương lượng) từ từ vào dung dịch được làm lạnh, duy trì nhiệt độ bên trong thấp hơn 5°C. Hỗn hợp không đồng nhất tạo ra được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 2 giờ mà tại thời điểm đó, trimetylamin (12,64g, 2,5 đương lượng) được nạp từ từ vào

đó, duy trì nhiệt độ bên trong thấp hơn 5°C. Khuấy hỗn hợp trong một giờ nữa và sau đó được làm dừng bằng cách bổ sung nước (30 mL, 3 thể tích). Làm ấm hỗn hợp hai pha lên 25°C và khuấy trong 30 phút. Sau đó, tách riêng các lớp và lớp nước được chiết thêm hai lần bằng diclometan (50 mL, 5 thể tích x 2). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa (50 mL, 5 thể tích) và làm khô trên natri sulfat khan (1% trọng lượng). Dung dịch sấy khô được lọc và rửa bằng diclometan (10 mL, 1 thể tích) và cô đặc dung dịch trong chân không để thu được chất rắn thô màu trắng. Chất rắn thô được tạo huyền phù đặc trong ete dầu mỏ (100 mL, 10 thể tích) trong 2 giờ ở nhiệt độ 25°C và chất rắn được tập hợp bằng cách lọc. Làm khô chất rắn ẩm trong chân không ở nhiệt độ 40°C trong 8 giờ để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (13,3 g, hiệu suất 90%). ES/MS m/z 295,3 (M+H).

Ví dụ điều chế 58

(S)-N-(1-(4-(2-xyclopropylaxetyl)phenyl)ethyl)-2,2,2-trifloaxetamit

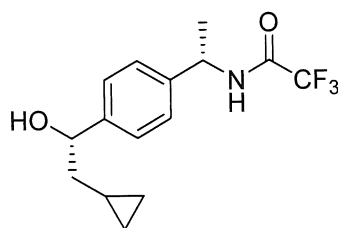


Nạp methyl *tert*-butyl ete (1500 mL, 15 thể tích) vào bình phản ứng thể tích 10L có khuấy ở phía trên. Tiến hành nạp (S)-N-(1-(4-bromophenyl)ethyl)-2,2,2-trifloaxetamit (100g, 1,0 đương lượng) vào dung dịch được khuấy. Khuấy hỗn hợp không đồng nhất ở nhiệt độ 25°C trong 30 phút và sau đó nạp tetrahydrofuran (500 mL, 5 thể tích) vào đó. Làm lạnh dung dịch đồng nhất tạo ra xuống nhiệt độ -83°C. Bổ sung từ từ *n*-Butyl lithi (297 mL, 2,2 đương lượng) vào dung dịch, duy trì nhiệt độ dưới -78°C và khuấy dung dịch tạo ra ở nhiệt độ -83°C trong 1,5 giờ. Bổ sung dung dịch của 2-xyclopropyl-N-metoxi-N-metylaxetamit (53,19g, 1,1 đương lượng) trong methyl *tert*-butyl ete (200 mL, 2 thể tích) vào dung dịch đã làm lạnh, duy trì nhiệt độ bên trong dưới -78°C. Khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ -83°C trong 1,5 giờ, tại thời điểm đó, dung dịch được làm ấm lên -30°C và làm dừng bằng cách bổ sung dung dịch nước amoni clorua bão hòa (5 L, 5 thể tích). Hỗn hợp phản ứng đã làm dừng được làm ấm lên 25°C và các lớp được tách riêng. Chiết lớp nước bằng methyl *tert*-butyl ete

(500 mL, 5 thể tích). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước (500 mL, 5 thể tích), tiếp theo bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa (500 mL, 5 thể tích) và sau đó, làm khô trên natri sulfat khan (50g, 0,5% trọng lượng/trọng lượng). Khối được lọc và rửa bằng methyl *tert*-butyl ete (50 mL, 0,5 thể tích). Cô đặc dung dịch thu được trong chân không cho tới xấp xỉ 1 thể tích dung dịch còn lại. Tiến hành nạp ete dầu mỏ (1500 mL, 15 thể tích) vào hỗn hợp cô đặc và huyền phù đặc thu được được khuấy ở nhiệt độ dưới 30°C trong 2 giờ. Chất rắn được tập hợp bằng cách lọc và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C trong 8 giờ để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (65,9 g, hiệu suất 67%). ES/MS m/z 298,0 (M-H).

Ví dụ điều chế 59

N-((*S*)-1-(4-((*S*)-2-xyclopropyl-1-hydroxyetyl)phenyl)etyl)-2,2,2-trifloaxetamit

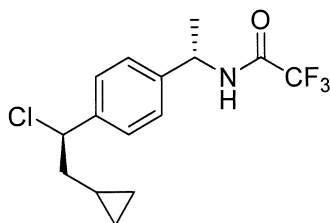


Tiến hành nạp ethanol tuyệt đối (7,89 kg, 10 thể tích) vào trong thiết bị phản ứng hydro hóa. Tiến hành nạp (*S*)-*N*-(1-(4-(2-xyclopropylaxetyl)phenyl)etyl)-2,2,2-trifloaxetamit (1,0 kg, 1,0 đương lượng) vào trong dung dịch được khuấy. Tiến hành nạp dung dịch của kali *tert*-butoxit (1,0 M trong *t*BuOH, 0,41 kg, 0,5 thể tích) vào dung dịch, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 30°C. Sau đó, nạp (*R*)-RUCY®-XylBINAP (0,0675 kg, 0,017 đương lượng) vào dung dịch. Làm sạch thiết bị hydro hóa bằng khí hydro hai lần, trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C. Sau khi làm sạch, khuấy dung dịch dưới áp suất hydro 4,5 kg ở nhiệt độ 25°C trong 5 giờ. Sau 5 giờ, dung dịch được thông khí và sau đó, cô đặc thành dầu với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 42°C. Dầu được hòa tan trong methyl *tert*-butyl ete (11,115 kg, 15 thể tích) và sau đó cô đặc thành dầu với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 45°C. Dầu được hòa tan trong methyl *tert*-butyl ete (11,115 kg, 15 thể tích) và sau đó cô đặc thành dầu với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 45°C. Nạp methyl *tert*-butyl ete (22,23 kg, 30 thể tích) vào dầu nêu trên ở nhiệt độ 25°C. Dung dịch thu được được rửa bằng nước (15,0 kg, 15 thể tích), tiếp theo bằng dung dịch NaCl trong nước (5,4kg NaCl trong 15,0 L nước). Làm

khô lớp hữu cơ bằng natri sulfat khan (1,5kg, 1,5 trọng lượng/trọng lượng) và sau đó lọc và rửa bằng metyl *tert*-butyl ete (1,112 kg, 1,5 thể tích). Tiến hành nạp than hoạt tính (0,3 kg, 0,3 trọng lượng/trọng lượng) vào dung dịch đã lọc và khuấy hỗn hợp và gia nhiệt ở nhiệt độ 40°C trong 2 giờ. Sau đó, lọc hỗn hợp và rửa bằng metyl *tert*-butyl ete (1,112 kg, 1,5 thể tích). Cô đặc hỗn hợp đã lọc thành dầu với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 45°C. hòa tan dầu trong ete dầu mỏ (9,84 kg, 15 thể tích) và cô đặc thành dầu với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 45°C. Hòa tan dầu trong ete dầu mỏ (9,84 kg, 15 thể tích) và cô đặc thành dầu với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 45°C. Nạp ete dầu mỏ (19,68 kg, 30 thể tích) vào dầu nêu trên và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 30°C trong 3 giờ và chất rắn thu được được tập hợp bằng cách lọc và rửa bằng ete dầu mỏ (9,84 kg, 15 thể tích). Chất rắn phân lập được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C trong 5 giờ để thu được hợp chất nêu ở tiêu đề (0,79 kg, 79%). ES/MS *m/z* 300,0 (M-H).

Ví dụ điều chế 60

N-((*S*)-1-(4-((*R*)-1-clo-2-xyclopropyletyl)phenyl)etyl)-2,2,2-trifloaxetamit



Tiến hành nạp metyl *tert*-butyl ete (4,45 kg, 6 thể tích) và *N*-((*S*)-1-(4-((*S*)-2-xyclopropyl-1-hydroxyetyl)phenyl)etyl)-2,2,2-trifloaxetamit (1,0 kg, 1,0 đương lượng) vào thiết bị phản ứng. Làm lạnh dung dịch xuống 10°C và tiến hành nạp từ từ 1-formylpyrrolidin (0,066 kg, 0,2 đương lượng) vào đó, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 13°C. Sau đó, nạp từ từ benzoyl clorua (0,56 kg, 1,2 đương lượng) vào dung dịch nêu trên, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 13°C. Làm ấm dung dịch thu được lên 25°C và khuấy trong thời gian 36 giờ (phản ứng có thể được giám sát trong tiến trình phản ứng và nếu phản ứng dừng lại, có thể tiến hành nạp thêm 1-formylpyrrolidin và benzoyl clorua). Sau đó, cô đặc phản ứng hoàn thành thành dầu với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 40°C. Làm lạnh dầu xuống 15°C và sau đó làm dừng bằng dung dịch nước natri bicarbonat 10% (22,0 kg, 20 thể tích) và khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ 25°C. Tiến

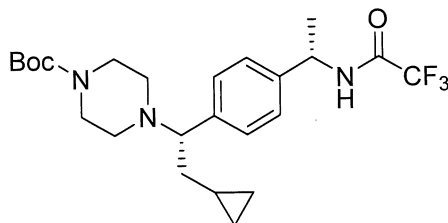
hành nạp ete dầu mỏ (6,56 kg, 10 thể tích) vào hỗn hợp hai pha. Tách riêng lớp hữu cơ. Chiết lớp nước bằng ete dầu mỏ (6,56 kg, 10 thể tích). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng dung dịch nước natri bicarbonat 10% (5,0 L, 5 thể tích) ba lần. Sau đó, rửa lớp hữu cơ bằng nước (5,0 L, 5 thể tích), tiếp theo bằng nước muối (5,0 L, 5 thể tích). Làm khô lớp hữu cơ bằng natri sulfat khan (0,5 kg, 0,5 trọng lượng/trọng lượng). Sau đó, lọc hỗn hợp và rửa bằng ete dầu mỏ (0,33 kg, 0,5 thể tích). Cô đặc dịch lọc thành dầu với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 40°C. Hòa tan dầu trong axetonitril (3,93 kg, 5 thể tích) và cô đặc thành dầu với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 40°C. Hòa tan dầu trong axetonitril (3,93 kg, 5 thể tích) và cô đặc thành dầu với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 40°C. Hòa tan dầu trong axetonitril (7,86 kg, 10 thể tích) và dung dịch thu được của hợp chất nêu ở tiêu đề được sử dụng thô trong bước tiếp theo. ES/MS m/z 318,0 (M-H).

Ví dụ điều chế 61

tert-Butyl

4-((*S*)-2-xyclopropyl-1-(4-((*S*)-1-(2,2,2-

trifloaxetamido)etyl)phenyl)etyl)piperazin-1-carboxylat

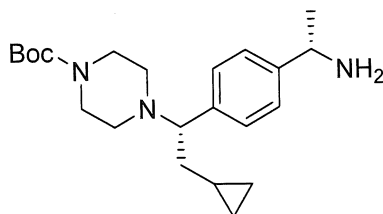


Tiến hành nạp *N*-Boc-piperazin (0,924 kg, 1,5 đương lượng), tiếp theo bằng natri bicarbonat (1,1 kg, 4,0 đương lượng) vào dung dịch thu được ở trên của *N*-((*S*)-1-(4-((*R*)-1-clo-2-xyclopropyletyl)phenyl)etyl)-2,2,2-trifloaxetamit. Hỗn hợp thu được được đun nóng đến 85°C trong 60 giờ. Lưu ý: phản ứng được lấy mẫu cứ mỗi 24 giờ và sau mỗi một mẫu được lấy xong, phản ứng được nạp bằng một lượng bổ sung của *N*-Boc-piperazin (0,31 kg, 0,5 đương lượng). Khi đã hoàn thành, phản ứng được cô đặc với áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 45°C để thu được dầu. Dầu được pha loãng bằng nước (10,0 kg, 10 thể tích) và methyl *tert*-butyl ete (7,41 kg, 10 thể tích). Tách riêng hỗn hợp hai pha thu được và chiết lớp nước bằng methyl *tert*-butyl ete (7,41 kg, 10 thể tích). Chiết các lớp hữu cơ kết hợp bằng axit xitric 30% (5,0 L, 5 thể tích) 5 lần. Rửa các lớp nước kết hợp hai lần bằng ete dầu mỏ (6,56 kg, 10 thể tích). Đưa lớp nước

tới độ pH = 9 bằng cách bổ sung natri carbonat (xấp xỉ 25,0 kg, 25 trọng lượng/trọng lượng) ở nhiệt độ 15°C. Chiết lớp nước bazơ hóa bằng metyl *tert*-butyl ete (7,41 kg, 10 thể tích). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước (5,0 L, 5 thể tích) và nước muối (5,0 L, 5 thể tích). Làm khô lớp hữu cơ bằng natri sulfat khan (0,5 kg, 50% trọng lượng/trọng lượng). Lọc hỗn hợp và rửa bằng metyl *tert*-butyl ete (0,37 kg, 0,5 thể tích). Cô đặc dịch lọc thành dầu bằng chân không ở nhiệt độ dưới 40°C. Hòa tan dầu thu được trong etanol tuyệt đối (3,95 kg, 5 thể tích) và dung dịch thô của hợp chất nêu ở tiêu đề được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo. ES/MS m/z 374,3 ($M+H-CF_3CO$).

Ví dụ điều chế 62

tert-Butyl 4-((*S*)-1-(4-((*S*)-1-aminoethyl)phenyl)-2-xyclopropylethyl)piperazin-1-carboxylat



Tiến hành nạp etanol tuyệt đối (3,7 kg, 3,7 trọng lượng/trọng lượng) vào dung dịch thu được ở trên của *tert*-butyl 4-((*S*)-2-xyclopropyl-1-(4-((*S*)-1-(2,2,2-trifloaxetamido)ethyl)phenyl)ethyl)piperazin-1-carboxylat. Làm lạnh dung dịch xuống 20°C và nạp dung dịch nước kali hydroxit 1M (0,168 kg KOH trong 3,0 kg nước) vào đó. Khuấy hỗn hợp tạo ra ở nhiệt độ 25°C trong 10 giờ và sau đó làm dừng bằng cách bổ sung từ từ dung dịch nước axit xitric 30% (5,0 kg, 5 trọng lượng/trọng lượng), duy trì nhiệt độ bên trong dưới 30°C. Tiến hành nạp metyl *tert*-butyl ete (7,41 kg, 7,41 trọng lượng/trọng lượng) vào dung dịch đã làm dừng. Tách riêng các lớp và chiết lớp hữu cơ bằng dung dịch nước axit xitric 30% (5,0 kg, 5 trọng lượng/trọng lượng). Đưa lớp nước tới độ pH = 8 bằng cách bổ sung natri carbonat (xấp xỉ 25,0 kg, 25 trọng lượng/trọng lượng) ở nhiệt độ 15°C. Chiết lớp nước bazơ hóa hai lần bằng etyl axetat (7,41 kg, 7,41 trọng lượng/trọng lượng). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước (5,0 kg, 5 trọng lượng/trọng lượng) và sau đó, bằng nước muối (5,0 kg, 5 trọng lượng/trọng lượng). Làm khô lớp hữu cơ bằng natri sulfat khan (0,5 kg, 50% trọng lượng), sau đó

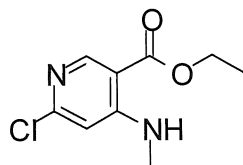
lọc và rửa bằng etyl axetat (0,37 kg, 0,37 trọng lượng/trọng lượng). Cô đặc dung dịch thành dầu bằng áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 45°C. Hòa tan dầu thu được trong rượu isopropyl (2 L, 2 thể tích), và cô đặc dung dịch thu được thành dầu bằng áp lực chân không ở nhiệt độ dưới 45°C. Hòa tan dầu thu được trong rượu isopropyl (1,2 L, 1,2 thể tích) và dung dịch thô của hợp chất nêu ở tiêu đề được sử dụng trực tiếp trong bước tinh chế tiếp theo. ES/MS m/z 374,2 (M+H).

Tiến hành nạp dung dịch của *tert*-butyl 4-((*S*)-1-(4-((*S*)-1-aminoethyl)phenyl)-2-xyclopropyletyl)piperazin-1-carboxylat (30,0 g, 1,0 đương lượng) trong rượu isopropyl (270 mL, 9 thể tích) vào trong bình thót cổ đáy tròn thể tích 1000 mL. Tiến hành nạp axit L-dibenzoyl tartaric (L-DBTA, 34,5 g, 1,2 đương lượng) vào dung dịch được khuấy ở nhiệt độ 20–30°C. Khuấy dung dịch ở nhiệt độ 20–30°C trong 2–4 giờ. Khuấy huyền phù đặc thu được trong 8–12 giờ ở nhiệt độ 20–30°C. Tiến hành nạp MTBE (300 mL, 10 thể tích) vào huyền phù đặc màu nhạt. Tiến hành khuấy huyền phù đặc thu được và làm đặc ở nhiệt độ 20–30°C trong thời gian 12–16 giờ. Sau đó, tập hợp chất rắn bằng cách lọc và rửa bằng MTBE (150 mL, 5 thể tích). Làm khô chất rắn trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 45–55°C trong 12 giờ để thu được muối axit *tert*-butyl 4-((*S*)-1-(4-((*S*)-1-aminoethyl)phenyl)-2-xyclopropyletyl)piperazin-1-carboxylat L-dibenzoyl tartaric ở dạng chất rắn màu trắng (48,8 g, hiệu suất 83%, >98:2 dr).

Tiến hành nạp muối axit *tert*-butyl 4-((*S*)-1-(4-((*S*)-1-aminoethyl)phenyl)-2-xyclopropyletyl)piperazin-1-carboxylat L-dibenzoyl tartaric (40,0 g, 1,0 đương lượng), tiếp theo là diclometan (400 mL, 10 thể tích) vào bình thót cổ đáy tròn thể tích 1000 mL được khuấy. Nạp dung dịch nước của Na₂CO₃ 10% (đủ để tạo ra độ pH = 8–10, xấp xỉ 6–8 thể tích) vào dung dịch được khuấy ở nhiệt độ 15–25°C. Khuấy hỗn hợp hai pha trong 1 giờ ở nhiệt độ 15–25°C và sau đó tách các lớp trong một phễu tách. Nạp DMSO (240 mL, 6 thể tích) vào lớp hữu cơ. Cô đặc dung dịch trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ dưới 40°C để loại bỏ diclometan. Sau đó, dung dịch của *tert*-butyl 4-((*S*)-1-(4-((*S*)-1-aminoethyl)phenyl)-2-xyclopropyletyl)piperazin-1-carboxylat bazơ tự do trong DMSO được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

Ví dụ điều chế 63

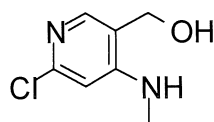
Etyl 6-clo-4-(metylamino)pyridin-3-carboxylat



Metyl amin (16 mL, 11,6 mol/L trong nước, 186 mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch của ethyl 4,6-diclopyridin-3-carboxylat (20 g, 92 mmol) trong axetonitril (300 mL) ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng được làm ấm lên nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Bổ sung nước và ethyl axetat vào hỗn hợp phản ứng và chiết lớp nước bằng ethyl axetat. Làm khô các phần chiết hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ khan, lọc và cô đặc tới trạng thái khô. Nguyên liệu thô thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silicagel (0-100% EtOAc/hexan) để thu được, sau khi cô đặc các phần thích hợp, ethyl 6-clo-4-(methylamino)pyridin-3-carboxylat ở dạng chất rắn màu trắng (10,46 g, 52,14 mmol, hiệu suất 57%). MS (m/z): 201 (M+H).

Ví dụ điều chế 64

[6-clo-4-(methylamino)-3-pyridyl]metanol

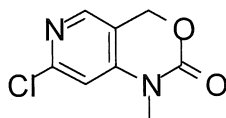


Dung dịch của ethyl 6-clo-4-(methylamino)pyridin-3-carboxylat (10,46 g, 52,14 mmol) trong THF (100 mL) được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp của lithi nhôm hydrua (78,2 mL, 1,0 mol/L trong THF, 78,2 mmol) ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng được làm ấm lên nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Lần lượt bổ sung nước (3 mL), dung dịch nước NaOH 15% (3 mL), và sau đó, nước (9 mL) vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi khuấy, hỗn hợp phản ứng được lọc qua đệm Celite. Pha loãng dịch lọc bằng nước và chiết bằng diclometan. Làm khô các phần chiết hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ khan, lọc và cô đặc tới trạng thái khô để thu được [6-clo-4-(methylamino)-3-pyridyl]metanol ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (2,78 g, hiệu suất 27%). Bánh lọc Celite được rửa thêm bằng metanol và cô đặc dịch lọc tới trạng thái khô. Các chất rắn từ bánh lọc được tập hợp và khuấy cùng với diclometan và được lọc qua Celite. Dịch

lọc được kết hợp với phần cặn còn lại từ các thao tác rửa metanol và nguyên liệu được cô đặc tới trạng thái khô và nguyên liệu được bảo quản. Bổ sung cloroform: rượu isopropyl tỷ lệ 4:1 vào các chất rắn tập hợp từ bước lọc và khuấy hỗn hợp qua đêm. Hỗn hợp được lọc qua đệm Celite, dịch lọc được kết hợp với phần cặn còn lại bảo quản và cô đặc tới trạng thái khô để thu được lượng [6-clo-4-(metylamino)-3-pyridyl]metanol bổ sung ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (5,07 g, hiệu suất 56%). Tổng lượng thu hồi của [6-clo-4-(metylamino)-3-pyridyl]metanol là 7,85 g, hiệu suất 83%). MS (m/z): 173 (M+H).

Ví dụ điều chế 65

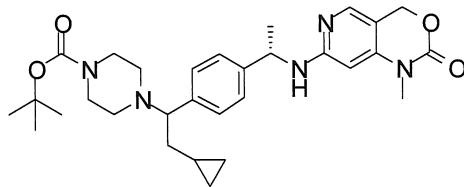
7-clo-1-metyl-4H-pyrido[4,3-d][1,3]oxazin-2-on



Triphosgen (6,04 g, 20,4 mol) được bổ sung vào dung dịch của [6-clo-4-(metylamino)-3-pyridyl]metanol (5,07 g, 29,1 mol) và DIPEA (51,2 mL, 291 mmol) trong THF (100 mL) ở nhiệt độ -20°C. Chậu làm lạnh được loại bỏ và hỗn hợp được làm ấm lên nhiệt độ trong phòng. Sau 30 phút, nước được bổ sung và chiết hỗn hợp bằng diclometan. Làm khô các phần chiết hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ khan, lọc và cô đặc tới trạng thái khô. Nguyên liệu thô thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silicagel (0-100% EtOAc/hexan) để thu được, sau khi cô đặc các phần thích hợp, 7-clo-1-metyl-4H-pyrido[4,3-d][1,3]oxazin-2-on ở dạng chất rắn màu vàng cam (5,13 g, 24,5 mmol, hiệu suất 84%). MS (m/z): 199 (M+H).

Ví dụ điều chế 66

tert-Butyl 4-[2-xyclopropyl-1-[4-[(1S)-1-[(1-metyl-2-oxo-4H-pyrido[4,3-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 1



Bổ sung diclo[1,3-bis(2,6-di-3-pentylphenyl)imidazol-2-yliden](3-clopyridyl)paladi(II) (291 mgs, 0,348 mmol) vào dung dịch của *tert*-butyl 4-[1-[4-[(1S)-1-aminoethyl]phenyl]-2-cyclopropyl-ethyl]piperazin-1-carboxylat (1,30 g, 3,48 mmol), 7-clo-1-metyl-4H-pyrido[4,3-d][1,3]oxazin-2-on (864 mg, 4,35 mmol), và xesi carbonat (2,27 g, 6,96 mmol) trong toluen (17,4 mL) trong môi trường nitơ và gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ 75 °C qua đêm. Sau khi làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được lọc qua nút slicagel và rửa giải bằng etyl axetat. Dịch lọc được cô đặc trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn còn lại thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silicagel (20-100% EtOAc/hexan). Các phần kết hợp lại được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silicagel (50-100% metyl *tert*-butyl ete/hexan) và các phần tinh khiết kết hợp từ cả hai cột được cô đặc để thu được *tert*-butyl 4-[2-cyclopropyl-1-[4-[(1S)-1-[(1-metyl-2-oxo-4H-pyrido[4,3-d][1,3]oxazin-7-yl)amino]etyl]phenyl]etyl]piperazin-1-carboxylat, chất đồng phân không đối quang 1 ở dạng bột màu trắng nhạt (1,312 g, 2,400 mmol, hiệu suất 69%). MS (m/z): 536 (M⁺).

Bệnh ung thư ngày càng được thừa nhận là một tập hợp các bệnh không đồng nhất mà sự khởi phát và tiến triển của chúng được gây ra do bởi chức năng bất thường của một hoặc nhiều gen điều hòa sự khôi phục ADN, độ ổn định của hệ gen, sự tăng sinh tế bào, sự chết của tế bào, sự dính kết, sự tạo mạch, sự xâm lấn, và sự di căn trong các vi môi trường tế bào và mô. Chức năng thay đổi hoặc bất thường của các gen “ung thư” có thể dẫn đến hiện tượng đa hình của ADN có trong tự nhiên, các thay đổi về số bản sao hệ gen (thông qua khuếch đại, mất đoạn, mất nhiễm sắc thể, hoặc sao chép), thay đổi về gen và cấu trúc nhiễm sắc thể (thông qua chuyển vị, đảo ngược nhiễm sắc thể, hoặc các phép sắp xếp lại khác mà dẫn đến biểu hiện gen bất thường), và các đột biến điểm. Các khối u tân sinh ung thư có thể do một chức năng gen bất thường gây ra, và do cùng chức năng gen bất thường đó duy trì, hoặc sự duy trì và tiến triển bị trầm trọng hóa bởi các chức năng gen bất thường khác.

Ngoài các bất thường về nhiễm sắc thể di truyền đã nêu trên đây, mỗi bệnh ung thư cũng có thể bao gồm các biến đổi di truyền ngoại gen của hệ gen bao gồm sự methyl hóa ADN, ghi dấu hệ gen, và biến đổi histon bằng sự axetyl hóa, methyl hóa, hoặc phosphoryl hóa. Biến đổi ngoại gen có thể đóng vai trò trong việc cảm ứng và/hoặc duy trì u ác tính.

Danh mục mở rộng về các bất thường di truyền tế bào trong bệnh ung thư ở người đã được biên soạn và được duy trì và cập nhật thường xuyên trực tuyến (xem The Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer at the US National Cancer Institute (NCI) Cancer Genome Anatomy Project (CGAP). Chương trình Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genome Project duy trì “Bảng điều tra gen ung thư” trực tuyến của tất cả các gen người mà có liên quan về mặt nguyên nhân đến sự sinh khối u cũng như cơ sở dữ liệu COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) về các đột biến soma trong bệnh ung thư ở người. Một nguồn khác chứa nhiều thông tin về các thay đổi di truyền tế bào có liên quan về mặt nguyên nhân đến các bệnh ung thư khác nhau là tài liệu Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

Việc chẩn đoán các khối u ác tính ung thư bằng cách sinh thiết, xác định kiểu hình miễn dịch và các xét nghiệm khác là đã biết và thường được sử dụng. Ngoài các công nghệ tạo băng nhiễm sắc thể có độ phân giải cao và chụp ảnh nhiễm sắc thể tiên tiến, các bất thường về nhiễm sắc thể trong các trường hợp nghi ngờ có thể được xác định bằng cách phân tích di truyền tế bào như phương pháp lai tại chỗ phát huỳnh quang (fluorescence in situ hybridization - FISH), phương pháp nhiễm sắc thể đồ, phương pháp nhiễm sắc thể đồ quang phổ (spectral karyotyping - SKY), FISH đa môi (M-FISH), phương pháp lai hệ gen so sánh (comparative genomic hybridization - CGH), phương pháp mảng đa hình nucleotit đơn (single nucleotit polymorphism arrays - SNP Chips) và các phương pháp chẩn đoán và phân tích đã biết và được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sử dụng.

Các đột biến về IDH1 và IDH2 đã được nhận diện ở nhiều loại khối u bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u tế bào hình sao, u tế bào thần kinh đệm ít gai, u cận hạch, hội chứng loạn sản tủy

xương (MDS), bệnh bạch cầu lympho bào B cấp tính (B-ALL), tuyến giáp, đại trực tràng, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (AML), Dang et al., *Trends Mol. Med.*, 2010, 16: 387-397; Ward et al., *Oncogene*, 2012, 31(19): 2491-2498; u hắc sắc tố, Shibata et al., *Am. J. Pathol.*, 2010, 178(3): 1395-1402; tiền liệt tuyến, Flaherty et al., *J. Clin. Oncol.*, 2014, 32 (suppl. 4; Abstract 213); Cairns et al., *Cancer Discovery*, 2013, 3: 730-741; sarcom sụn và ung thư đường mật, Balss et al., *Acta Neuropathol.*, 2012, 124: 883-891; Cairns et al., *Cancer Discovery*, 2013, 3: 730-741; u lympho tế bào T nguyên bào mạch máu - miễn dịch (AITL), Cairns et al. *Blood*, 2012. 119(8):1901-1903. Các đột biến đã được phát hiện tại hoặc gần các gốc cụ thể ở vị trí hoạt động: G97D, R100, R132H, R132C, R132S, R132V, R132G, V71I, R132L, và G123R đối với IDH1, Dang et al., *Trends Mol. Med.*, 2010, 16: 387-397; Ward et al., 2012 and Supplementary Table 2.

Các dạng đột biến của IDH1 và IDH2 đã được chứng minh có hoạt tính gen tạo hình mới (thêm chức năng) khử α -ketoglutarat thành 2-hydroxyglutarat. Việc sản xuất 2-hydroxyglutarat nội sinh là đặc hiệu đồng phân đối ảnh dẫn tới sự tạo ra chất đồng phân đối ảnh D (còn được gọi là chất đồng phân đối ảnh R). Bình thường, các tế bào có mức 2-hydroxyglutarat thấp trong khi các tế bào chứa đột biến IDH1 hoặc IDH2 có các mức 2-hydroxyglutarat tăng cao đáng kể. Mức 2-hydroxyglutarat tăng cao đáng kể được phát hiện trong các khối u chứa đột biến và trong huyết tương của bệnh nhân có IDH1 hoặc IDH2 đột biến. Các mức 2-hydroxyglutarat cao có liên quan đến kiểu hình tăng metyl hóa dẫn tới ngăn chặn sự biệt hóa mà dẫn tới sự phát sinh khối u tăng.

Hoạt tính của chất ức chế đồng hóa trị không thể đảo ngược đặc hiệu được xác định bằng sự gắn kết của nó với đích (IDH1 hoặc IDH2), được xác định bằng K_I , và tốc độ hình thành liên kết đồng hóa trị tiềm tàng tối đa, được xác định bằng k_{inact} . Hai hệ số này không phải là các thực thể riêng biệt, mà đúng hơn là cùng với nhau để tạo ra tác động mong muốn cho việc hình thành liên kết đồng hóa trị. Quá trình này được minh họa bằng 3 điểm sau đây.

Trước tiên, thực tiễn chất có ái lực điện tử, ví dụ acrylamit, cần được định vị một cách chính xác so với chất cho điện tử, ví dụ cystein, là thành phần cơ bản cho sự hình thành liên kết đồng hóa trị trong hóa học hữu cơ. Có một góc và khoảng cách

chính xác mà tại đó, chất cho điện tử cần phải tiếp cận chất có ái lực điện tử để tạo ra liên kết đồng hóa trị. Sự bố trí đơn giản chất có ái lực điện tử gần chất cho điện tử là không đủ cho sự hình thành liên kết đồng hóa trị.

Thứ hai, khi sáp nhập nhóm phản ứng lên nhân có chứa các phần liên kết hydro để làm ổn định sự liên kết của chất ức chế với enzym, ví dụ nhân định hướng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cần phải xem xét việc nhân định hướng liên kết với đích như thế nào và định vị chất có ái lực điện tử so với chất cho điện tử như thế nào theo góc và khoảng cách tối ưu nêu trên. Thêm nữa, sự bố trí đơn giản chất có ái lực điện tử gần chất cho điện tử là không đủ cho sự hình thành liên kết đồng hóa trị. Những thay đổi về nhân định hướng có thể ảnh hưởng đến khả năng của hợp chất ức chế trong việc tạo ra liên kết đồng hóa trị.

Thứ ba, khi hai điểm nêu trên được xem xét cùng nhau, chỉ sự có mặt của phần có ái lực điện tử trên nhân định hướng là không đủ để gợi ý tới liên kết đồng hóa trị sẽ được tạo ra.

Các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* sau đây chứng minh hoạt tính ức chế protein IDH1 và IDH2 đột biến và hiệu quả của các hợp chất thử nghiệm có công thức I hoặc Ia đối với các dòng tế bào ung thư đặc hiệu khác nhau. Các thử nghiệm này thường được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này công nhận là chỉ dấu về hoạt tính trị liệu trên lâm sàng ở người. Sự ức chế các protein IDH1 hoặc IDH2 đột biến kiểu hình mới trong các nghiên cứu được bộc lộ được cho là sẽ có hiệu quả đối với các protein IDH1 và IDH2 đột biến kiểu hình mới khác. Các thử nghiệm chứng tỏ hoạt tính ức chế IDH1 hoặc IDH2 đột biến và tính hiệu quả có thể được thực hiện cơ bản như sau hoặc theo các thử nghiệm tương tự thu được dữ liệu tương tự.

Kết quả của các thử nghiệm sau chứng minh rằng, các hợp chất được minh họa và thử nghiệm là hữu dụng làm các chất ức chế IDH1 và IDH2 đột biến và có thể hữu dụng trong điều trị các bệnh ung thư biểu hiện IDH1 hoặc IDH2 đột biến.

Các thử nghiệm sinh hóa đối với các enzym đột biến IDH1 và IDH2

Các enzym đột biến IDH1-R132H, IDH1-R132C, IDH2-R172K và IDH2-R140Q xúc tác cho sự chuyển hóa của α KG thành 2HG. 2HG được phân tích sử dụng

phương pháp chiết pha rắn trực tiếp và phổ khối. Phân tích này được thực hiện trong dụng cụ RapidFire® kết hợp với phổ khối kế ba tứ cực 6460 (G6460A Agilent).

Các protein đột biến IDH1 (R132H và R132C) và đột biến IDH2 (R140Q và R172K) chứa đuôi His tận cùng N được biểu hiện trong E.coli và được tinh chế sử dụng phương pháp sắc ký ái lực niken. Các thử nghiệm enzym được thực hiện trong các đĩa polypropylen 96 giếng đáy hình chữ V chứa 100 mM hệ đệm Tris-HCl, 1 mM DTT, 0,005% TRITON™ X-100, 120 mM NaCl. Đối với IDH1 R132H, α -ketoglutarat, NADPH và MnCl_2 được bao gồm với các nồng độ cuối lần lượt là 300 μM , 2,5 μM và 300 μM . Đối với IDH1 R132C, α -ketoglutarat, NADPH và MnCl_2 được bao gồm với các nồng độ cuối lần lượt là 100 μM , 10 μM và 100 μM . Đối với IDH2 R172K, α -ketoglutarat, NADPH và MnCl_2 được bao gồm với các nồng độ cuối lần lượt là 150 μM , 10 μM và 150 μM . Đối với IDH2 R140Q, α -ketoglutarat, NADPH và MnCl_2 được bao gồm với các nồng độ cuối lần lượt là 3000 μM , 10 μM và 100 μM . Độ pH cuối cùng = 7,0. Hợp chất thử nghiệm hòa tan trong dung dịch gốc DMSO được pha loãng trong hỗn hợp phản ứng với nồng độ DMSO cuối là 4%. Các hợp chất được thử nghiệm ở định dạng đáp ứng liều lượng. Thử nghiệm được bắt đầu bằng cách bổ sung enzym. Các enzym được sử dụng với các nồng độ cuối sau: IDH1 R132H, 2 nM; IDH1 R132C, 0,5 nM; IDH2 R172K, 1,2 nM; IDH2 R140Q, 1,2 nM. Sau 90 phút, phản ứng được làm dừng bằng cách bổ sung ACN (50:50) chứa axit 3-hydroxy-1,5-pentanedioic-2,2,3,4,4- d_5 (5d_5 -3HG) làm nội tiêu chuẩn để phân tích phổ khối và định lượng sản phẩm phản ứng. 2-Hydroxyglutarat (2HG) trong các mẫu làm dừng được tách riêng sử dụng phương pháp sắc ký cột trao đổi ion mạnh (Phenomenex Strata-X-A SecurityGuard) và được phân tích bằng phổ khối trong phổ khối kế ba tứ cực 6460 (G6460A Agilent). Chuyển dạng tín hiệu 2HG phát hiện được thành nồng độ chất phân tích sử dụng đường cong hiệu chỉnh được tạo ra sử dụng các nồng độ 2HG đã biết. Đối với mỗi một hợp chất thử nghiệm, % ức chế được tính toán sử dụng mẫu đối chứng DMSO là 0% ức chế và đối chứng không chứa enzym là 100% ức chế. Các giá trị IC_{50} thu được từ các giá trị % ức chế riêng biệt ở các nồng độ hợp chất khác nhau sử dụng phương trình 4 tham số. Các thao tác tính toán này được thực hiện sử dụng các chương trình phân tích dữ liệu Activity Base (IDBS) hoặc Screener (Genedata).

Kết quả của thử nghiệm này chứng minh rằng, các hợp chất minh họa và thử nghiệm ức chế hoạt tính IDH1 đột biến đối với IDH1/R132H và IDH1/R132C và ức chế hoạt tính IDH2 đột biến đối với IDH2/R140Q và IDH2/R172K.

Các ví dụ sau được thử nghiệm cơ bản như được mô tả ở trên và thể hiện hoạt tính đối với IDH1 đột biến và IDH2 đột biến như được thể hiện trong bảng 14 dưới đây.

Bảng 14

Ví dụ số	IDH1/R132H IC ₅₀ (μM)	IDH1/R132C IC ₅₀ (μM)	IDH2/R140Q IC ₅₀ (μM)	IDH2/R172K IC ₅₀ (μM)
1	0,00569 ± 0,000766, n=3	0,00431 ± 0,000895, n=3	0,113	0,0328
2	0,00627 ± 0,00127, n=3	0,00371 ± 0,00126, n=3	0,0369	0,0115
3	0,0111 ± 0,0035, n=2	0,0156 ± 0,0075, n=2	0,0648	0,0156
4	0,0137 ± 0,0030, n=2	0,00869 ± 0,00280, n=2	0,0811	0,028
5	0,00276	0,00249		
6	0,00491	0,00505		
7	0,00638	<0,00508	0,0743	0,0224
8	<0,00508	<0,00508	0,046	0,017
9	0,00743 ± 0,00188, n=2	0,0151 ± 0,0024, n=2		
10	0,0139 ± 0,0017, n=2	0,0165 ± 0,0019, n=2		

Ví dụ số	IDH1/R132H IC ₅₀ (μM)	IDH1/R132C IC ₅₀ (μM)	IDH2/R140Q IC ₅₀ (μM)	IDH2/R172K IC ₅₀ (μM)
11	0,00978 ± 0,00038, n=2	0,0156 ± 0,0034, n=2	0,0543	0,02
12	0,0294 ± 0,0331, n=2	0,0390 ± 0,0629, n=2	0,134	0,0263
13	0,0124 ± 0,0105, n=2	0,0166 ± 0,0055, n=2	0,239	0,039
14	0,0190 ± 0,0224, n=2	0,0186 ± 0,0176, n=2	0,746	0,162

Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của giá trị trung bình.

Các thử nghiệm sinh hóa đối với các enzym IDH1 và IDH2 kiểu tự nhiên

Các enzym IDH1 và IDH2 xúc tác cho sự chuyển hóa của isoxitrat thành αKG. Các protein IDH1 kiểu tự nhiên (National Center for Biotechnology Information, Accession: NP_001269316.1) và IDH2 (National Center for Biotechnology Information, Accession: EAX02082.1) chứa đuôi His tận cùng N được biểu hiện trong E. coli và được tinh chế sử dụng phương pháp sắc ký ái lực niken. Các thử nghiệm enzym được thực hiện trong các đĩa polypropylen 96 giếng đáy hình chữ V chứa 100 mM hệ đệm Tris-HCl ở độ pH 7,5, 1 mM DTT, 0,005% TRITON™ X-100, 120 mM NaCl. Đối với thử nghiệm IDH1 kiểu tự nhiên, isoxitrat, NADP⁺ và MnCl₂ được bao gồm ở các nồng độ lần lượt là 85 μM, 50 μM và 20 μM. Đối với thử nghiệm IDH2 kiểu tự nhiên, isoxitrat, NADP⁺ và MnCl₂ được bao gồm ở các nồng độ lần lượt là 30 μM, 50 μM và 10 μM. Các chất ức chế hòa tan trong dung dịch gốc DMSO được pha loãng trong hỗn hợp phản ứng ở nồng độ DMSO cuối là 4%. Thử nghiệm enzym được xác định (làm dừng) bằng cách bổ sung ACN (50:50) chứa axit d6-2-ketopentandioic (d6-αKG) làm nội tiêu chuẩn để phân tích phổ khối. Mười (10) microlit hỗn hợp phản ứng được kết hợp với 100 μL nước, 50 μL O-benzylhydroxylamin 1M trong hệ đệm pyridin (8,6% pyridin, pH 5), và 50 μL N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydroclorua 1M (EDC) trong hệ đệm pyridin. Sau khi dẫn xuất hóa ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, các mẫu được chiết bằng 600 μL EtOAc. Lấy ra 400 μL lớp phía

trên, làm khô trong môi trường nitơ gia nhiệt và hoàn nguyên bằng 100 μL MeOH/nước (1:1). 10 μL mẫu dẫn xuất hóa được bơm lên hệ LC-MS bao gồm hệ Shimadzu Prominence 20A HPLC và quang phổ kế ba tứ cực Thermo Quantum Ultra™. Tách riêng các chất phân tích trên cột Waters XBridge™ C18 (2,1 x 50 mm, 3,5 μm) với tốc độ dòng là 0,6 mL/phút. Pha động A là axit formic 0,1% trong nước và pha động B là MeOH. Chuyển dạng tín hiệu αKG phát hiện được thành nồng độ chất phân tích sử dụng đường cong hiệu chỉnh được tạo ra sử dụng các nồng độ αKG đã biết. Đối với mỗi một hợp chất thử nghiệm, % ức chế được tính toán sử dụng mẫu đối chứng DMSO là 0% ức chế và đối chứng không chứa enzym là 100% ức chế. Các giá trị IC_{50} thu được từ các giá trị % ức chế riêng biệt ở các nồng độ hợp chất khác nhau sử dụng phương trình 4 tham số. Các thao tác tính toán này được thực hiện sử dụng các chương trình phân tích dữ liệu Activity Base (IDBS) hoặc Screener (Genedata).

Kết quả của thử nghiệm này chứng minh rằng, các hợp chất minh họa và thử nghiệm ít có hoạt tính ức chế enzym IDH1 kiểu tự nhiên so với các enzym IDH1 R132H hoặc R132C đột biến và ít có hoạt tính ức chế enzym IDH2 kiểu tự nhiên so với các enzym IDH2 R140Q hoặc R172K đột biến.

Các ví dụ sau đây trong bảng 15 được thử nghiệm cơ bản như được mô tả ở trên và ít có hoạt tính ức chế các enzym kiểu tự nhiên so với các enzym đột biến.

Bảng 15

Ví dụ số	Giá trị IC_{50} của IDH1 kiểu tự nhiên (μM)	Giá trị IC_{50} của IDH2 kiểu tự nhiên (μM)
1	$0,0854 \pm 0,107$, n=2	$0,801 \pm 0,745$, n=2
2	$0,105 \pm 0,113$, n=2	$0,884 \pm 0,748$, n=2
3	0,425	3,37
4	0,302	3,7
6	0,0549	0,493
7	0,233	1,53
8	0,237	1,62
11	0,345	2,08

12	0,277	3,22
13	0,456	7,03
14	0,392	7,4

Thử nghiệm pha loãng vô hạn sinh hóa IDH1 (R132H)

Các hợp chất ví dụ đông khô được hoàn nguyên tới 10 mM hoặc 100 mM bằng DMSO 100% và được giữ ở nhiệt độ trong phòng tới khi được thử nghiệm. Protein IDH1(R132H)-His được biểu hiện và tinh chế bằng các phương pháp đã biết và thường được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Các chất phản ứng thử nghiệm này bao gồm các chất sau: axit α -ketoglutaric (Sigma Cat# K1875), MnCl_2 - Fisher Scientific Cat# M87-100, NADPH - Sigma-Aldrich Cat# N7505, Tris-HCl (Invitrogen, Cat#15567-027), NaCl (Sigma, S3014), dithiothreitol (Sigma, D5545), và TRITON™ X100 (Peirce, 28314). Bộ kit NAD(P)H-Glo™ từ Promega (G9061).

Hệ đệm thử nghiệm sử dụng trong suốt quá trình chứa 100 mM Tris-HCl pH 7,0, 120 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,005% TRITON™ X-100, và 2% DMSO (từ việc bổ sung hợp chất thử nghiệm). Giá trị IC_{50} của mỗi một hợp chất được xác định bằng cách ủ liều đáp ứng của hợp chất, được điều chế trên Echo555, với 1,5 nM IDH1(R132H), 1 mM α -ketoglutarat, 1 mM MnCl_2 , và 15 μM NADPH trong hệ đệm thử nghiệm. Phản ứng được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được làm dừng sử dụng 6-cyclopropyl-5-(isoquinolin-5-yl)-2-[(3R)-4-(3-metoxypentanoyl)-3-methylpiperazin-1-yl]pyridin-3-carbonitril (10 μM). Các nồng độ NADPH được đo sử dụng bộ kit NAD(P)H-Glo™, theo hướng dẫn của nhà phân phối. Đọc tín hiệu phát quang trên Envision (Perkin Elmer; 0,1 giây/Luminescence Mirror/bộ lọc Lum700 WL400-700). Trong thử nghiệm pha loãng vô hạn tiếp theo, nồng độ hợp chất tương đương với $10 \times$ giá trị IC_{50} được ủ sơ bộ với 100 nM IDH1(R132H). Nồng độ của hợp chất luôn lớn hơn hoặc tương đương nồng độ enzym. Sau 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp này được pha loãng tỷ lệ 1:100 vào trong dung dịch chứa α -ketoglutarat (10 mM), MnCl_2 (10 mM), và NADPH (15 μM). Phản ứng enzym cuối cùng này chứa 1 nM IDH1(R132H) và $0,1 \times [\text{IC}_{50}]$. Sau khi ủ 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, nồng độ

NADPH được xác định như xác định ở trên sử dụng 6-xyclopropyl-5-(isoquinolin-5-yl)-2-[(3R)-4-(3-metoxipropanoyl)-3-methylpiperazin-1-yl]pyridin-3-carbonitril và bộ kit NAD(P)H-Glo™. Ba mẫu đối chứng được bao gồm: 1) “đối chứng 10×” chứa 10×IC₅₀ hợp chất trong thử nghiệm ủ sơ bộ và thử nghiệm enzym ngoại trừ 1 mM α -ketoglutarat, 1 mM MnCl₂, và 15 μ M NADPH được sử dụng trong thử nghiệm cuối cùng xác định hoạt tính enzym, 2) “đối chứng hoạt tính tối đa” chứa DMSO thay cho hợp chất trong cả hai thử nghiệm ủ sơ bộ và thử nghiệm enzym, và 3) “đối chứng 0,1×” chứa DMSO thay cho hợp chất trong thử nghiệm ủ sơ bộ và 0,1×IC₅₀ hợp chất trong thử nghiệm enzym. “Đối chứng hoạt tính tối thiểu” thiếu enzym, nhưng mặt khác tương đương với “đối chứng hoạt tính tối đa” được bao gồm. Bộ thứ hai gồm các đối chứng hoạt tính tối đa và tối thiểu được thực hiện sử dụng 1 mM α -ketoglutarat, 1 mM MnCl₂, và 15 μ M NADPH. Mỗi một điều kiện thử nghiệm được thử nghiệm làm ba lần và 32 bản sao được thực hiện đối với đối chứng hoạt tính tối đa (10 mM) và đối chứng hoạt tính tối thiểu (10 mM) trong khi 16 bản sao được tiến hành đối với đối chứng hoạt tính tối đa (1 mM) và đối chứng hoạt tính tối thiểu (1 mM).

Nồng độ của NADP (sản phẩm) được tạo ra trong mỗi một thực nghiệm/đối chứng được xác định sử dụng tỷ lệ % giảm về tín hiệu quan sát được so với đối chứng hoạt tính tối thiểu, chứa 15 μ M NADPH. Đối chứng hoạt tính tối thiểu (1 mM và 10 mM) và đối chứng hoạt tính tối đa (1 mM và 10 mM) được tính trung bình và độ lệch chuẩn được tính toán cho mỗi một đối chứng. Tín hiệu của mỗi một dung dịch pha loãng vô cực và đối với các đối chứng 0,1× được nhân với 15 rồi chia cho số lượng trung bình của các giếng trong đối chứng hoạt tính tối thiểu (10 mM). Lấy 15 trừ đi con số này để tính toán NADP (μ M sản phẩm). Các tính toán tương tự được sử dụng đối với các đối chứng 10× nhưng các đối chứng hoạt tính tối thiểu (1 mM) được sử dụng. Số μ mol của sản phẩm đối với các đối chứng hoạt tính tối đa (1 mM và 10 mM) được tính toán bằng cách lấy các số lượng trung bình nhân với 15 rồi chia cho từng đối chứng hoạt tính tối thiểu tương ứng (1 mM và 10 mM). μ M NADP đối với mỗi một giếng được chia cho đối chứng hoạt tính tối đa trung bình (1 mM hoặc 10 mM) rồi nhân với 100 để xác định % hoạt tính IDH của dung dịch pha loãng vô cực hợp chất, đối chứng 10×, và đối chứng 0,1×. Hợp chất chuyển qua phải thể hiện <30% hoạt tính đối với đối chứng 10× – chứng tỏ rằng, nồng độ ủ sơ bộ là đủ để bão hòa enzym bằng

hợp chất. Ngoài ra, hợp chất cần phải thể hiện >70-80% hoạt tính đối với đối chứng $0,1 \times$ khẳng định rằng, không có sự ức chế ở $0,1 \times$ nồng độ hợp chất pha loãng.

Các hợp chất ví dụ được thử nghiệm cơ bản như được mô tả ở trên và thể hiện % dữ liệu phục hồi đối với IDH1/R132H trong thử nghiệm này. Các hợp chất minh họa và thử nghiệm theo sáng chế ức chế enzym 2 giờ sau khi pha loãng trái ngược với các hợp chất trước đây không ức chế enzym 2 giờ sau khi pha loãng bằng % phục hồi. Dữ liệu từ thử nghiệm này chứng minh rằng, các hợp chất thử nghiệm theo sáng chế tác động theo cách phù hợp với sự ức chế đồng hóa trị của IDH1 đột biến vì sự pha loãng chất ức chế không dẫn đến sự phục hồi hoạt tính enzym.

Các thử nghiệm dựa vào tế bào đối với các chất ức chế IDH1 đột biến

Để thử nghiệm sự ức chế tế bào của IDH1 đột biến R132C, dòng tế bào sarcom xơ HT1080 (mua từ ATCC) được sử dụng. Để thử nghiệm sự ức chế dựa vào tế bào của đột biến R132H, dòng tế bào u thần kinh đệm U87MG (ATCC) được cấy nhiễm một cách ổn định bằng cấu trúc ADN biểu hiện enzym đột biến R132H bằng các phương pháp đã biết và được sử dụng thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Thử nghiệm tế bào HT1080:

15 nghìn tế bào được cấy lên các đĩa 96 giếng có phủ poly-D-lys (15000 tế bào/giếng) 18-24 giờ trước khi xử lý bằng các hợp chất. 4 giờ trước khi xử lý hợp chất, tế bào được làm cho thiếu hụt glutamin bằng cách loại bỏ môi trường bình thường và thay thế bằng môi trường không có glutamin. Sau khi bỏ đói, tế bào được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm với các nồng độ khác nhau ($20 \mu\text{M}$ đến 1 nM ; hoặc $0,2 \mu\text{M}$ đến $0,01 \text{ nM}$) được hòa tan trong môi trường không có glutamin chứa DMSO ở nồng độ cuối là 0,2%. Lần ủ hợp chất đầu tiên trong 1 giờ ở nhiệt độ $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$. Sau 1 giờ, glutamin được bổ sung vào tới nồng độ cuối 2 mM và các tế bào đã xử lý sau đó được ủ trong 18 giờ nữa ở nhiệt độ $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$. Sau 18 giờ ủ, 2HG và αKG trong tế bào được phân tích trong các dịch phân giải tế bào. Các dịch phân giải được điều chế sau khi loại bỏ môi trường và bổ sung hệ đệm chứa 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA/1% TRITON™-X 100 vào các tế bào. Phần phân ước của dịch phân giải được bổ sung vào hỗn hợp của $\text{d}_6\text{-}\alpha\text{KG}$ và $\text{d}_5\text{-3HG}$ làm nội tiêu

chuẩn và hỗn hợp được xử lý bằng O-benzylhydroxylamin với sự có mặt của *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydroclorua (EDC) và pyridin. Các dẫn xuất chất phân tích sau đó được chiết bằng EtOAc, làm khô, và sau đó hoàn nguyên bằng MeOH 50% trong H₂O. Các mẫu điều chế như mô tả được bơm vào HPLC để tách riêng các dẫn xuất 2HG và α KG (và các nội tiêu chuẩn tương ứng) sử dụng phương pháp sắc ký pha đảo trong cột C18. Việc phân tích các mẫu được thực hiện sử dụng phổ khối kế ba tứ cực 6460 (G6460A Agilent). Chuyển dạng các tín hiệu 2HG và α KG phát hiện được thành nồng độ chất phân tích sử dụng tỷ lệ α KG/*d*₆- α KG và tỷ lệ 2HG/*d*₅-3HG mà được ngoại suy bên trong đường cong hiệu chỉnh. Tỷ lệ % ức chế đối với mỗi một mẫu riêng biệt thu được sau khi chuẩn hóa nồng độ 2HG hoặc α KG tính toán theo các tham chiếu tối đa và tối thiểu thu được với sự có mặt và không có mặt của glutamin trong quá trình xử lý tế bào bằng các hợp chất. Các giá trị IC₅₀ thu được từ % ức chế riêng biệt sử dụng phương trình 4 tham số đáp ứng liều sigmoid. Các thao tác tính toán này được thực hiện một cách tự động sử dụng các chương trình phân tích dữ liệu Activity Base (IDBS) hoặc Screener (Genedata).

Kết quả của thử nghiệm này chứng minh rằng, các ví dụ thử nghiệm trong bảng 15 ức chế sự tạo ra 2-hydroxyglutarat, cho thấy sự ức chế IDH1 đột biến R132C trong các tế bào ở thử nghiệm này. α KG, chất chuyển hóa phát sinh bởi IDH1 kiểu tự nhiên không bị tác động bởi các chất ức chế, cho thấy các hợp chất có tính chọn lọc đối với IDH1 đột biến hơn so với IDH1 loại tự nhiên trong các tế bào ở thử nghiệm này. Các giá trị IC₅₀ thu được của các ví dụ sau được đưa ra trong bảng 16. Đối với các thử nghiệm mà trong đó, đường cong ức chế không đạt tới 50%, nồng độ cao nhất được thử nghiệm được thể hiện (ví dụ, IC₅₀ >20 μ M hoặc >0,2 μ M).

Bảng 16

Ví dụ số	HT1080 (R132C, 2-hydroxyglutarat) IC ₅₀ (μ M)	HT1080 (R132C, α KG) IC ₅₀ (μ M)
1	0,000698 $\pm$ 0,000352, n=7	>20,0
2	0,00128 $\pm$ 0,00100, n=8	>20,0
3	0,00127 $\pm$ 0,00044, n=2	>0,200
4	0,00334 $\pm$ 0,00140, n=2	>0,200

Ví dụ số	HT1080 (R132C, 2-hydroxyglutarat) IC ₅₀ (μM)	HT1080 (R132C, αKG) IC ₅₀ (μM)
5	0,000623 ± 0,000745, n=2	>20,0
6	0,00112 ± 0,00052, n=4	19,2
7	0,000625 ± 0,000182, n=2	>0,200
8	0,000775 ± 0,0000981, n=2	>0,200
9	0,00275 ± 0,00046, n=3	>20,0
10	0,00391 ± 0,00259, n=3	>20,0
11	0,00104 ± 0,00050, n=4	>20,0
12	0,00272 ± 0,00330, n=4	>20,0
13	0,000987 ± 0,000009, n=2	>20,0
14	0,00138 ± 0,00015 n=3	>20,0

Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của giá trị trung bình.

Thử nghiệm tế bào U87MG/IDH1R132H

Các tế bào được cấy lên các đĩa 96 giếng được phủ poly-D-lys (12000 tế bào/giếng) 18-24 giờ trước khi xử lý bằng các hợp chất. 4 giờ trước khi xử lý hợp chất, tế bào được làm cho thiếu hụt glutamin bằng cách loại bỏ môi trường bình thường và thay thế bằng môi trường không có glutamin. Sau khi bỏ đói, tế bào được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm với các nồng độ khác nhau (20 μM đến 1 nM) được hòa tan trong môi trường không có glutamin chứa DMSO ở nồng độ cuối là 0,2%. Lần ủ hợp chất đầu tiên trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂. Sau 1 giờ, glutamin được bổ sung vào tới nồng độ cuối 2 mM và các tế bào đã xử lý sau đó được ủ trong 18 giờ nữa ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂. 2HG trong tế bào được phân tích trong các dịch phân giải tế bào thu được sau khi loại bỏ môi trường và xử lý bằng hệ đệm phân giải (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA/1% TRITON™-X 100). Dịch phân giải tế bào được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho tới khi xử lý. Để chiết chất phân tích, lượng phân ước của dịch phân giải đã làm tan đông được chuyển lên đĩa 96 giếng sâu và được xử lý bằng MeOH lạnh chứa d₅-3HG làm nội tiêu chuẩn, sau đó bằng cloroform và H₂O (1:4:3:2). Pha ở trên được tập hợp sau khi tách và được bơm vào HPLC để tách 2HG (và nội tiêu chuẩn) sử dụng phương pháp sắc ký tương tác ưa nước

(HILIC) kết hợp phát hiện MS/MS trong 6460 phổ khối kế ba tứ cực. Tỷ lệ % ức chế đối với mỗi một mẫu riêng biệt thu được sau khi chuẩn hóa nồng độ 2HG tính toán theo các tham chiếu tối đa và tối thiểu thu được với sự có mặt và không có mặt glutamin trong quá trình xử lý tế bào bằng các hợp chất. Các giá trị IC₅₀ thu được từ % ức chế riêng biệt sử dụng phương trình 4 tham số đáp ứng liều xichma. Các thao tác tính toán này được thực hiện một cách tự động sử dụng các chương trình phân tích dữ liệu Activity Base (IDBS) hoặc Screener (Genedata).

Các ví dụ sau được thử nghiệm cơ bản như được mô tả ở trên và thể hiện hoạt tính ức chế đối với IDH1/R132H đột biến trong các tế bào U87MG trong thử nghiệm này được thể hiện trong bảng 17 dưới đây.

Bảng 17

Ví dụ số	U87MG (IDH1/R132H 2-hydroxyglutarat IC ₅₀ (μM)
1	0,000209 ± 0,000100, n=6
2	0,000406 ± 0,000375, n=8
3	0,000426 ± 0,000188, n=2
4	0,000805 ± 0,000187, n=2
5	0,000295 ± 0,00200, n=2
6	0,000379 ± 0,000202, n=2
7	0,000356 ± 0,000178, n=2
8	0,000432 ± 0,000016, n=2
9	0,000388 ± 0,000703, n=2
10	0,000529 ± 0,000356, n=2
11	0,000258 ± 0,000209, n=3
12	0,00135 ± 0,00151, n=4
13	0,000267 ± 0,000227, n=2
14	0,000353 ± 0,000483, n=2

Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của giá trị trung bình.

Thử nghiệm 2-hydroxyglutarat In Vivo

Để thử nghiệm *in vivo* đối với các chất ức chế IDH1, các khối u ghép ngoại lai dưới da được phát triển ở chuột chui lông không có tuyến ức (20-22g, Harlan Laboratories) sau khi cấy tế bào HT1080 (sarcom xơ mang IDH1 đột biến R132C) hoặc tế bào TB08 (u nguyên bào thần kinh đệm thứ phát mang IDH1 đột biến R132H). Chuột được cung cấp thức ăn và nước tùy ý và được tập quen môi trường 1 tuần trước khi cấy tế bào. Tế bào khối u (HT1080) hoặc mảnh khối u (TB08) được cấy vào vùng sườn phía sau bên phải. Đối với HT1080, $5,0 \times 10^6$ tế bào được cấy trong hỗn hợp 1:1 với Matrigel ở thể tích cuối là 0,2 ml. Đối với TB08, các mảnh khối u sinh ra từ các mẫu khối u cấy trước đó được cấy trực tiếp vào vùng sườn phía sau. Thể tích khối u được đo bằng thước cặp hai lần hàng tuần và thể tích khối u được tính toán sử dụng $0,536 \times L \times W^2$, trong đó L=chiều dài và W=chiều rộng. Khi thể tích khối u đạt tới 150-400 mm³, động vật được phân chia ngẫu nhiên vào các nhóm (n=3-6 mỗi nhóm) và được định liều bằng các chất ức chế IDH1 hoặc đối chứng thể mang. Đối với các chất ức chế IDH1, các hợp chất được phối chế trong thể mang chứa 1% hydroxyetylxenluloza/0,25% TweenTM 80/0,05% chất chống tạo bọt hoặc 10% Acacia với 1,1 mol đương lượng HCl. Các hợp chất được nghiền siêu âm để thu được huyền phù. Các hợp chất được định liều trên cơ sở miligam trên kilogam (mpk) thông qua ống thông theo đường miệng với thể tích cuối là 0,2 ml. Để xác định sự ức chế 2HG, các hợp chất được định liều hai lần hằng ngày (BID) trong 3 ngày (tổng số liều lượng = 6). Sau khi xử lý bằng hợp chất, chuột được gây chết nhẹ nhàng bằng cách gây mê bằng isofluran và làm trật khớp cổ. Các khối u được cắt ra, đặt vào trong các ống nghiệm có dán nhãn, và làm đông lạnh ngay trong nitơ lỏng. Bảo quản các khối u ở nhiệt độ -80°C để xử lý.

Điều chế các dịch phân giải khối u

Hệ đệm XY Lite được điều chế trong nước cất độ phân tử và chứa các thành phần sau: 25 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% TRITONTM X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA. Bổ sung 800 µl dung dịch hỗn hợp Halt Proteaza và chất ức chế phosphataza (HaltTM Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-Free Thermo Scientific, Cat# 78441) vào hệ đệm XY Lite (40 ml). Các mẫu được tạo xoáy và sau đó làm lạnh trên nước đá. Các ống nghiệm phân giải A nắp màu da cam được ghi nhãn và đặt trong một giá để trên nước đá. Một bộ cối và chày bằng gốm được trong nước

đá khô để làm lạnh. Một mảnh nhôm lá hình vuông 2×2 inso được đặt ở đáy của cối giã. Mẫu khối u được chuyển vào trong cối giã được làm lạnh trước trên mảnh lá hình vuông. Nitơ lỏng (khoảng 5 ml) được bổ sung và cho phép bay hơi, làm siêu lạnh khối u. Một mảnh lá nhôm khác được đặt được đặt trên khối u và khối u được làm vỡ thành các mảnh nhỏ bằng chày gôm. Khối u nghiền nhanh chóng được chuyển vào ống nghiệm phân giải. Hệ đệm XY Lite làm lạnh bằng nước đá (500 μ L) được bổ sung vào mỗi một ống nghiệm và đậy nắp. Sau đó, các khối u được xử lý trên thiết bị FastPrep-24 MP Biomedicals bằng cách quay hai lần trong 35 giây mỗi lần ở tốc độ hiệu chỉnh 5. Sau đó, ly tâm các mẫu trong thiết bị ly tâm Beckman Microfuge R ở nhiệt độ 4°C với tốc độ 14000 vòng/phút trong 30 phút. Lớp nổi trên bề mặt được chuyển lên đĩa 96 giếng sâu được làm lạnh trước. Viên kết được loại bỏ.

Thử nghiệm protein

Đĩa pha loãng thử nghiệm protein trước tiên được tạo ra bằng cách bổ sung hệ đệm XY (145 μ L) vào đĩa Corning đáy tròn 96 giếng không vô trùng. Bổ sung dịch phân giải khối u (5 μ L) vào đĩa này và trộn kết hợp nhẹ nhàng. Đĩa được giữ ở trên nước đá. Các dung dịch pha loãng hàng loạt của BSA chuẩn (Thermo Scientific cat. 23209 2 mg/mL) được thiết lập như sau: 5 ống nghiệm 0,5 mL được đặt ở trên giá và bổ sung hệ đệm XY (60 μ L) vào mỗi một ống nghiệm. Bổ sung dung dịch gốc BSA (60 μ L) vào ống nghiệm thứ nhất và tạo xoáy. Chuyển 60 μ L từ ống nghiệm thứ nhất sang ống nghiệm tiếp theo, tạo xoáy và tiếp tục cho tới khi hoàn thành loạt dung dịch pha loãng như sau: Ống nghiệm 1= dung dịch gốc BSA, các ống nghiệm từ 2-5 là các dung dịch pha loãng 1:2, ống nghiệm 6= duy nhất hệ đệm XY. Các chất phản ứng thử nghiệm protein BCA nhiệt được kết hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chất phản ứng BCA hỗn hợp (200 μ L) được bổ sung vào mỗi một mẫu và được ủ trong 15 phút. Đọc kết quả của thử nghiệm protein trên thiết bị đọc SOFTmax Pro Plate Reader. Dựa vào các kết quả thử nghiệm protein, lượng thích hợp của hệ đệm XY được bổ sung vào mỗi một dịch phân giải khối u để tạo ra nồng độ protein cuối là 5 mg/mL. Tất cả các mẫu được ghi nhãn và bảo quản ở nhiệt độ -80°C .

Phân tích chất chuyển hóa trong các dịch phân giải khối u

Các tác dụng ức chế IDH1 in vivo lên nồng độ của toàn bộ 2HG và α KG được xác định bằng phân tích sắc ký-phổ khối lỏng (LC-MS) của các khối u ghép ngoại lai. Phương pháp sử dụng dẫn xuất hóa bằng O-benzylhydroxylamin trước khi phân tích bằng LC-MS. 10 microlit của mỗi một dịch phân giải khối u được đưa lên đĩa 96 giếng sâu và được kết hợp với 100 μ L dung dịch nội chuẩn chứa 10 μ M d₅-3HG và 10 μ M d₆- α KG. 50 μ L của 1 M O-benzylhydroxylamin trong hệ đệm pyridin (8,6% pyridin, pH 5) và 50 μ L của 1 M N-(3-dimetylaminopropyl)-N-etylcarbodiimide hydroclorua (EDC) trong hệ đệm pyridin được bổ sung vào mỗi một mẫu. Phản ứng dẫn xuất hóa tiến hành ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sử dụng bộ xử lý dịch lỏng Beckman Biomek FX, bổ sung 600 μ L EtOAc vào mỗi một mẫu. Đậy kín các đĩa và tạo xoáy trong 5 phút, sau đó, ly tâm các đĩa trong 5 phút ở tốc độ 4000 vòng/phút trong thiết bị ly tâm Eppendorf 5810R. Chuyển 400 μ L lớp ở trên lên một đĩa 96 giếng mới. Làm khô các mẫu trong môi trường nitơ gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C và hoàn nguyên bằng 100 μ L hỗn hợp MeOH/nước (1:1). Bơm 1 microlit mẫu đã dẫn xuất hóa lên hệ LC-MS bao gồm hệ Shimadzu Prominence 20A HPLC và phổ khối kế ba tứ cực Thermo Quantum Ultra™. Tách riêng các chất phân tích trên cột Water XBridge™ C18 (2,1 x 50 mm, 3,5 μ m) với tốc độ dòng là 0,6 mL/phút. Pha động A là axit formic 0,1% trong nước và pha động B là MeOH. Biên dạng gradien là: 0 phút, 5% B; 3 phút, 100% B; 4,00 phút, 100% B; 4,1 phút, 5% B; 5,50 phút, dừng. Phổ khối kế sử dụng bộ dò HESI-II hoạt động theo phương thức giám sát phản ứng lựa chọn ion dương. Các đường cong hiệu chỉnh được xây dựng bằng cách vẽ đồ thị nồng độ chất phân tích với các tỷ lệ diện tích đỉnh chất phân tích/nội chuẩn và tiến hành lắp khít bình phương của dữ liệu sử dụng phương pháp bình chỉnh 1/nồng độ bằng phần mềm Xcalibur™. Các nồng độ chất phân tích của các chất chưa biết được tính toán lại từ đường cong hiệu chỉnh. Dữ liệu chất chuyển hóa từ thử nghiệm LC-MS được biểu hiện ở dạng nmol/mg protein. Mức 2HG trung bình trong nhóm xử lý bằng chất mang được sử dụng để xác định đối chứng 0% ức chế. Sau đó, % ức chế ở mỗi một động vật xử lý bằng chất ức chế được xác định so với đối chứng chất mang. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm JMP để xác định % ức chế trung bình ở mỗi một nhóm định liều, độ lệch chuẩn, và sai số chuẩn.

Dữ liệu chứng minh sự ức chế *in vivo* của 2-hydroxyglutarat ở chuột ghép ngoại lai đột biến IDH1 bằng các hợp chất minh họa và thử nghiệm được thể hiện trong bảng 18 dưới đây.

Bảng 18

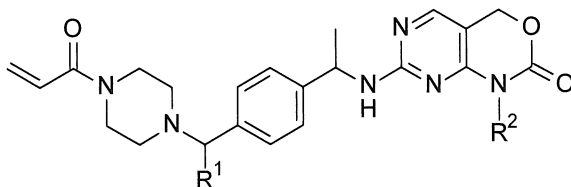
Mô hình ghép ngoại lai	Xử lý hoặc Ví dụ số	Liều	Chuột (n)	2HG, % ức chế trung bình	Độ lệch chuẩn	Trung bình sai số chuẩn
TB08 (R132H)	Chất mang	0 mpk	5	0	30,3	13,55
TB08 (R132H)	1	1 mpk	5	21,4	21	9,38
TB08 (R132H)	1	2 mpk	5	16,1	30,3	13,6
TB08 (R132H)	1	4 mpk	5	41,5	26	11,6
TB08 (R132H)	1	8 mpk	5	78,8	1,8	0,8
TB08 (R132H)	1	16 mpk	5	92,1	1,8	0,8
TB08 (R132H)	1	32 mpk	5	95,8	0,7	0,3
Mô hình ghép ngoại lai	Xử lý hoặc Ví dụ số	Liều	Chuột số	2HG, % ức chế trung bình	Độ lệch chuẩn	Trung bình sai số chuẩn
TB08 (R132H)	Chất mang	0 mpk	5	0	39,2	17,5
TB08 (R132H)	2	1 mpk	5	37,4	13,3	5,9
TB08	2	2 mpk	5	23,9	16,2	7,2

(R132H)						
TB08 (R132H)	2	4 mpk	5	63,7	12,1	5,4
TB08 (R132H)	2	8 mpk	5	80,95	6,27	2,8
TB08 (R132H)	2	16 mpk	5	92,97	2,63	1,1
TB08 (R132H)	2	32 mpk	5	96,88	0,68	0,3
Mô hình ghép ngoại lai	Xử lý hoặc Ví dụ số	Liều	Chuột số	2HG, % ức chế trung bình	Độ lệch chuẩn	Trung bình sai số chuẩn
TB08 (R132H)	Chất mang	0,00 mpk	5	0	24,4	10,9
TB08 (R132H)	8	10,0 mpk	5	60,36	10,06	4,5
TB08 (R132H)	7	10,0 mpk	5	69,56	9,15	4,1
TB08 (R132H)	4	10,0 mpk	5	61,82	14,4	6,4
TB08 (R132H)	3	10,0 mpk	5	87,26	3,95	1,77
TB08 (R132H)	14	10,0 mpk	5	86,71	5,27	2,36
Mô hình ghép ngoại lai	Xử lý hoặc Ví dụ số	Liều	Chuột số	2HG, % ức chế trung bình	Độ lệch chuẩn	Trung bình sai số chuẩn
TB08 (R132H)	Chất mang	0,00 mpk	5	0	26,87	12,02

TB08 (R132H)	11	10,0 mpk	5	90,63	4,5	2,01
Mô hình ghép ngoại lai	Xử lý hoặc Ví dụ số	Liều	Chuột số	2HG, % ức chế trung bình	Độ lệch chuẩn	Trung bình sai số chuẩn
TB08 (R132H)	Chất mang	0,00 mpk	5	0	39,6	17,7
TB08 (R132H)	13	10,0 mpk	5	86,3	3,7	1,67
TB08 (R132H)	12	10,0 mpk	5	94,16	0,66	0,3

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



trong đó:

R^1 là $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, hoặc $-\text{CH}_2$ -xyclopropyl;

R^2 là $-\text{CH}_3$ hoặc $-\text{CH}_2\text{CH}_3$; hoặc

muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, hợp chất này là:

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on;

7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on;

1-ethyl-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)propyl]phenyl]ethyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 1;

1-ethyl-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)propyl]phenyl]ethyl]amino]-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on, chất đồng phân 2;

hoặc muối được dụng của hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất này.

3. Hợp chất theo điểm 2, hợp chất này là 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-xyclopropyl-1-(4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl)ethyl]phenyl]ethyl]amino]-1-ethyl-4H-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-on hoặc muối được dụng của hợp chất này.

4. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1, hoặc muối được dụng của hợp chất này, và chất mang được dụng.