



(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)



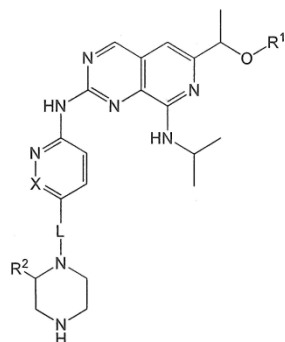
1-0036156

(51)⁷ C07D 471/04; A61P 11/00; A61P 29/00; (13) B
A61P 43/00; A61P 9/10; A61K 31/519;
A61P 35/00

- (21) 1-2019-02901 (22) 27/11/2017
(86) PCT/JP2017/042437 27/11/2017 (87) WO 2018/097295 A1 31/05/2018
(30) 2016-229973 28/11/2016 JP
(45) 26/06/2023 423 (43) 25/09/2019 378A
(73) TEIJIN PHARMA LIMITED (JP)
2-1, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1000013, Japan
(72) MIYAMOTO, Hidetoshi (US); MIZUNO, Tsuyoshi (JP); UNOKI, Gen (JP);
MIYAZAWA, Yuki (JP); YAJIMA, Naoki (JP).
(74) Văn phòng Luật sư MINERVAS (MINERVAS)

(54) TINH THỂ CỦA HỢP CHẤT PYRIDO[3,4-D]PYRIMIDIN HOẶC SOLVAT CỦA NÓ, VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA TINH THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến tinh thể của hợp chất pyrido[3,4-d]pyrimidin có hoạt tính ức chế CDK4/6 tốt. Tinh thể của hợp chất được biểu thị bởi công thức (I). Trong công thức này, R¹ biểu thị nguyên tử hydro hoặc nhóm C₁₋₃ alkyl; R² biểu thị nguyên tử hydro hoặc nhóm oxo; L biểu thị liên kết đơn hoặc nhóm C₁₋₃ alkylen; và X biểu thị CH hoặc N. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa tinh thể này.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập đến

Sáng chế đề cập đến các tinh thể của hợp chất pyrido[3,4-d]pyrimidin hoặc solvat của nó mà có hoạt tính ức chế kháng kinaza phụ thuộc xyclin 4 và/hoặc kinaza phụ thuộc xyclin 6 (sau đây gọi tắt là “CDK4/6”) và hữu ích đối với việc phòng ngừa hoặc điều trị viêm khớp dạng thấp, chứng xơ cứng động mạch, xơ phổi, nhồi máu não và/hoặc ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chất ức chế CDK4/6 có thể được sử dụng để điều trị các bệnh tật khác nhau do sự tăng trưởng tế bào bất thường, bao gồm ung thư, rối loạn tim mạch, bệnh thận, nhiễm khuẩn đặc hiệu và bệnh tự miễn, và được kỳ vọng có hiệu quả trong việc điều trị viêm khớp dạng thấp, chứng xơ cứng động mạch, xơ phổi, nhồi máu não, và ung thư. Những lý do tại sao việc kìm hãm chu kỳ tế bào và ngăn cản sự phát triển của tế bào thông qua sự ức chế CDK được kỳ vọng sẽ có hiệu quả trong chữa trị các tình trạng này dựa trên các phát hiện kỹ thuật sau đây.

Viêm khớp dạng thấp được biết đến bao gồm sự hình thành dịch rỉ viêm khớp thông qua sự tăng sinh quá mức của các tế bào hoạt dịch. Đã có báo cáo rằng sự tăng sinh quá mức này có thể bị giảm bằng việc cho động vật uống chất ức chế CDK4/6 (NPL 1). Phức hợp CDK4-xyclin D điều chỉnh sự tạo ra MMP3 trong các tế bào hoạt dịch được tìm thấy từ bệnh nhân viêm khớp dạng thấp. Sự điều chỉnh tiêu cực hoạt tính của CDK4/6 ức chế không chỉ sự tăng sinh mà còn sự tạo ra MMP3 (NPL 2).

Do đó, các chất ức chế CDK4/6 được kỳ vọng thể hiện cả hiệu quả ức chế đối với sự tăng sinh của các tế bào hoạt dịch và hiệu quả bảo vệ xương sụn trong viêm khớp dạng thấp.

Sự cảm ứng biểu hiện của protein ức chế chu kỳ tế bào p21 với một vector adenoviral có hiệu quả trong mẫu xơ phổi chuột (NPL 3).

Mức độ xyclin D1/CDK4 được biết đến là tăng trong mẫu nhồi máu não chuột

liên quan đến tử vong neuron thần kinh do thiếu máu cục bộ. Sự tử vong của tế bào thần kinh được giảm bằng cách sử dụng flavopiridol, một chất ức chế CDK không chọn lọc (NPL 4).

Quy trình xyclin D-CDK4/6-INK4a-Rb thường được phát hiện trong ung thư ở người do sự bất thường của bất kỳ yếu tố nào góp phần vào sự phát triển của các tế bào ung thư, như là mất chức năng p16INK4a, sự biểu hiện quá mức xyclin D1, sự biểu hiện quá mức CDK4, hoặc mất chức năng Rb (NPL 5). Bất thường như vậy thúc đẩy quy trình chu kỳ tế bào từ pha G1 sang pha S, và quy trình này chắc chắn đóng một vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa gây bệnh ung thư hoặc sự tăng trưởng bất thường của các tế bào ung thư.

Các chất ức chế CDK4/6 có thể hiệu quả, đặc biệt đối với khối u bất thường ở các gen mà kích hoạt hoạt tính kinase CDK4/6, như các bệnh ung thư liên quan đến sự dịch chuyển xyclin D, bệnh ung thư liên quan đến sự mở rộng xyclin D, các bệnh ung thư liên quan đến sự mở rộng hoặc bộc lộ quá mức CDK4 hoặc CDK6, và các bệnh ung thư liên quan đến sự bất hoạt của p16. Các chất ức chế CDK4/6 có thể hiệu quả trong điều trị các bệnh ung thư liên quan đến bất thường về di truyền trong bộ điều chỉnh hướng ngược dòng của xyclin D, lượng tăng lên do các sai sót trong bộ điều chỉnh hướng ngược dòng.

Thực tế, nhiều hợp chất mà ức chế hoạt tính CDK4/6 đã được tổng hợp và bộc lộ trong kỹ thuật, và các hợp chất như vậy đã được thử nghiệm lâm sàng cho điều trị các bệnh ung thư, như là ung thư vú (NPL 6).

Hầu hết các phép trị liệu bằng bức xạ cấp tính và nghiêm trọng và các độc tố hóa trị liệu do các ảnh hưởng của các tế bào gốc và các tế bào tiền thân. Chất ức chế CDK4/6 gây ra sự ngừng chu kỳ tế bào tạm thời đối với các tế bào gốc và tiền thân sinh huyết, và bảo vệ chúng khỏi độc tính tế bào trị liệu bằng bức xạ hoặc hóa trị liệu. Sau khi điều trị với chất ức chế, các tế bào gốc và tiền thân sinh huyết (HSPCs) quay trở lại từ trạng thái ngủ tạm thời và sau đó hoạt động bình thường. Do đó, sức đề kháng hóa trị liệu với việc sử dụng chất ức chế CDK4/6 được kỳ vọng tạo ra sự bảo vệ đáng kể cho tủy xương (NPL 7).

Do đó, các chất ức chế CDK4/6 được kỳ vọng để có hiệu quả trong điều trị, ví

dụ, viêm khớp dạng thấp, chứng xơ cứng động mạch, xơ phổi, nhồi máu não, hoặc ung thư, và bảo vệ tủy xương, đặc biệt, trong điều trị viêm khớp dạng thấp hoặc ung thư và bảo vệ tủy xương.

Các chất ức chế CDK bao gồm CDK4/6 đã được mô tả trong các PTL 1 và 2.

Danh sách tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

[PTL1] WO2003/062236A

[PTL2] WO2010/020675A

Tài liệu phi sáng chế

[NPL 1] Taniguchi, K et al., Nature Medicine, quyển 5, trang 760-767 (1999)

[NPL 2] Nonomura Y et al., Arthritis & Rheumatology 2006, Jul; 54 (7): trang 2074-83

[NPL 3] American Journal Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology, 2004, quyển 286, trang L727-L733

[NPL 4] Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, quyển 97, trang 10254-10259

[NPL 5] Science, quyển 254, trang 1138-1146 (1991)

[NPL 6] Guha M, Nature Biotechnology 2013, Mar; 31 (3): trang 187

[NPL 7] Journal of Clinical Investigation 2010; 120 (7): trang 2528-2536

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất pyrido[3,4-d]pyrimidin hoặc solvat của nó mà thể hiện hoạt tính ức chế CDK4/6 tốt.

Cách thức giải quyết vấn đề

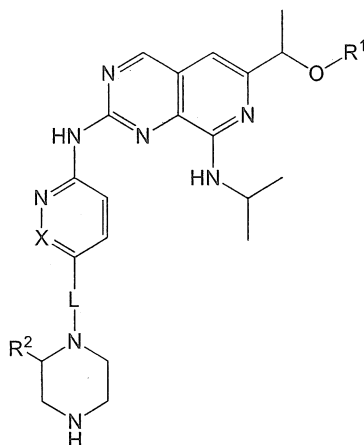
Sau khi tiến hành các nghiên cứu sâu rộng để thu được các đối tượng nêu trên, các nhà sáng chế đã phát hiện thấy hợp chất pyrido[3,4-d]pyrimidin có các cấu trúc cụ thể thể hiện hoạt tính ức chế CDK4/6 tốt.

Các nhà sáng chế cũng phát hiện thấy một số hợp chất này có dạng tinh thể mà có sự ổn định hóa học và thích hợp làm các thành phần dược phẩm hoạt tính.

Vì vậy, sáng chế đề cập đến tinh thể của hợp chất được biểu thị bởi công thức (I) hoặc solvat của nó, trong đó hợp chất được biểu thị bởi công thức (I) được chọn từ nhóm gồm có:

1-(6-(((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on;

1-(6-(((6-((1R)-1-metoxetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin-2-on.



(I)

Trong công thức này, R¹ biểu thị nguyên tử hydro hoặc nhóm C₁₋₃ alkyl, R² biểu thị nguyên tử hydro hoặc nhóm oxo (trong trường hợp là nhóm oxo, R² liên kết với vòng piperazin thông qua một liên kết đôi), L biểu thị liên kết đơn hoặc nhóm C₁₋₃ alkyl, và X biểu thị CH hoặc N; với điều kiện là hợp chất được biểu thị bởi công thức (I) được chọn từ nhóm gồm có:

1-(6-(((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on;

1-(6-(((6-((1R)-1-metoxetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin-2-on;

(R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxetyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmetyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề xuất tinh thể của hợp chất pyrido[3,4-d]pyrimidin hoặc solvat của nó mà thể hiện hoạt tính ức chế CDK4/6 tốt và hữu dụng như thuốc điều trị hoặc phòng ngừa của, ví dụ, viêm khớp dạng thấp, chứng xơ cứng động mạch, xơ phổi,

nhồi máu não và/hoặc ung thư.

Tinh thể theo sáng chế có thể được sử dụng làm thành phần dược phẩm hoạt tính trong sản xuất sản phẩm dược.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

[FIG.1] Hình 1 là phổ nhiễu xạ bột tia X của Tinh thể D của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

[FIG.2] Hình 2 là phổ nhiễu xạ bột tia X của Tinh thể A của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

[FIG.3] Hình 3 là phổ nhiễu xạ bột tia X của Tinh thể A của 1-(6-((6-((1R)-1-metoxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin.

[FIG.4] Hình 4 là phổ nhiễu xạ bột tia X của Tinh thể B của 1-(6-((6-((1R)-1-metoxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin.

[FIG.5] Hình 5 là phổ nhiễu xạ bột tia X của Tinh thể A của (R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxyetyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmetyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin.

[FIG.6] Hình 6 là phổ nhiễu xạ bột tia X của Tinh thể B của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

[FIG.7] Hình 7 là phổ nhiễu xạ bột tia X của tinh thể (Tinh thể C) của solvat của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on với dimetyl sulfoxit.

[FIG.8] Hình 8 là phổ nhiễu xạ bột tia X của Tinh thể I của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

[FIG.9] Hình 9 là phổ nhiễu xạ bột tia X của Tinh thể C của 1-(6-((6-((1R)-1-

metoxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin.

[FIG.10] Hình 10 là phổ hấp thụ hồng ngoại của Tinh thể D của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

[FIG.11] Hình 11 là phổ hấp thụ hồng ngoại của Tinh thể A của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

[FIG.12] Hình 12 là phổ hấp thụ hồng ngoại của tinh thể (Tinh thể C) của solvat của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on với dimetyl sulfoxit.

[FIG.13] Hình 13 là phổ hấp thụ hồng ngoại của tinh thể I của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

[FIG.14] Hình 14 là phổ hấp thụ hồng ngoại của Tinh thể A của 1-(6-((6-((1R)-1-metoxetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin.

[FIG.15] Hình 15 là phổ hấp thụ hồng ngoại của Tinh thể C của 1-(6-((6-((1R)-1-metoxetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin.

[FIG.16] Hình 16 là phổ hấp thụ hồng ngoại của Tinh thể A của (R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxetyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmetyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin.

[FIG.17] Các hình 17-1 và 17-2 là phổ NMR dạng rắn (^{13}C) của Tinh thể D của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on. Hình 17-1 là phổ đã thu được trong chế độ 6500Hz, và Hình 17-2 là phổ đã thu được trong chế độ 14000Hz.

[FIG.18] Hình 18 là phổ NMR dạng rắn (^{15}N) của Tinh thể D của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

[FIG.19] Các hình 19-1 và 19-2 là phổ NMR dạng rắn (^{13}C) của Tinh thể A của 1-(6-(((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on. Hình 19-1 là phổ đã thu được trong chế độ 6500Hz, và Hình 19-2 là phổ đã thu được trong chế độ 14000Hz.

[FIG.20] Hình 20 là phổ NMR dạng rắn (^{15}N) của Tinh thể A của 1-(6-(((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

[FIG.21] Các hình 21-1 và 21-2 là phổ NMR dạng rắn (^{13}C) của Tinh thể A của 1-(6-(((6-((1R)-1-metoxetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin. Hình 21-1 là phổ đã thu được trong chế độ 6500Hz, và Hình 21-2 là phổ đã thu được trong chế độ 14000Hz.

[FIG.22] Hình 22 là phổ NMR dạng rắn (^{15}N) của Tinh thể A của 1-(6-(((6-((1R)-1-metoxetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin.

[FIG.23] Các hình 23-1 và 23-2 là phổ NMR dạng rắn (^{13}C) của Tinh thể A của (R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxetyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmetyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin. Hình 23-1 là phổ đã thu được trong chế độ 6500Hz, và Hình 23-2 là phổ đã thu được trong chế độ 14000Hz.

[FIG.24] Hình 24 là phổ NMR dạng rắn (^{15}N) của Tinh thể A của (R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxetyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmetyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tinh thể theo sáng chế được đặc trưng bởi phổ nhiễu xạ bột tia X (XRD), phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC), phổ hấp thụ hồng ngoại biến đổi Fourier (sau đây gọi tắt là “phổ hấp thụ hồng ngoại”) và/hoặc phổ NMR dạng rắn. Phổ nhiễu xạ bột tia X (XRD) của các tinh thể này thể hiện các dạng khác biệt, mỗi tinh thể này có các giá trị cụ thể ở góc nhiễu xạ 2θ . Các tinh thể này cũng thể hiện các trạng thái nhiệt khác biệt theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC). Phổ hấp thụ hồng ngoại của các tinh thể này thể hiện các dạng khác biệt, mỗi tinh

thể này có phổ hấp thụ hồng ngoại riêng với số sóng khác biệt. Phổ NMR dạng rắn ^{13}C của các tinh thể này thể hiện các dạng khác biệt, mỗi tinh thể này có độ dịch chuyển hóa học riêng (ppm). Phổ NMR dạng rắn ^{15}N của các tinh thể này thể hiện các dạng khác biệt, mỗi tinh thể này có độ dịch chuyển hóa học riêng (ppm).

Trong khi sáng chế bao gồm tinh thể bất kỳ của một hợp chất được biểu thị bởi công thức (I), phần mô tả sau đây sẽ được tập trung vào các phương án theo sáng chế, bao gồm chín tinh thể của ba hợp chất sau đây:

- 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on (sau đây gọi tắt là “Hợp chất (a)”);
- 1-(6-((6-((1R)-1-metoxetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin- (sau đây gọi tắt là “Hợp chất (b)”); và
- (R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxetyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmetyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin (sau đây gọi tắt là “Hợp chất (c)”).

Tinh thể D của Hợp chất (a) thể hiện các đỉnh đặc trưng tại góc nhiễu xạ $2\theta = 6,3^\circ, 6,6^\circ, 11,6^\circ, 16,9^\circ$ và 20° trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Tinh thể D của Hợp chất (a) thể hiện dạng hình thành như được minh họa ở Hình 1 trên phổ nhiễu xạ bột tia X.

Tinh thể D của Hợp chất (a) thể hiện đỉnh thu nhiệt với nhiệt độ khởi phát ngoại suy 277°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC).

Tinh thể D của Hợp chất (a) thể hiện các đỉnh hấp thụ tại các số sóng 703 cm^{-1} , 896 cm^{-1} và 3418 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại khác biệt đã thu được theo phương pháp KBr. Tinh thể D của Hợp chất (a) cũng thể hiện đồ thị phổ hấp thụ hồng ngoại như được minh họa trong Hình 10.

Tinh thể D của Hợp chất (a) thể hiện độ dịch chuyển hóa học là 136,0ppm, 111,2ppm, 105,1ppm, 101,8ppm, 52,7ppm, 49,6ppm, 42,9ppm, 23,8ppm và 18,5 ppm trên phổ NMR dạng rắn ^{13}C . Tinh thể D của Hợp chất (a) cũng thể hiện đồ thị phổ NMR dạng rắn ^{13}C như được minh họa trong Hình 17-1 (6500Hz) và Hình 17-2 (14000Hz).

Tinh thể D của Hợp chất (a) thể hiện độ dịch chuyển hóa học tại 248,6ppm, 245,7ppm, 229,2ppm, 214,5ppm, 174,3ppm, 86,5ppm, 54,7ppm và -12,4ppm trên

phổ NMR dạng rắn ^{15}N . Tinh thể D của Hợp chất (a) cũng thể hiện đồ thị phổ NMR dạng rắn ^{15}N như được minh họa trong Hình 18.

Tinh thể A của Hợp chất (a) thể hiện các đỉnh khác biệt tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,3^\circ, 7,3^\circ, 10,3^\circ, 15,1^\circ$ và $17,4^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Tinh thể A của Hợp chất (a) cũng thể hiện một dạng như được minh họa trong Hình 2 trên phổ nhiễu xạ bột tia X.

Tinh thể A của Hợp chất (a) thể hiện đỉnh thu nhiệt với nhiệt độ khởi phát ngoại suy 277°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC).

Tinh thể A của Hợp chất (a) thể hiện các đỉnh hấp thụ tại các số sóng 874 cm^{-1} , 1330 cm^{-1} và 3314 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại đã thu được theo phương pháp KBr. Tinh thể A của Hợp chất (a) cũng thể hiện đồ thị phổ hấp thụ hồng ngoại như được minh họa trong Hình 11.

Tinh thể A của Hợp chất (a) thể hiện các độ dịch chuyển hóa học $154,7\text{ppm}$, $138,8\text{ppm}$, $133,6\text{ppm}$, $113,2\text{ppm}$, $101,6\text{ppm}$, $100,4\text{ppm}$, $67,4\text{ppm}$, $51,8\text{ppm}$, $26,6\text{ppm}$ và $23,3\text{ppm}$ trên phổ NMR dạng rắn ^{13}C . Tinh thể A của Hợp chất (a) cũng thể hiện đồ thị phổ NMR dạng rắn ^{13}C như được minh họa trong Hình 19-1 (6500Hz) và Hình 19-2 (14000Hz).

Tinh thể A của Hợp chất (a) thể hiện các độ dịch chuyển hóa học $243,6\text{ppm}$, $86,7\text{ppm}$, $56,7\text{ppm}$ và $-12,4\text{ppm}$ phổ NMR dạng rắn ^{15}N . Tinh thể A của Hợp chất (a) cũng thể hiện đồ thị phổ NMR dạng rắn ^{15}N như được minh họa trong Hình 20.

Tinh thể B của Hợp chất (a) thể hiện các đỉnh khác biệt tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,3^\circ, 6,0^\circ, 6,7^\circ, 10,4^\circ$ và $20,8^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Tinh thể B của Hợp chất (a) cũng thể hiện một dạng như được minh họa trong Hình 6 trên phổ nhiễu xạ bột tia X.

Tinh thể B của Hợp chất (a) thể hiện đỉnh thu nhiệt với nhiệt độ khởi phát ngoại suy 271°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC).

Tinh thể C của Hợp chất (a) thể hiện các đỉnh khác biệt tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 6,0^\circ, 10,0^\circ, 13,7^\circ, 20,3^\circ$ và $23,0^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Tinh thể C của Hợp chất (a) cũng thể hiện một dạng như được minh họa trong Hình 7 trên phổ nhiễu xạ bột tia X.

Tinh thể C của Hợp chất (a) thể hiện đỉnh thu nhiệt với nhiệt độ khởi phát ngoại suy 100°C và 278°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC).

Tinh thể C của Hợp chất (a) thể hiện các đỉnh hấp thụ tại các số sóng 840 cm^{-1} , 904 cm^{-1} , 955 cm^{-1} , 1490 cm^{-1} và 3281 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại đã thu được theo phương pháp KBr. Tinh thể C của Hợp chất (a) cũng thể hiện đồ thị phổ hấp thụ hồng ngoại như được minh họa trong Hình 12.

Tinh thể I của Hợp chất (a) thể hiện các đỉnh khác biệt tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,2^\circ$, $7,2^\circ$, $9,5^\circ$, $14,5^\circ$, $16,5^\circ$, $20,9^\circ$, $25,0^\circ$ và $27,9^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Tinh thể I của Hợp chất (a) cũng thể hiện một dạng như được minh họa trong Hình 8 trên phổ nhiễu xạ bột tia X.

Tinh thể I của Hợp chất (a) thể hiện đỉnh thu nhiệt với nhiệt độ khởi phát ngoại suy 272°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC).

Tinh thể I của Hợp chất (a) thể hiện các đỉnh hấp thụ tại các số sóng 1081 cm^{-1} và 1260 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại đã thu được theo phương pháp KBr. Tinh thể I của Hợp chất (a) cũng thể hiện đồ thị phổ hấp thụ hồng ngoại như được minh họa trong Hình 13.

Tinh thể A của Hợp chất (b) thể hiện các đỉnh khác biệt tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,2^\circ$, $7,6^\circ$, $8,4^\circ$, $10,5^\circ$, $15,2^\circ$, $16,9^\circ$, $20,1^\circ$, $21,0^\circ$, $23,3^\circ$ và $26,6^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Tinh thể A của Hợp chất (b) cũng thể hiện một dạng như được minh họa trong Hình 3 trên phổ nhiễu xạ bột tia X.

Tinh thể A của Hợp chất (b) thể hiện đỉnh thu nhiệt với nhiệt độ khởi phát ngoại suy 225°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC).

Tinh thể A của Hợp chất (b) thể hiện các đỉnh hấp thụ tại các số sóng 1369 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} và 1566 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại. Tinh thể A của Hợp chất (b) thể hiện đồ thị phổ hấp thụ hồng ngoại như được minh họa trong Hình 14.

Tinh thể A của Hợp chất (b) thể hiện các độ dịch chuyển hóa học 163,4ppm, 157,6ppm, 155,5ppm, 117,8ppm, 82,2ppm, 56,1ppm và 42,3ppm trên phổ NMR dạng rắn ^{13}C . Tinh thể A của Hợp chất (b) cũng thể hiện đồ thị phổ NMR dạng rắn ^{13}C như được minh họa trong Hình 21-1 (6500Hz) và Hình 21-2 (14000Hz).

Tinh thể A của Hợp chất (b) thể hiện các độ dịch chuyển hóa học 311,7ppm, 232,4ppm, 168,5ppm, 79,5ppm, 53,3ppm, 32,9ppm và -4,3ppm phổ NMR dạng rắn ^{15}N . Tinh thể A của Hợp chất (b) cũng thể hiện đồ thị phổ NMR dạng rắn ^{15}N như được minh họa trong Hình 22.

Tinh thể B của Hợp chất (b) thể hiện các đỉnh khác biệt tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,2^\circ, 6,6^\circ, 8,1^\circ, 15,2^\circ, 15,9^\circ, 16,2^\circ, 18,8^\circ, 20,5^\circ, 20,8^\circ$ và $21,7^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Tinh thể B của Hợp chất (b) cũng thể hiện một dạng như được minh họa trong Hình 4 trên phổ nhiễu xạ bột tia X.

Tinh thể B của Hợp chất (b) thể hiện đỉnh thu nhiệt với nhiệt độ khởi phát ngoại suy 221°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC).

Tinh thể C của Hợp chất (b) thể hiện các đỉnh khác biệt tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,2^\circ, 7,6^\circ, 8,4^\circ, 10,0^\circ, 10,5^\circ, 11,9^\circ, 15,2^\circ, 17,0^\circ, 20,9^\circ$ và $21,2^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Tinh thể C của Hợp chất (b) cũng thể hiện một dạng như được minh họa trong Hình 9 trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Tinh thể C của Hợp chất (b) cũng thể hiện đỉnh thu nhiệt với nhiệt độ khởi phát ngoại suy 223°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC).

Tinh thể C của Hợp chất (b) thể hiện các đỉnh hấp thụ tại các số sóng 1369 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1546 cm^{-1} và 1566 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại đã thu được theo phương pháp KBr. Tinh thể C của Hợp chất (b) cũng thể hiện đồ thị phổ hấp thụ hồng ngoại như được minh họa trong Hình 15.

Tinh thể A của Hợp chất (c) thể hiện các đỉnh khác biệt tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 4,8^\circ, 7,6^\circ, 8,2^\circ, 9,7^\circ, 15,3^\circ, 16,6^\circ, 19,1^\circ, 19,8^\circ, 22,4^\circ$ và $26,2^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Tinh thể A của Hợp chất (c) cũng thể hiện một dạng như được minh họa trong Hình 5 trên phổ nhiễu xạ bột tia X.

Tinh thể A của Hợp chất (c) thể hiện đỉnh thu nhiệt với nhiệt độ khởi phát ngoại suy 182°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC).

Tinh thể A của Hợp chất (c) thể hiện các đỉnh hấp thụ tại các số sóng 1115 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} và 1601 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại đã thu được theo phương pháp KBr. Tinh thể A của Hợp chất (c) thể hiện đồ thị phổ hấp thụ hồng ngoại như được minh họa trong Hình 16.

Tinh thể A của Hợp chất (c) thể hiện các độ dịch chuyển hóa học 161,3ppm, 150,8ppm, 138,9 ppm, 128,1ppm, 109,8ppm, 82,7ppm, 47,6ppm, 42,5ppm, 41,5ppm, 24,5ppm và 21,7ppm trên phổ NMR dạng rắn ^{13}C . Tinh thể A của Hợp chất (c) cũng thể hiện đồ thị phổ NMR dạng rắn ^{13}C như được minh họa trong Hình 23-1 (6500Hz) và Hình 23-2 (14000Hz).

Tinh thể A của Hợp chất (c) thể hiện các độ dịch chuyển hóa học 242,8ppm, 233,8ppm, 219,0ppm, 171,7ppm, 86,9ppm, 54,9ppm, 11,3ppm và -5,5ppm trên phổ NMR dạng rắn ^{15}N . Tinh thể A của Hợp chất (c) cũng thể hiện đồ thị phổ NMR dạng rắn ^{15}N như được minh họa trong Hình 24.

Thuật ngữ “các đỉnh khác biệt” được sử dụng ở đây nghĩa là các đỉnh mà được quan sát chủ yếu đối với, và là đặc trưng của, mỗi các tinh thể đa hình trên phổ nhiễu xạ bột tia X. Các tinh thể được xác định bởi các góc nhiễu xạ được trích dẫn trong sáng chế có thể thể hiện các đỉnh khác ngoài các đỉnh khác biệt.

Vị trí và mật độ tương ứng của mỗi đỉnh tại góc nhiễu xạ 2θ trên phổ nhiễu xạ bột tia X có thể thay đổi một ít phụ thuộc vào các điều kiện đo lường. Theo đó, việc xác định các tinh thể sẽ được xác định dựa trên toàn bộ sự tương tự của các dạng phổ, thậm chí mỗi giá trị 2θ khác một chút. Các tinh thể trong phạm vi giới hạn sai số được bao gồm trong sáng chế. Giới hạn sai số của giá trị 2θ có thể là, ví dụ, trong biên độ $\pm 0,5^\circ$ hoặc $\pm 0,2^\circ$. Cụ thể, các tinh thể có các góc nhiễu xạ mà mỗi góc trong biên độ $\pm 0,2^\circ$ đến $\pm 0,5^\circ$ của các giá trị tương ứng nêu trên sẽ được bao gồm trong phạm vi của tinh thể theo sáng chế.

Các tinh thể được bao gồm trong phạm vi các sai số do các điều kiện đối với phổ nhiễu xạ bột tia X (ví dụ, dụng cụ đo lường) cũng được bao gồm trong sáng chế.

Thuật ngữ “nhiệt độ khởi phát ngoại suy” của một đỉnh trong bối cảnh phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC) có nghĩa là nhiệt độ mà tại đó một đỉnh thu nhiệt hoặc tỏa nhiệt bắt đầu, ví dụ, nhiệt độ khởi phát thu nhiệt hoặc tỏa nhiệt được tính thông qua phép ngoại suy. Một đỉnh thu nhiệt hoặc tỏa nhiệt theo phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC) có thể thay đổi một chút phụ thuộc vào các điều kiện đo lường. Một giới hạn sai số có thể là, ví dụ, trong biên độ $\pm 5^\circ\text{C}$ hoặc $\pm 2^\circ\text{C}$. Cụ thể, các tinh thể có một đỉnh trong biên độ $\pm 2^\circ\text{C}$ đến $\pm 5^\circ\text{C}$ của giá trị tương ứng nêu trên sẽ được bao gồm

trong phạm vi của tinh thể theo sáng chế.

Thông thường, các độ dịch chuyển hóa học trên phổ NMR dạng rắn cũng có thể bao gồm các sai số. Một giới hạn sai số của độ dịch chuyển hóa học có thể là, ví dụ, trong biên độ $\pm 0,25\text{ppm}$, thường trong biên độ $\pm 0,5\text{ppm}$. Cụ thể, các tinh thể có các độ dịch chuyển hóa học trong biên độ $\pm 0,25\text{ppm}$ đến $\pm 0,5\text{ppm}$ của giá trị tương ứng nêu trên sẽ được bao gồm trong phạm vi của tinh thể theo sáng chế. Các sự khác biệt trong, ví dụ, các tần số quay hoặc các dụng cụ đo lường có thể ảnh hưởng đến mật độ hoặc sự xuất hiện/biến mất của mỗi đỉnh.

Thông thường, các đỉnh hấp thụ trên phổ hấp thụ hồng ngoại cũng có thể bao gồm các sai số. Giới hạn sai số của đỉnh hấp thụ có thể là, ví dụ, trong biên độ $\pm 2\text{cm}^{-1}$, thường trong biên độ $\pm 5\text{cm}^{-1}$. Cụ thể, các tinh thể có mỗi đỉnh hấp thụ trong biên độ $\pm 2\text{cm}^{-1}$ đến $\pm 5\text{cm}^{-1}$ của giá trị tương ứng nêu trên sẽ được bao gồm trong phạm vi của tinh thể theo sáng chế.

Ngoài ra, đối với mỗi phổ nhiễu xạ bột tia X, phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC), phổ hấp thụ hồng ngoại, phổ NMR dạng rắn ^{13}C , và phổ NMR dạng rắn ^{15}N , mặc dù có sự khác biệt giữa giá trị đo lường thực tế của tiêu chuẩn tham chiếu đối với mỗi tinh thể (ví dụ, tinh thể thu được bằng phương pháp được mô tả theo các Ví dụ của sáng chế) và giá trị cụ thể nêu trên, các khác biệt như vậy sẽ được chấp nhận như là sai số đo lường. Cụ thể, các tinh thể có các góc nhiễu xạ, các đỉnh thu nhiệt hoặc tỏa nhiệt, phổ hấp thụ hồng ngoại, phổ NMR dạng rắn ^{13}C , hoặc phổ NMR dạng rắn ^{15}N mà nằm trong biên độ sai số được tính theo cách thức nêu trên sẽ được bao gồm trong phạm vi của tinh thể theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ liên quan đến sáng chế sẽ được mô tả ngay bây giờ theo phương pháp của các Ví dụ. Các phương pháp tổng hợp, tinh chế, và kết tinh các hợp chất được mô tả theo các ví dụ sau đây chỉ là các phương án để điều chế tinh thể theo sáng chế, và vì vậy tinh thể theo sáng chế không bị giới hạn bởi tinh thể được điều chế bằng các phương pháp tổng hợp, tinh chế, và kết tinh hợp chất được bộc lộ theo các ví dụ sau đây.

Cấu trúc các hợp chất dạng tinh thể theo các Ví dụ và các hợp chất mới được tách ra trong suốt sự tổng hợp được xác định bằng $^1\text{H-NMR}$ hoặc phương pháp khối phổ sử dụng LC/MS (sắc ký lỏng/khối phổ kế).

$^1\text{H-NMR}$ được đo với JEOL JNM-ECZ400S (400MHz). Mẫu tiêu chuẩn là TMS (tetrametylsilan) (đỉnh tại 0,0 ppm) đối với dung môi CDCl_3 hoặc dimethyl sulfoxit (đỉnh tại 2,49 ppm) đối với DMSO- d_6 . Với phổ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , CD_3OD , hoặc CDCl_3), độ dịch chuyển hóa học (δ : ppm) và hằng số ghép cặp (J: Hz) được minh họa, trong đó s chỉ mũi đơn, d chỉ mũi đôi, t chỉ mũi ba, q chỉ mũi bốn, brs chỉ mũi đơn rộng, và m chỉ mũi đa.

Các kết quả của phép đo phổ LC/MS được biểu thị bởi $[\text{M}+\text{H}]^+$ (trọng lượng phân tử quan sát được (Obs. MS), ví dụ, proton $[\text{H}]^+$ được thêm vào khối lượng phân tử $[\text{M}]$ của hợp chất).

Phổ nhiễu xạ tia X của mỗi bột tinh thể theo các Ví dụ được quan sát theo các điều kiện sau đây:

Dụng cụ: D8 DISCOVER với GADDS CS được sản xuất bởi Bulker AXS Inc., nguồn phát tia X: Cu- $\text{K}\alpha$ (bước sóng: $1,541838 (10^{-10}\text{m})$), ống điện áp hiện tại: 40kv-40mA, ống chuẩn trực, máy ghi sắc than chì đĩa phẳng bên: $\phi 300\mu\text{m}$, máy dò PSP hai chiều, phạm vi quét: 3 đến 40° .

Phép đo phân tích nhiệt quét vi sai của các mẫu thử trong các Ví dụ được thực hiện theo các điều kiện sau đây:

Dụng cụ: DSC 8000 được sản xuất bởi Perkin Elmer, tốc độ gia nhiệt: $10^\circ\text{C}/\text{phút}$, môi trường: nitơ, khay mẫu: nhôm, mẫu thử: 0,1 giây, phạm vi quét: 25 đến 300°C .

Phổ hấp thụ IR (KBr) của mỗi mẫu trong các Ví dụ được quan sát theo quy trình nén bromua kali trong phổ hấp thụ IR được mô tả theo các phương pháp kiểm tra thông thường Japanese Pharmacopoeia theo các điều kiện thông thường:

Dụng cụ: AVATAR320 Nicolet iS5 được thực hiện bởi Thermo Fisher Scientific, phạm vi quét: 4000 đến 400cm^{-1} , giải pháp: 4cm^{-1} , quãng đường tích lũy: 16. Phổ dạng rắn NMR của mỗi mẫu trong các Ví dụ được quan sát theo các điều kiện sau đây:

Dụng cụ: Bruker DSX300WB, các hạt nhân được xác định: ^{13}C và ^{15}N , thời gian lặp xung: 5 s, chế độ xung: CP/MAS.

Ví dụ 1

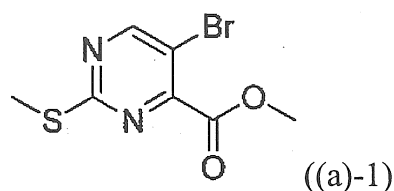
Ví dụ 1 mô tả Tinh thể D của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on (Hợp chất (a)).

Sự tổng hợp của Hợp chất (a) sẽ được mô tả.

Sự tổng hợp của Hợp chất (a)-1

Metyl 5-brom-2-metylthiopyrimidin-4-cacboxylat (Hợp chất (a)-1) đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 2]

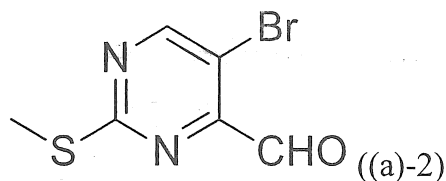


Dung dịch 5-brom-2-(metylthio)pyrimidin-4-axit cacboxylic (110 g, 0,44 mol) trong metanol (1,1 L) được làm mát đến 0°C với việc khuấy, và sau đó thionyl clorua (50 mL, 0,66 mol) được thêm vào từng giọt. Dung dịch được đun hồi lưu trong khoảng 4 giờ. Việc hoàn thành phản ứng được xác nhận bởi LC/MS và TLC, dung dịch này được làm mát đến nhiệt độ phòng. Thành phần dễ bay hơi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và chất còn dư được hòa tan trong etyl axetat (1L). Dung dịch được rửa với dung dịch natri cacbonat 10% (200mL) ba lần và với nước muối bão hòa (200 mL) hai lần. Pha hữu cơ thu được được sấy khô trên magie sulfat anhydrit. Sau khi thành phần chất rắn được lọc ra, chất lọc ra được cô đặc. Sản phẩm thô được tinh chế bởi phép sắc ký cột silica gel để được Hợp chất (a)-1 (88g, 75%).

Sự tổng hợp Hợp chất (a)-2

Hợp chất (a)-2, 5-brom-2-metylthiopyrimidin-4-cacbaldehit đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 3]

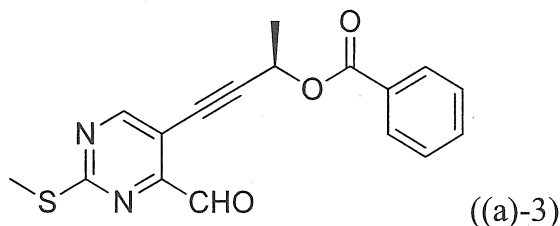


1,7 M dung dịch của Hợp chất (a)-1 (25 g, 95 mmol) trong THF (tetrahydrofuran) (375 mL) được làm lạnh với việc khuấy đến -78°C trong dòng nitơ. Diisobutylaluminum hydrit (84 mL, 143 mmol) trong toluen được thêm từng giọt vào dung dịch, và hỗn hợp này được khuấy trong 4 giờ tại -78°C . Sau khi việc hoàn thành phản ứng đã được xác nhận bởi TLC, metanol đã được thêm vào từng giọt tại -78°C để làm nguội phản ứng, và sau đó dung dịch được gia nhiệt từ từ đến 0°C . Dung dịch được hòa tan với etyl axetat và đã được lọc hút thông qua tấm Xelit. Chất lọc ra được rửa với nước muối bão hòa (200 mL) hai lần, pha hữu cơ thu được được sấy khô trên magie sulfat anhydrit, và sau đó thành phần chất rắn được lọc ra. Chất lọc ra được cô đặc để nhận được hợp chất tiêu đề (25 g, hợp chất thô). Hợp chất thô đã được sử dụng trong phản ứng sau đây mà không được tinh chế thêm.

Sự tổng hợp Hợp chất (a)-3

Hợp chất (a)-3, (R)-3-(4-formyl-2-methylthiopyrimidin-5-yl)-1-methyl-2-propynyl benzoate, được tổng hợp.

[Công thức hóa học 4]



Dung dịch của $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (7,832 g, 11,2 mmol) và đồng iodua (2,12 g, 11,2 mmol) trong 1,4-dioxan (60 mL) được khử khí và thanh lọc với acgon. Diisopropyletylamin (25,29 mL, 145,1 mmol) được thêm vào tại nhiệt độ phòng. Dung dịch này được khuấy trong 5 phút tại nhiệt độ phòng, và một dung dịch của hỗn hợp (26 g, hợp chất thô) của Hợp chất (a)-2 và (5-brom-2-methylthiopyrimidin-4-yl)metoxymetanol trong 1,4-dioxan (50 mL) được thêm vào tại nhiệt độ phòng.

Dung dịch của (R)-1-methylpropargyl benzoat (23,3 g, 133,9 mmol) trong 1,4-dioxan (55 mL) sau đó được thêm vào từng giọt từ từ, và dung dịch này được khuấy trong 16 giờ tại nhiệt độ phòng. Phản ứng này được theo dõi bởi LC/MS. Sau khi hoàn thành phản ứng, hỗn hợp này được hòa tan với ethyl axetat (400 mL), và được lọc hút qua tấm Xelit. Tấm Xelit được rửa với ethyl axetat. Chất lọc ra được cô đặc dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô thu được được sử dụng trong phản ứng sau đây không cần tinh chế.

Sự tổng hợp hỗn hợp của Hợp chất (a)-2 và (5-brom-2-methylthiopyrimidin-4-yl)metoxymetanol sẽ được mô tả trong Ví dụ Tham khảo 1.

Ví dụ Tham khảo 1

Sự tổng hợp hỗn hợp của Hợp chất (a)-2 và (5-brom-2-methylthiopyrimidin-4-yl)metoxymetanol

[Công thức hóa học 5]



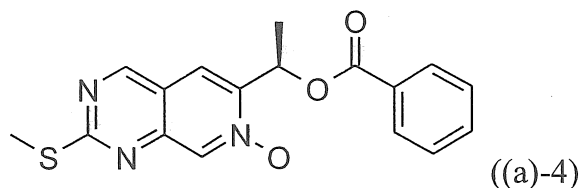
Dung dịch của Hợp chất (a)-2 (25 g, 95 mmol) trong THF (375 mL) được làm lạnh với việc khuấy đến -78°C trong dòng nitơ. Dung dịch 1,7 M của diisobutyl nhôm hydrit (84 mL, 143 mmol) trong toluen đã được thêm vào từng giọt và dung dịch này được khuấy trong 4 giờ ở -78°C . Sau khi hoàn thành phản ứng được xác nhận bởi TLC, metanol đã được thêm vào từng giọt ở -78°C để làm nguội phản ứng. Dung dịch này được gia nhiệt từ từ đến 0°C . Dung dịch này được pha loãng với ethyl axetat, và được lọc hút thông qua tấm Xelit. Chất lọc ra được rửa với nước muối bão hòa (200 mL) hai lần, và pha hữu cơ thu được được sấy khô trên magie sulfat anhydrit. Thành phần chất rắn được lọc ra. Chất lọc ra được cô đặc thành hỗn hợp (25 g, sản phẩm thô) của hợp chất tiêu đề. Sản phẩm thô được sử dụng trong phản ứng sau đây không tinh chế thêm.

Sự tổng hợp Hợp chất (a)-4

Hợp chất (a)-4, (R)-6-(1-(benzoyloxy)ethyl)-2-(methylthio)pyrido[3,4-

d]pyrimidin-7-oxit, được tổng hợp.

[Công thức hóa học 6]



Muối hydroxyamin monohydroclorua (8,31 g, 119,6 mmol) và natri axetat (9,81 g, 119,6 mmol) được thêm vào một dung dịch (260 ml) của Hợp chất (a)-3 (26,0g, 79,8mmol) trong ethanol ở nhiệt độ phòng, và hỗn hợp này được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ phòng. Etanol (250 ml) được thêm vào dung dịch, và kali cacbonat (27,5 g, 199,4 mmol) được thêm vào ở nhiệt độ phòng, và hỗn hợp này được khuấy trong ba giờ ở 50°C. Phản ứng được theo dõi bởi LC/MS. Sau khi hoàn thành phản ứng, hỗn hợp phản ứng được lọc hút thông qua tấm Xelit. Tấm Xelit được rửa với etyl axetat (1,0 L) và một lượng nhỏ metanol. Chất lọc ra được cô đặc dưới áp suất giảm, và lớp hữu cơ được sấy khô trên magie sunfat anhydrit. Thành phần chất rắn được lọc ra. Sản phẩm thô thu được được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel để tạo ra Hợp chất (a)-4 (13,0 g, 48 %).

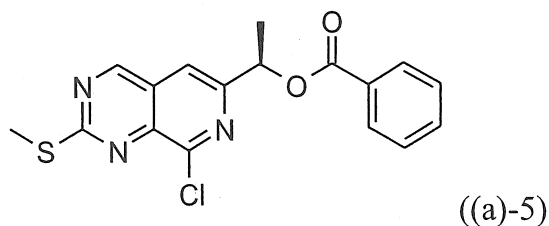
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của Hợp chất (a)-4 là như sau:

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 9,04 (1H,s), 8,79 (1H,s), 8,14 (2H,d,J=7,5Hz), 7,77-7,40 (4H,m), 6,66 (1H,q,J=6,3Hz), 2,65 (3H,s), 1,79 (3H,d,J=6,6Hz)

Sự tổng hợp Hợp chất (a)-5

Hợp chất (a)-5, (R)-1-(8-cloro-2-(metylthio)pyrido[3,4-d] pyrimidin-6-yl)etyl benzoat đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 7]



Thionyl clorua (51 ml, 704 mmol) được thêm từng giọt vào dung dịch (130 ml) của Hợp chất (a)-4 (8,0 g, 23,5 mmol) trong diclorometan ở 0°C trong dòng nitơ.

Dung dịch này được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ phòng. Phản ứng được theo dõi bởi phép sắc ký lớp mỏng (TLC). Sau khi hoàn thành phản ứng, dung dịch được cô đặc dưới áp suất giảm, và pha hữu cơ thu được được tinh chế bằng phép sắc ký cột alumin để tạo ra Hợp chất (a)-5 (3,2g, 37%).

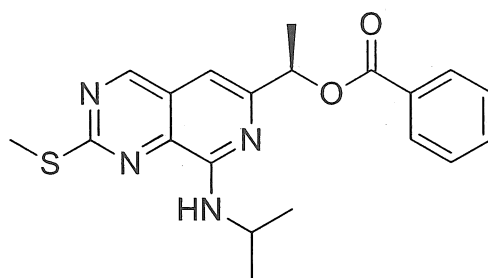
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của Hợp chất (a)-5 là như sau:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 9,19 (1H,s), 8,16-8,12 (2H,m), 7,68 (1H,s), 7,64-7,58 (1H,m), 7,53-7,46 (2H,m), 6,27 (1H,q, $J=6,8\text{Hz}$), 2,74 (3H,s), 1,81 (3H,d, $J=6,4\text{Hz}$)

Hợp chất (a)-6

Sự tổng hợp Hợp chất (a)-6, (R)-1-(8-(isopropylamino)-2-(methylthio)pyrido[3,4-d]pyrimidin-6-yl)ethyl benzoat

Công thức hóa học 8



((a)-6)

Hỗn hợp của Hợp chất (a)-5 (3,06 g, 8,5 mmol) và isopropylamin (18 mL) được khuấy trong vòng một giờ ở 80°C , và dung dịch này được làm mát tới nhiệt độ phòng. Dung dịch này được pha loãng với nước, và được chiết xuất với ethyl axetat. Pha hữu cơ thu được được rửa với nước muối, và sau đó được sấy khô trên natri sunfat anhydrit. Dung môi bị loại bỏ, và sản phẩm thô được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel để tạo ra Hợp chất (a)-6 (1,78 g, hiệu suất 55%).

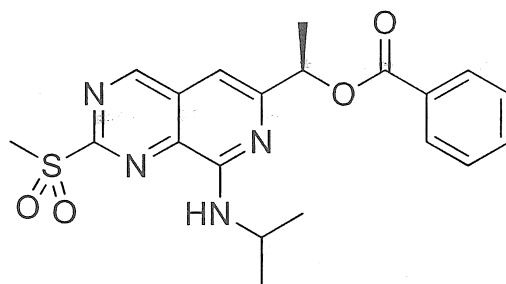
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của Hợp chất (a)-6 là như sau:

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 9,28 (1H,s), 8,08 (2H,d, $J=7,4\text{Hz}$), 7,70 (1H,t, $J=7,4\text{Hz}$), 7,57 (2H,t, $J=7,7\text{Hz}$), 7,05 (1H,d, $J=8,0\text{Hz}$), 6,99 (1H,s), 5,34 (2H,s), 4,32 (1H,m), 2,66 (3H,s), 1,25 (6H,d, $J=6,5\text{Hz}$)

Sự tổng hợp Hợp chất (a)-7

Hợp chất (a)-7, (R)-1-(8-(isopropylamino)-2-(methylsulfonyl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-6-yl)ethyl benzoate, đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 9]



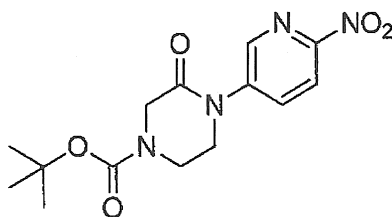
((a)-7)

Oxon (peroxymonokali sulfat) (5,72 g, 9,3 mmol) được thêm vào dung dịch của Hợp chất (a)-6 (1,78 g, 4,7 mmol) trong dung môi hỗn hợp của tetrahydrofuran (47 ml) và nước (47 ml) ở 0°C, và hỗn hợp này được khuấy trong 18 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch này được chiết xuất với etyl axetat. Pha hữu cơ được rửa với nước, và được sấy khô trên natri sunfat khan. Dung môi bị loại bỏ và sản phẩm thô được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel để tạo ra Hợp chất (a)-7 (1,61 g, hiệu suất 87%). LC/MS: $(M+H)^+ = 415,0$

Sự tổng hợp Hợp chất (a)-8

Hợp chất (a)-8, tert-butyl 4-(6-nitropyridin-3-yl)-3-oxopiperazin-1-carboxylat đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 10]



((a)-8)

2-nitơ-5-brompyridin (1,01, 5,0 mol), tert-butyl 2-oxo-4-piperazin-carboxylat (1,00, 5,0 mol), và xêsi cacbonat (3,26 g, 10,0 mmol) được ngưng tụ trong 1,4-dioxan, và khí nitơ đã được sủi bọt trong thể huyền phù trong 30 phút. Xantphos (4,5'-bis(diphenylphosphin)-9,9'-dimetylxanthen) 246 mg, 0,43 mmol) và tris(dibenzylidenaxeton)dipalladi (229 mg, 0,25 mmol) được thêm vào thể huyền phù, và hỗn hợp này được đun hồi lưu với việc khuấy trong hai giờ. Dung dịch này được làm mát tới nhiệt độ phòng, và nước và etyl axetat được thêm vào. Dung dịch này được lọc qua một tấm Xelit. Lốp hữu cơ của chất lọc ra được tách riêng, và pha có nước được chiết xuất với etyl axetat. Các pha hữu cơ thu được được kết hợp, và

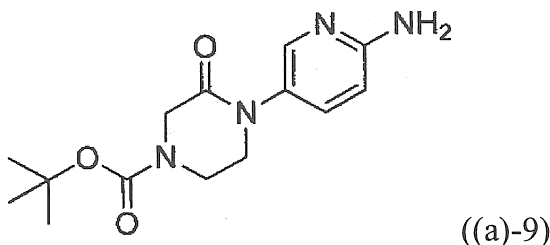
được sấy khô trên natri sunfat khan. Thành phần chất rắn được lọc ra và chất lọc ra được cô đặc dưới áp suất giảm. Chất còn dư được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel để tạo ra Hợp chất (a)-8 (1,08 g, 67%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8,67 (1H,d,J=2,4Hz), 8,32 (1H,d,J=8,8Hz), 8,15 (1H,dd,J=8,8, 2,4Hz), 4,33 (2H,s), 3,93-3,83 (4H,m), 1,51 (9H,s)

Sự tổng hợp Hợp chất (a)-9

Hợp chất (a)-9, tert-butyl 4-(6-aminopyridin-3-yl)-3-oxopiperazin-1-carboxylat, đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 11]



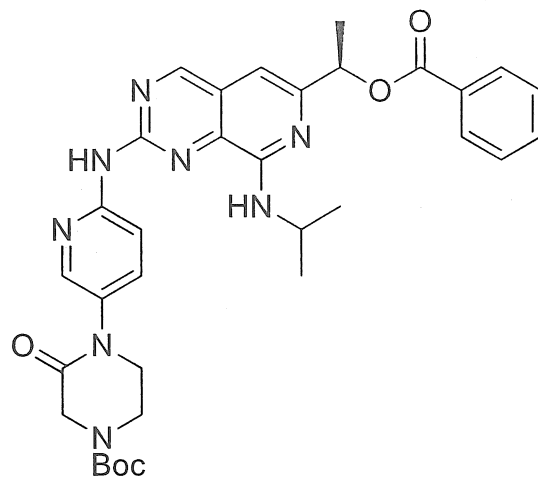
Hợp chất (a)-8 (1,08 g, 3,34 mmol) được hòa tan trong một hỗn hợp của etanol (45 mL) và THF (22 mL). Palladi trên cacbon (108 mg) được thêm vào dung dịch, và hỗn hợp này được khuấy trong 24 giờ trong môi trường hydro. Dung dịch này được lọc ra qua một tấm Xelit, và chất lọc ra được cô đặc dưới áp suất giảm. Chất còn dư được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel column để tạo ra Hợp chất (a)-9 (0,928 g, 95%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,99 (1H,d,J=2,4Hz), 7,38 (1H,dd,J=8,8, 2,4Hz), 6,53 (1H,d,J=8,8Hz), 4,50 (2H,brs), 4,24 (2H,s), 3,78 (2H,t,J=5,1Hz), 3,67 (2H,t,J=5,4Hz), 1,50 (9H,s)

Sự tổng hợp Hợp chất (a)-10

Hợp chất (a)-10, tert-butyl (R)-4-(6-((6-(1-(benzoyloxy) ethyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)pyridin-3-yl)-3-oxopiperazin-1-carboxylat, đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 12]



((a)-10)

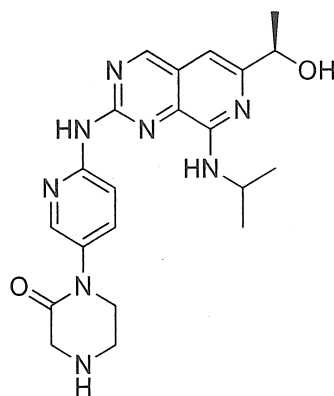
Hợp chất (a)-7 (62 mg, 0,15 mmol) và Hợp chất (a)-9 (88 mg, 0,30 mmol) được khuấy trong toluen (0,375 ml) ở 100°C trong sáu ngày. Dung dịch này được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel để tạo ra Hợp chất (a)-10 (0,0092g, 10%).

¹H-NMR (DMSO) δ: 10,27 (1H,s), 9,27 (1H,s), 8,33 (2H,m), 8,07 (2H,m), 7,86 (1H,m), 7,70 (1H,m), 7,58 (3H,m), 7,00 (1H,s), 6,55 (1H,d), 5,98 (1H,q), 4,27 (1H,m), 4,11 (2H,s), 3,74 (4H,m), 1,68 (3H,d), 1,45 (9H,s), 1,30 (6H,m)

Sự tổng hợp và tinh chế Hợp chất (a)

Hợp chất (a), 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on, đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 13]



(a)

Axit trifloroaxetic (0,15 ml) được thêm vào dung dịch của Hợp chất (a)-10 (9,2 mg, 0,15 mmol) trong diclorometan (0,35 ml) ở nhiệt độ phòng, và dung dịch được khuấy trong một giờ. Sau khi dung dịch được làm bay hơi để khô, tetrahydrofuran (0,15 ml) và metanol (0,15 ml) được thêm vào, và sau đó dung dịch liti hydroxit 4M

(0,018 ml) được thêm vào. Dung dịch sau phản ứng được trung hòa với axit fomic, chất thu được được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel để tạo ra hợp chất tiêu đề.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ : 10,16 (1H,s), 9,26 (1H,s), 8,31 (1H,m), 8,29 (1H,s), 7,81 (1H,m), 7,00 (1H,s), 6,42 (1H,m), 5,18 (1H,d), 4,63 (1H,m), 4,27 (1H,m), 3,65 (2H,m), 3,41 (2H,s), 3,05 (2H,m), 1,39 (3H,d), 1,30 (6H,m)

Sản xuất tinh thể D của Hợp chất (a)

Dung dịch của Hợp chất (a) được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel được cô đặc cho tới khi các tinh thể được kết tủa. Tinh thể D của Hợp chất (a) bằng cách này được điều chế.

Đánh giá Tinh thể D của Hợp chất (a)

Fig. 1 minh họa phổ nhiễu xạ tia X của tinh thể thu được. Các đỉnh được quan sát tại $6,3^\circ$, $6,6^\circ$, $11,6^\circ$, $16,9^\circ$, và $20,0^\circ$ (góc nhiễu xạ 2θ).

Đường cong dòng nhiệt bởi phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở 277°C .

Fig. 10 minh họa phổ hấp thụ IR (KBr) của tinh thể. Các góc hấp thụ được quan sát tại 703 cm^{-1} , 896 cm^{-1} và 3418 cm^{-1} (số sóng).

Các Fig. 17-1 và 17-2 minh họa phổ dạng rắn $^{13}\text{C-NMR}$ của tinh thể. Fig.17-1 thể hiện chế độ 6500Hz và Fig.17-2 thể hiện chế độ 14000Hz. Các đỉnh được quan sát tại 136,0ppm, 111,2ppm, 105,1ppm, 101,8ppm, 52,7ppm, 49,6ppm, 42,9ppm, 23,8ppm và 18,5ppm (độ dịch chuyển hóa học).

Fig. 18 minh họa phổ dạng rắn $^{15}\text{N-NMR}$ của các tinh thể. Các đỉnh được quan sát tại 248,6ppm, 245,7ppm, 229,2ppm, 214,5ppm, 174,3ppm, 86,5ppm, 54,7ppm và -12,4ppm (độ dịch chuyển hóa học).

Ví dụ 2

Ví dụ 2 giải thích Tinh thể A của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on (Hợp chất (a)).

Sản xuất Tinh thể A của Hợp chất (a)

Tinh thể A của Hợp chất (a) được sản xuất bằng cách biến đổi Tinh thể D của

Hợp chất (a) được điều chế trong Ví dụ 1.

Tinh thể D được ngưng tụ trong etanol bậc 5 tới 50. Thể huyền phù được gia nhiệt với việc khuấy trong sáu giờ, và sau đó được khuấy ở 0°C. Chất kết tủa được thu lại bằng cách lọc và sấy thành tinh thể.

Mặc dù không có giới hạn về lượng dung môi, thời gian gia nhiệt, điều kiện khuấy, thời gian lọc, các thông số này có thể ảnh hưởng tới hiệu suất của các tinh thể, độ tinh khiết hóa học, đường kính hạt, và phân bố kích thước hạt. Tốt nhất là các thông số này được xác định một cách thích hợp. Các tinh thể có thể được thu lại bằng quy trình thông thường bất kỳ, ví dụ, lọc tự động, lọc áp lực, lọc hút, sấy bằng nhiệt, hoặc sấy bằng nhiệt dưới áp suất giảm.

Đánh giá Tinh thể A của Hợp chất (a)

Fig. 2 minh họa phổ nhiễu xạ tia X của tinh thể thu được. Các đỉnh được quan sát tại 5,3°, 7,3°, 10,3°, 15,1°, và 17,4° (góc nhiễu xạ 2θ).

Đường cong dòng nhiệt bởi phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở 277°C.

Fig. 11 minh họa phổ hấp thụ IR (KBr) của tinh thể. Các đỉnh hấp thụ được quan sát tại 874 cm⁻¹, 1330 cm⁻¹ và 3314cm⁻¹ (số sóng).

Các Fig. 19-1 và 19-2 minh họa phổ dạng rắn ¹³C-NMR của tinh thể. Fig.19-1 thể hiện chế độ 6500Hz và Fig.19-2 thể hiện chế độ 14000Hz. Các đỉnh được quan sát tại 154,7ppm, 138,8ppm, 133,6ppm, 113,2ppm, 101,6ppm, 100,4ppm, 67,4ppm, 51,8ppm, 26,6ppm và 23,3ppm (độ dịch chuyển hóa học).

Fig. 20 thể hiện phổ dạng rắn ¹⁵N-NMR của các tinh thể. Các đỉnh được quan sát 243,6ppm, 86,7ppm, 56,7ppm và -12,4ppm (độ dịch chuyển hóa học).

Ví dụ 3

Ví dụ 3 giải thích Tinh thể B của 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on (Hợp chất (a)).

Sản xuất Tinh thể B của Hợp chất (a)

Hợp chất (a) được tinh chế như ở Ví dụ 1 ngoại trừ dung môi được sử dụng trong sắc ký cột là diclorometan/metanol = 20/1, và dung dịch của Hợp chất (a) được

cô đặc đến khi các tinh thể được kết tủa. Tinh thể B của Hợp chất (a) bằng cách này được điều chế.

Fig. 6 minh họa phổ nhiễu xạ tia X của tinh thể thu được. Các đỉnh được quan sát tại $5,3^\circ$, $6,0^\circ$, $6,7^\circ$, $10,4^\circ$ và $20,8^\circ$ (góc nhiễu xạ 2θ).

Đường cong dòng nhiệt bởi phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở 271°C .

Ví dụ 4

Sản xuất Tinh thể C của Hợp chất (a)

Dimetyl sulfoxit (5,4 mL) được thêm vào Tinh thể D (900 mg) của Hợp chất (a) và hỗn hợp được gia nhiệt tới 70°C . Dung dịch thu được được làm mát tới 40°C . Axetonitril (6,75 mL) được thêm vào, được làm mát tới 15°C , sau đó được khuấy trong hai giờ. Thành phần chất rắn được thu lại bằng cách lọc, được rửa với axetonitril (2,5 mL), và được sấy khô dưới áp suất giảm ở 40°C để tạo ra sản phẩm cộng của hợp chất tiêu đề (986mg, 92%) với dimetyl sulfoxit.

Đánh giá Tinh thể C của Hợp chất (a)

Fig. 7 minh họa phổ nhiễu xạ tia X của tinh thể thu được. Các đỉnh được quan sát tại $6,0^\circ$, $10,0^\circ$, $13,7^\circ$, $20,3^\circ$ và $23,0^\circ$ (góc nhiễu xạ 2θ).

Đường cong dòng nhiệt được đo bằng phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở 100°C và 278°C .

Fig. 12 minh họa phổ hấp thụ IR (KBr) của tinh thể. Các đỉnh hấp thụ được quan sát tại 840 cm^{-1} , 904 cm^{-1} , 955 cm^{-1} , 1490 cm^{-1} và 3281 cm^{-1} (số sóng).

Ví dụ 5

Sản xuất tinh thể I của Hợp chất (a)

Nước (10 mL) được thêm vào Tinh thể A (500 mg) của Hợp chất (a), hỗn hợp được khuấy trong bốn ngày ở nhiệt độ phòng. Chất rắn thu được được thu lại bằng cách lọc, và được sấy khô ở 30°C dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất tiêu đề (432 mg, 86%).

Đánh giá tinh thể I của Hợp chất (a)

Fig. 8 minh họa phổ nhiễu xạ tia X của tinh thể thu được. Các đỉnh được quan sát ở $5,2^\circ$, $7,2^\circ$, $9,5^\circ$, $14,5^\circ$, $16,5^\circ$, $20,9^\circ$, $25,0^\circ$ và $27,9^\circ$ (góc nhiễu xạ 2θ).

Đường cong dòng nhiệt bởi phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở 272°C.

Fig. 13 minh họa phổ hấp thụ IR (KBr) của tinh thể. Các đỉnh hấp thụ được quan sát tại 1081 cm^{-1} và 1260 cm^{-1} (số sóng).

Ví dụ 6

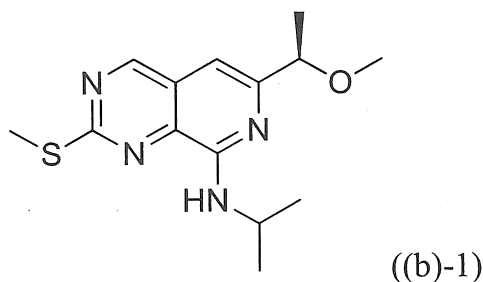
Ví dụ 6 giải thích Tinh thể A của 1-(6-(((1R)-1-metoxyletyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin-1-yl(piperazin) (Hợp chất (b)).

Sự tổng hợp của Hợp chất (b) sẽ được mô tả ngay bây giờ.

Sự tổng hợp Hợp chất (b)-1

Hợp chất (b)-1, (R)-N-isopropyl-6-(1-metoxyletyl)-2-(methylthio)pyrido[3,4-d]pyrimidin-8-amin đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 14]



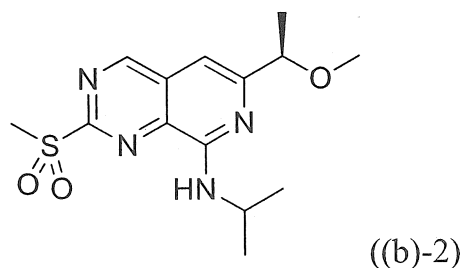
Hợp chất (b)-1 được tổng hợp như trong các Hợp chất (a)-3, (a)-4, (a)-5, và (a)-6.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 9,27 (7H,s), 6,94 (1H,brs), 6,92 (1H,s), 4,30-4,23 (1H,m), 3,29 (3H,s), 2,66 (3H,s), 1,38 (3H,d,J=6,4Hz), 1,32-1,25 (6H,m)

Sự tổng hợp Hợp chất (b)-2

Hợp chất (b)-2, (R)-N-isopropyl-6-(1-metoxyletyl)-2-(methylsulfonyl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-8-amin, đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 15]



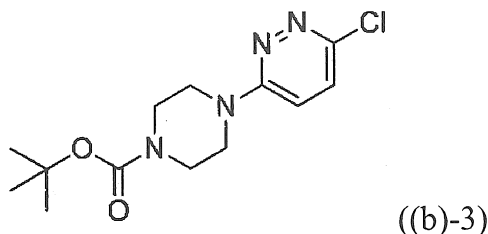
Oxon được thêm vào dung dịch của Hợp chất (b)-1 trong hỗn hợp của tetrahydrofuran (THF) và nước ở 0°C và được khuấy trong 18 giờ. Sản phẩm phản ứng được chiết xuất với etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa với nước và được sấy khô trên natri sunfat, anhydrit. Sau đó dung môi bị loại bỏ, sản phẩm thô được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel để tạo ra Hợp chất (b)-2.

LC/MS: (M+H)⁺ = 325,10

Sự tổng hợp Hợp chất (b)-3

Hợp chất (b)-3, tert-butyl 4-(6-cloropyridazin-3-yl) piperazin-1-cacboxylat, đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 16]

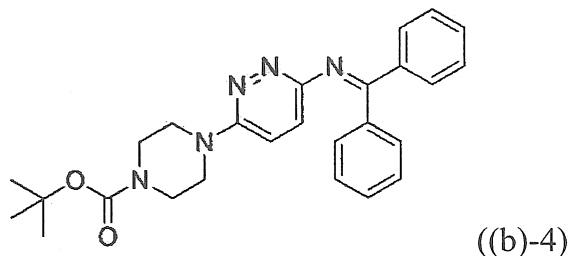


3,6-dicloropyridazin (5,01 g, 33,6 mmol) và tert-butylpiperazin cacboxylat (6,88 g, 37,0 mmol) được hòa tan trong DMF (50 mL). Triethylamin (11,7 mL, 50,4 mmol) được thêm vào và hỗn hợp được khuấy ở 80°C qua đêm. Dung dịch được làm mát tới nhiệt độ phòng, và nước được thêm vào. Sản phẩm được chiết xuất ba lần với dung môi hỗn hợp (50 mL) của diclorometan và metanol (95:5) ba lần. Pha hữu cơ đã kết hợp được sấy khô trên magiê sulfit, anhydrit, và thành phần chất rắn được thu lại bằng cách lọc. Chất lọc ra được cô đặc dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được rửa với diethyl ete để tạo ra Hợp chất tiêu đề (b)-3 (7,0 g, 70%).

Sự tổng hợp Hợp chất (b)-4

Hợp chất (b)-4, tert-butyl 4-(6-((diphenylmetylen)amino)pyridazin-3-yl)piperazin-1-cacboxylat, đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 17]

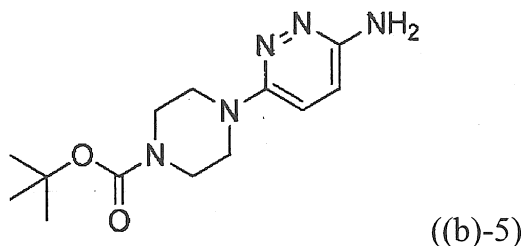


Hợp chất (b)-3 (59,8 mg, 0,2 mmol), benzophenon imin (43,5 mg, 0,24 mmol), tris(dibenzylidenaxeton)dipalladi (9,2mg, 0,010 mmol), BINAP (2,2'-bis(diphenylphosphin)-1,1'-binaphtyl) (12,5 mg, 0,020 mmol), và cesi cacbonat (130,3 mg, 0,40 mmol) được ngưng tụ trong toluen (1,0 mL), và thể huyền phù được khuấy ở 100°C qua đêm. Sau đó thể huyền phù được làm mát tới nhiệt độ phòng, dung dịch này được lọc qua tấm Xelit và tấm Xelit được rửa với etyl axetat. Chất lọc ra thu được được rửa với nước muối bão hòa và được sấy khô trên magiê sunfat, anhydrit. Sau đó thành phần chất rắn được lọc ra, chất lọc ra được cô đặc dưới áp suất giảm. Chất còn dư được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel để tạo ra Hợp chất tiêu đề (b)-4 (67 mg, 76%).

Sự tổng hợp Hợp chất (b)-5

Hợp chất (b)-5, tert-butyl 4-(6-aminopyridazin-3-yl)piperazine-1-carboxylate, đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 18]



Hợp chất (b)-4 (67 mg, 0,151 mmol) được hòa tan trong THF (0,76 mL), và dung dịch axit xitric (0,378 mL, 0,755 mmol, 2 mol/L) được thêm vào. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Hệ thống phản ứng được trung hòa với natri hydro cacbonat bão hòa (5 mL), và sản phẩm này được chiết xuất hai lần với etyl axetat (5 mL). Các pha hữu cơ được kết hợp và được sấy khô trên magiê sunfat, anhydrit. Sau đó các thành phần chất rắn được lọc ra, chất lọc ra được cô đặc dưới

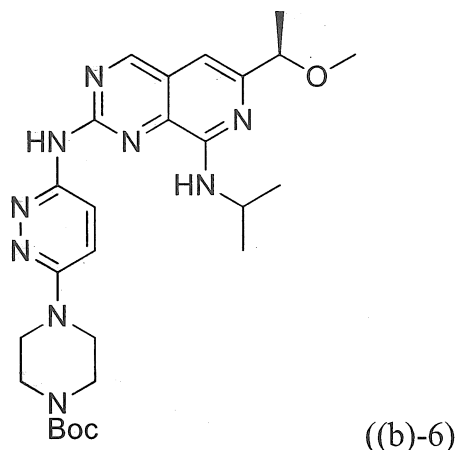
áp suất giảm. Sản phẩm thô được rửa với tert-butyl methyl ete (5 mL) để tạo ra Hợp chất tiêu đề (b)-5 (0,30 g, 71%).

Sự tổng hợp các hợp chất liên quan đến các Ví dụ sáng chế, ví dụ, 6-aminopyridin-3-cacbaldehit và tert-butyl 4-[(6-aminopyridin-3-yl)metyl]piperazin-1-cacboxylat sẽ được mô tả ngay bây giờ trong các Ví dụ tham khảo sau đây.

Sự tổng hợp Hợp chất (b)-6

Hợp chất (b)-6, tert-butyl (R)-4-(6-((8-(isopropylamino)-6-(1-metoxymetyl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)pyridazin-3-yl)piperazin-1-cacboxylat, đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 19]

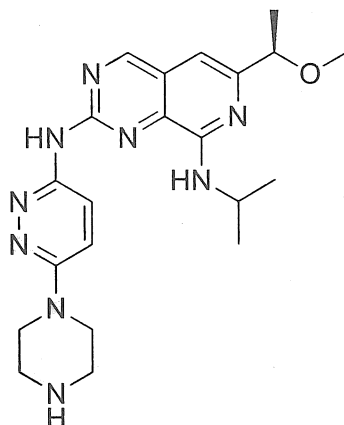


Dung dịch của hợp chất (a)-5 (708 mg, 2,2 mmol) và Hợp chất (b)-5 (732 mg, 2,6 mmol) đã được tổng hợp trong Ví dụ 1 trong toluen (5,5 ml) được khuấy trong ba ngày ở 100°C. Sau khi được làm mát tới nhiệt độ phòng, dung dịch này được pha loãng với etyl axetat (20 ml) và diclorometan (100 ml). Dung dịch được rửa với nước muối bão hòa (90 ml), sau đó với dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa (10 ml). Pha hữu cơ đã tách riêng được làm bay hơi để khô, và được tinh chế qua phép sắc ký cột silica gel để tạo ra Hợp chất tiêu đề (b)-6 (510 mg, 45%).

Sự tổng hợp Hợp chất (b)

Hợp chất (b), 1-(6-((6-((1R)-1-metoxymetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin-1-yl(piperazin), đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 20]



(b)

Axit trifloroaxetic (0,2 ml) được thêm vào dung dịch của Hợp chất (b)-6 (33,2 mg, 0,063 mmol) trong diclorometan (0,44 ml) ở nhiệt độ phòng, và hỗn hợp này được khuấy trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch này được cô đặc thành khô, và sản phẩm được tinh chế bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC để tạo ra Hợp chất tiêu đề (23,8 mg, 88%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ : 10,24 (1H,s), 9,20 (1H,s), 8,16 (1H,d), 7,36 (1H,d), 6,86 (1H,s), 6,35 (1H,d), 6,42 (1H,m), 4,22 (2H,m), 3,43 (4H,m), 3,26 (4H,m), 2,81 (3H,m), 1,37 (3H,d), 1,26 (6H,m)

Sản xuất Tinh thể A của Hợp chất (b)

Muối axit trifloroaxetic (TFA) của Hợp chất (b) được tinh chế bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đã được điều chế. Muối TFA này được khuấy trong hỗn hợp của nước và diclorometan. Độ pH của pha có nước được điều chỉnh thành kiềm yếu (pH 8 tới 9) với dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, và pha hữu cơ được tách riêng. Sau đó pha hữu cơ này được rửa với nước muối bão hòa và được sấy khô trên natri sunfat, anhydrit, dung môi được loại bỏ để tạo ra Tinh thể A.

Đánh giá Tinh thể A của Hợp chất (b)

Fig. 3 minh họa phổ nhiễu xạ tia X của tinh thể thu được. Các đỉnh được quan sát tại $5,2^\circ$, $7,6^\circ$, $8,4^\circ$, $10,5^\circ$, $15,2^\circ$, $16,9^\circ$, $20,1^\circ$, $21,0^\circ$, $23,3^\circ$ và $26,6^\circ$ (góc nhiễu xạ 2θ).

Đường cong dòng nhiệt bởi phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở 225°C .

Fig. 14 minh họa phổ hấp thụ IR (KBr) của tinh thể. Các đỉnh hấp thụ được quan sát tại 1369 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} và 1566 cm^{-1} (số sóng).

Các Fig. 21-1 và 21-2 minh họa phổ dạng rắn ^{13}C -NMR của tinh thể. Fig. 21-1 thể hiện chế độ 6500 Hz và Fig. 21-2 thể hiện chế độ 14000 Hz . Các đỉnh được quan sát tại $163,4\text{ ppm}$, $157,6\text{ ppm}$, $155,5\text{ ppm}$, $117,8\text{ ppm}$, $82,2\text{ ppm}$, $56,1\text{ ppm}$ và $42,3\text{ ppm}$ (độ dịch chuyển hóa học).

Fig. 22 minh họa phổ dạng rắn ^{15}N -NMR của các tinh thể. Các đỉnh được quan sát tại $311,7\text{ ppm}$, $232,4\text{ ppm}$, $168,5\text{ ppm}$, $79,5\text{ ppm}$, $53,3\text{ ppm}$, $32,9\text{ ppm}$ và $-4,3\text{ ppm}$ (độ dịch chuyển hóa học).

Ví dụ 7

Ví dụ 7 giải thích Tinh thể B của 1-(6-(((1R)-1-metoxyletyl)-8-(isopropylamino)pyrido [3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin-1-yl(piperazin) (Hợp chất (b)).

Sản xuất Tinh thể B của Hợp chất (b)

Tetrahydrofuran (0,15 ml) và metanol (0,15 ml) được thêm vào muối TFA đã kết tủa trong quá trình sản xuất Tinh thể A, và sau đó dung dịch liti hydroxit 4M (0,018 ml) được thêm vào. Dung dịch được trung hòa với axit formic, và sản phẩm này được tinh chế bằng phép sắc ký cột silica gel. Dung dịch của Hợp chất (b) được cô đặc cho tới khi các tinh thể kết tủa. Tinh thể B của Hợp chất (b) bằng cách này được điều chế.

Đánh giá Tinh thể B của Hợp chất (b)

Fig. 4 minh họa phổ nhiễu xạ tia X của tinh thể thu được. Các đỉnh được quan sát tại $5,2^\circ$, $6,6^\circ$, $8,1^\circ$, $15,2^\circ$, $15,9^\circ$, $16,2^\circ$, $18,8^\circ$, $20,5^\circ$, $20,8^\circ$, và $21,7^\circ$ (góc nhiễu xạ 2θ).

Đường cong dòng nhiệt bởi phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt tại 221°C .

Ví dụ 8

Sản xuất tinh thể C của Hợp chất (b)

Etanol (11 mL) được thêm vào Tinh thể C (1,1 g) của Hợp chất (b), và hỗn hợp này được khuấy qua đêm ở nhiệt độ phòng. Thành phần chất rắn thu được được thu

lại bằng cách lọc và được sấy khô ở 40°C dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất tiêu đề (945 mg, 86%).

Đánh giá Tinh thể C của Hợp chất (b)

Fig. 9 minh họa phổ nhiễu xạ tia X của tinh thể thu được. Các đỉnh được quan sát tại $5,2^\circ$, $7,6^\circ$, $8,4^\circ$, $10,0^\circ$, $10,5^\circ$, $11,9^\circ$, $15,2^\circ$, $17,0^\circ$, $20,9^\circ$ và $21,2^\circ$ (góc nhiễu xạ 2θ).

Đường cong dòng nhiệt bởi phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở 223°C .

Fig. 15 minh họa phổ hấp thụ IR (KBr) của tinh thể. Các đỉnh hấp thụ được quan sát tại 1369 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1546 cm^{-1} và 1566 cm^{-1} (số sóng).

Ví dụ 9

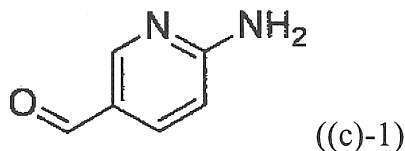
Ví dụ 9 giải thích Tinh thể A của (R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxyletyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmetyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin (Hợp chất (c)).

Sự tổng hợp của Hợp chất (c) sẽ được mô tả ngay bây giờ.

Sự tổng hợp Hợp chất (c)-1

Hợp chất (c)-1, 6-aminopyridin-3-cacbaldehyt đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 21]



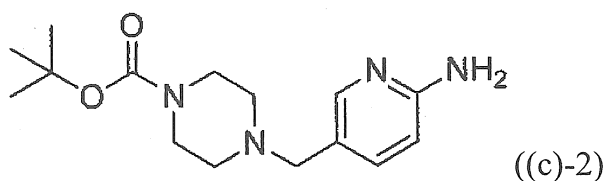
6-aminopyridin-3-cacbonitril (1,9 g, 16 mmol) được hòa tan trong THF (160 mL), và dung dịch được làm lạnh với việc khuấy tới -78°C . Diisobutylaluminum hydrit (106,5 mL, dung dịch toluen 1,5M) được thêm từ từ từng giọt vào dung dịch ở -78°C , được gia nhiệt và được khuấy tới 20°C , và được khuấy thêm trong hai giờ. Nước băng đá (100 mL) được thêm vào dung dịch để làm nguội phản ứng. Sản phẩm được chiết xuất ba lần với diclorometan (50 mL). Sau khi các pha hữu cơ thu được được kết hợp, dung dịch này được rửa một lần với nước muối (100 mL) và được sấy khô trên natri sunfat, anhydrit. Sau khi thành phần chất rắn lọc ra, chất lọc ra được cô đặc dưới áp suất giảm. Chất còn dư được tinh chế bằng phép sắc ký silica gel để

tạo ra Hợp chất tiêu đề thô (c)-1 (1,7 g). Sản phẩm thô được dùng cho phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Sự tổng hợp Hợp chất (c)-2

Hợp chất (c)-2, tert-butyl 4-[(6-amino pyridin-3-yl)methyl]piperazin-1-carboxylat đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 22]



6-aminopyridin-3-carbonitril (1,9 g, 16 mmol) được hòa tan trong THF (160 mL), và hỗn hợp được làm lạnh với việc khuấy tới -78°C . Diisobutylaluminum hydrit (106,5 mL, dung dịch toluene 1,5 M) được thêm từ từ từng giọt vào dung dịch ở -78°C . Hệ thống được gia nhiệt với việc khuấy tới 20°C , và được khuấy thêm trong hai giờ. Nước băng đá (100 mL) được thêm vào dung dịch để làm nguội phản ứng. Sản phẩm được chiết xuất ba lần với diclorometan (50 mL). Sau khi các pha hữu cơ được kết hợp, dung dịch này được rửa một lần với nước muối (100 mL) và được sấy khô trên natri sunfat, anhydrit. Sau khi thành phần chất rắn được lọc ra, chất lọc ra được cô đặc dưới áp suất giảm. Chất còn dư được tinh chế bằng phép sắc ký silica gel để tạo ra Hợp chất tiêu đề thô (1,7 g).

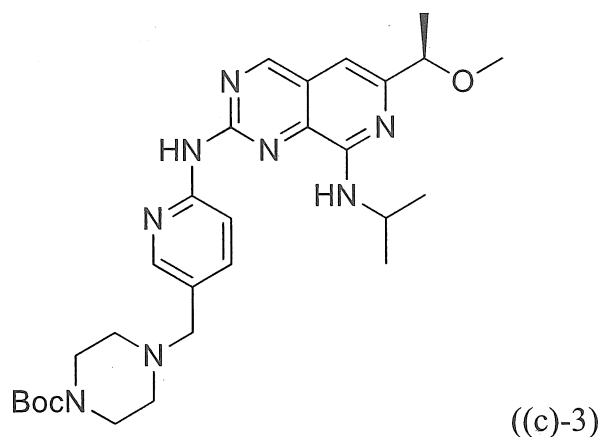
Sản phẩm thô thu được (1,7 g, 13,9 mmol) và tert-butyl piperazin-1-carboxylat (3,2 g, 17,2 mmol) được hòa tan trong diclorometan (50 mL), và hỗn hợp này được khuấy trong tám giờ ở nhiệt độ phòng. Natri triaxetoxymorhydrit (8,84 g, 40,9 mmol) được thêm vào dung dịch và hỗn hợp này được khuấy trong hai giờ ở nhiệt độ phòng. Phản ứng được theo dõi bởi LC/MS. Sau khi hoàn thành phản ứng, dung dịch natri cacbonat bão hòa (50 mL) được thêm vào để làm nguội phản ứng. Sản phẩm được chiết xuất ba lần với etyl axetat (50 mL). Sau khi các pha hữu cơ thu được được kết hợp, dung dịch này được rửa một lần với nước muối (100 mL) và được sấy khô trên natri sunfat, anhydrit. Sau khi thành phần chất rắn được lọc ra, chất lọc ra được cô đặc dưới áp suất giảm. Chất còn dư được tinh chế bằng phép sắc

ký silica gel để tạo ra Hợp chất tiêu đề thô (3,8 g, 81%).

Sự tổng hợp Hợp chất (c)-3

Hợp chất (c)-3, tert-butyl (R)-4-(((6-((8-(isopropylamino)-6-(1-metoxyletyl)pyrido [3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino) pyridin-3-yl)methyl)piperazin-1-carboxylat, đã được tổng hợp.

[Công thức hóa học 23]

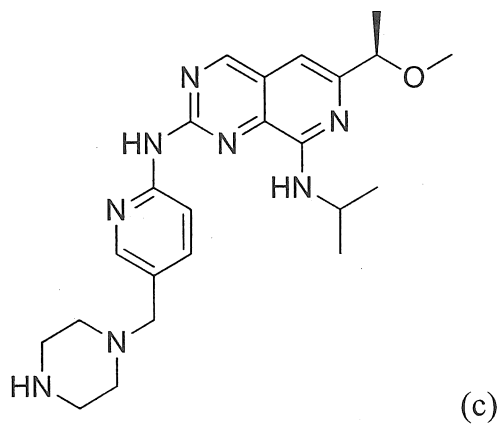


Hợp chất Tiêu đề (c)-3 đã được tổng hợp như trong Hợp chất (b)-6 sử dụng các Hợp chất B-2 và C-2.

Sự tổng hợp Hợp chất (c)

Sự tổng hợp của Hợp chất (c), (R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxyletyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmethyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin

[Công thức hóa học 24]



Hợp chất tiêu đề được điều chế với Hợp chất (c)-3 như trong Hợp chất (a) trong Ví dụ 1.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 9,04(1H,s), 8,34(1H,d), 8,26(1H,s), 7,74(1H,dd),

6,84(1H,s), 6,14(1H,d), 4,41(1H,m), 4,33(1H,q), 3,49(2H,s), 3,41(3H,s), 2,91(4H,m), 2,46(4H,br), 1,50(3H,d), 1,36(6H,m)

Sản xuất Tinh thể A của Hợp chất (c)

Dung dịch của Hợp chất (c) được tinh chế bằng phép sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC đã được cô đặc cho tới khi các tinh thể kết tủa. Tinh thể A của Hợp chất (c) bằng cách này được điều chế.

Đánh giá Tinh thể A của Hợp chất (c)

Fig. 5 minh họa phổ nhiễu xạ tia X của tinh thể thu được. Các đỉnh được quan sát tại 4,8°, 7,6°, 8,2°, 9,7°, 15,3°, 16,6°, 19,1°, 19,8°, 22,4° và 26,2° (góc nhiễu xạ 2 θ).

Đường cong dòng nhiệt bởi phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) có đỉnh thu nhiệt ở 182°C.

Fig. 16 minh họa phổ hấp thụ IR (KBr) của tinh thể. Các Đỉnh hấp thụ được quan sát tại 1115 cm⁻¹, 1446 cm⁻¹, 1508 cm⁻¹, 1560 cm⁻¹ và 1601 cm⁻¹ (số sóng).

Các Fig. 23-1 và 23-2 minh họa phổ dạng rắn ¹³C-NMR của tinh thể. Fig. 23-1 thể hiện chế độ 6500Hz và Fig. 23-2 thể hiện chế độ 14000Hz. Các đỉnh được quan sát tại 161,3ppm, 150,8ppm, 138,9ppm, 128,1ppm, 109,8ppm, 82,7ppm, 47,6ppm, 42,5ppm, 41,5ppm, 24,5ppm và 21,7ppm (độ dịch chuyển hóa học).

Fig. 24 minh họa phổ dạng rắn ¹⁵N-NMR của các tinh thể. Các đỉnh được quan sát tại 242,8ppm, 233,8ppm, 219,0ppm, 171,7ppm, 86,9ppm, 54,9ppm, 11,3ppm và -5,5ppm (độ dịch chuyển hóa học).

Ví dụ 10

Đánh giá hoạt tính ức chế CDK4/xyclin D3 ở người

Các hoạt tính ức chế CDK4/xyclin D3 ở người của các Hợp chất (a), (b), và (c) đã được đánh giá.

Hoạt tính ức chế CDK4/xyclin D3 ở người của mỗi hợp chất được xác định bằng một bộ dụng cụ thí nghiệm (QS S Assist CDK4/Xyclin D3_FP kit) có sẵn từ Carna Biosciences, Inc. Bộ dụng cụ thí nghiệm này có thể xác định hoạt tính kinaza bao gồm việc xác định sự thay đổi của phân cực huỳnh quang gây ra bởi liên kết của chất nền huỳnh quang được photphoryl hoá bởi kinaza với thuốc thử liên kết IMAP

dựa trên công nghệ IMAP của Molecular Devices.

Chất đệm thử nghiệm (10×) được chứa trong bộ dụng cụ hoặc chất đệm thử nghiệm được sản xuất trong phòng thí nghiệm như của bộ dụng cụ đã được sử dụng để điều chế các dung dịch mẫu. Chất đệm thử nghiệm (10×) được chứa trong bộ dụng cụ được pha loãng mười lần với nước tinh khiết để điều chế một chất đệm thử nghiệm. Chất đệm thử nghiệm chứa HEPES 20 mM (pH 7,4), Tween 20 0,01%, và dithiothreitol 2 mM. Hợp chất thử nghiệm được điều chế với dimetyl sulfoxit (DMSO) tới nồng độ gấp 100 lần nồng độ cuối, và sau đó được pha loãng với chất đệm thử nghiệm tới 25 lần, do đó nồng độ của dung dịch hợp chất thử nghiệm gấp bốn lần nồng độ cuối. Dung dịch ATP(5×)/chất nền/Kim loại được chứa trong bộ dụng cụ được pha loãng với chất đệm thử nghiệm tới năm lần trước khi sử dụng. CDK4/xyclin D3 được chứa trong bộ dụng cụ được pha loãng với chất đệm thử nghiệm tới nồng độ gấp hai lần nồng độ cuối để điều chế dung dịch enzym (nồng độ cuối của CDK4/xyclin D3 là 12,5 tới 25 ng/bể). Chất đệm liên kết A IMAP(5×) và chất đệm liên kết B IMAP(5×) được pha loãng riêng với nước tinh khiết tới năm lần, các chất đệm này được trộn sao cho tỷ lệ của chất đệm liên kết A IMAP và chất đệm liên kết B IMAP là 85:15, và thuốc thử liên kết IMAP được thêm vào để pha loãng 400 lần để điều chế thuốc thử phát hiện.

Dung dịch hợp chất thử nghiệm (5 μ L) và dung dịch ATP/chất nền/Kim loại (5 μ L) được đặt trên đĩa giếng nuôi cấy tế bào 384. Sau khi dung dịch enzym hoặc chất đệm thử nghiệm (10 μ L) được đặt, dung dịch này được trộn để bắt đầu phản ứng enzym. Tổng thể tích dung dịch là 20 μ L/bể, và dung dịch phản ứng chứa HEPES 20 mM (pH 7,4), Tween 20 0,01%, dithiothreitol 2 mM, chất nền peptit thương hiệu FITC 100 nM (Carna Biosciences, Inc.), ATP 100 μ M, magiê clorua 1 mM, DMSO 1%, và 12,5 tới 25 ng/bể CDK4/xyclin D3. Sau khi phản ứng trong 45 phút ở nhiệt độ phòng, thuốc thử phát hiện (60 μ L) được thêm vào mỗi bể, phản ứng được kéo dài thêm 30 phút ở nhiệt độ phòng trong điều kiện chắn ánh sáng. Sự phân cực huỳnh quang được đo ở bước sóng kích thích 485 nm và bước sóng phát hiện 535 nm bằng máy đọc microplate.

Dung dịch enzym được thêm vào và phần trăm ức chế hoạt tính enzym trong hợp

chất thử nghiệm được xác định trong đó hoạt tính enzym khi DMSO được thêm vào thay thế dung dịch hợp chất thử nghiệm được xác định là 100% và hoạt tính enzym khi chất đệm thử nghiệm được thêm vào thay thế dung dịch enzym và DMSO được thêm vào thay thế dung dịch hợp chất thử nghiệm được xác định là 0%. Phần trăm ức chế đã phù hợp với đường cong phản ứng - liều lượng để tính toán nồng độ ức chế 50% đối với CDK4/xyclin D3.

Hoạt tính ức chế IC_{50} của mỗi hợp chất để ức chế hoạt tính CDK4/xyclin D3 nhỏ hơn 10 nM.

Ví dụ 11

Đánh giá hoạt tính ức chế CDK2/xyclin A2 ở người

Các hợp chất A, B, và C được đưa ra để đánh giá hoạt tính ức chế đối với CDK2/xyclin A2 ở người sử dụng một bộ dụng cụ thí nghiệm (QS S Assist CDK2/Xyclin A2_FP kit) có sẵn từ Carna Biosciences, Inc. Bộ dụng cụ này có thể xác định hoạt tính kinaza bao gồm việc xác định sự thay đổi phân cực huỳnh quang gây ra bởi liên kết của chất nền huỳnh quang được photphoryl hóa bởi kinaza với thuốc thử IMAP dựa trên công nghệ IMAP của Molecular Devices.

Chất đệm thử nghiệm (10×) được chứa trong bộ dụng cụ được pha loãng với nước tinh khiết đến mười lần để điều chế chất đệm thử nghiệm, mà chất đệm thử nghiệm này sau đó được dùng để điều chế mỗi dung dịch. Chất đệm thử nghiệm chứa HEPES 20 mM (pH 7,4), Tween 20 0,01%, và dithiothreitol 2 mM. Mỗi hợp chất thử nghiệm được pha loãng với dimethyl sulfoxit (DMSO) tới nồng độ gấp 100 lần nồng độ cuối và sau đó được pha loãng với chất đệm thử nghiệm tới 25 lần, để nồng độ của hợp chất thử nghiệm gấp bốn lần nồng độ cuối, để điều chế hợp chất thử nghiệm. Dung dịch ATP(5×)/chất nền/Kim loại có chứa trong bộ dụng cụ được pha loãng với chất đệm thử nghiệm năm lần trước khi sử dụng. CDK2/xyclin A2 có trong bộ dụng cụ được pha loãng với chất đệm thử nghiệm tới nồng độ gấp hai lần nồng độ cuối để điều chế dung dịch enzym (nồng độ cuối của CDK2/xyclin A2 là 2,5 ng/bể). Chất đệm liên kết A IMAP(5×) được pha loãng với nước tinh khiết gấp năm lần và thuốc thử liên kết IMAP được thêm vào dung dịch pha loãng tới 400 lần để điều chế thuốc thử phát hiện.

Dung dịch hợp chất thử nghiệm (5 μ L) và dung dịch ATP/chất nền/Kim loại (5 μ L) được đặt trên đĩa giếng nuôi cấy tế bào 384. Sau khi dung dịch enzym hoặc chất đệm thử nghiệm (10 μ L) được đặt vào, dung dịch này được trộn để bắt đầu phản ứng enzym. Tổng thể tích dung dịch là 20 μ L/bể, và dung dịch phản ứng này chứa HEPES 20 mM (pH 7,4), Tween 20 0,01%, dithiothreitol 2 mM, chất nền peptit thương hiệu FITC 100 nM (Carna Biosciences, Inc.), ATP 30 μ M, magiê clorua 5 mM, DMSO 1%, và 2,5 ng/bể CDK2/xyclin A2. Sau phản ứng trong 60 phút ở nhiệt độ phòng, thuốc thử phát hiện (60 μ L) được thêm vào từng bể, phản ứng tiếp tục được tiếp tục trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong điều kiện hạn chế ánh sáng. Sự phân cực huỳnh quang được đo ở bước sóng kích thích 485 nm và bước sóng phát hiện 535 nm bằng máy đọc khay vi thể.

Dung dịch enzym được thêm vào và phần trăm ức chế hoạt tính enzym trong hợp chất thử nghiệm được xác định trong đó hoạt tính enzym khi DMSO được thêm vào thay thế dung dịch hợp chất thử nghiệm được xác định là 100% và hoạt tính enzym khi chất đệm thử nghiệm được thêm vào thay thế dung dịch enzym và DMSO được thêm vào thay thế dung dịch hợp chất thử nghiệm được xác định là 0%. Phần trăm ức chế đã phù hợp với đường cong phản ứng - liều lượng để tính toán nồng độ ức chế 50% đối với CDK2/xyclin A2.

Hoạt tính ức chế IC_{50} của mỗi hợp chất đối với hoạt tính CDK4/xyclin D3 bằng hoặc thấp hơn 100 nM.

Ví dụ 12

Đánh giá hoạt tính ức chế đối với CDK6/xyclin D3 ở người

Hoạt tính ức chế CDK6/xyclin D3 được xác định bởi Off-chip Mobility Shift Assay (MSA). MSA này có thể xác định hoạt tính kinaza bao gồm việc tách riêng các protein bằng các phương thức khác nhau trong độ linh động của điện di phụ thuộc vào trọng lượng phân tử và sự tích điện của mỗi protein. Hoạt tính kinaza được xác định thông qua sự phân tách điện di của các protein có các độ âm điện khác nhau phụ thuộc vào tỷ phần sự phosphoryl hóa bởi kinaza.

Mỗi dung dịch được điều chế với chất đệm thử nghiệm chứa HEPES 20 mM (pH 7,5), Triton X-100 0,01%, và dithiothreitol 2 mM. Mỗi hợp chất thử nghiệm

được pha loãng với dimethyl sulfoxit (DMSO) tới nồng độ gấp 100 lần nồng độ cuối và sau đó được pha loãng với chất đệm thử nghiệm tới 25 lần, để nồng độ của hợp chất thử nghiệm gấp bốn lần nồng độ cuối, để điều chế dung dịch hợp chất thử nghiệm. Dung dịch ATP/chất nền/Kim loại đã được điều chế sao cho nồng độ này gấp bốn lần nồng độ cuối. Dung dịch enzym đã được điều chế sao cho nồng độ này gấp hai lần nồng độ cuối. Nồng độ cuối của enzym được điều chỉnh phù hợp trên cơ sở tín hiệu bởi hoạt tính enzym và hoạt tính ức chế của hợp chất kiểm soát tích cực.

Dung dịch hợp chất thử nghiệm (5 μ L) và dung dịch ATP/chất nền/Kim loại (5 μ L) được đặt trên đĩa giếng nuôi cấy tế bào 384. Sau khi dung dịch enzym hoặc chất đệm thử nghiệm (10 μ L) được đặt vào, dung dịch này được trộn để bắt đầu phản ứng enzym. Tổng thể tích dung dịch là 20 μ L/bể, và dung dịch phản ứng chứa HEPES 20 mM (pH 7,5), Triton X-100 0,01%, dithiothreitol 2 mM, chất nền peptit 1000 nM (DYRKtide-F), ATP 300 μ M, magiê clorua 5 mM, DMSO 1%, và CDK6/xyclin D3 với nồng độ dự định. Sau khi phản ứng trong năm giờ ở nhiệt độ phòng, một chất đệm kết thúc (QuickScout Screening Assist MSA; Carna Biosciences, Inc.) (60 μ L) đã được thêm vào mỗi bể để làm nguội phản ứng. Chất nền peptit và peptit đã phosphoryl hóa trong dung dịch này được tổng hợp và được xác định với LabChip 3000 (Caliper Lifesciences). Khả năng phản ứng kinaza đã được đánh giá bởi tỷ lệ sản phẩm (P/(P+S)) của độ cao đỉnh (S) của chất nền peptit với độ cao đỉnh (P) của peptit đã phosphoryl hóa.

Dung dịch enzym được thêm vào và phần trăm ức chế hoạt tính enzym của hợp chất thử nghiệm đã được xác định trong đó hoạt tính enzym khi DMSO được thêm vào dung dịch hợp chất thử nghiệm đã được xác định là 100% và hoạt tính enzym khi chất đệm thử nghiệm được thêm vào dung dịch enzym và DMSO được thêm vào dung dịch hợp chất thử nghiệm được xác định là 0%. Phần trăm ức chế phù hợp với đường cong liều lượng - phản ứng để tính toán nồng độ ức chế 50% đối với CDK6/xyclin D3.

Hoạt tính ức chế IC_{50} của mỗi hợp chất đối với hoạt tính CDK6/xyclin D3 thấp hơn 10 nM.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Tinh thể của hợp chất theo công thức (I), trong đó hợp chất này được biểu thị bởi công thức (I) được chọn từ nhóm gồm có:

1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on;

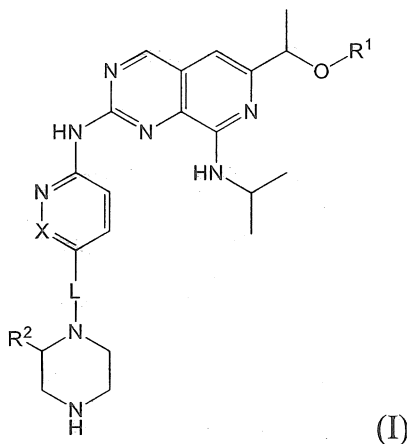
1-(6-((6-((1R)-1-metoxetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin; và

(R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxetyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmetyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin.

có thể được sử dụng như một thành phần hoạt tính đối với việc sản xuất dược phẩm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tinh thể của hợp chất được biểu thị bởi công thức (I):



trong đó R^1 biểu thị nguyên tử hydro hoặc nhóm C_{1-3} alkyl, R^2 biểu thị nguyên tử hydro hoặc nhóm oxo, L biểu thị liên kết đơn hoặc nhóm C_{1-3} alkylen, và X biểu thị CH hoặc N;

hoặc solvat của nó;

trong đó hợp chất được biểu thị bởi công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm:

1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

1-(6-((6-((1R)-1-metoxetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin; và

(R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxetyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmetyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin.

2. Tinh thể theo điểm 1, trong đó hợp chất là 1-(6-((6-((1R)-1-hydroxyetyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridyl)piperazin-2-on.

3. Tinh thể theo điểm 2, trong đó tinh thể này thể hiện các đỉnh tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 6,3^\circ, 6,6^\circ, 11,6^\circ, 16,9^\circ$ và 20° trên phổ nhiễu xạ bột tia X, và ưu tiên thể hiện một hoặc nhiều đặc tính (i) đến (iv) dưới đây:

(i) nhiệt độ khởi phát ngoại suy đối với đỉnh thu nhiệt 277°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai;

(ii) các đỉnh hấp thụ khác biệt với các số sóng 703 cm^{-1} , 896 cm^{-1} và 3418 cm^{-1}

trên phổ hấp thụ hồng ngoại sử dụng phương pháp KBr;

(iii) các đỉnh khác biệt tại 136,0ppm, 111,2ppm, 105,1ppm, 101,8ppm, 52,7ppm, 49,6ppm, 42,9ppm, 23,8ppm, và 18,5 ppm trên phổ NMR (C^{13}) dạng rắn;

(iv) các đỉnh khác biệt tại 248,6ppm, 245,7ppm, 229,2ppm, 214,5ppm, 174,3ppm, 86,5ppm, 54,7ppm và -12,4 ppm trên phổ NMR (N^{15}) dạng rắn.

4. Tinh thể theo điểm 2, trong đó tinh thể này thể hiện các đỉnh tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,3^\circ, 7,3^\circ, 10,3^\circ, 15,1^\circ$ và $17,4^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X, và ưu tiên thể hiện một hoặc nhiều đặc tính (i) đến (iv) dưới đây:

(i) nhiệt độ khởi phát ngoại suy đối với đỉnh thu nhiệt $277^\circ C$ theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai;

(ii) các đỉnh hấp thụ khác biệt với các số sóng $874\text{ cm}^{-1}, 1330\text{ cm}^{-1}$ và 3314 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại sử dụng phương pháp KBr;

(iii) các đỉnh khác biệt tại 154,7ppm, 138,8ppm, 133,6ppm, 113,2ppm, 101,6ppm, 100,4ppm, 67,4ppm, 51,8ppm, 26,6ppm và 23,3ppm trên phổ NMR (C^{13}) dạng rắn;

(iv) Các đỉnh khác biệt tại 243,6ppm, 86,7ppm, 56,7ppm và -12,4 ppm trên phổ NMR (N^{15}) dạng rắn.

5. Tinh thể theo điểm 2, trong đó tinh thể này thể hiện các đỉnh tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,3^\circ, 6,0^\circ, 6,7^\circ, 10,4^\circ$ and $20,8^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X, và ưu tiên thể hiện một nhiệt độ khởi phát ngoại suy đối với đỉnh thu nhiệt $271^\circ C$ theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai.

6. Tinh thể theo điểm 2, trong đó tinh thể này thể hiện các đỉnh tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 6,0^\circ, 10,0^\circ, 13,7^\circ, 20,3^\circ$ và $23,0^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X và ưu tiên thể hiện một hoặc nhiều đặc tính (i) đến (ii) dưới đây:

(i) nhiệt độ khởi phát ngoại suy đối với đỉnh thu nhiệt $100^\circ C$ và $278^\circ C$ theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai;

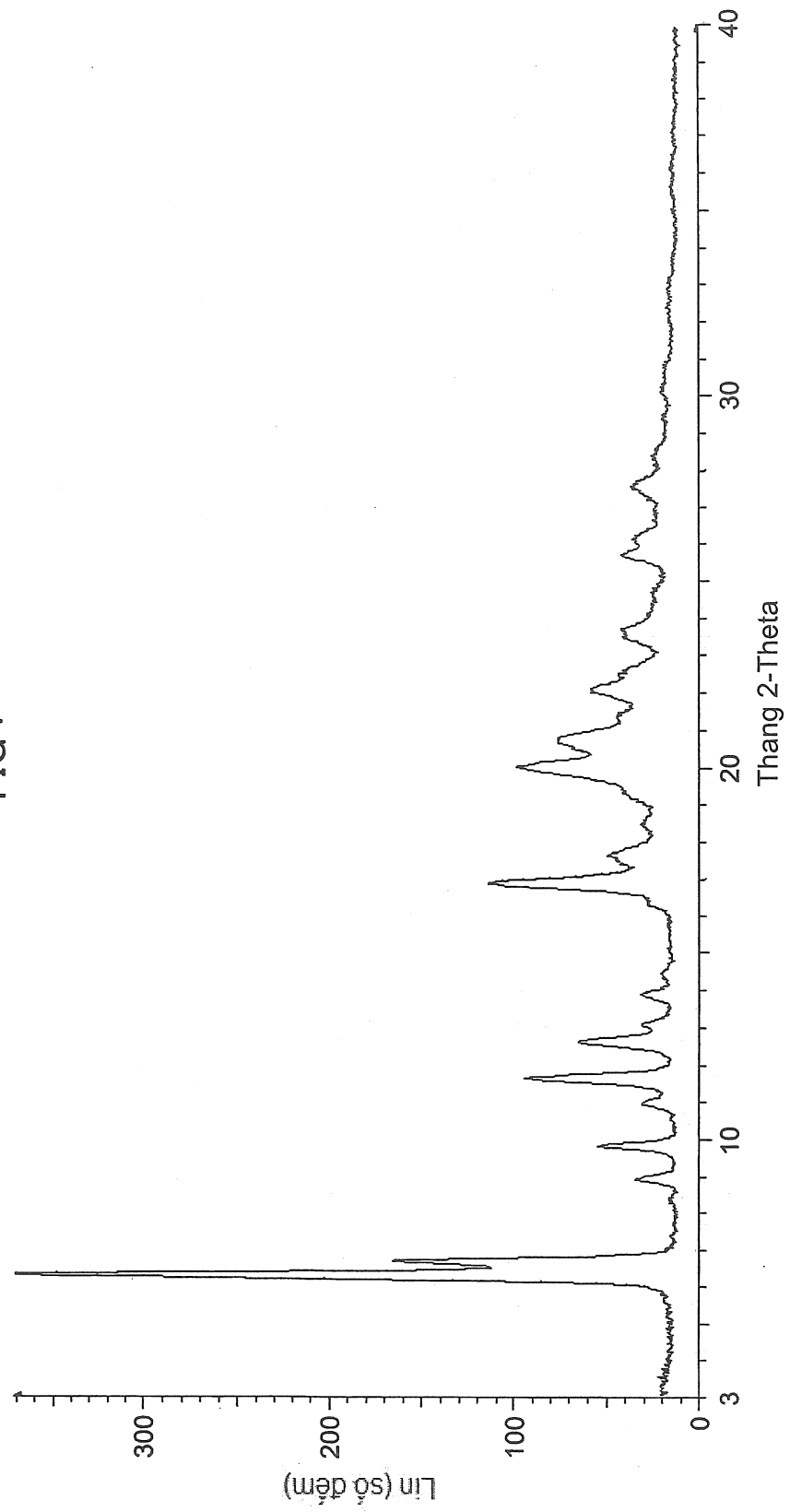
(ii) các đỉnh hấp thụ khác biệt với các số sóng $840\text{ cm}^{-1}, 904\text{ cm}^{-1}, 955\text{ cm}^{-1}$,

- 1490 cm^{-1} và 3281 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại sử dụng phương pháp KBr.
7. Tinh thể theo điểm 2, trong đó tinh thể này thể hiện các đỉnh tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,2^\circ, 7,2^\circ, 9,5^\circ, 14,5^\circ, 16,5^\circ, 20,9^\circ, 25,0^\circ$ và $27,9^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X, và ưu tiên thể hiện một hoặc nhiều đặc tính (i) đến (ii) dưới đây:
- (i) nhiệt độ khởi phát ngoại suy đối với đỉnh thu nhiệt 272°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai;
 - (ii) các đỉnh hấp thụ khác biệt với các số sóng 1081 cm^{-1} và 1206 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại sử dụng phương pháp KBr.
8. Tinh thể theo điểm 1, trong đó hợp chất là 1-(6-(((1R)-1-metoxymethyl)-8-(isopropylamino)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2-yl)amino)-3-pyridazyl)piperazin.
9. Tinh thể theo điểm 8, trong đó tinh thể này thể hiện các đỉnh tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,2^\circ, 7,6^\circ, 8,4^\circ, 10,5^\circ, 15,2^\circ, 16,9^\circ, 20,1^\circ, 21,0^\circ, 23,3^\circ$ và $26,6^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X, và ưu tiên thể hiện một hoặc nhiều đặc tính (i) đến (iv) dưới đây:
- (i) nhiệt độ khởi phát ngoại suy đối với đỉnh thu nhiệt 225°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai;
 - (ii) các đỉnh hấp thụ khác biệt với các số sóng 1369 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} và 1566 cm^{-1} trên phổ hấp thụ hồng ngoại sử dụng phương pháp KBr;
 - (iii) các đỉnh khác biệt tại 163,4ppm, 157,6ppm, 155,5ppm, 117,8ppm, 82,2ppm, 56,1ppm và 42,3ppm trên phổ NMR (C^{13}) dạng rắn;
 - (iv) các đỉnh khác biệt tại 311,7ppm, 232,4ppm, 168,5ppm, 79,5ppm, 53,3ppm, 32,9ppm và -4,3ppm trên phổ NMR (N^{15}) dạng rắn.
10. Tinh thể theo điểm 8, trong đó tinh thể này thể hiện các đỉnh tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,2^\circ, 6,6^\circ, 8,1^\circ, 15,2^\circ, 15,9^\circ, 16,2^\circ, 18,8^\circ, 20,5^\circ, 20,8^\circ$ và $21,7^\circ$, trên phổ nhiễu xạ bột tia X, và ưu tiên thể hiện một nhiệt độ khởi phát ngoại suy đối với đỉnh thu nhiệt 221°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai.
11. Tinh thể theo điểm 8, trong đó tinh thể này thể hiện các đỉnh tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 5,2^\circ, 7,6^\circ, 8,4^\circ, 10,0^\circ, 10,5^\circ, 11,9^\circ, 15,2^\circ, 17,0^\circ, 20,9^\circ$ và $21,2^\circ$, trên phổ nhiễu xạ bột tia X, và ưu tiên thể hiện một hoặc nhiều đặc tính (i) đến (ii) dưới đây:

- (i) nhiệt độ khởi phát ngoại suy đối với đỉnh thu nhiệt 223°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai;
- (ii) các đỉnh hấp thụ khác biệt với các số sóng 1081 cm⁻¹, 1424 cm⁻¹, 1507 cm⁻¹, 1546 cm⁻¹ và 1566 cm⁻¹ trên phổ hấp thụ hồng ngoại sử dụng phương pháp KBr.
12. Tinh thể theo điểm 1, trong đó hợp chất là (R)-N8-isopropyl-6-(1-metoxetyl)-N2-(5-(piperazin-1-ylmetyl)pyridin-2-yl)pyrido[3,4-d]pyrimidin-2,8-diamin.
13. Tinh thể theo điểm 12, trong đó tinh thể này thể hiện các đỉnh tại các góc nhiễu xạ $2\theta = 4,8^\circ, 7,6^\circ, 8,2^\circ, 9,7^\circ, 15,3^\circ, 16,6^\circ, 19,1^\circ, 19,8^\circ, 22,4^\circ$ và $26,2^\circ$ trên phổ nhiễu xạ bột tia X, và ưu tiên thể hiện một hoặc nhiều đặc tính (i) đến (iv) dưới đây:
- (i) nhiệt độ khởi phát ngoại suy đối với đỉnh thu nhiệt 182°C theo phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai;
- (ii) các đỉnh hấp thụ khác biệt với các số sóng 1115 cm⁻¹, 1446cm⁻¹, 1508cm⁻¹, 1560 cm⁻¹ và 1601cm⁻¹ trên phổ hấp thụ hồng ngoại sử dụng phương pháp KBr;
- (iii) các đỉnh khác biệt tại 161,3ppm, 150,8ppm, 138,9ppm, 128,1ppm, 109,8ppm, 82,7ppm, 47,6ppm, 42,5ppm, 41,5ppm, 24,5ppm và 21,7ppm trên phổ NMR (C¹³) dạng rắn;
- (iv) các đỉnh khác biệt tại 242,8ppm, 233,8ppm, 219,0ppm, 171,7ppm, 86,9ppm, 54,9ppm, 11,3ppm và -5,5ppm trên phổ NMR (N¹⁵) dạng rắn.
14. Dược phẩm chứa tinh thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 và chất mang dược dụng.
15. Dược phẩm để ức chế CDK4/6 chứa tinh thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 làm thành phần hoạt tính.

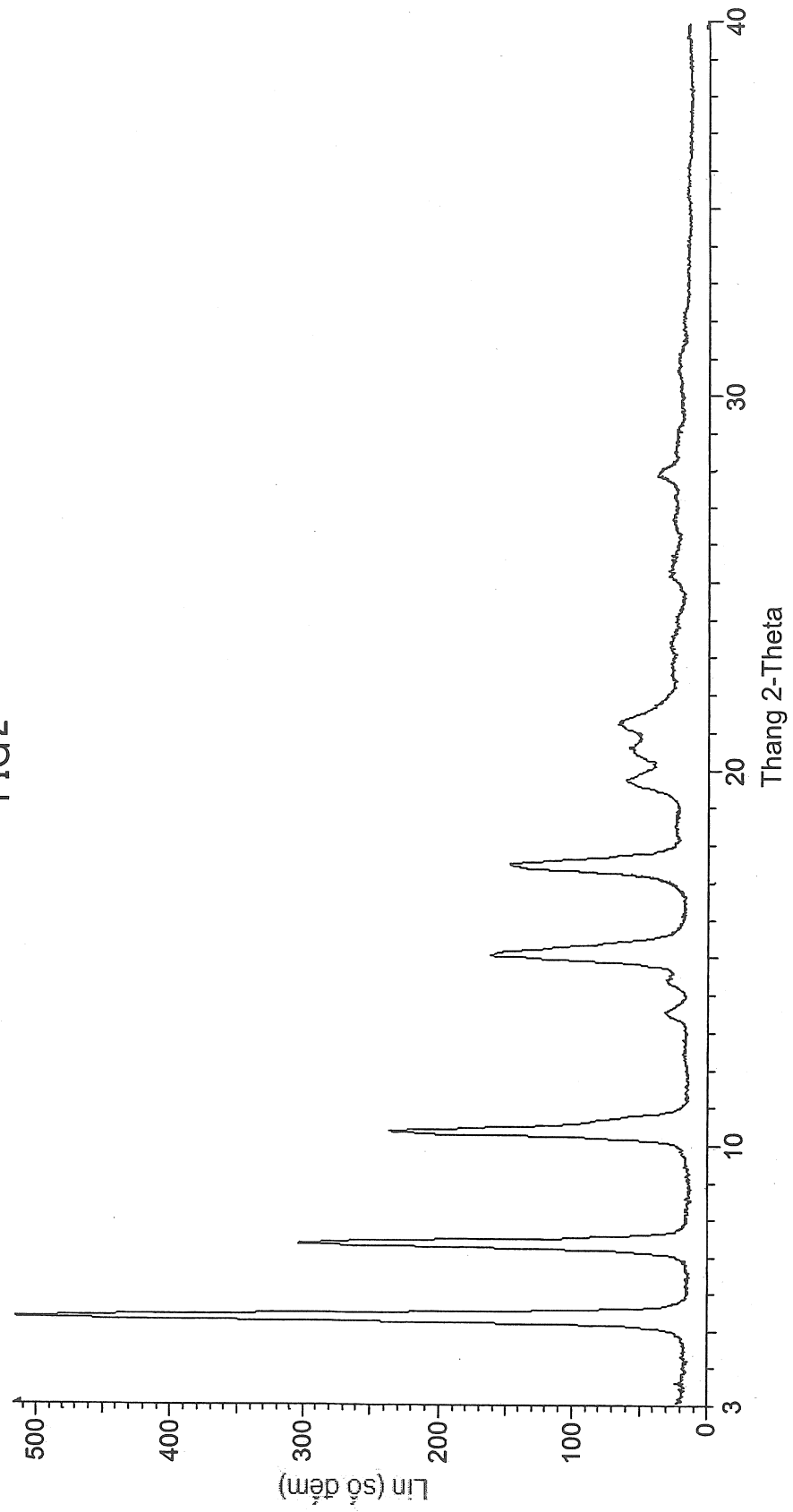
$\frac{1}{28}$

FIG 1



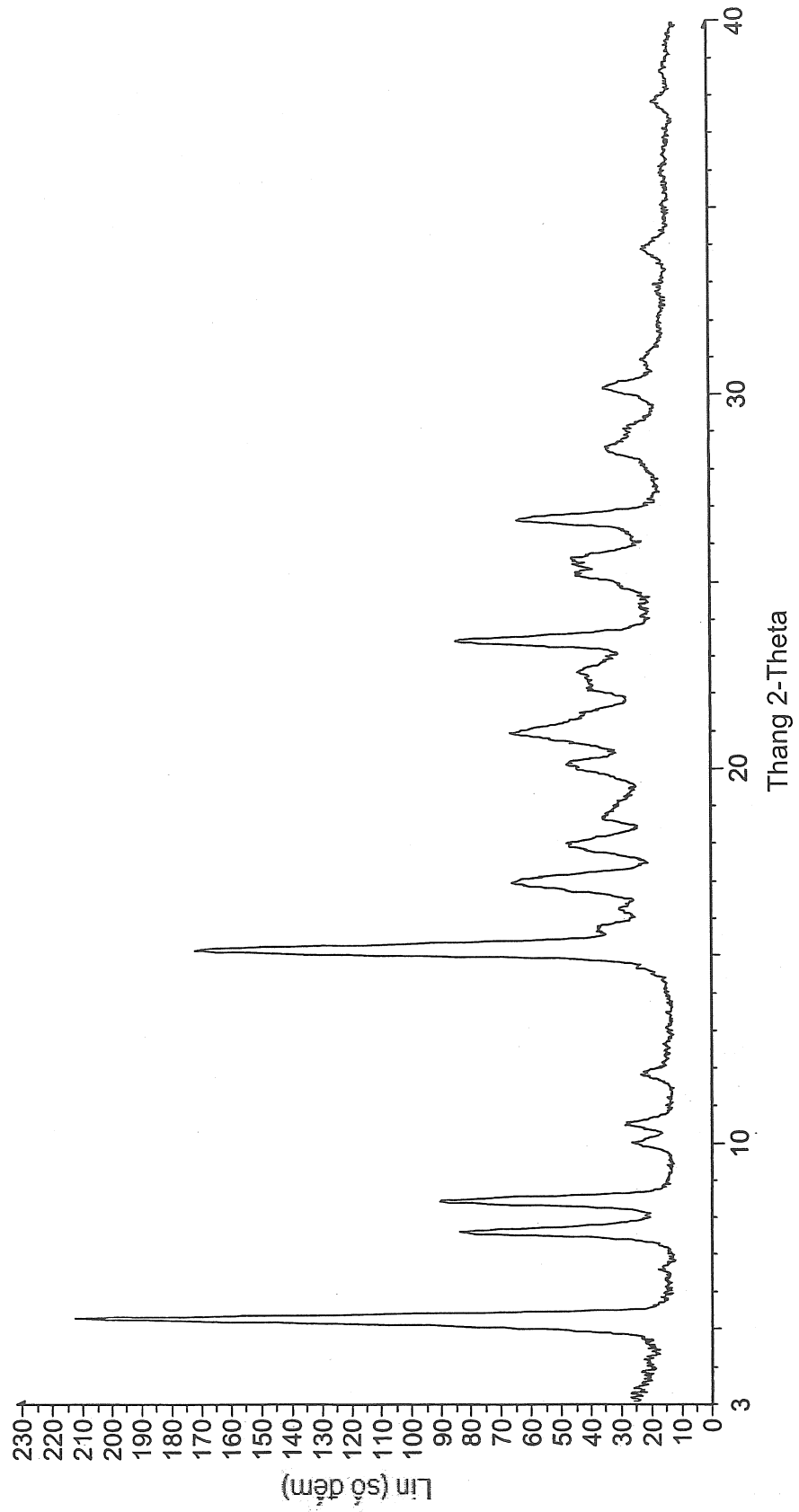
$\frac{2}{28}$

FIG2



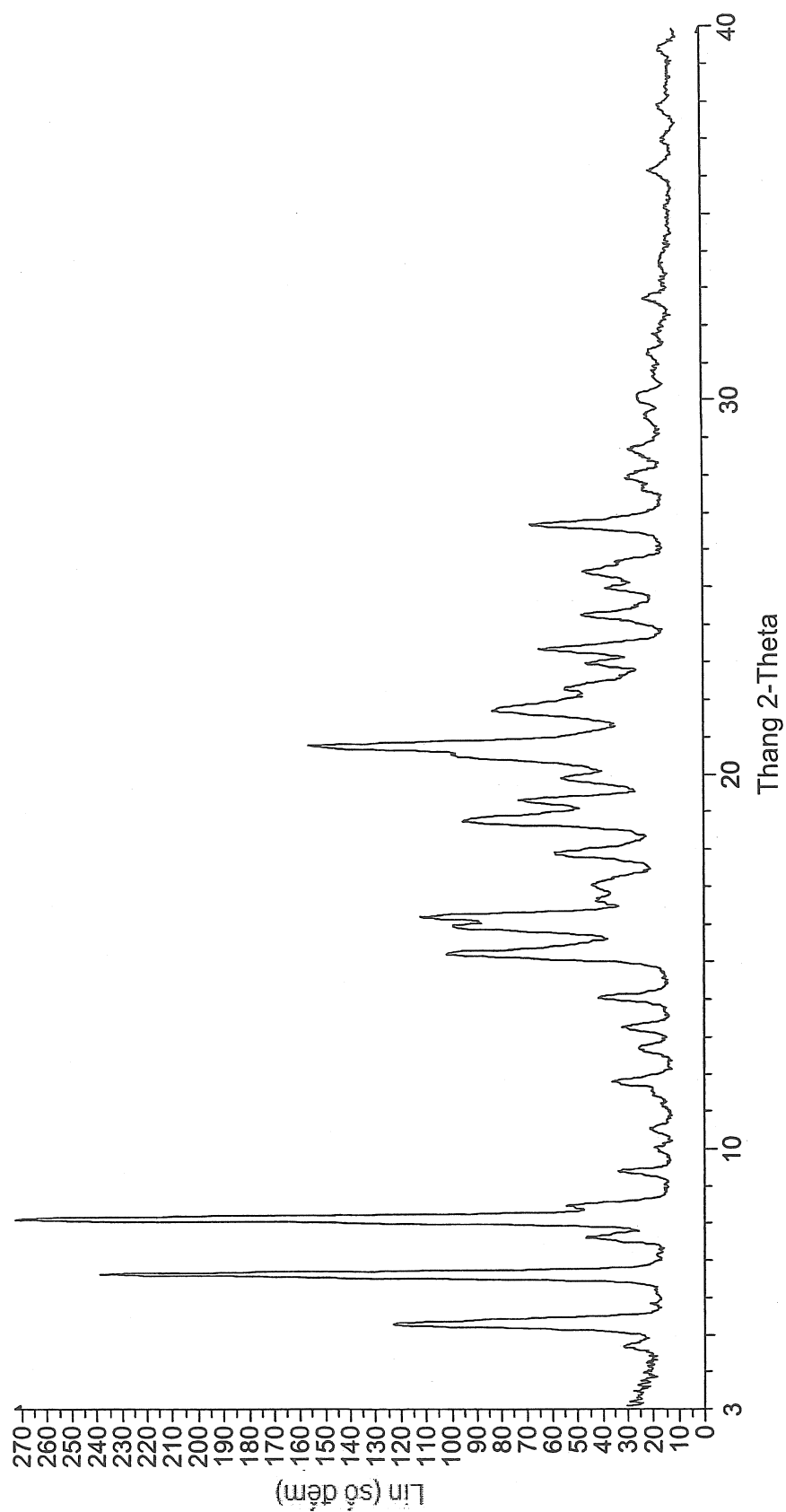
$\frac{3}{28}$

FIG 3



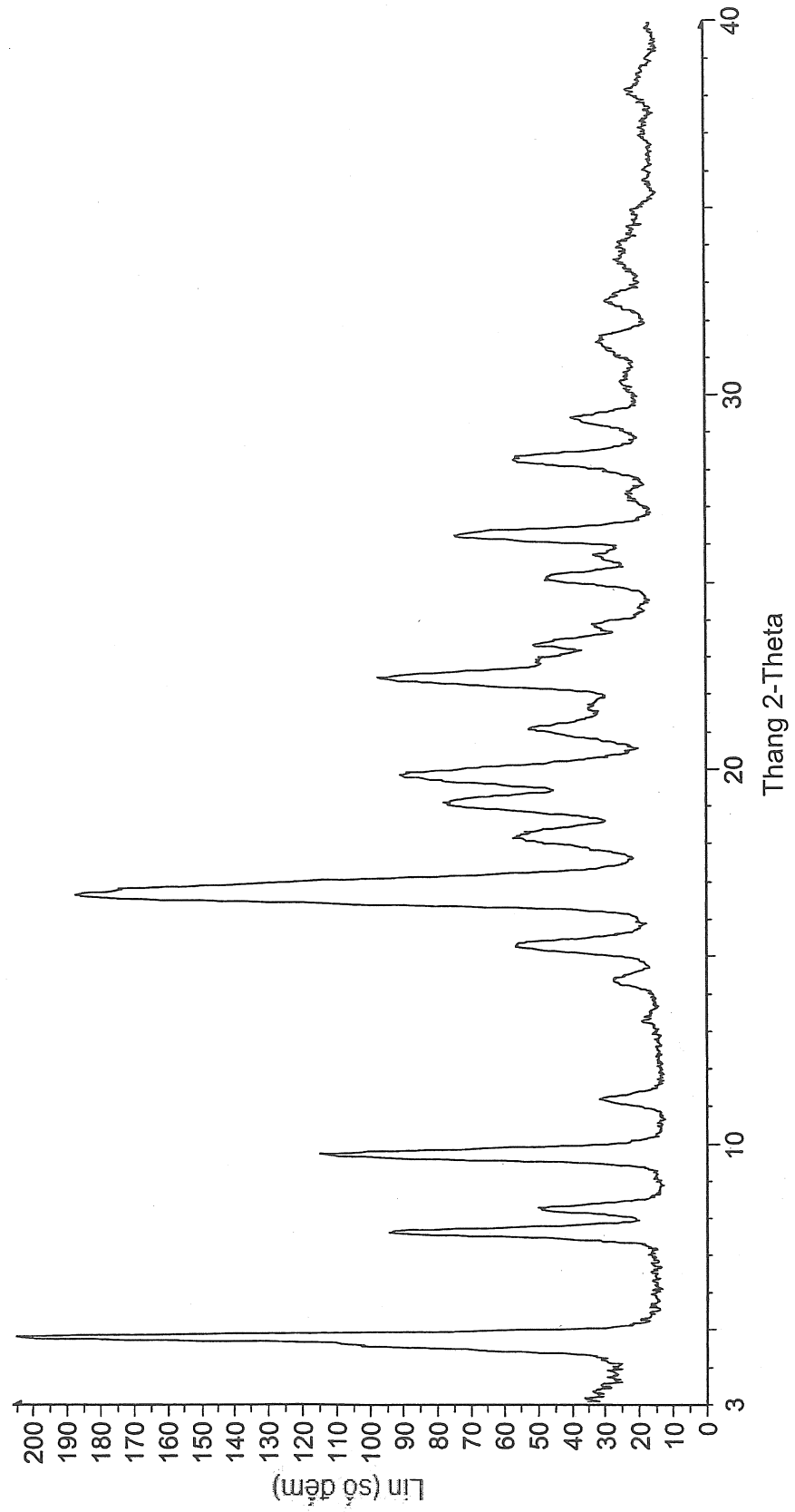
$\frac{4}{28}$

FIG 4



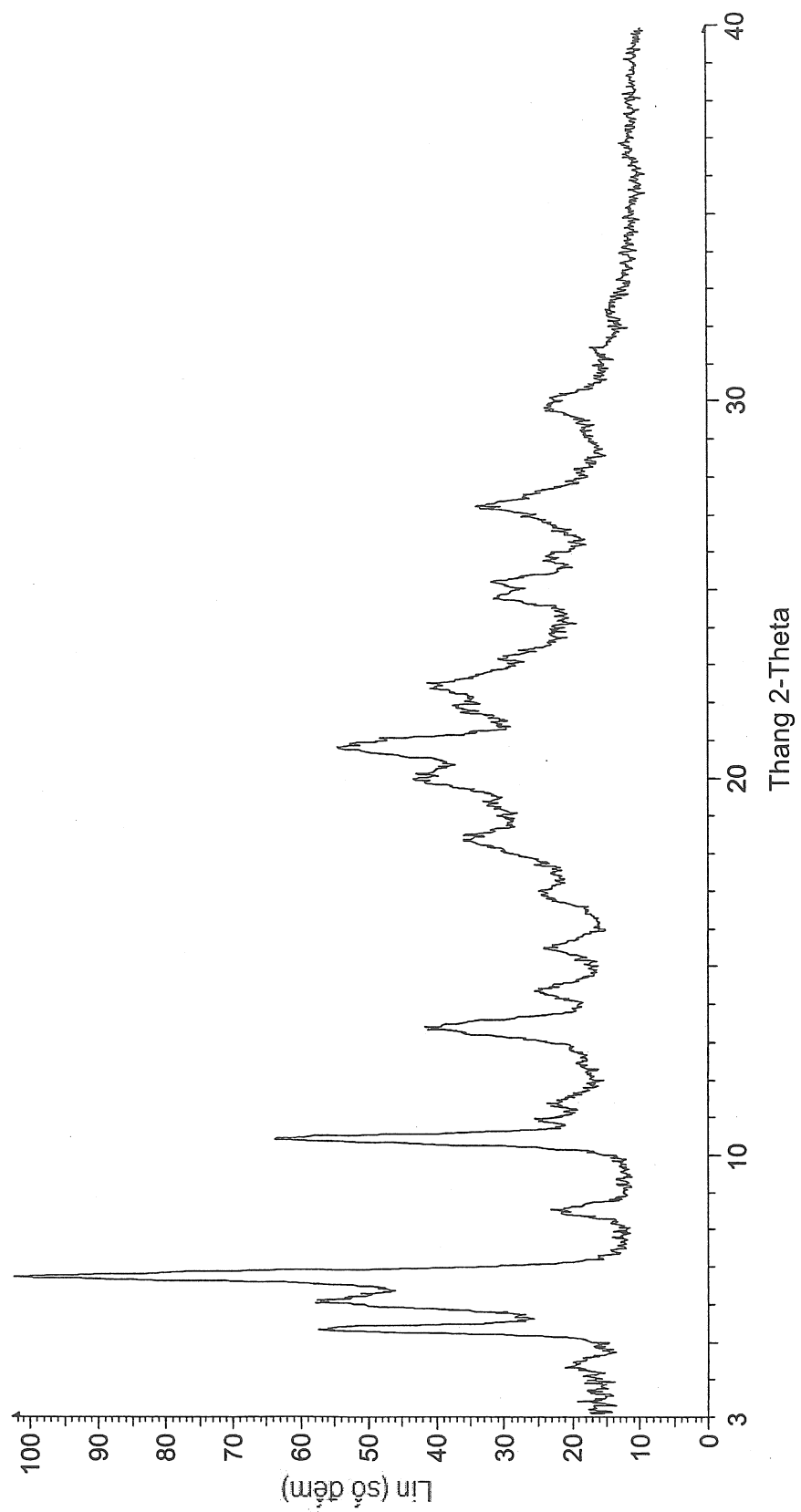
$\frac{5}{28}$

FIG 5



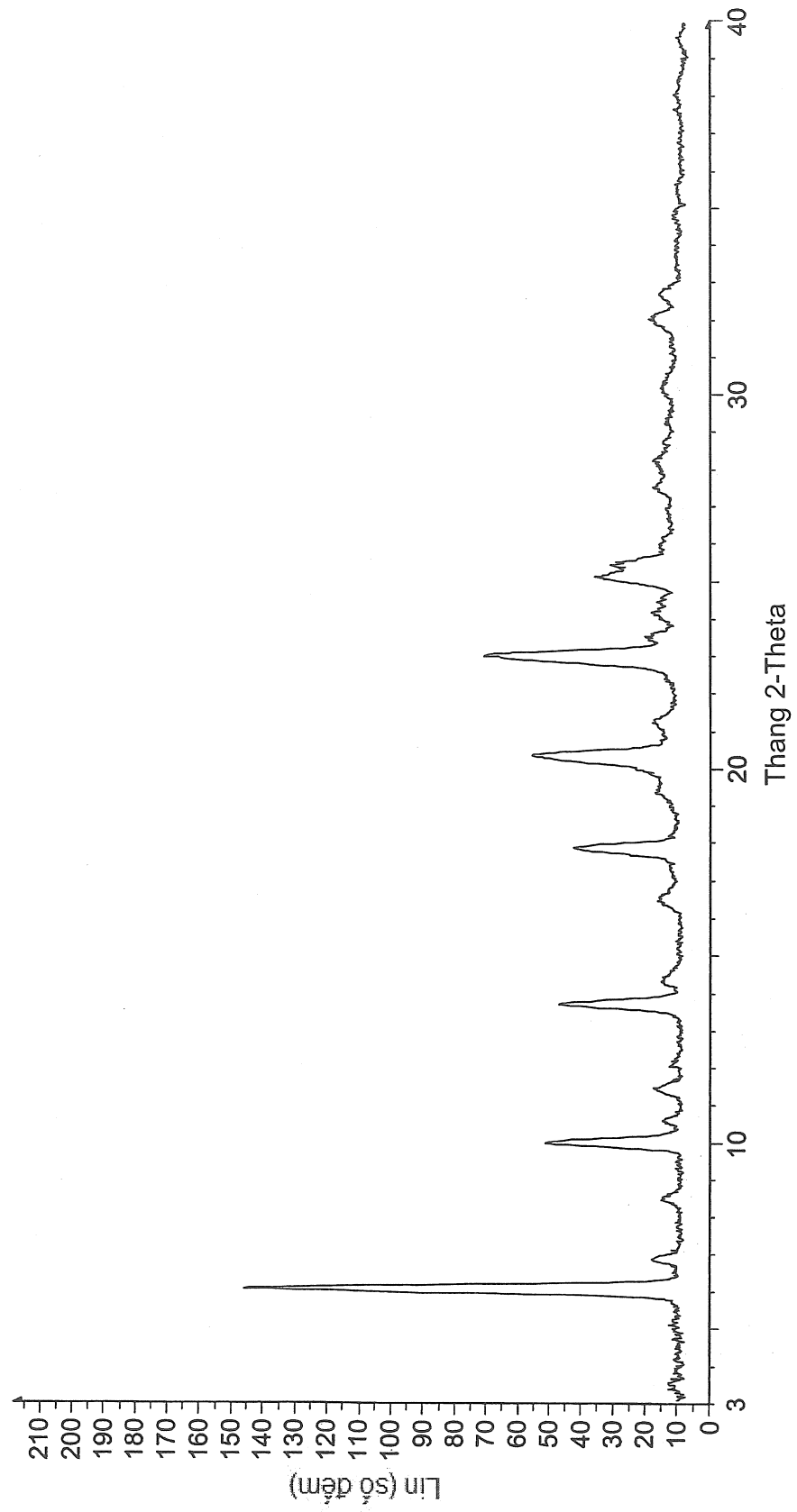
$\frac{6}{28}$

FIG 6



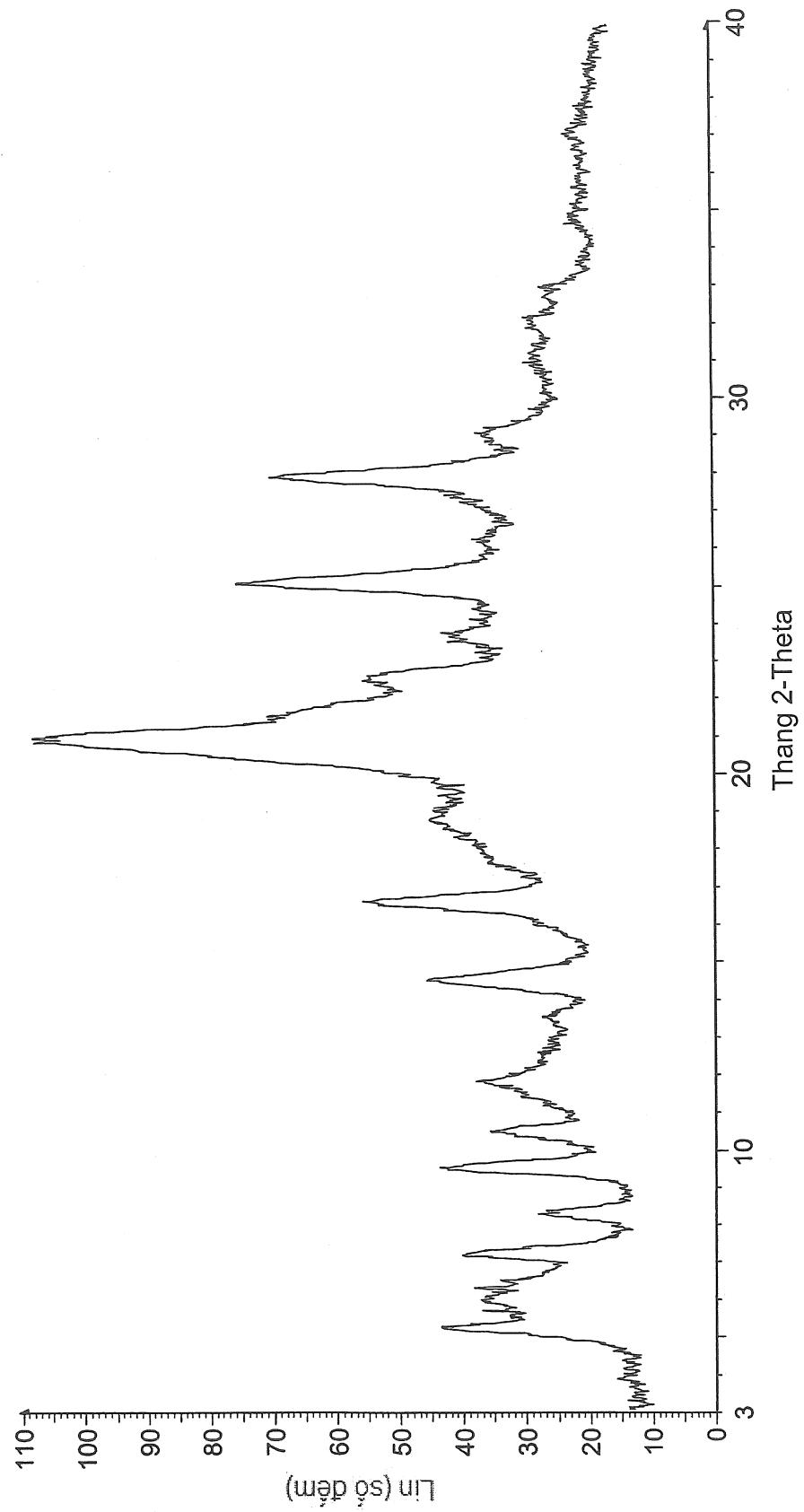
$\frac{7}{28}$

FIG 7



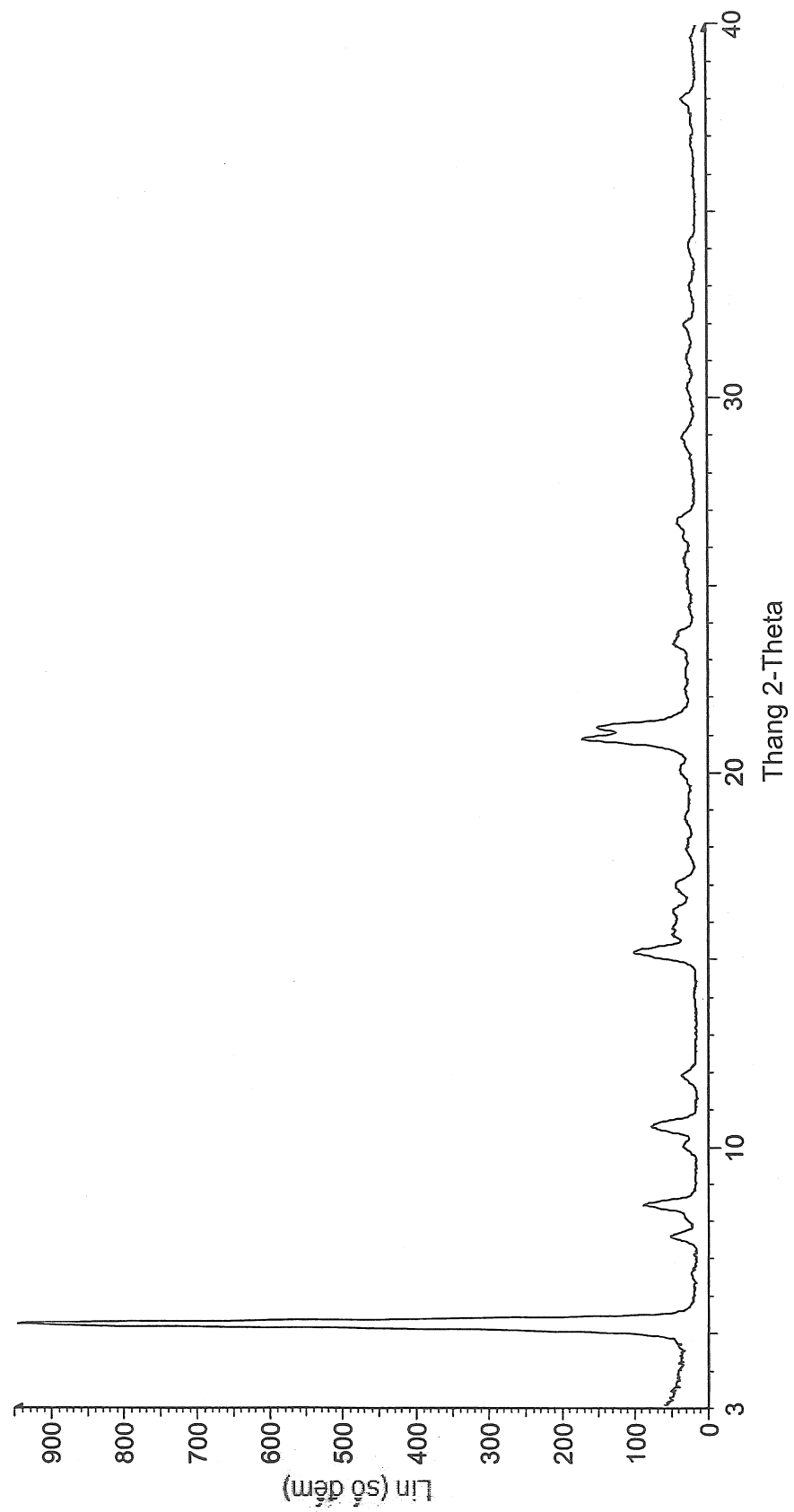
8/28

FIG 8



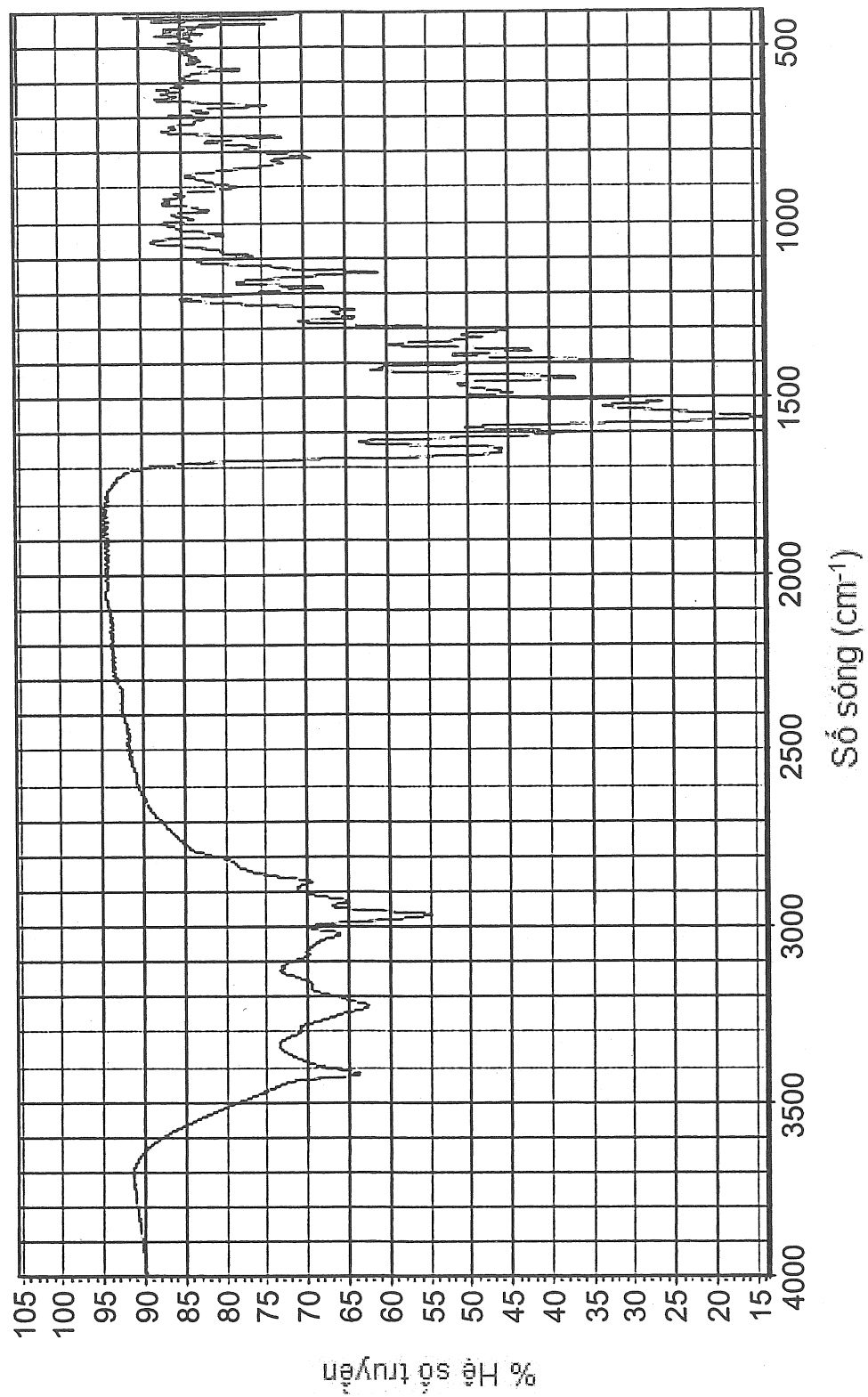
$\frac{9}{28}$

FIG 9



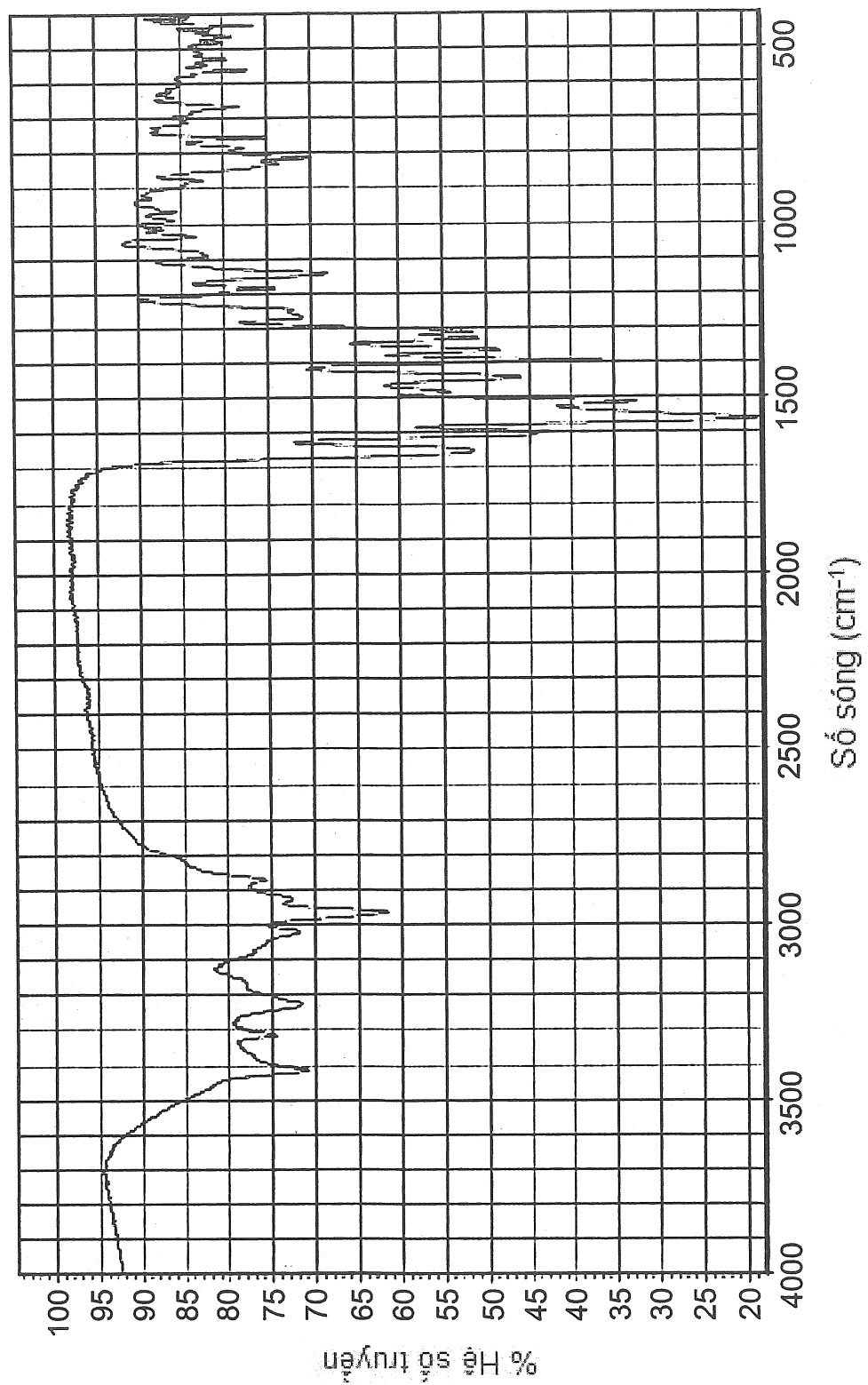
10/28

FIG10



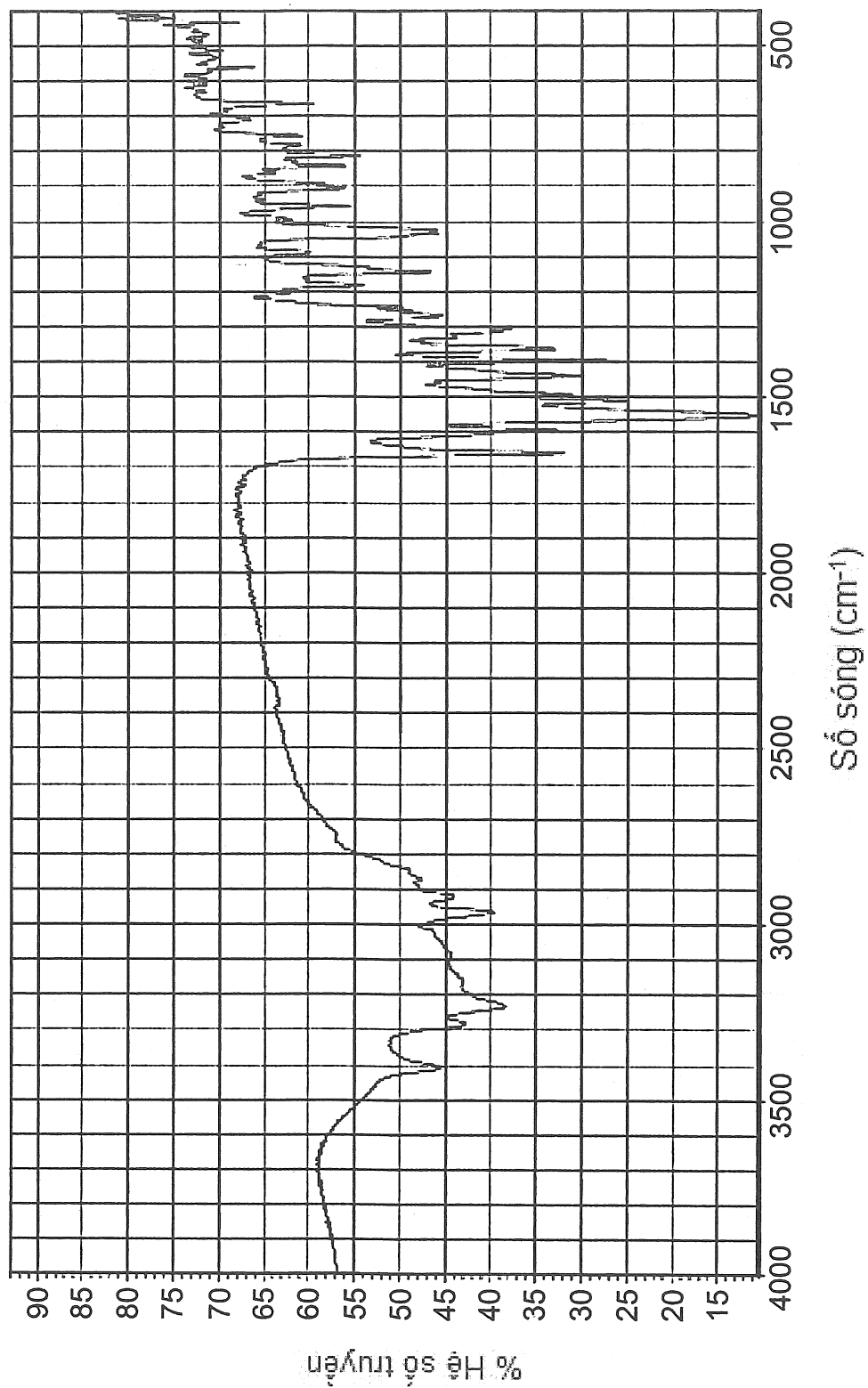
11/28

FIG11



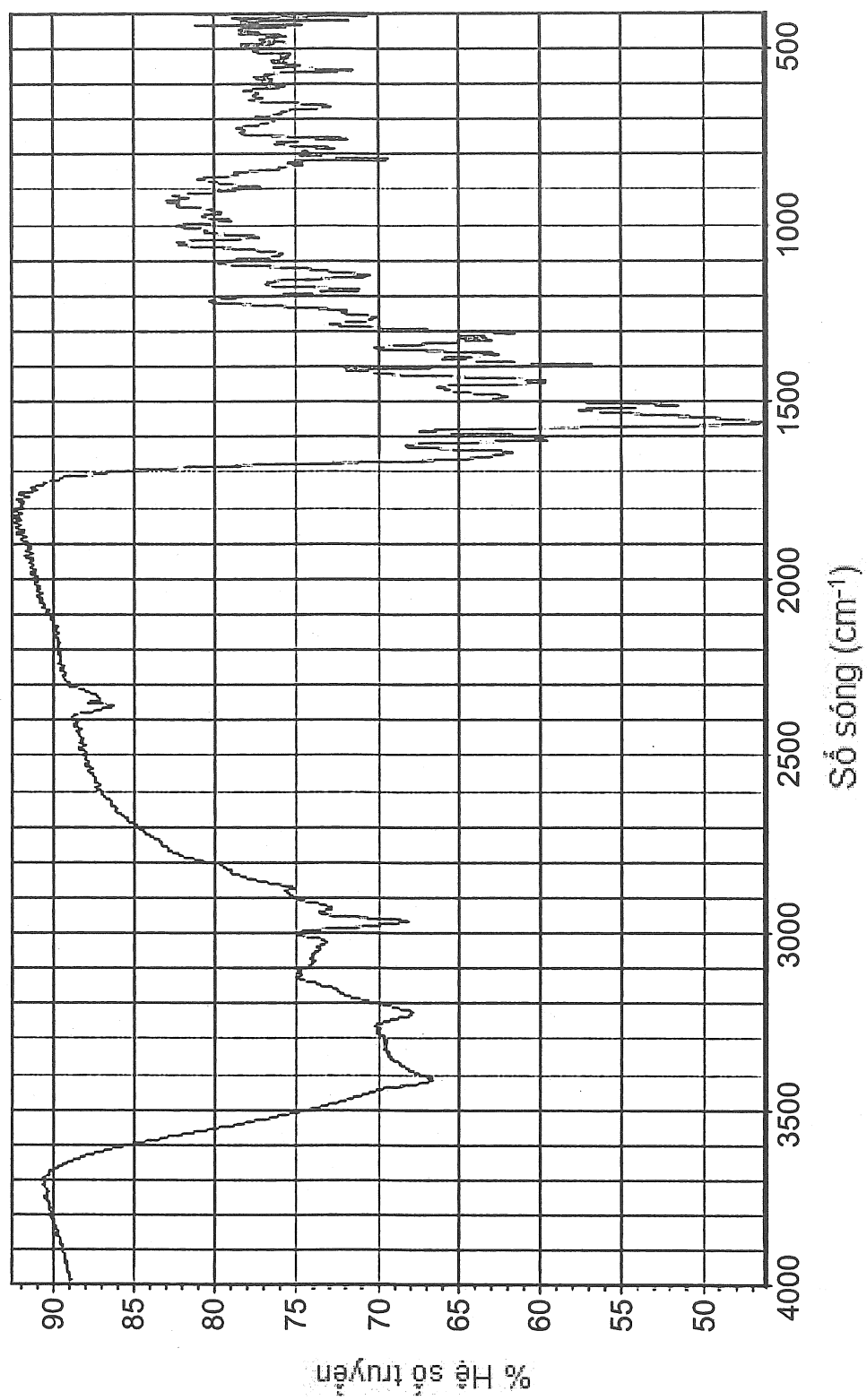
$^{12}/_{28}$

FIG 12



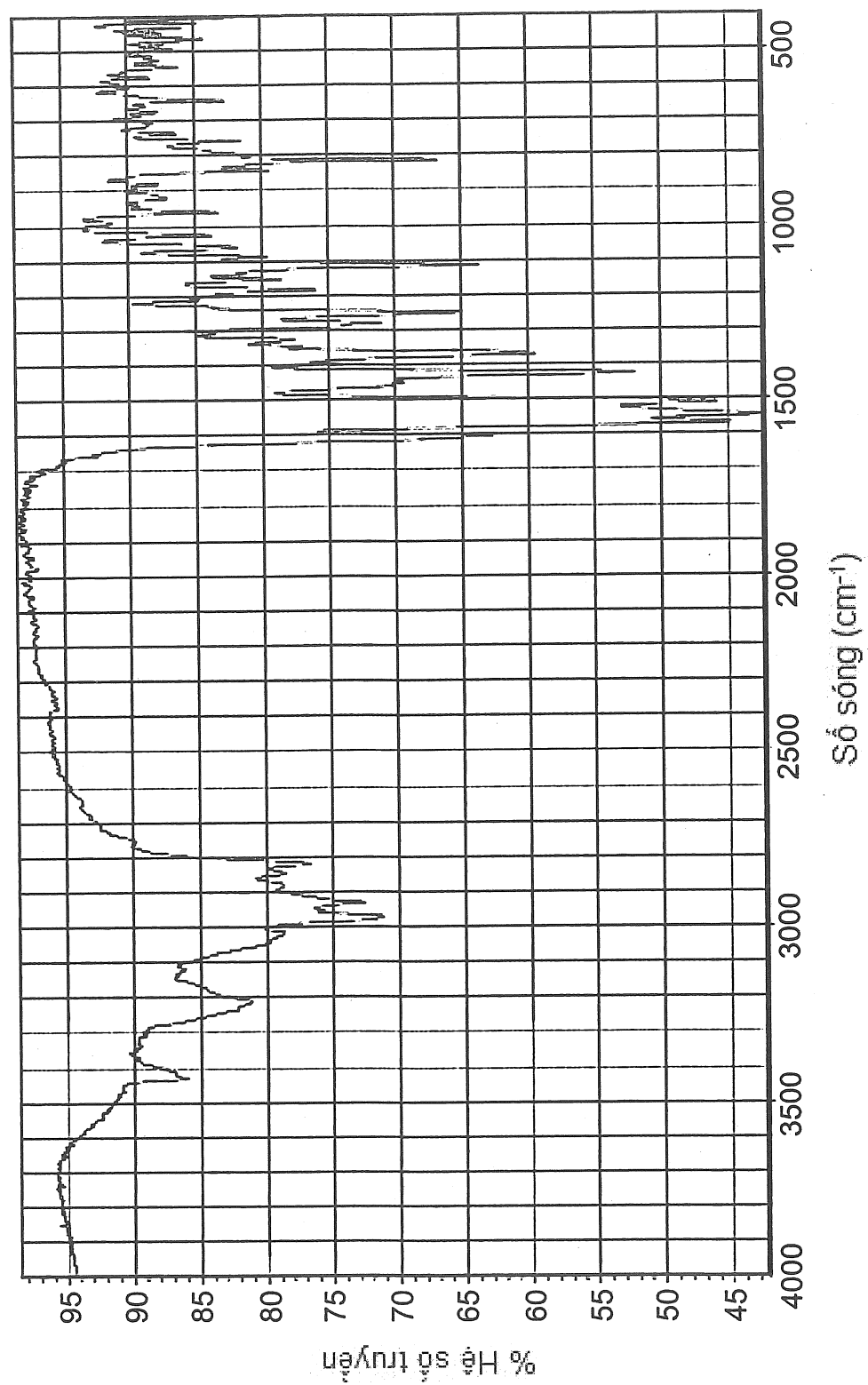
$\frac{13}{28}$

FIG13



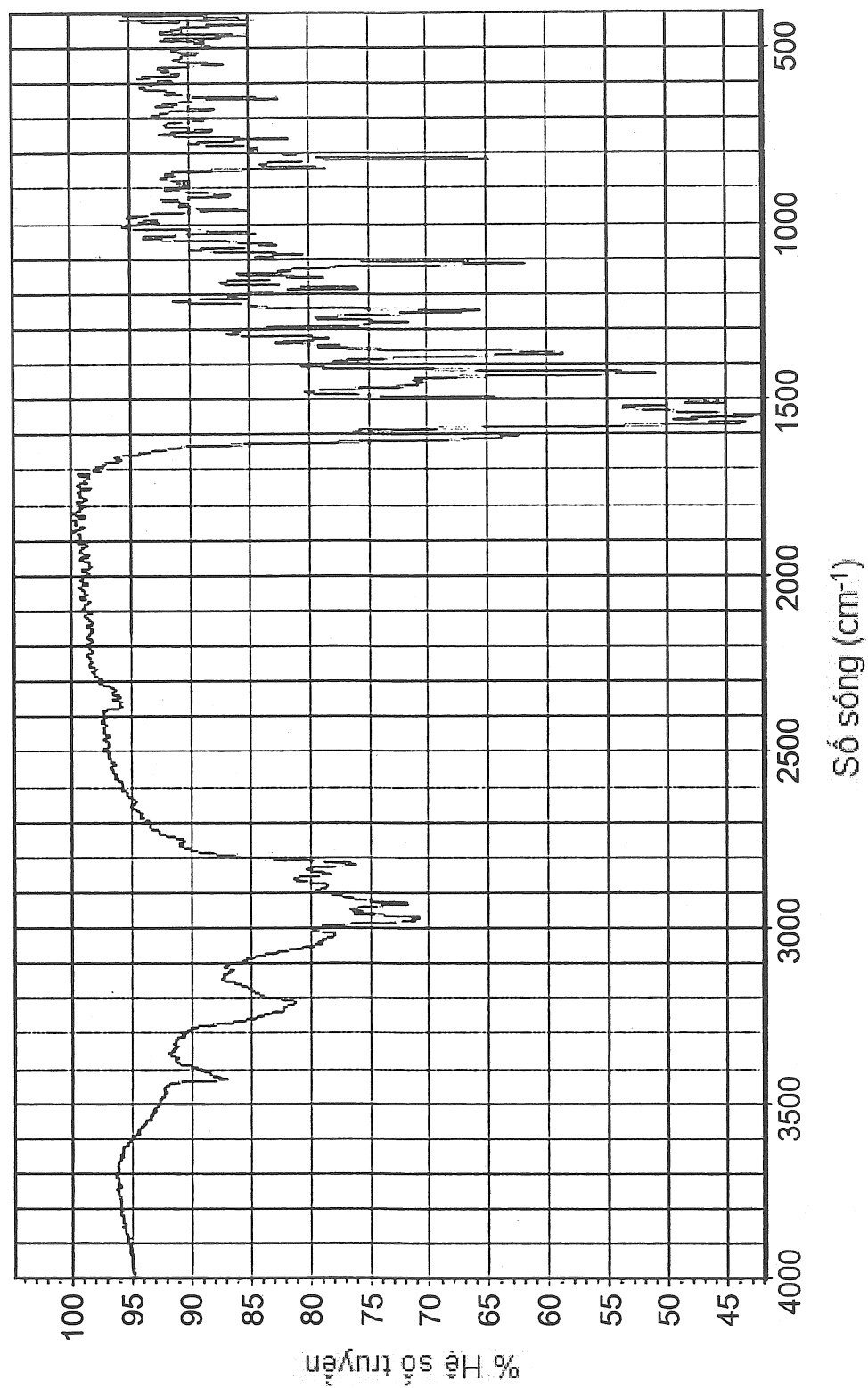
14/28

FIG 14



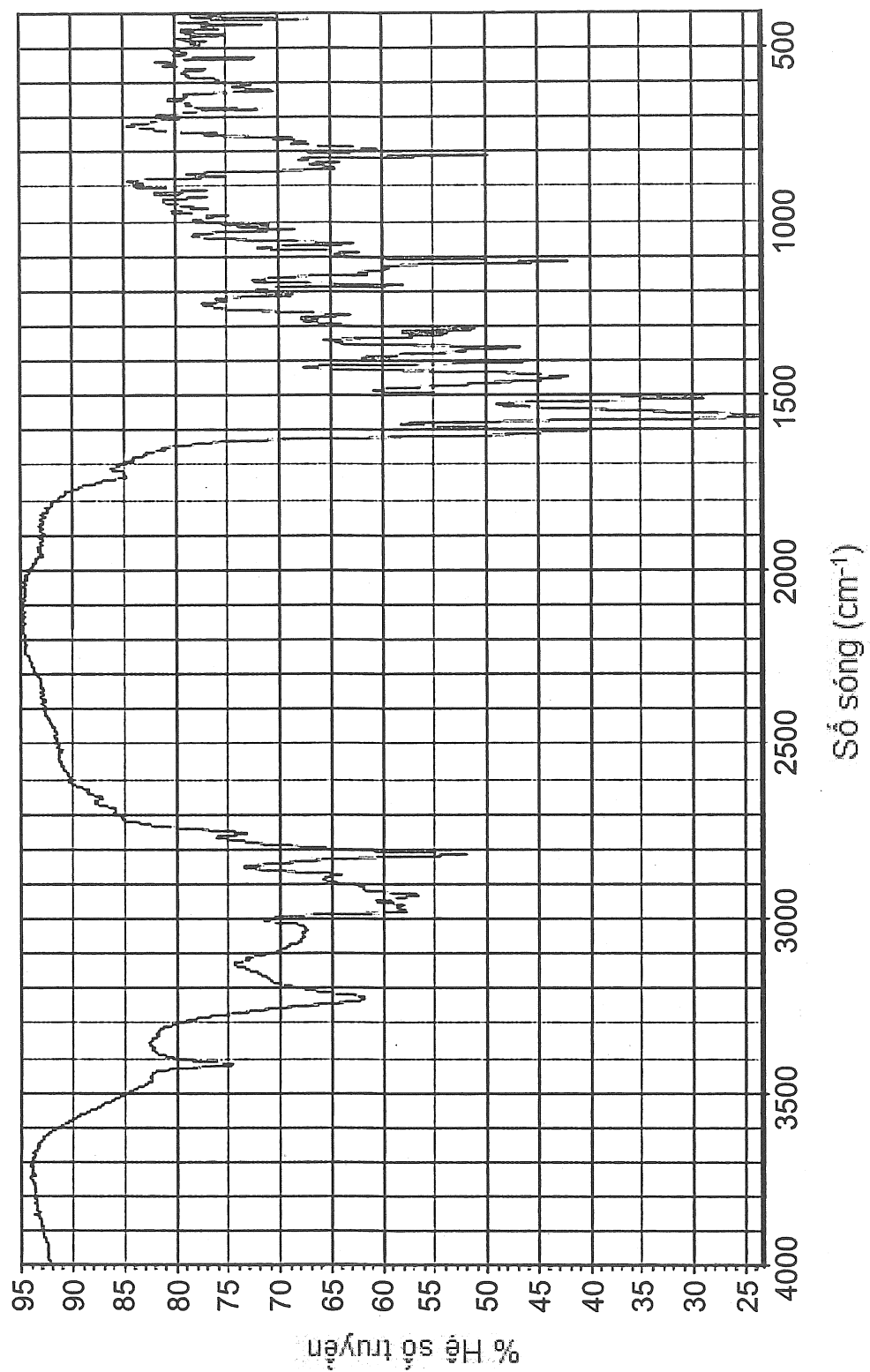
$\frac{15}{28}$

FIG 15



$\frac{16}{28}$

FIG16



17/28

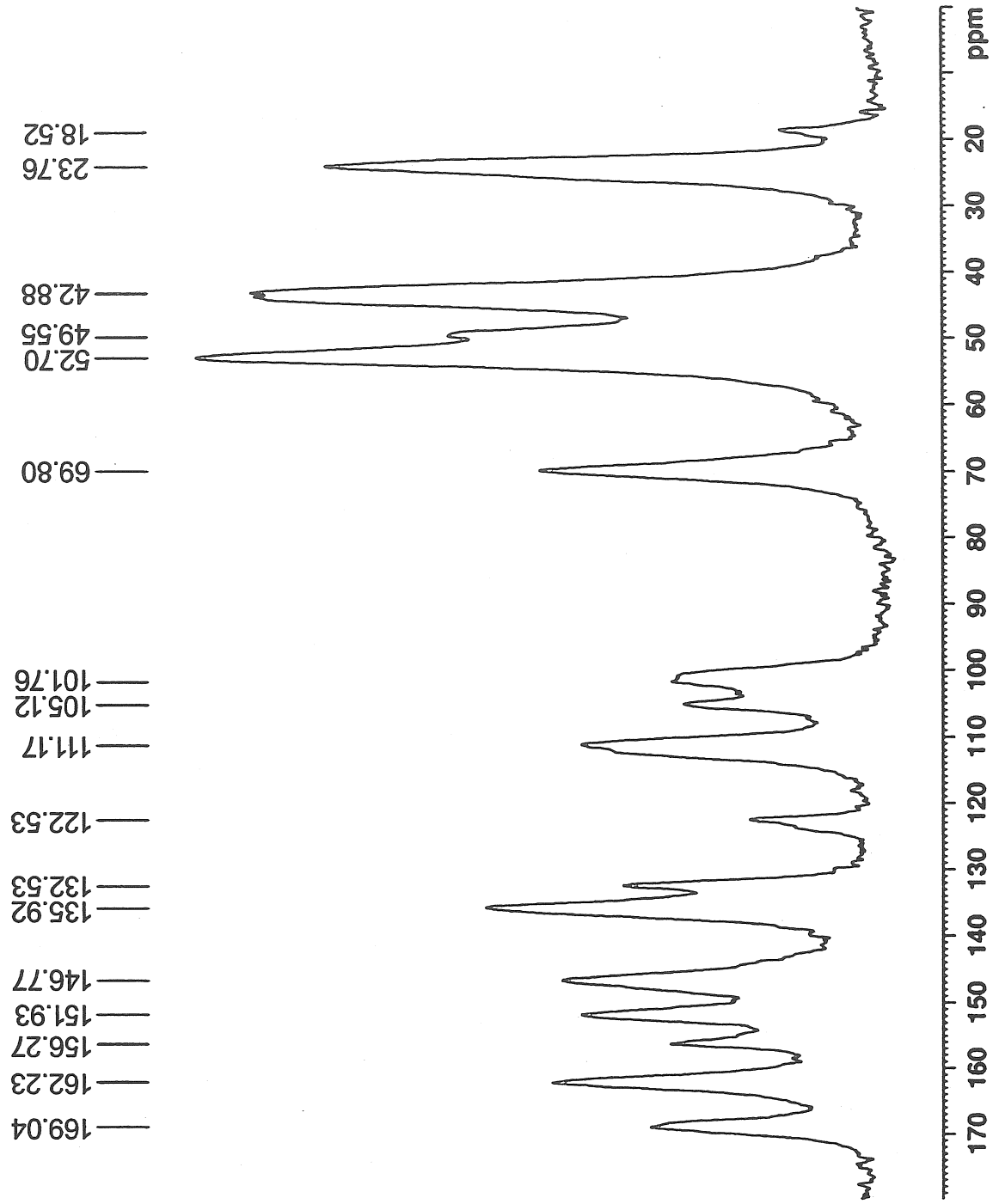


FIG 17-1

18/28

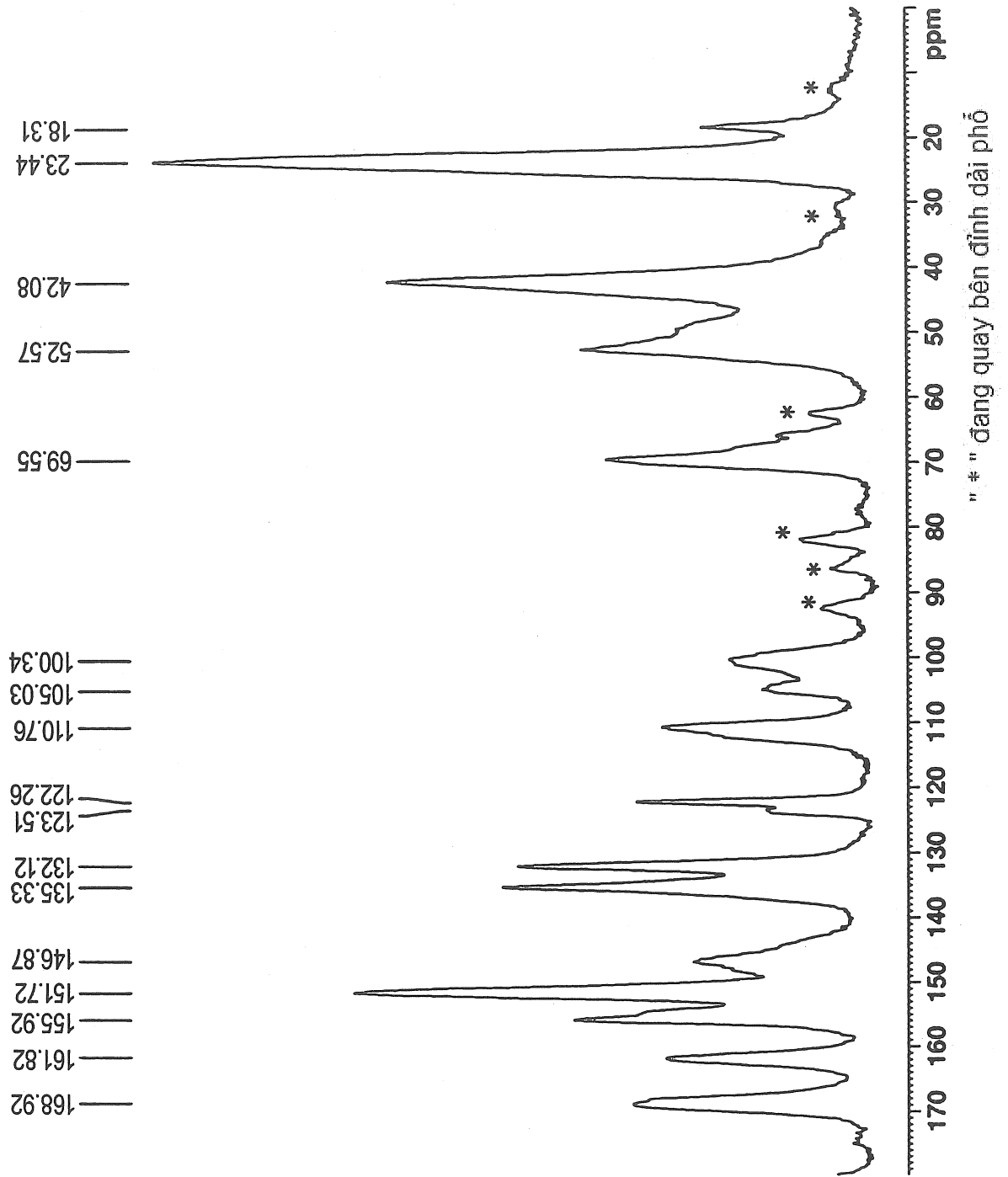


FIG 17-2

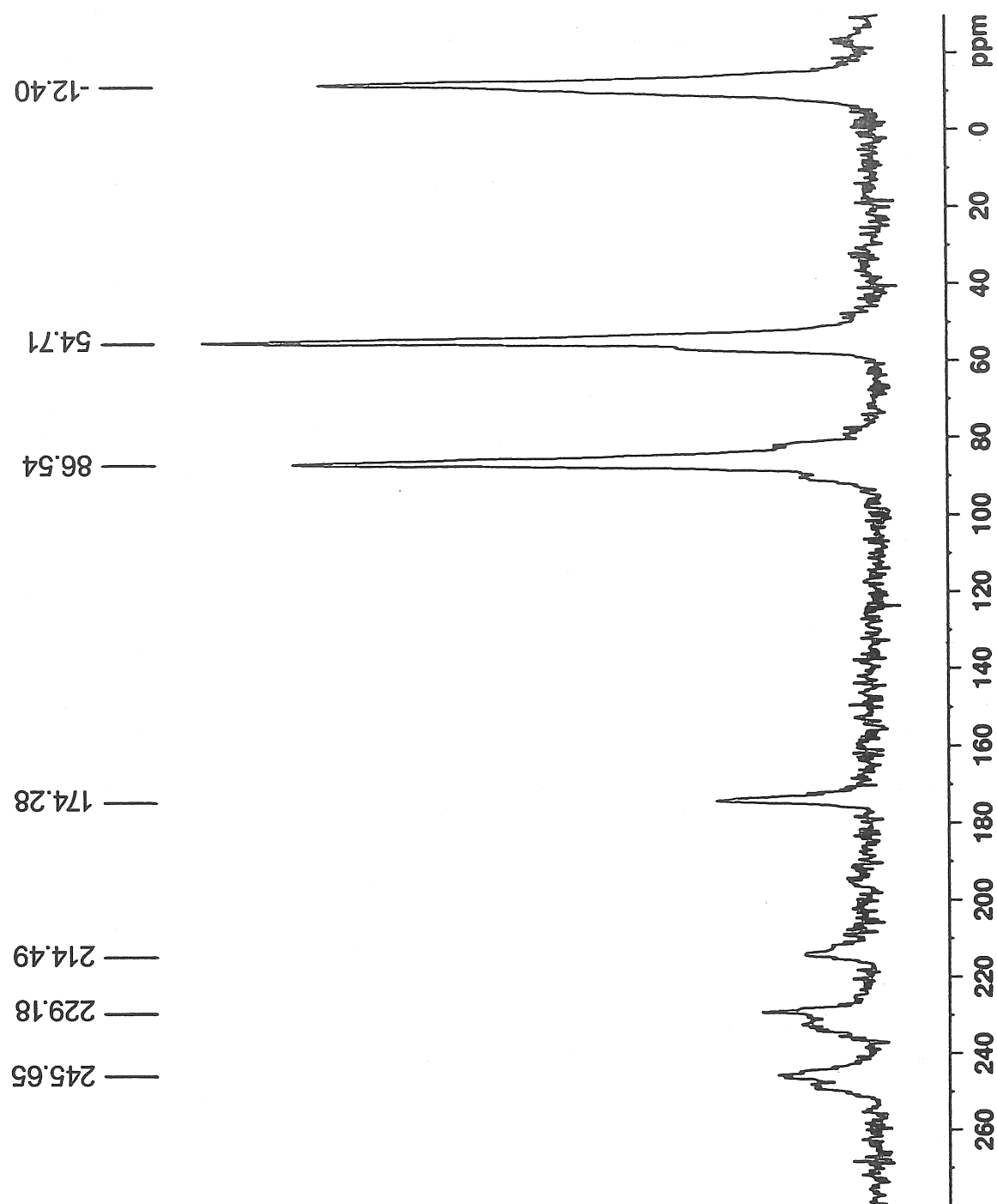
$\frac{19}{28}$ 

FIG 18

20/28

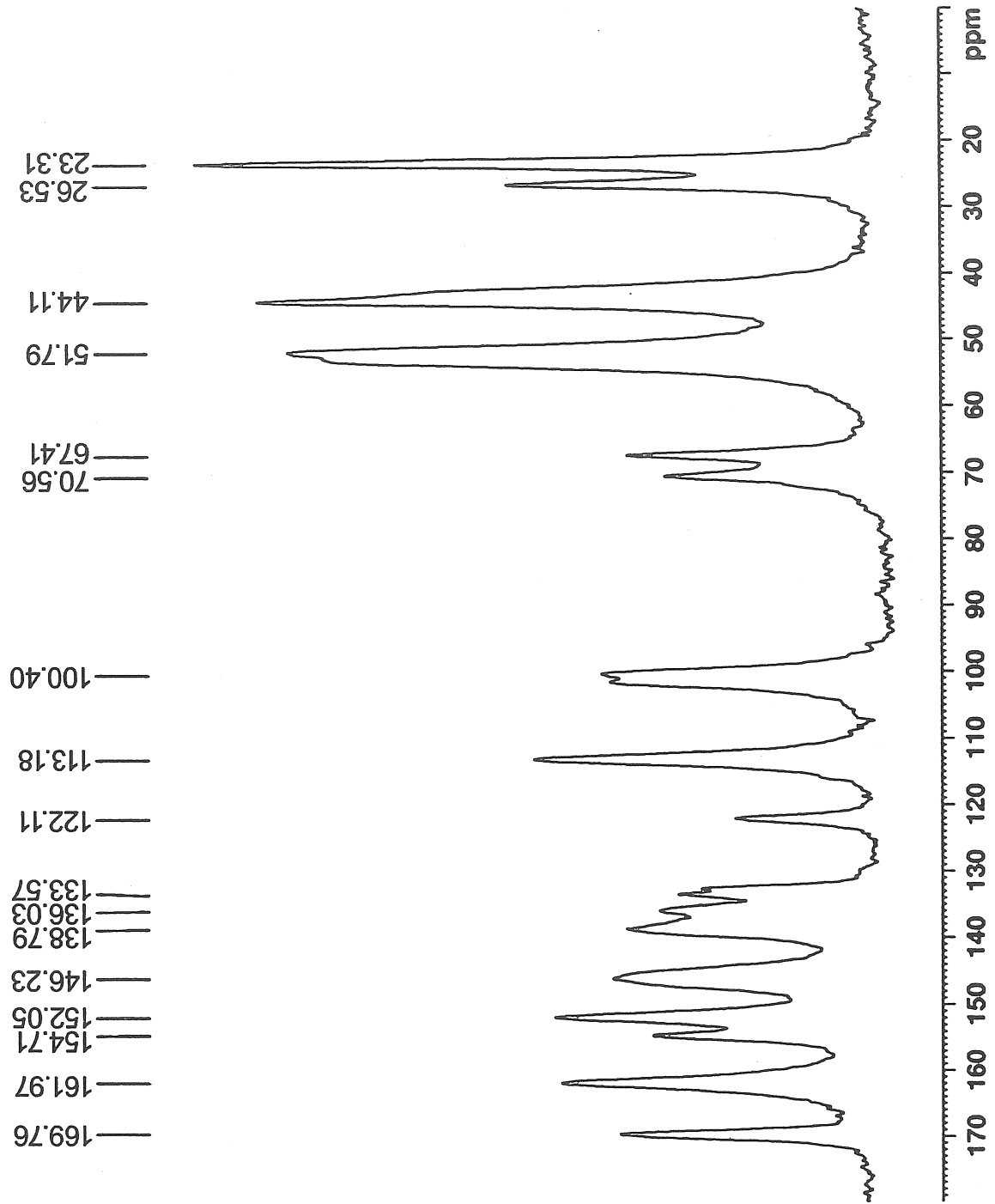


FIG19-1

21/28

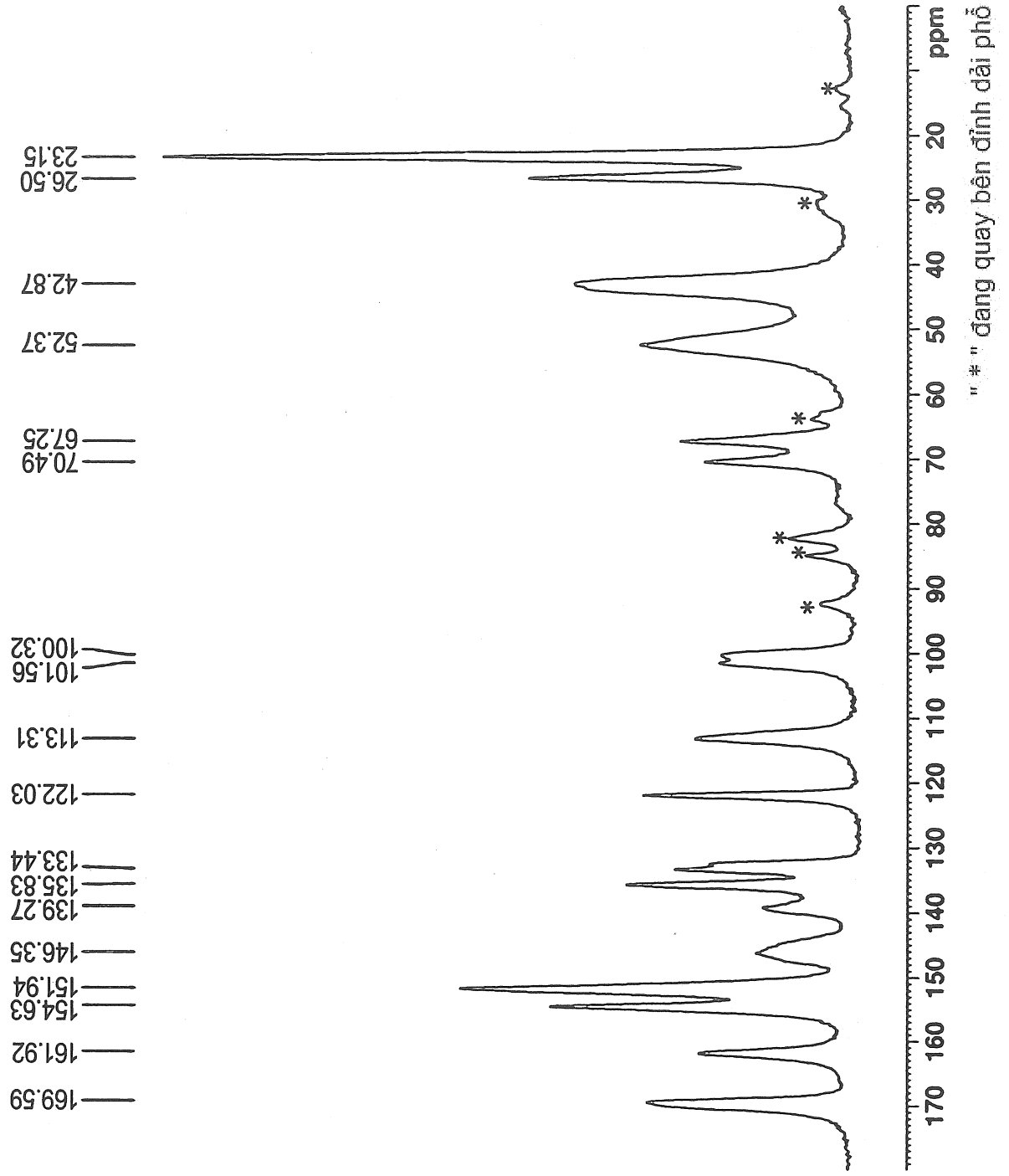


FIG 19-2

22/28

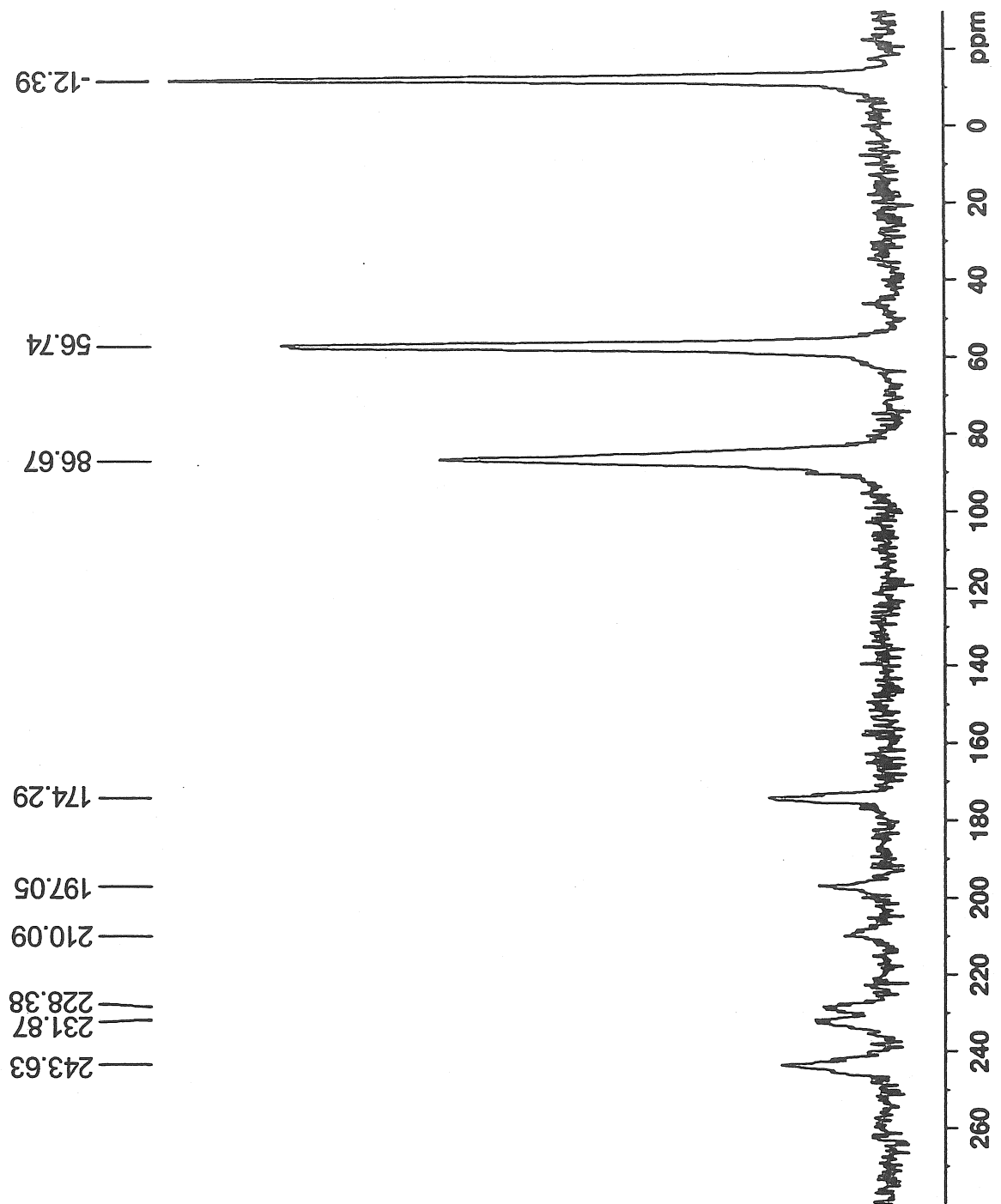


FIG 20

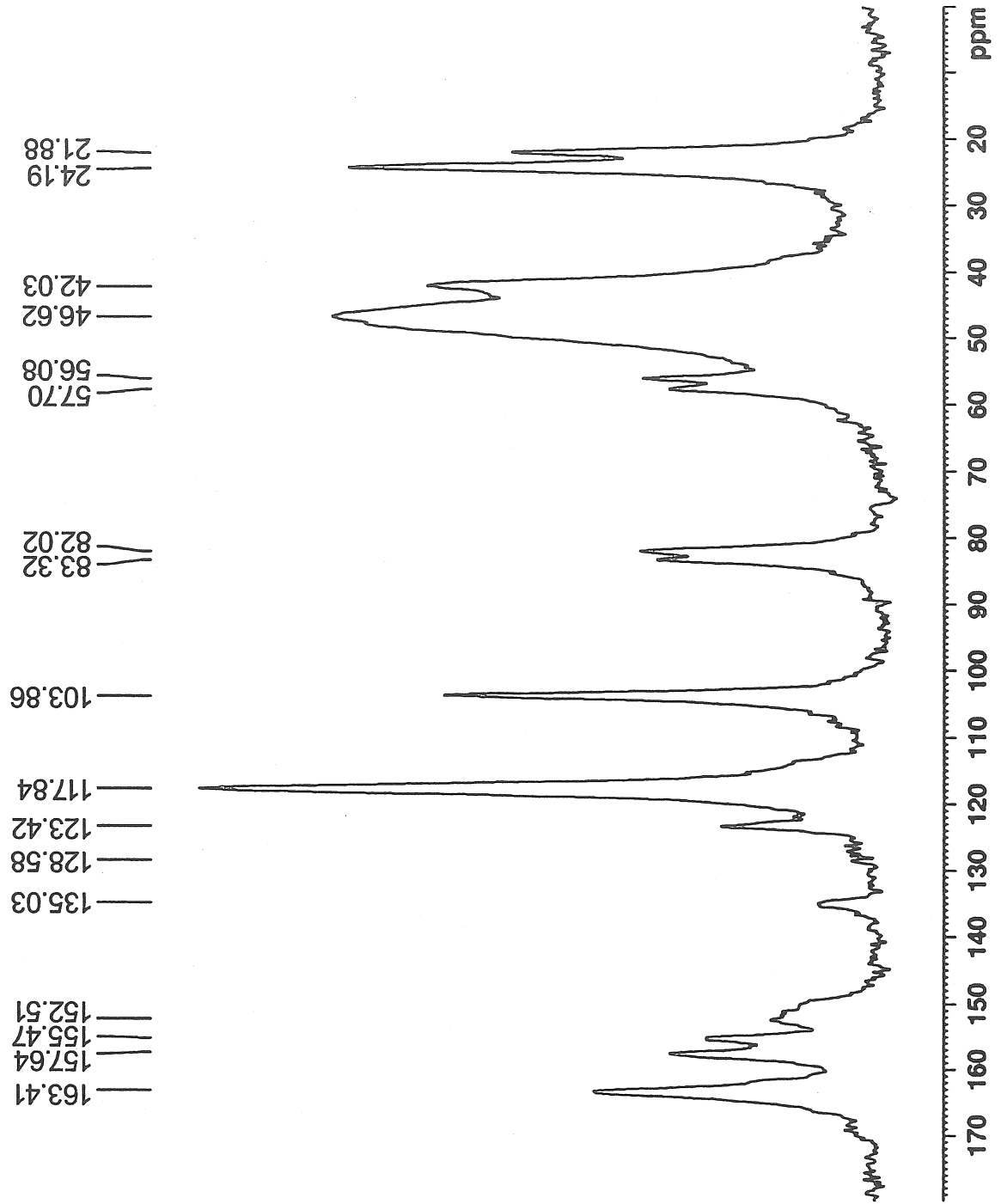
$^{23}\text{F}/^{28}$ 

FIG 21-1

24/28

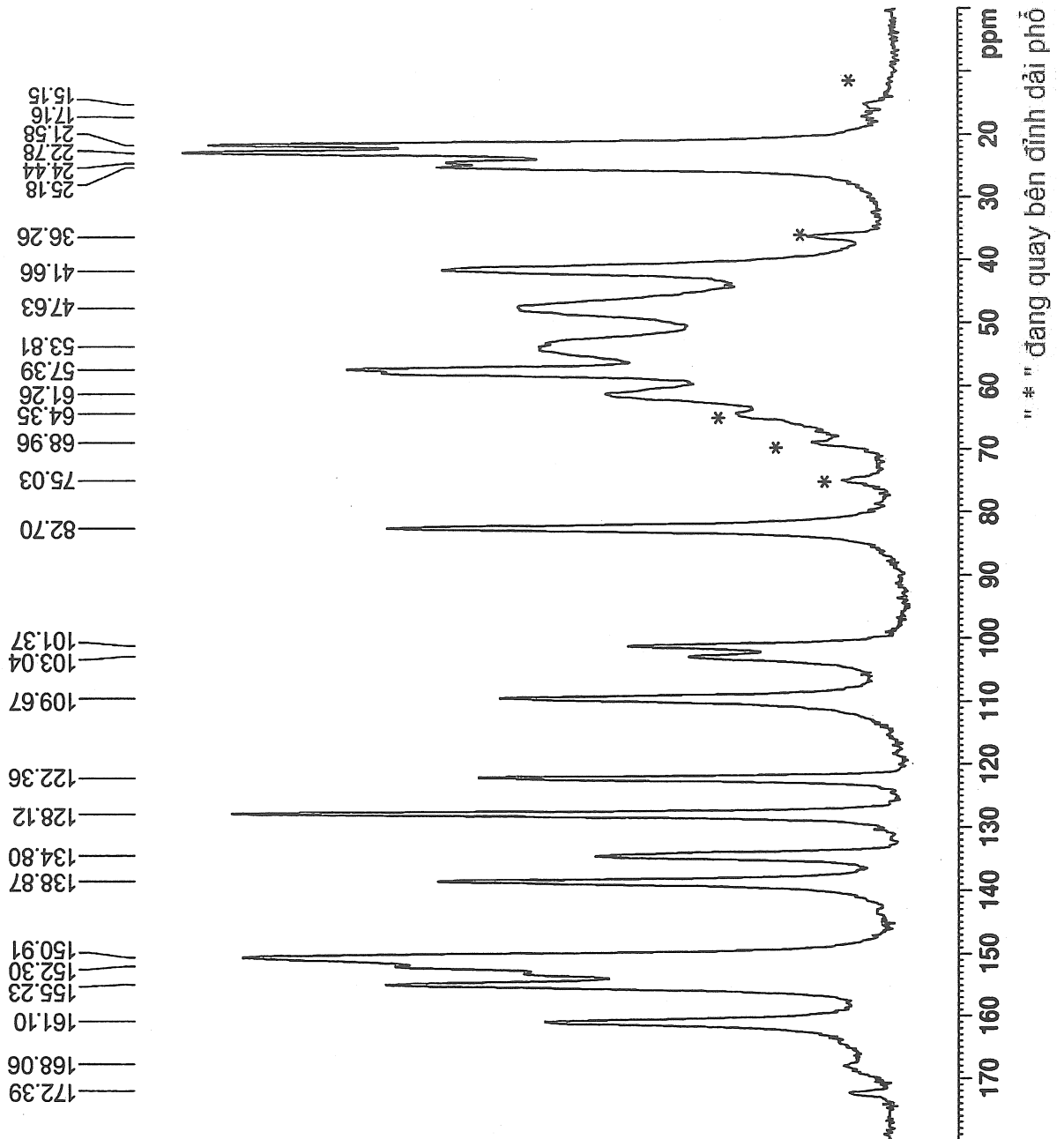


FIG21-2

25/28

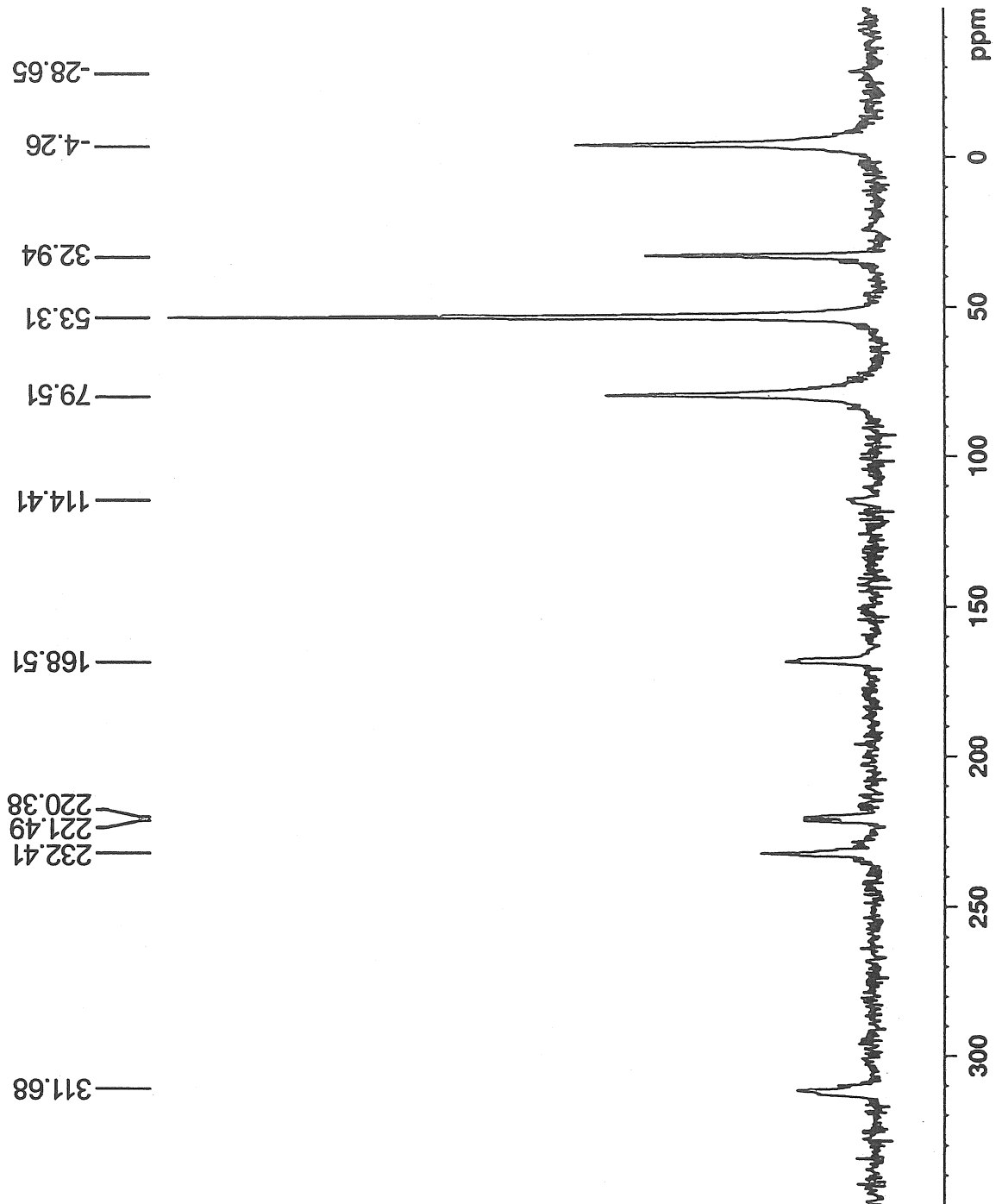


FIG 22

26/28

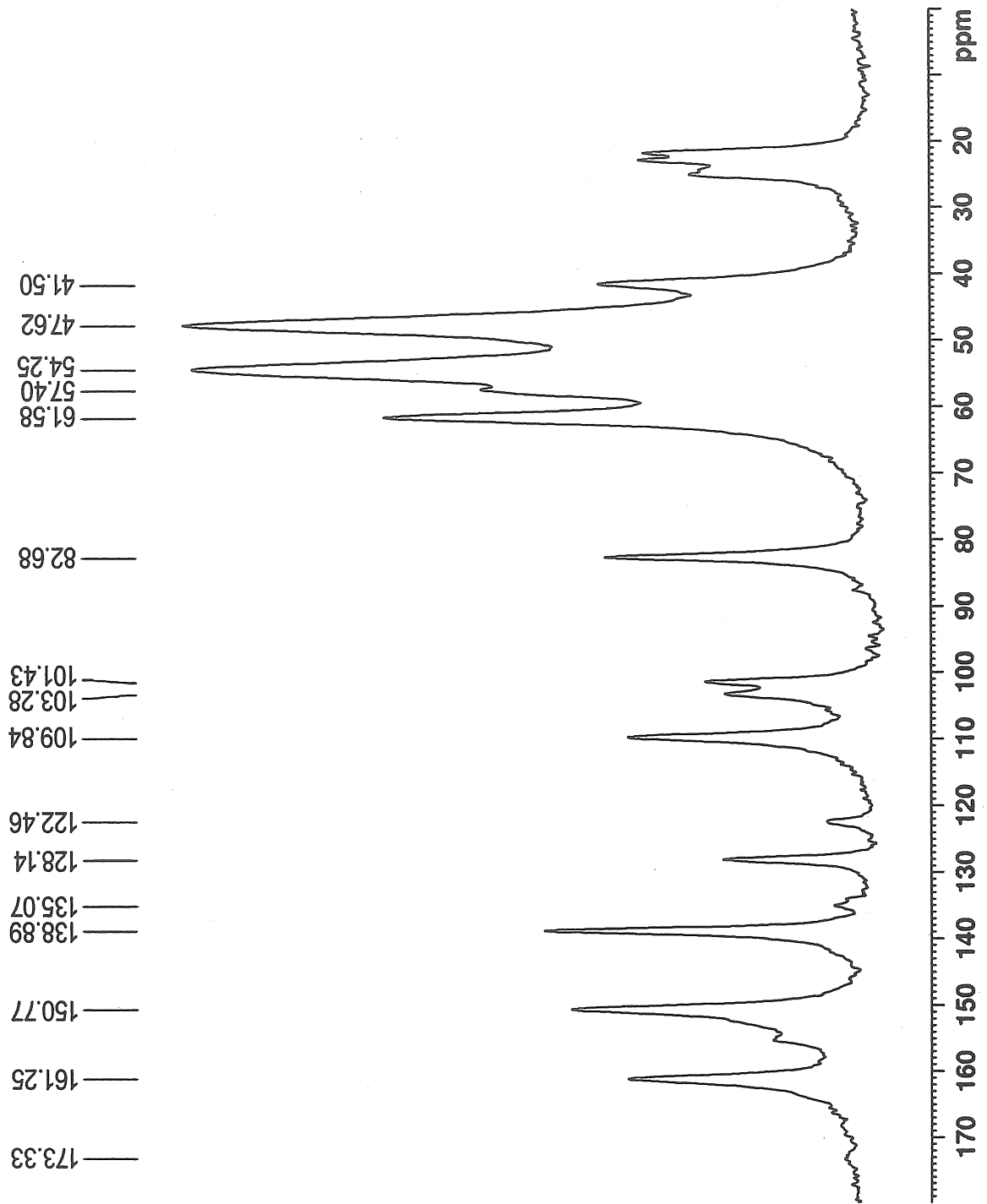


FIG23-1

27/28

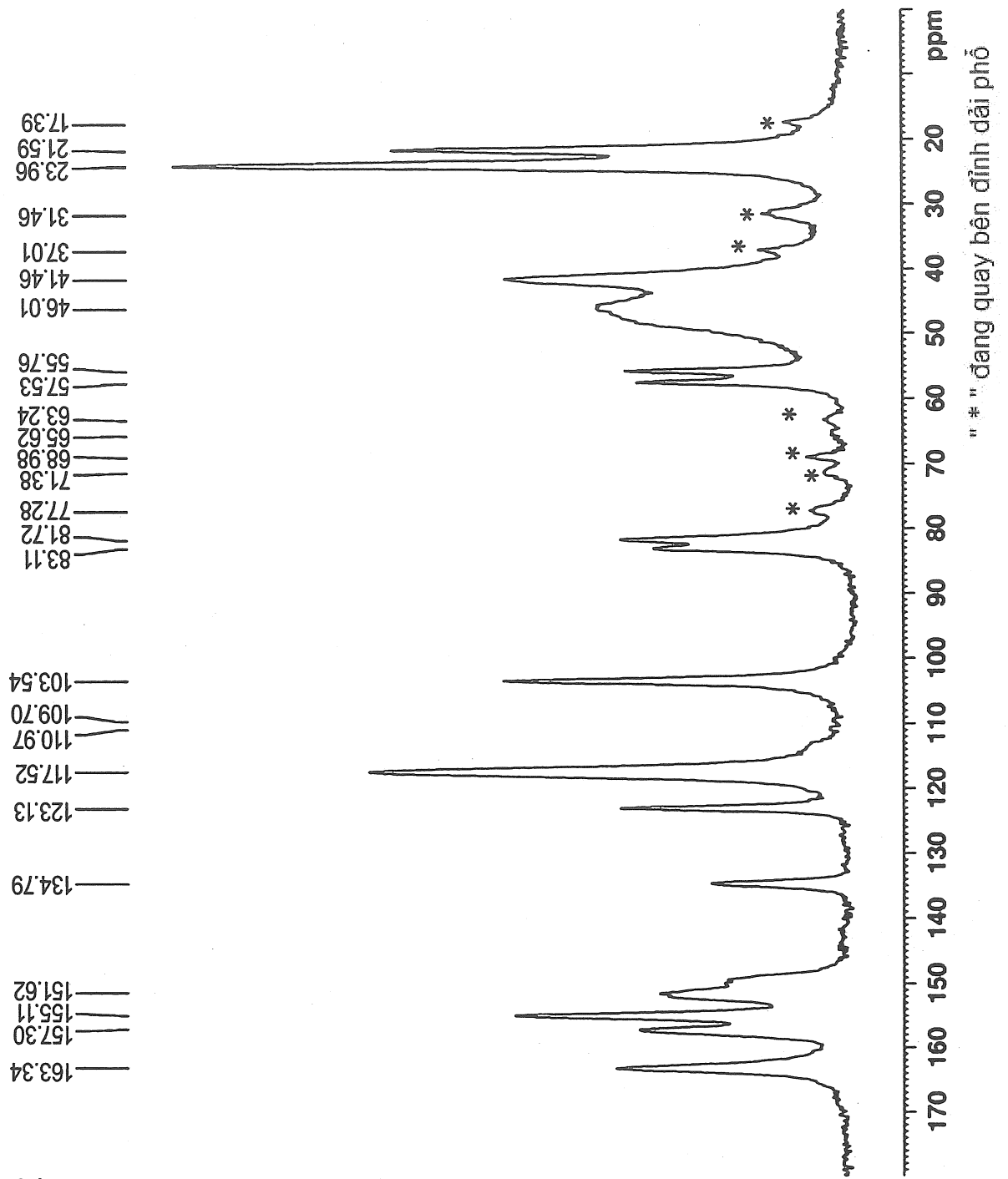


FIG 23-2

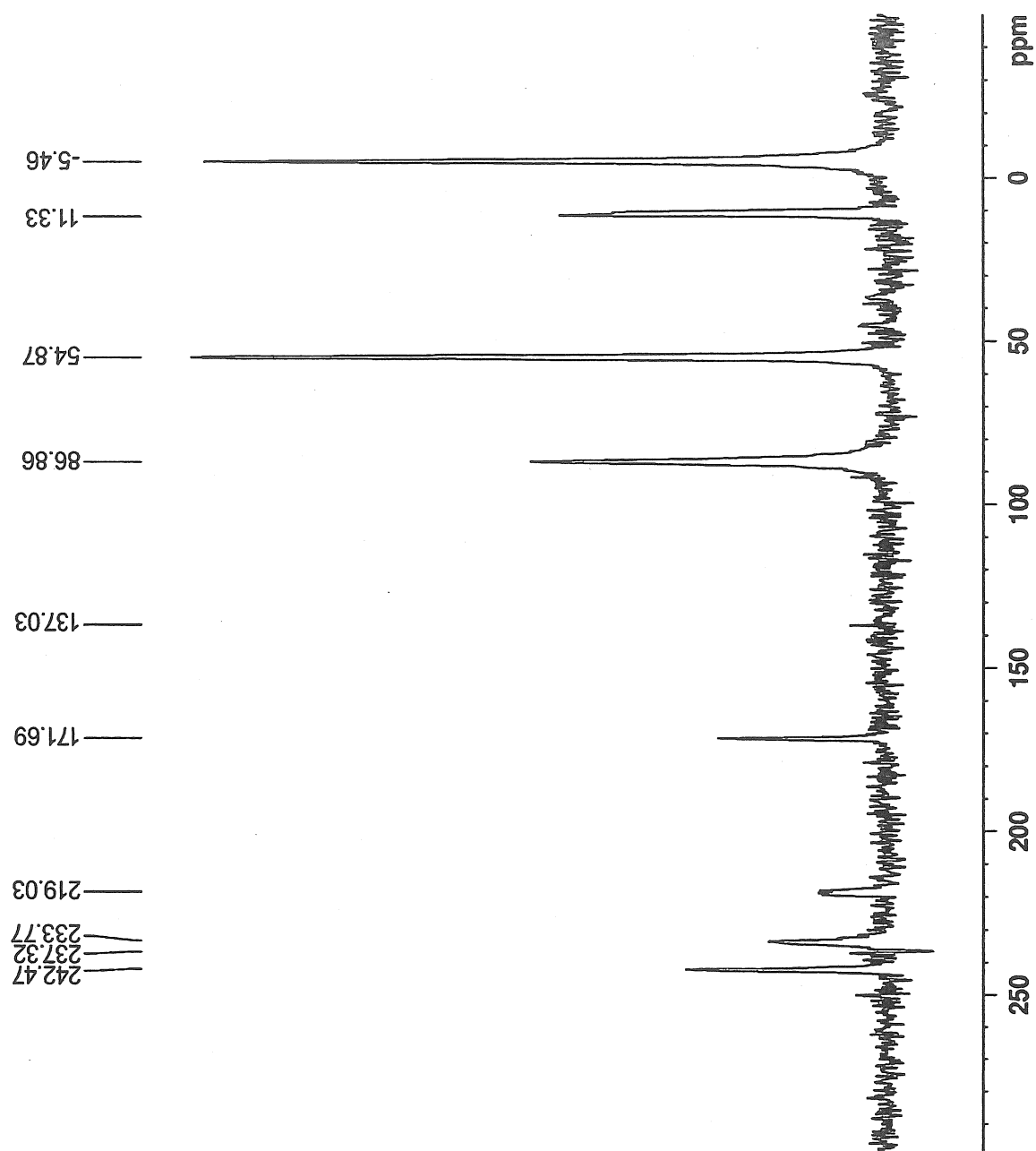
$^{28}/_{28}$ 

FIG 24