



(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)



1-0037051

(51)^{2020.01} C07D 487/04; A61K 31/519; A61P
35/00

(13) B

(21) 1-2020-03207

(22) 09/11/2018

(86) PCT/US2018/060025 09/11/2018

(87) WO2019/099298 23/05/2019

(30) 17382778.3 16/11/2017 EP; 18382034.9 23/01/2018 EP; 18382546.2 20/07/2018 EP

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/08/2020 389ASC

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

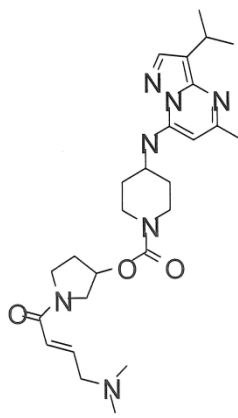
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) COATES, David Andrew (US); MONTERO, Carlos (ES); PATEL, Bharvin Kumar Rameschandra (US); REMICK, David Michael (US); YADAV, Vipin (IN).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT HỮU ÍCH ĐỀ ỨNG CHẾ CDK7 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề xuất các chất ức chế kinaza phụ thuộc cyclin 7 (cyclin-dependent kinase 7 - CDK7):



hoặc muối dược dụng của nó và dược phẩm chứa chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất hữu ích để ức chế kinaza phụ thuộc xyclin 7 (cyclin-dependent kinase 7 - CDK7) và được phẩm chứa chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kinaza phụ thuộc xyclin (CDK) là loại kinaza chủ yếu và quan trọng trong quá trình tăng sinh tế bào ung thư và phiên mã sinh ung thư phi điều tiết. CDK7 liên kết với xyclin H và MATI để tạo thành kinaza hoạt hóa xyclin trime (CAK) thực hiện chức năng của nó bằng cách phosphoryl hóa các CDK khác tham gia vào điều khiển chu trình tế bào. Các phức hợp này điều khiển sự chuyển tiếp đặc hiệu giữa hai pha tiếp theo trong chu trình tế bào. CDK7 liên quan đến cả việc điều khiển chu trình tế bào theo thời gian và hoạt tính phiên mã. CDK7 liên quan đến quá trình khởi đầu phiên mã bởi sự phosphoryl hóa dưới đơn vị Rbp1 của ARN Polymeraza II (RNAPII). Sự tăng sinh tế bào không kiểm soát được và sự phiên mã phi điều tiết là dấu hiệu xác nhận bệnh ung thư. Việc hướng đích CDK7 một cách chọn lọc có thể có lợi thế bởi việc ức chế đồng thời sự phiên mã tích cực và sự phát triển chu trình tế bào. Vì vậy, CDK7 là đích hứa hẹn để điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư xâm lấn và khó điều trị.

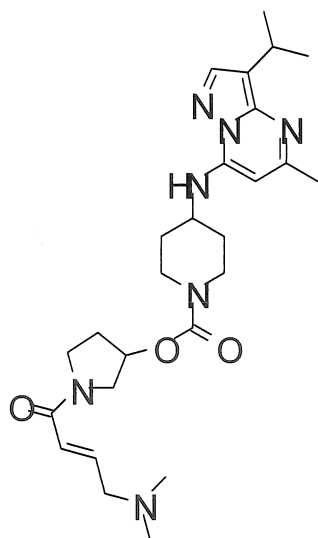
Chất ức chế phân tử nhỏ đối với CDK7 đã được báo cáo trong tài liệu (*xem, chẳng hạn*, WO 2015/154022, WO 2016/142855, WO 2016/160617, WO 2016/193939, và WO 2017/044858). Vẫn cần có các chất ức chế CDK7 có thể được sử dụng trong điều trị các rối loạn tăng sinh tế bào, như bệnh ung thư. Ngoài ra, cần có các chất ức chế CDK7 mà chọn lọc đối với CDK7 so với các CDK khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các hợp chất mới là các chất ức chế CDK7 chọn lọc. Các hợp chất mới như vậy có thể đáp ứng nhu cầu đối với việc điều trị tiềm năng và hữu hiệu bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư với sự phiên mã phi điều tiết. Sáng chế cũng có thể đáp ứng nhu cầu đối với việc điều trị hữu hiệu và tiềm năng bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh

ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung thư da, và/hoặc u thần kinh đệm.

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức:



hoặc muối được dụng của nó. Đặc biệt được ưu tiên là muối besylat. Muối hemi-edisylat hydrat cũng được ưu tiên.

Bản mô tả bộc lộ phương pháp điều trị bệnh ung thư, cụ thể là để điều trị bệnh ung thư với sự phiên mã phi điều tiết. Tốt hơn là, bệnh ung thư là bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung thư da, hoặc u thần kinh đệm. Tốt hơn nữa là, bệnh ung thư là bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư dạ dày. Tốt nhất là, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú.

Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực

tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung thư da, hoặc u thần kinh đệm ở bệnh nhân, bao gồm bước nghiên cứu sự có mặt của ít nhất một sự mất đột biến chức năng ở các gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* và/ *RB1* trong mẫu sinh học từ bệnh nhân và sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của hợp chất hoặc muối theo sáng chế, cụ thể là [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hoặc muối được dùng của nó cho bệnh nhân nếu mẫu này thử nghiệm dương tính đối với ít nhất một sự mất đột biến chức năng ở gen bất kỳ trong số các gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* và/hoặc *RB1*. Tốt hơn là, muối này là muối besylat hoặc muối hemi-edisylat hydrat. Tốt hơn nữa là, bệnh ung thư là bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư dạ dày. Tốt nhất là, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú. Tốt hơn là, mẫu sinh học là mẫu khối u và mẫu này được phân tích bằng phân tích trình tự bộ gen/ADN. Tốt hơn là, mẫu này thu được từ bệnh nhân trước khi dùng lần đầu hợp chất hoặc muối của nó, tốt hơn là [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hoặc muối được dùng của nó, cho bệnh nhân. Tốt hơn là, muối này là muối besylat hoặc muối hemi-edisylat hydrat. Tốt hơn là, gen này là gen *ARID1A*. Tốt hơn là, gen này là gen *KMT2C*. Tốt hơn là, gen này là gen *KMT2D*. Tốt hơn là, gen này là gen *RB1*.

Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung thư da, hoặc u thần kinh đệm ở bệnh nhân, bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của hợp chất hoặc muối theo sáng chế, cụ thể là [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hoặc muối được dùng của nó cho bệnh nhân với điều kiện là mẫu sinh học từ bệnh nhân bao gồm ít

nhất một sự mất đột biến chức năng ở các gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* và/hoặc *RBI*. Tốt hơn là, muối này là muối besylat hoặc muối hemi-edisylat hydrat. Tốt hơn nữa là, bệnh ung thư là bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư dạ dày. Tốt nhất là, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú. Tốt hơn là, mẫu sinh học là mẫu khối u và mẫu này được phân tích bằng phân tích trình tự bộ gen/ADN. Tốt hơn là, mẫu này thu được từ bệnh nhân trước khi dùng lần đầu hợp chất hoặc muối của nó, tốt hơn là [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hoặc muối được dùng của nó, cho bệnh nhân. Tốt hơn là, muối này là muối besylat hoặc muối hemi-edisylat hydrat. Tốt hơn là, gen này là gen *ARID1A*. Tốt hơn là, gen này là gen *KMT2C*. Tốt hơn là, gen này là gen *KMT2D*. Tốt hơn là, gen này là gen *RBI*.

Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung thư da, hoặc u thần kinh đệm ở bệnh nhân, bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của hợp chất hoặc muối theo sáng chế, cụ thể là [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hoặc muối được dùng của nó cho bệnh nhân với điều kiện là bệnh nhân được lựa chọn để điều trị nếu mẫu sinh học từ bệnh nhân được thử nghiệm dương tính đối với ít nhất một sự mất đột biến chức năng trong các gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* và/hoặc *RBI*. Tốt hơn là, muối này là muối besylat hoặc muối hemi-edisylat hydrat. Tốt hơn nữa là, bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư dạ dày. Tốt nhất là, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú. Tốt hơn là, mẫu sinh học là mẫu khối u và mẫu này được phân tích bằng phân tích trình tự bộ gen/ADN. Tốt hơn là, mẫu này thu được từ bệnh nhân trước khi dùng lần đầu hợp chất hoặc muối của nó, tốt hơn là [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-

a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hoặc muối được dụng của nó, cho bệnh nhân. Tốt hơn là, muối này là muối besylat hoặc muối hemi-edisylat hydrat. Tốt hơn là, gen này là gen *ARID1A*. Tốt hơn là, gen này là gen *KMT2C*. Tốt hơn là, gen này là gen *KMT2D*. Tốt hơn là, gen này là gen *RBI*.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, kết hợp với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng. Theo một phương án khác, được phẩm còn chứa một hoặc nhiều tác nhân điều trị khác. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm để điều trị bệnh ung thư chứa hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, kết hợp với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm để điều trị bệnh ung thư với sự phiên mã phi điều tiết chứa hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, kết hợp với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng. Theo các phương án này, bệnh ung thư là bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung thư da, hoặc u thần kinh đệm.

Theo một phương án được ưu tiên, bệnh ung thư là bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư dạ dày. Theo một phương án được ưu tiên hơn, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó, để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư cũng bao gồm bước thực hiện thử nghiệm *in vitro* bằng cách sử dụng mẫu sinh học từ bệnh nhân, xác định sự có mặt của ít nhất một sự đột biến mất hoạt tính ở các gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* và *RBI*, và sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của hợp chất hoặc muối của nó cho bệnh nhân nếu có mặt ít nhất một sự đột biến mất hoạt tính ở gen bất kỳ trong số các gen này. Theo phương án này, bệnh ung thư cần điều trị là bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật,

bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung thư da, hoặc u thần kinh đệm. Tốt hơn là, mẫu sinh học là mẫu khối u và mẫu này được phân tích bằng phân tích trình tự bộ gen/ADN. Tốt hơn là, hợp chất hoặc muối của nó được dùng cho bệnh nhân ở liều lượng từ khoảng 1 mg đến 2 g. Tốt hơn là, mẫu này thu được từ bệnh nhân trước khi dùng lần đầu tiên hợp chất hoặc muối của nó cho bệnh nhân. Tốt hơn là, bệnh nhân được lựa chọn để có sự đột biến mất hoạt tính ở gen *ARID1A*. Tốt hơn là, bệnh nhân được lựa chọn để có sự đột biến mất hoạt tính ở gen *KMT2C*. Tốt hơn là, bệnh nhân được lựa chọn để có sự đột biến mất hoạt tính ở gen *KMT2D*. Tốt hơn là, bệnh nhân được lựa chọn để có sự đột biến mất hoạt tính ở gen *RBI*.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dùng của nó, để dùng trong trị liệu, cụ thể là để điều trị bệnh ung thư với sự phiên mã phi điều tiết. Theo một phương án khác, bản mô tả bộc lộ việc sử dụng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dùng của nó, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư với sự phiên mã phi điều tiết. Theo các phương án này, bệnh ung thư là bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung thư da, hoặc u thần kinh đệm. Theo một phương án được ưu tiên, bệnh ung thư được chọn từ bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư dạ dày. Theo một phương án được ưu tiên hơn, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dùng của nó, để dùng trong trị liệu, cụ thể là để điều trị bệnh ung thư. Theo một phương án khác, bản mô tả bộc lộ việc sử dụng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dùng của nó, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư. Theo các phương án này, bệnh ung thư là bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung

thư da, hoặc u thần kinh đệm. Theo một phương án được ưu tiên, bệnh ung thư là bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư dạ dày. Theo một phương án được ưu tiên hơn, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư biểu mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung thư da, hoặc u thần kinh đệm, còn bao gồm bước thực hiện thử nghiệm *in vitro* bằng cách sử dụng mẫu sinh học từ bệnh nhân, xác định sự có mặt của ít nhất một sự đột biến mất hoạt tính ở các gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* và *RBI*, và sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của hợp chất hoặc muối của nó cho bệnh nhân nếu có mặt ít nhất một sự đột biến mất hoạt tính ở gen bất kỳ trong số các gen này. Tốt hơn là, mẫu sinh học là mẫu khối u và mẫu này được phân tích bằng phân tích trình tự bộ gen/ADN. Tốt hơn là hợp chất hoặc muối của nó được dùng cho bệnh nhân ở liều lượng từ khoảng 1 mg đến 2 g. Tốt hơn là, mẫu này thu được từ bệnh nhân trước khi dùng lần đầu tiên hợp chất hoặc muối của nó cho bệnh nhân. Tốt hơn là, bệnh nhân được lựa chọn để có ít nhất một sự đột biến mất hoạt tính ở gen *ARID1A*. Tốt hơn là, bệnh nhân được lựa chọn để có ít nhất một sự đột biến mất hoạt tính ở gen *KMT2C*. Tốt hơn là, bệnh nhân được lựa chọn để có ít nhất một sự đột biến mất hoạt tính ở gen *KMT2D*. Tốt hơn là, bệnh nhân được lựa chọn để có ít nhất một sự đột biến mất hoạt tính ở gen *RBI*.

Sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat ở dạng muối tinh thể. Sáng chế cũng đề xuất [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hemi-edisylat hydrat dạng tinh thể. Sáng chế cũng đề xuất [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hemi-edisylat hydrat ở dạng tinh thể được đặc trưng

bởi phổ nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh đặc trưng sử dụng bức xạ CuK α , ở $2\theta \pm 0,2^\circ$, xuất hiện ở $18,5^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm $21,5^\circ$, $16,7^\circ$, và $15,2^\circ$. Sáng chế cũng đề xuất [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat besylat dạng tinh thể. Sáng chế cũng đề xuất [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat besylat ở dạng tinh thể được đặc trưng bởi phổ nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh đặc trưng sử dụng bức xạ CuK α , ở $2\theta \pm 0,2^\circ$, xuất hiện ở $21,5^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm $12,4^\circ$, $17,3^\circ$, và $15,8^\circ$. Sáng chế cũng đề xuất [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hydroclorua dạng tinh thể. Sáng chế cũng đề xuất [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hydroclorua ở dạng tinh thể được đặc trưng bởi phổ nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh đặc trưng sử dụng bức xạ CuK α , ở $2\theta \pm 0,2^\circ$, xuất hiện ở $18,9^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm $5,5^\circ$, $15,5^\circ$, và $9,7^\circ$.

Sáng chế cũng bao gồm các chất trung gian và các quy trình hữu dụng để tổng hợp hợp chất theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

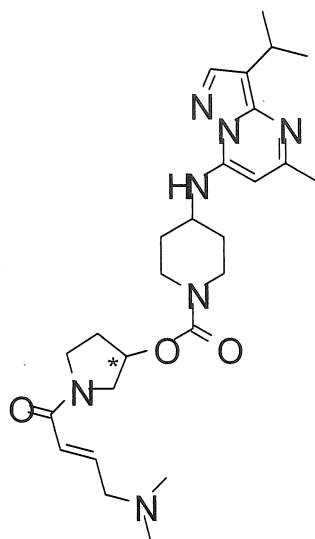
Thuật ngữ “việc điều trị” (hoặc “điều trị” hoặc “sự điều trị”) như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến việc hạn chế, làm chậm, làm ngừng, hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng, tình trạng hoặc rối loạn hiện có.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “ung thư” và “thuộc về ung thư” dùng để chỉ hoặc mô tả tình trạng sinh lý ở các bệnh nhân điển hình đặc trưng bởi sự tăng sinh tế bào không kiểm soát được. Định nghĩa này bao gồm cả u lành tính và ung thư ác tính. Thuật ngữ “ung thư giai đoạn sớm” hoặc “khỏi u giai đoạn sớm” có nghĩa là ung thư còn chưa tiến triển hoặc di căn hoặc được phân loại là ung thư giai đoạn 0, I, hoặc II. Ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh ung thư biểu

mô đường niệu, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, xa-côm, bệnh ung thư da, hoặc u thần kinh đệm.

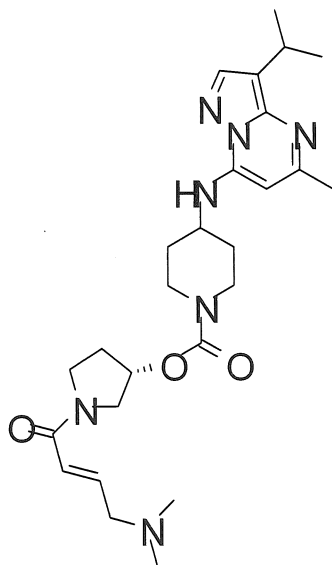
Hợp chất theo sáng chế có thể phản ứng để tạo thành các muối được dụng. Các muối được dụng và các phương pháp thông thường để điều chế chúng là đã được biết rõ trong lĩnh vực (xem, chẳng hạn, P. Stahl, *et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, *et al.*, “Pharmaceutical Salts,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, January 1977).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể hiểu rằng hợp chất theo sáng chế, như được thể hiện trong (I), hoặc muối được dụng của chúng, bao gồm lõi chứa một tâm bất đối, được thể hiện bằng * dưới đây:



(I)

Mặc dù sáng chế bao gồm tất cả các đồng phân đối ảnh, cũng như hỗn hợp của các đồng phân đối ảnh của các hợp chất bao gồm các dạng triệt quang, hợp chất được ưu tiên theo sáng chế được thể hiện bởi công thức (II) dưới đây:

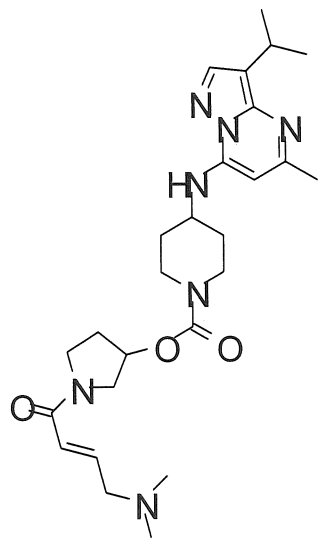


(II)

hoặc các muối được dụng của nó.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng hiểu rằng việc gọi tên cấu hình Cahn-Ingold-Prelog (R) hoặc (S) cho tất cả các tâm bất đối này sẽ khác nhau phụ thuộc vào kiểu thế của hợp chất cụ thể. Đồng phân đối ảnh có thể được điều chế bắt đầu bằng các chất phản ứng bất đối hoặc bằng các kỹ thuật tổng hợp lập thể chọn lọc hoặc lập thể đặc thù. Theo cách khác, đồng phân đối ảnh có thể được phân lập từ các hỗn hợp bằng các kỹ thuật sắc ký bất đối tiêu chuẩn hoặc các kỹ thuật kết tinh ở thời điểm thuận tiện trong quy trình tổng hợp các hợp chất theo sáng chế. Các đồng phân đối ảnh đơn của các hợp chất theo sáng chế là phương án ưu tiên của sáng chế.

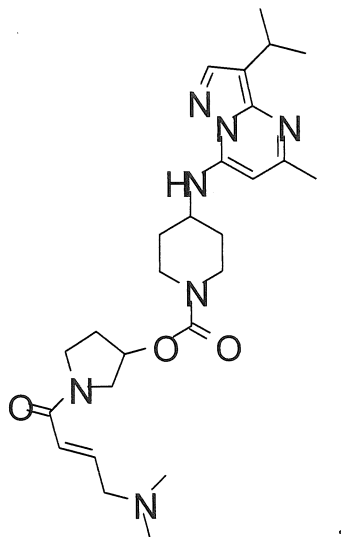
Các hợp chất theo sáng chế tốt hơn là được bào chế ở dạng dược phẩm dùng theo nhiều đường khác nhau. Các dược phẩm như vậy và các quy trình bào chế chúng là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (*xem, chẳng hạn, Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (A. Gennaro, *et al.*, eds., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005)). Dược đặc biệt ưu tiên hơn là dược phẩm chứa hợp chất có công thức:



(I)

hoặc muối được dụng của nó và một hoặc nhiều chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

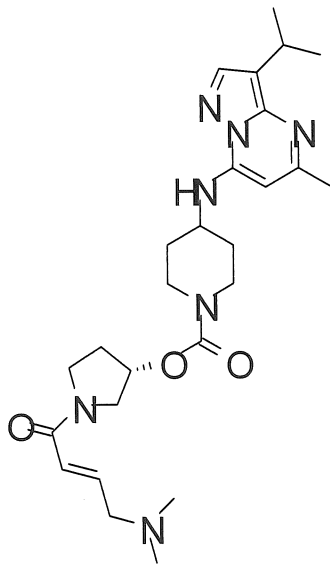
Một phương án được ưu tiên của sáng chế là



(I)

hoặc muối được dụng của nó.

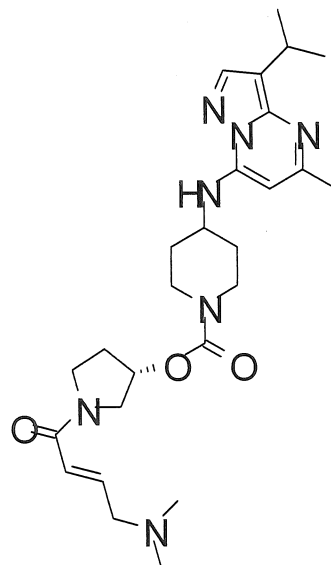
Một phương án được đặc biệt ưu tiên của sáng chế đề cập đến hợp chất (3S)-1-[(2E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl 4-{[5-metyl-3-(propan-2-yl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl]amino}piperidin-1-carboxylat:



(II)

hoặc muối được dụng của nó. Muối hemi-edisylat hydrat hoặc muối besylat được đặc biệt ưu tiên.

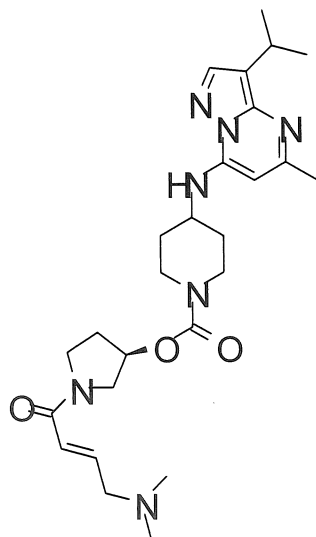
Một phương án khác được đặc biệt ưu tiên của sáng chế đề cập đến hợp chất (3S)-1-[(2E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl 4-{[5-metyl-3-(propan-2-yl)pyrazolo[1,5-A]pyrimidin-7-yl]amino}piperidin-1-carboxylat:



(II)

Một phương án được đặc biệt ưu tiên khác của sáng chế đề cập đến hợp chất

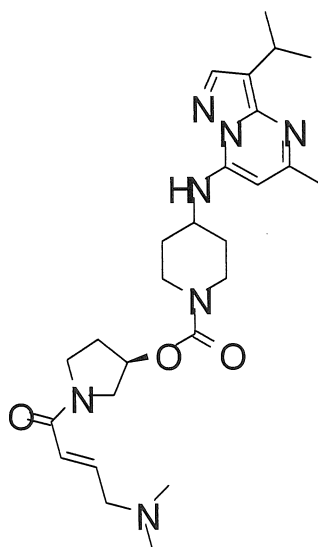
(3R)-1-[(2E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl 4-{[5-methyl-3-(propan-2-yl)pyrazolo[1,5-A]pyrimidin-7-yl]amino}piperidin-1-carboxylat (như được chỉ ra bởi (III) dưới đây):



(III)

hoặc muối được dụng của nó. Muối hemi-edisylat hydrat hoặc muối besylat được đặc biệt ưu tiên.

Một phương án khác được đặc biệt ưu tiên của sáng chế đề cập đến hợp chất (3R)-1-[(2E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl 4-{[5-methyl-3-(propan-2-yl)pyrazolo[1,5-A]pyrimidin-7-yl]amino}piperidin-1-carboxylat:



(III)

Các hợp chất theo sáng chế thường hữu hiệu trong khoảng liều lượng rộng. Ví dụ, các liều dùng trên ngày nằm trong khoảng từ 1 mg đến khoảng 2 g. Trong một số trường hợp mức liều dưới giới hạn dưới của khoảng đã nêu có thể đã quá đủ, trong khi đó trong một số trường hợp khác liều lớn hơn có thể được sử dụng trong khi vẫn duy trì tác dụng có lợi mong muốn/nguy cơ, và do đó khoảng liều nêu trên không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Cần hiểu rằng lượng hợp chất thực tế được dùng sẽ được xác định bởi bác sĩ, trong trường hợp tương ứng, bao gồm tình trạng được điều trị, đường dùng được chọn, hợp chất hoặc các hợp chất thực tế được dùng, độ tuổi, thể trọng, và đáp ứng của bệnh nhân cụ thể, và mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng của bệnh nhân.

Các chất đồng phân riêng rẽ và các chất đồng phân đối ảnh có thể được tách hoặc được phân giải bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này ở thời điểm phù hợp bất kỳ trong quá trình tổng hợp hợp chất theo sáng chế, bởi các phương pháp như kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký không đối xứng (xem, chẳng hạn, J. Jacques, et al., "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley and Sons, Inc., 1981, and E.L. Eliel and S.H. Wilen, "*Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994).

Ngoài ra, các chất trung gian nhất định được mô tả ở đây có thể chứa một hoặc nhiều nhóm bảo vệ. Nhóm bảo vệ biến đổi có thể là giống hoặc khác nhau trong mỗi lần xuất hiện tùy thuộc vào các điều kiện phản ứng cụ thể và sự chuyển dạng cụ thể cần 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*", Fourth Edition, của Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Các ký hiệu viết tắt nhất định được định nghĩa dưới đây: "¹H NMR" dùng để chỉ ¹H-cộng hưởng từ hạt nhân; "eq" dùng để chỉ đương lượng; "THF" dùng để chỉ tetrahydrofuran; "DCM" dùng để chỉ diclometan; "MeCN" hoặc "ACN" dùng để chỉ axetonitril; "DMSO" dùng để chỉ dimetyl sulfoxit; "MTBE" dùng để chỉ methyl tert-butyl ete; "TEA" dùng để chỉ trimetylamin; "HATU" dùng để chỉ I-

[Bis(dimethylamino)metylen]-I 8-1,2,3-triazolo[4, 5-b]pyridinium 3-oxid-hexaflophosphat; “MeOH” dùng để chỉ metanol; “TLC” dùng để chỉ sắc ký lớp mỏng; “UV” dùng để chỉ cực tím; “cột LC” dùng để chỉ cột sắc ký lỏng; “DMEA” dùng để chỉ dimethylmetylamin; “EtOAc” dùng để chỉ etyl axetat; “DMF” dùng để chỉ dimethylformamit; “SCX” dùng để chỉ trao đổi cation mạnh; “ca.” dùng để chỉ khoảng hoặc xấp xỉ; “RBF” dùng để chỉ bình đáy tròn; “ATP” dùng để chỉ adenosin triphosphat; “DTT” dùng để chỉ dithiothreitol; “HEPES” dùng để chỉ (axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic); “EDTA” dùng để chỉ axit etylendiamintetraaxetic; “ATCC” dùng để chỉ Bộ sưu tập chủng giống kiểu Mỹ (American Type Culture Collection); “RT” dùng để chỉ nhiệt độ trong phòng; “PBS” dùng để chỉ nước muối đệm phosphat; “BSA” dùng để chỉ albumin huyết thanh bò; “FBS” dùng để chỉ huyết thanh bào thai bò; “RNAase” dùng để chỉ ribonucleaza; “cDNA” dùng để chỉ ADN bổ trợ; “GST” dùng để chỉ glutathion S-transferaza; “His” dùng để chỉ histidin; “GSH” dùng để chỉ glutathion; và “HBSS” dùng để chỉ dung dịch muối cân bằng của Hank (Hank’s Balanced Salt Solution).

Các hợp chất theo sáng chế, hoặc các muối được dụng của nó, có thể được điều chế bằng nhiều quy trình đã biết trong lĩnh vực này, cũng như các quy trình 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 các hợp chất theo sáng chế, hoặc các muối được dụng của chúng. Các sản phẩm của từng bước trong các sơ đồ dưới đây có thể được thu hồi theo các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, gồm chiết, làm bay hơi, tạo kết tủa, sắc ký, lọc, nghiền tinh chế, và kết tinh. Các chất phản ứng và các nguyên liệu ban đầu đều sẵn có đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

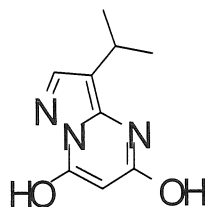
Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ điều chế và các ví dụ sau minh họa thêm cho sáng chế và thể hiện quá trình tổng hợp điển hình cho các hợp chất theo sáng chế.

Điều chế và ví dụ

Ví dụ điều chế 1

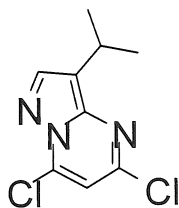
Tổng hợp 3-isopropylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-5,7-diol.



Bổ sung natri etoxit (979 g, 14,4 mol, 3,0 đương lượng) và diethyl malonat (998 g, 6,23 mol, 3,0 đương lượng) ở 23 °C vào dung dịch chứa 4-isopropyl-1H-pyrazol-3-amin (600 g, 4,79 mol) trong etanol (4,2 L) và gia nhiệt hỗn hợp đến 80 °C (nhiệt độ bên trong) trong 15 giờ. Làm nguội hỗn hợp đến 25 °C, bổ sung dung dịch nước HCl 1 M (2,0 L) (độ pH cuối = 2,0), lọc, rửa chất rắn bằng nước (2,0 L), và làm khô để thu được 3-isopropylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-5,7-diol (600 g, 65%) ở dạng chất rắn màu trắng. ES/MS m/z 194 (M+H).

Ví dụ điều chế 2

Tổng hợp 5,7-diclo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin.



Bổ sung POCl₃ (2,00 L, 25,8 mol, 10 đương lượng) và N,N-dimetylanilin (162 mL, 2,58 mol, 1,0 đương lượng) vào huyền phù gồm 3-isopropylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-5,7-diol (500 g, 2,58 mol) trong MeCN (1,25 L) ở 50 °C và gia nhiệt hỗn hợp đến 100 °C trong 36 giờ. Làm nguội đến 23 °C, đổ từng giọt vào 1:1 đá/dung dịch đệm phosphat (1 M, pH = 8, 10 L) và khuấy trong 15 giờ. Lọc, rửa chất rắn bằng nước (5,0 L) và làm khô để thu được 5,7-diclo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin (375 g, 63%) ở dạng chất rắn màu nâu. ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 230/232 (M+H). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 1,32 (d, 6H), 3,19 (dq, 1H), 7,58 (s, 1H), 8,31 (s,

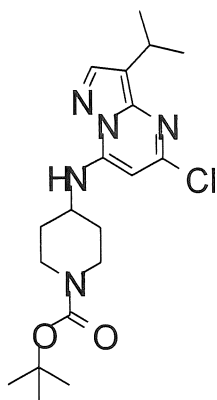
1H).

Tổng hợp 5,7-diclo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin theo cách khác.

Bổ sung natri etoxit -21% trong etanol- (17,9 mL, 47,9 mmol) vào dung dịch chứa 4-isopropyl-1H-pyrazol-5-amin (5 g, 39,9 mmol) và diethyl malonat (6,74 mL, 43,9 mmol) trong etanol (150 mL) và khuấy ở RT. Sau 5 phút, gia nhiệt ở 90 °C và khuấy. Sau 18 giờ, làm nguội đến RT và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Hòa tan phần còn lại bằng nước và bổ sung axit clohydric 1 N đến độ pH=3. Lọc chất kết tủa màu trắng và làm khô trong điều kiện áp suất giảm ở 50 °C trong 18 giờ. Tạo huyền phù chứa chất rắn thu được, 3-isopropylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-5,7-diol (4,92 g, 25,5 mmol, 0,638) trong phosphor oxyclorea (48 mL) và bổ sung N,N-dimetylanilin (2,3 mL). Hồi lưu hỗn hợp ở 110 °C. Sau 2 giờ, làm nguội đến RT và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Đổ phần còn lại lên trên dung dịch đá/nước và chiết bằng DCM (hai lần). Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat. Lọc, và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được phần còn lại. Tinh chế phần còn lại bằng cách sắc ký nhanh (silica gel), rửa giải bằng etyl hexan: axetat để tạo ra 5,7-diclo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin (4,45 g, 19,3 mmol) ở dạng chất rắn màu nâu. MS (m/z): 230,232(M+1). ¹H NMR (400,21 MHz, DMSO): 8,31 (s, 1 H), 7,58 (s, 1 H), 3,19 (m, 1 H), 1,32 (d, J= 7,0 Hz, 6H).

Ví dụ điều chế 3

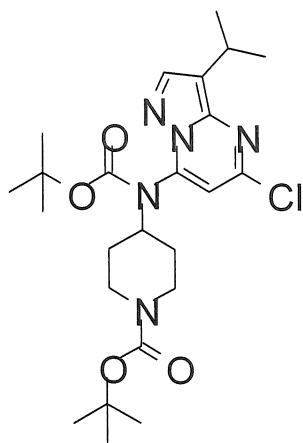
Tổng hợp tert-butyl 4-[(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat.



Bổ sung N,N-diisopropyletylamin (189 mL, 140 g, 1080 mmol, 2 đương lượng) và tert-butyl 4-aminopiperidin-1-carboxylat (114 g, 570 mmol, 1,05 đương lượng) vào huyền phù gồm 5,7-diclo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin (130 g, 542 mmol) trong 2-propanol (1,0 L) ở 23 °C và khuấy hỗn hợp trong 18 giờ. Lọc, rửa chất rắn bằng MTBE (200 mL), và làm khô để thu được tert-butyl 4-[(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (182 g, hiệu suất 85%) ở dạng chất rắn màu vàng. ES/MS m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 394/396 (M+H). ^1H NMR ($\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 1,28 (d, 6H), 1,42 (s, 9H), 1,61 (m, 2H), 1,83 (m, 2H), 2,87 (m, 1H), 3,10 (dq, 1H), 3,32 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,98 (m, 2H), 6,34 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 8,07 (d, 1H).

Ví dụ điều chế 4

Tổng hợp tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat.



Bổ sung N,N-diisopropyletylamin (69,1 mL, 51,2 g, 396 mmol, 1 đương lượng), 4-dimetylaminopyridin (4,84 g, 39,6 mmol, 0,1 đương lượng), và di-tert-butyl dicacbonat (200 mL, 190 g, 871 mmol, 2,2 đương lượng) vào dung dịch chứa tert-butyl 4-[(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (156 g, 396 mmol) trong THF (936 mL) ở 23 °C, và gia nhiệt hỗn hợp ở 50 °C (nhiệt độ bên trong) trong 21 giờ. Làm nguội đến 23 °C và làm nguội trong chân không để thu được tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (195 g, 99%) ở dạng

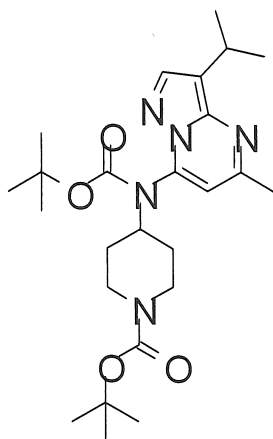
chất rắn màu cam. ES/MS m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 438/440 ($M+H-56$). ^1H NMR (d_6 -DMSO) δ 1,20 (s, 9H), 1,31 (d, 6H), 1,35 (s, 9H), 1,46 (m, 2H), 1,88 (m, 2H), 2,75 (m, 1H), 3,19 (dq, 1H), 3,32 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 4,18 (m, 2H), 7,20 (s, 1H), 8,19 (s, 1H).

Tổng hợp tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat theo cách khác.

Bổ sung tert-butyl 4-aminopiperidin-1-carboxylat (2,8 g, 14 mmol) vào dung dịch chứa 5,7-diclo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin (3,1 g, 13 mmol) trong etanol (32 mL). Gia nhiệt ở 80 °C. Sau 18 giờ, làm nguội đến RT và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng cách sắc ký nhanh (silica gel), rửa giải bằng etyl axetat:DCM để tạo ra tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat ở dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối (m/e): 394,396($M+1$) Bổ sung tert-butoxycarbonyl tert-butyl cacbonat (1,14 g, 5,22 mmol) vào dung dịch chứa tert-butyl 4-[(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (940 mg, 2,386 mmol) và 4-dimethylaminopyridin (290 mg, 2,33 mmol) trong THF (7 mL). Gia nhiệt hỗn hợp ở 60 °C. Sau 30 phút, làm nguội đến RT và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng cách sắc ký nhanh (silica gel), rửa giải bằng DCM để tạo ra tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (1,1 g) ở dạng dầu màu vàng nhạt. Phổ khối (m/z): 438($M-t\text{-Bu}$). ^1H NMR (400,13 MHz, d_6 -DMSO): 8,19 (s, 1H), 7,20 (s, 1H), 5,76 (s, 1H), 4,17(m, 1H), 3,95 (m, 2 H), 3,19 (m, 1 H), 1,87 (m, 2 H), 1,47 (m, 2 H), 1,35 (s, 9 H), 1-31 (d, 6H), 1,19 (s, 9H).

Ví dụ điều chế 5

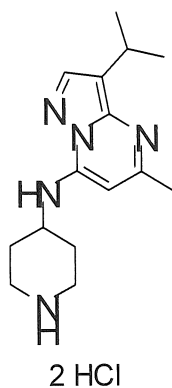
Tổng hợp tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat.



Bổ sung sản phẩm cộng [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi (II) DCM (15,7 g, 19,3 mmol, 0,05 đương lượng), kali phosphat tribazơ (245 g, 1160 mmol, 3 đương lượng), và 2,4,6-trimetyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriborinan (50 % khối lượng trong THF, 75,3 mL, 67,6 g, 270 mmol, 0,7 đương lượng) vào dung dịch chứa tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (190 g, 385 mmol) trong 1,4-dioxan (1,5 L) ở 90 °C (nhiệt độ bên trong). Sau 5 ngày, làm nguội đến 23 °C, lọc qua đệm đất tảo diatomit, và rửa chất rắn bằng THF (3 x 250 mL). Xử lý dịch lọc kết hợp ở 23 °C bằng nhựa SiliaMetS® Thiol (40-63 µm; lượng nạp = 1,46 mmol/g; 320 g, 467 mmol), và gia nhiệt đến 65 °C trong 18 giờ. Làm nguội đến 23 °C, lọc, và rửa nhựa bằng DCM (2 x 250 mL). Cô đặc dịch lọc kết hợp trong chân không, hòa tan phần còn lại trong MTBE (1 mL), rửa bằng nước (200 mL), làm khô (MgSO₄), và làm nguội trong chân không để thu được tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (182 g, 100%) ở dạng chất rắn màu nâu. ES/MS m/z 474 (M+H).

Ví dụ điều chế 6

Tổng hợp 3-isopropyl-5-metyl-N-(4-piperidyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin dihydroclorua.



Bổ sung axit clohydric trong 2-propanol (5,50 mol/L, 349 mL, 1920 mmol, 5 đương lượng) vào huyền phù gồm tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (182 g, 384 mmol) trong 2-propanol (1,4 L) ở 23 °C, và gia nhiệt hỗn hợp đến 70 °C (nhiệt độ bên trong) trong 3 giờ. Làm nguội đến 23 °C, lọc, rửa chất rắn bằng MTBE (2 x 200 mL) và làm khô để thu được 3-isopropyl-5-methyl-N-(4-piperidyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin dihydroclorua (95 g, hiệu suất 71%) ở dạng chất rắn màu vàng. Kết hợp dung dịch nước cái, pha loãng bằng MTBE (2 L), lọc, rửa chất rắn bằng MTBE (2 x 50 mL), và làm khô để thu được nguyên liệu bổ sung (8,42 g, hiệu suất 15%). ES/MS m/z 274 (M+H). ^1H NMR (d_6 -DMSO) δ 1,28 (d, 6H), 2,04 (m, 4H), 2,61 (s, 3H), 3,00 (m, 2H), 3,40 (m, 3H), 4,16 (m, 2H), 6,68 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,80 (m, 1H), 9,21 (m, 1H), 9,86 (m, 1H).

Tổng hợp 3-isopropyl-5-methyl-N-(4-piperidyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin dihydroclorua theo cách khác.

Hòa tan 7-clo-3-isopropyl-5-methylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin (2,1 kg, 10,0 mol) và diisopropyletylamin (4,18 L, 2,4 đương lượng) trong isopropanol (16,8 L, 8 mL/g). Nạp tert-butyl 4-aminopiperidin-1-carboxylat (2,6 kg, 1,3 đương lượng) vào hỗn hợp phản ứng và gia nhiệt đến 75-80 °C trong 16 giờ. Làm nguội hỗn hợp đến 5-10 °C và bổ sung 4 M dung dịch chứa axit clohydric trong isopropanol (17,5 L, 7,0 đương lượng). Gia nhiệt đến 40-45 °C trong 4 giờ. Làm nguội đến 25-30 °C và lọc hỗn hợp để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (2,25 kg, hiệu suất 72,7%). Nguyên liệu được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8,16 (s, 1H), 6,45 (s, 1H), 4,29-4,26 (m, 1 H), 3,63 (d, $J = 15,0$ Hz, 2H),

3,26 – 3,12 (m, 3H), 2,64 (s, 3H), 2,40 (d, $J = 15,0$ Hz, 2H), 2,08 (dd, $J = 10,0, 25,0$ Hz, 2H), 1,31 (d, $J = 5,0$ Hz, 6H).

Tổng hợp 3-isopropyl-5-metyl-N-(4-piperidyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin ở dạng bazơ tự do.

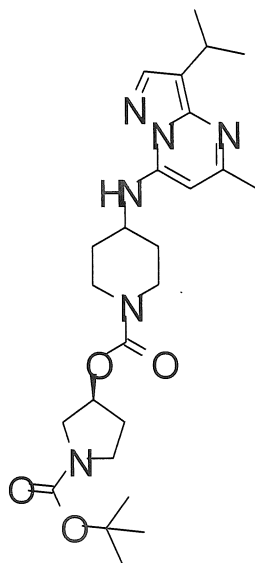
Bổ sung 1,4-dioxan (15 mL) vào hỗn hợp gồm tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(5-clo-3-isopropyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (689 mg, 1,39 mmol), 2,4,6-trimetyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriborinan (350 mg, 2,79 mmol) và kali phosphat tribazơ (1,2 g, 5,5 mmol). Sục N_2 vào dung dịch trong 5 phút. Bổ sung chất cộng hợp [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]-dichloropalladi(II) DCM (60 mg, 0,072 mmol). Gia nhiệt ở $110^\circ C$. Sau 1,5 giờ, bổ sung thêm [1,1-bis(diphenylphosphino)feroxen]dichloropalladi(II) (60 mg, 0,072 mmol) và gia nhiệt ở $100^\circ C$. Sau 18 giờ, làm nguội đến RT, lọc hỗn hợp qua đệm gồm màng lọc xenluloza, rửa bằng etyl axetat và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng cách sắc ký nhanh (silica gel), rửa giải bằng etyl axetat và DCM để tạo ra tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (537 mg, 1,077 mmol) ở dạng dầu màu cam. Phổ khối (m/z): 474(M+1).

Bổ sung nhỏ giọt axit trifloaxetic (2,5 mL, 33 mmol) vào dung dịch chứa tert-butyl 4-[tert-butoxycarbonyl-(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (537 mg, 1,077 mmol) trong DCM (12 mL). Khuấy ở RT. Sau 2 giờ, cô đặc hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng cột SCX-2 rửa giải với 10% DCM: MeOH sau đó MeOH (2 N NH_3). Cô đặc phần bazơ trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 3-isopropyl-5-metyl-N-(4-piperidyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin (345 mg, 1,199 mmol) ở dạng chất rắn màu nâu. Phổ khối (m/z): 274(M+1). 1H NMR (400,13 MHz, DMSO): 7,82 (s, 1 H), 7,23 (d, 1H), 6,08 (s, 1 H), 3,58 (m, 1 H), 3,12 (m, 1 H), 2,97 (m, 2 H), 2,58 (m, 2 H), 2,39 (s, 3 H), 2,10 (m, 2 H), 1,28 (d, 6 H).

Ví dụ điều chế 7

Tổng hợp [(3S)-1-tert-butoxycarbonylpyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-

methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat



Bổ sung phosgen (20 % khối lượng trong toluen, 348 mL, 485 g, 981 mmol, 2,4 đương lượng) vào dung dịch chứa tert-butyl (3S)-3-hydroxypyrrolidin-1-carboxylat (76,5 g, 409 mmol) trong THF (765 mL) được đặt trong RBF 3 cổ được nối với chai bẫy loại bỏ tạp chất chứa dung dịch nước NH_4OH 32%, ở 23 °C trong 1 giờ. Sục N_2 qua hỗn hợp trong 30 phút, và cô đặc trong chân không. Hòa tan phần còn lại trong DCM (757 mL), làm lạnh đến 0 °C (nhiệt độ bên trong), và bổ sung (thêm chậm trong 7 phút) huyền phù chứa 3-isopropyl-5-methyl-N-(4-piperidyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin dihydroclorua (94,6 g, 273,2 mmol) trong DCM (756,8 mL), được xử lý trước đó bằng triethylamin (228 mL, 166 g, 1639 mmol, 6 đương lượng). Bỏ chậu làm lạnh sau khi bổ sung, và dập tắt phản ứng sau 30 phút bằng dung dịch nước HCl 35% (20 mL) và dung dịch nước HCl 1M (300 mL) (độ pH cuối = 7). Tách lớp hữu cơ, rửa bằng nước (300 mL) và dung dịch nước NaCl bão hòa (300 mL), làm khô (MgSO_4), và cô đặc trong chân không. Hòa tan phần còn lại (khoảng 180 g) trong DCM (1,5 L), bổ sung nhựa SiliaMetS® Thiol (40-63 μm ; lượng nạp = 1,46 mmol/g; 10 g, 14,6 mmol, 140 đương lượng dựa trên hàm lượng Pd) ở 23 °C, và sau đó gia nhiệt hỗn hợp đến 40 °C trong 2 giờ. Lọc, rửa nhựa bằng DCM (2 x 10 mL), và cô đặc dịch lọc kết hợp trong chân không để thu được [(3S)-1-tert-butoxycarbonylpyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (129 g, 97%) ở dạng

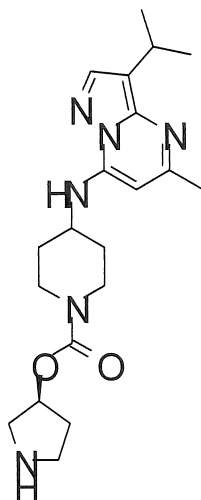
chất rắn màu vàng. ES/MS m/z 487 ($M+H$). 1H NMR (d_6 -DMSO) δ 1,28 (d, 6H), 1,40 (s, 9H), 1,65 (m, 2H), 1,88 (m, 2H), 1,96 (m, 1H), 2,07 (m, 1H), 2,46 (s, 3H), 2,90 (m, 2H), 3,31 (m, 5H), 3,89 (m, 1H), 4,02 (m, 2H), 5,10 (m, 1H), 6,32 (s, 1H), 8,01 (s, 1H).

Tổng hợp [(3S)-1-tert-butoxycarbonylpyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat theo cách khác

Hòa tan tert-butyl (3S)-3-hydroxypyrrolidin-1-carboxylat (438 g, 1,3 đương lượng) trong ACN (4,4 L, 10,0 mL/g) ở 15-30°C. Bổ sung triethylamin (595 mL, 4,5 đương lượng) sau đó là 4-nitrophenyl clorofomat (490 g, 1,4 đương lượng) ở 15-30°C. Gia nhiệt đến 35-40 °C và khuấy hỗn hợp trong 4 giờ. Làm nguội đến 15-25°C và bổ sung 3-isopropyl-5-methyl-N-(piperidin-4-yl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin (500 g, 1,8 mol). Khuấy ở 15-30 °C trong 5 giờ. Cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung 2-metyltetrahydrofuran (4,4 L, 10,0 mL/g), khuấy và lọc. Rửa dịch lọc liên tiếp bằng 2 M NaOH (1,1 L, 2,5 mL/g, 4 lần) và dung dịch nước NaCl bão hòa (4,4 L, 10,0 mL/g). Làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc, và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung rượu isopropylic (2,2 L, 5 mL/g) để thu được dung dịch chứa hợp chất nêu ở đề mục này (660 g, hiệu suất 75,4%).

Ví dụ điều chế 8

Tổng hợp [(3S)-pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat.



Bổ sung axit clohydric trong 2-propanol (5,50 mol/L, 217 mL, 1190 mmol, 5 đương lượng) vào huyền phù gồm [(3S)-1-tert-butoxycarbonylpyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (116 g, 239 mmol) trong 2-propanol (755 mL) ở 23 °C, và gia nhiệt hỗn hợp đến 70 °C trong 90 phút. Làm nguội đến 23 °C, và cô đặc trong chân không. Tạo huyền phù chứa phần còn lại trong DCM (1,5 L), bổ sung dung dịch nước NaOH 1M (400 mL) và dung dịch nước NaOH 50% (100 mL). Khuấy trong 15 phút. Tách pha hữu cơ, làm khô (MgSO₄), và cô đặc trong chân không. Tạo huyền phù chứa phần còn lại (khoảng 131 g) trong MTBE / hexan (2:1, 900 mL), và khuấy hỗn hợp trong 18 giờ. Lọc, rửa chất rắn đã lọc bằng hexan (2 x 100 mL), và làm khô để thu được [(3S)-pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (82,7 g, hiệu suất 90%) ở dạng chất rắn màu vàng. ES/MS m/z 387 (M+H). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 1,28 (d, 6H), 1,60 (m, 3H), 1,88 (m, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,75 (m, 2H), 2,91 (m, 4H), 3,13 (dq, 1H), 3,78 (m, 1H), 4,02 (m, 2H), 5,10 (m, 1H), 6,14 (s, 1H), 7,41 (d, 1H), 7,87 (s, 1H).

Tổng hợp [(3S)-pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat theo cách khác.

Bổ sung axit clohydric 5,5 M trong rượu isopropylic (8,4 L, 5,0 mL/g) vào dung dịch rượu isopropylic chứa (S)-1-(tert-butoxycarbonyl)pyrrolidin-3-yl 4-[(3-isopropyl-5-metylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (819 g) ở 20-30°C. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến 50-60°C trong 5 giờ. Làm nguội đến 30-35°C, bổ sung MTBE (8,2 L, 10 mL/g) và khuấy trong 1 giờ. Lọc, bổ sung phần bánh ướt vào dung dịch nước natri hydroxit (3,0 đương lượng) ở 0-5 °C và khuấy trong 30 phút. Bổ sung 2-metyltetrahydrofuran (8,2 L, 10,0 mL/g) và khuấy. Chiết pha hữu cơ và rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hòa. Làm khô bằng natri sulfat, lọc, và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm đến 1-2 thể tích. Bổ sung MTBE (2,46 L, 3 mL/g) và khuấy trong 3 giờ. Lọc để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (550 g). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,82 (s, 1H), 6,12 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 5,78 (s, 1H), 5,27 – 5,13 (m, 1H), 4,26 – 4,01 (m, 2H), 3,74 – 3,59 (m, 1H), 3,36 – 3,23 (m, 1H), 3,14 – 2,98 (m, 5H), 2,90 (ddd, *J* = 11,1, 8,4, 5,4 Hz, 1H), 2,52 (s, 3H), 2,18 – 2,00 (m, 3H),

1,87 (dd, $J = 12,6, 6,4$ Hz, 1H), 1,76 (s, 1H), 1,66 – 1,52 (m, 2H), 1,34 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H).

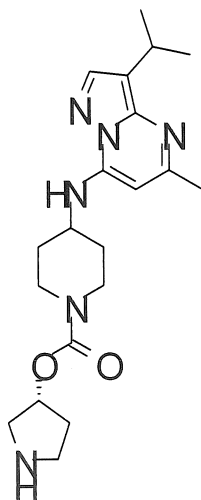
Tổng hợp [(3S)-pyrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat theo cách khác.

Bổ sung phosgen (1,14 mL, 20 % khối lượng trong toluen, 3,20 mmol) vào dung dịch lạnh (0 °C) chứa tert-butyl (3S)-3-hydroxypyrolidin-1-carboxylat (500 mg, 2,67 mmol) và TEA (0,37 mL, 2,6 mmol) trong THF (13 mL). Loại bỏ chậu làm lạnh và khuấy hỗn hợp ở RT. Sau 30 phút, cô đặc hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm và hòa tan phần còn lại trong DCM (11 mL). Bổ sung dung dịch này vào dung dịch chứa 3-isopropyl-5-metyl-N-(4-piperidyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin (C, 365 mg, 100 % khối lượng, 0,365 g) và TEA (0,3 mL) trong DCM (11 mL). Khuấy hỗn hợp ở RT. Sau 10 phút, bổ sung dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa và chiết bằng một lượng DCM nữa. Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hòa, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được phần còn lại. Tinh chế phần còn lại bằng cách sắc ký nhanh (silica gel), rửa giải bằng DCM: MeOH để tạo ra [(3S)-1-tert-butoxycarbonylpyrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (671 mg) ở dạng dầu màu vàng nhạt. Phổ khối (m/z): 487(M+1).

Bổ sung từng giọt axit trifloaxetic (2 mL, 26,45 mmol) vào dung dịch chứa [(3S)-1-tert-butoxycarbonylpyrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (671 mg, 1,269 mmol) trong DCM (12 mL). Khuấy ở RT. Sau 18 giờ, cô đặc hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm. Hòa tan phần còn lại trong DCM và rửa pha hữu cơ bằng dung dịch nước K₂CO₃ 10%. Làm khô pha hữu cơ bằng magie sulfat, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra [(3S)-pyrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (274 mg, 0,6593 mmol) ở dạng bột màu trắng. Phổ khối (m/z): 387(M+1). ¹H NMR (400,13 MHz, d₆-DMSO): 7,87 (s, 1H), 7,42 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,00 (ddd, $J = 9,0, 5,2, 2,5$ Hz, 1H), 4,02 (m, 2H), 3,77 (m, 1H), 3,13 (m, 1H), 2,89 (m, 4H), 2,72 (m, 2H), 2,40 (s, 3H), 1,87 (dd, $J = 6,8, 14,1$ Hz, 2H), 1,63 (m, 3H), 1,28 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H).

Ví dụ điều chế 9

Tổng hợp [(3R)-pyrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat



Bổ sung phosgen (1,14 mL, 20 % khối lượng trong toluen, 3,20 mmol) vào dung dịch lạnh (0 °C) chứa tert-butyl (3R)-3-hydroxypyrrolidin-1-carboxylat (500 mg, 2,67 mmol) và TEA (0,37 mL, 2,6 mmol) trong THF (13 mL). Loại bỏ chậm làm lạnh và khuấy hỗn hợp ở RT.

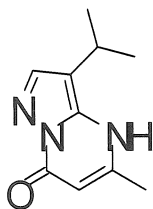
Sau 30 phút, cô đặc hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm và hòa tan phần còn lại trong DCM (11 mL). Bổ sung dung dịch này vào dung dịch chứa 3-isopropyl-5-metyl-N-(4-piperidyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin (365 mg, 100 % khối lượng, 0,365 g) và TEA (0,3 mL) trong DCM (11 mL). Khuấy hỗn hợp ở RT. Sau 10 phút, bổ sung dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa và chiết bằng một lượng DCM nữa. Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hòa làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được phần còn lại. Tinh chế phần còn lại bằng cách sắc ký nhanh (silica gel), rửa giải bằng hexan: etyl axetat để tạo ra [(3R)-1-tert-butoxycarbonylpyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (350 mg) ở dạng dầu màu vàng nhạt. Phổ khối (m/z): 487(M+1).

Bổ sung từng giọt axit trifloaxetic (0,8 mL, 0,72 mmol) vào dung dịch chứa [(3R)-1-tert-butoxycarbonylpyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-

a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (350 mg, 0,72 mmol) trong DCM (7 mL). Khuấy ở RT. Sau 45 phút, cô đặc hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng cột SCX-2 rửa giải với 10% DCM: MeOH sau đó MeOH (2 N NH₃). Cô đặc phần bazơ trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra [(3R)-pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (246 mg) ở dạng chất rắn màu nâu. Phổ khối (m/z): 387(M+1).

Ví dụ điều chế 10

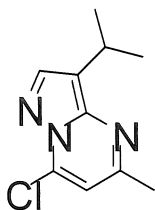
Tổng hợp 3-isopropyl-5-metyl-4H-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-on



Hòa tan 4-isopropyl-1H-pyrazol-5-amin (2,2 kg, 17,6 mol) và etyl axetoaxetat (2,86 kg, 1,25 đương lượng) vào axit axetic (17,6 L, 8,0 mL/g). Gia nhiệt hỗn hợp đến 110-115 °C và sau đó làm nguội đến 35-40°C. Bổ sung heptan và MTBE (44 L, 20 mL/g, tỷ lệ 5/1). Lọc và rửa chất rắn bằng heptan (4,4 L, 2 mL/g) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (2,28 kg, hiệu suất 85,5%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11,81 (s, 1H), 7,77 (s, 1H), 5,50 (s, 1H), 3,08 – 3,05 (m, 1H), 2,31 (s, 3H), 1,22 (d, *J* = 5,0 Hz, 6H).

Ví dụ điều chế 11

Tổng hợp 7-clo-3-isopropyl-5-metylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin

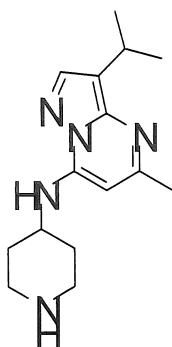


Hòa tan 3-isopropyl-5-metyl-4H-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-on (2,1 kg, 11,0 mol) và N,N-dimetylanilin (0,86 kg, 0,65 đương lượng) trong ACN (8,4 L, 4 mL/g). Gia nhiệt phản ứng đến 50-55°C và bổ sung từng giọt POCl₃ (4,2 kg, 2,5 đương

lượng). Điều chỉnh nhiệt độ đến 60-65 °C và khuấy hỗn hợp trong 9 giờ. Làm nguội hỗn hợp đến 25-30°C và đổ vào dung dịch đệm kali phosphat 2M (pH=8,0, 42 L, 20 mL/g). Bổ sung MTBE (23,9 L, 11,4 mL/g) và chiết pha hữu cơ. Rửa pha hữu cơ liên tiếp hai lần bằng dung dịch axit xitric 20% (4,2 L, 2,0 mL/g), dung dịch nước NaHCO₃ 10% (10,5 L, 5,0 mL/g) và dung dịch nước NaCl bão hòa (10,5 L, 5,0 mL/g). Làm khô pha hữu cơ bằng Na₂SO₄, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (1,8 kg, hiệu suất 78%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,02 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 3,27 – 3,25 (m, 1H), 2,58 (s, 3H), 1,42 (d, *J* = 8,0 Hz, 6H).

Ví dụ điều chế 12

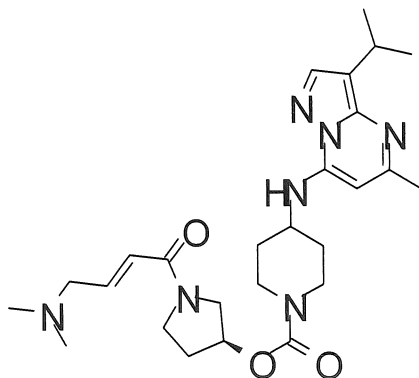
3-isopropyl-5-metyl-N-(4-piperidyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin



Bổ sung 3-isopropyl-5-metyl-N-(4-piperidyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin dihydroclorua (2,2 kg, 6,4 mol) vào dung dịch nước natri hydroxit 1M (19,2 L, 3,0 đương lượng) ở 10-15°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 15-20 phút sau đó bổ sung 2-metyltetrahydrofuran (4,70 L, 10,0 đương lượng) và khuấy trong 20-25 phút. Tách pha hữu cơ và rửa pha nước bằng 2-metyltetrahydrofuran (6,6 L, 3,0 mL/g, 3 lần). Gộp các dung dịch hữu cơ và rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (11 L, 5,0 mL/g). Làm khô pha hữu cơ bằng Na₂SO₄, lọc, và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung MTBE (6,6 L, 3,0 mL/g) và khuấy trong 40 phút ở 25-30°C. Lọc để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (1,5 kg, hiệu suất 85,7%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,81 (s, 1H), 6,10 (d, *J* = 8,0 Hz 1H), 5,75 (s, 1H), 3,59-3,54 (m, 1 H), 3,32-3,28 (m, 1 H), 3,22-3,19 (m, 2 H), 2,77-2,73 (m, 2 H), 2,51 (s, 3H), 2,11 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 1,56-1,50 (m, 3 H), 1,34 (d, *J*=8,0 Hz, 6H).

Ví dụ 1

Tổng hợp [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat.



(II)*

[*Lưu ý rằng như được chỉ ra ở đây trong ví dụ 1, tâm bất đối có hướng thay đổi và dạng đồng phân đối ảnh S được mô tả một cách khác biệt hơn so với như được chỉ ra ở các ví dụ trên đây trong cấu trúc (II).] Bổ sung hydroclorua axit (E)-4-(dimethylamino)but-2-enoic (15,0 g, 90,3 mmol, 1,2 đương lượng), N,N-diisopropyletylamin (31,3 mL, 23,4 g, 181 mmol, 2,4 đương lượng), và HATU (42,9 g, 113 mmol, 1,5 đương lượng) vào huyền phù gồm [(3S)-pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (29,1 g, 75,3 mmol) trong THF (146 mL) ở 23°C, và khuấy hỗn hợp trong 90 phút. Pha loãng bằng dung dịch đệm phosphat (0,5 M, pH = 9, 150 mL), chiết bằng DCM (2 x 375 mL), làm khô (MgSO₄), và cô đặc trong chân không. Tinh chế phần còn lại thu được (khoảng 95 g) bằng cách sắc ký (nạp phần còn lại đã được hòa tan trong 65 mL DCM; 330 g SiO₂; dung môi rửa giải: MTBE / 7N NH₃ trong MeOH 0% đến 10%; TLC: MTBE / 7N NH₃ trong MeOH 5:1). Hòa tan nguyên liệu (khoảng 40 g) trong DCM (400 mL), rửa bằng dung dịch nước K₂HPO₄ 1M (1 M, 80 mL), làm khô (MgSO₄), và cô đặc trong chân không. Tinh chế phần còn lại (khoảng 38 g) bằng cách sắc ký (nạp phần còn lại đã được hấp thu trong SiO₂ (50 g); 330 g SiO₂; dung môi rửa giải: MTBE / 7N NH₃ trong MeOH 0% đến 10%) để thu được [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (28,1 g, 75%) ở dạng chất rắn màu

trắng. ES/MS m/z 498 (M+H). ^1H NMR (CD_3OD) δ 1,33 (d, 6H), 1,64 (m, 2H), 2,10 (m, 2H), 2,18 (m, 1H), 2,26 (m, 1H), 2,29 (s, 6H), 2,50 (s, 3H), 3,11 (m, 2H), 3,18 (dd, 2H), 3,29 (dq, 1H), 3,70 (m, 3H), 3,87 (m, 2H), 4,14 (m, 2H), 5,31 (m, 1H), 6,12 (s, 1H), 6,47 (m, 1H), 6,86 (m, 1H), 7,88 (s, 1H). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +49,9^\circ$ (C=2,0, MeOH). Lượng dư chất đồng phân đối ảnh (Enantiomeric excess - ee) = 97%. Rt (thời gian lưu) = 2,79 phút (UV); Cột LC: CHIRALPAK® AS (4,6 x 150 mm, 5 μm); MeOH + 0,2% DMEA; Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút.

Tổng hợp [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat theo cách khác.

Bổ sung N,N-diisopropyletylamin (0,36 mL, 2,1 mmol) vào dung dịch chứa [(3S)-pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (170 mg, 0,4091 mmol), hydroclorua axit (E)-4-(dimethylamino)but-2-enoic (135 mg, 0,81512 mmol) và HATU (317 mg, 0,8181 mmol) trong N,N-dimetylformamit (4 mL). Khuấy ở RT. Sau 5 phút, cô đặc hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng cột SCX-2 rửa giải bằng 10% DCM: MeOH sau đó MeOH (2N NH_3). Cô đặc phần bazơ trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế phần còn lại qua dây cột Claricep C pha đảo ISCO™ rửa giải bằng NH_4CO_3 pH 9/ACN để tạo ra [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (129 mg, 0,255 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối (m/z): 498 (M+1). ^1H NMR (400,13 MHz, MeOD): 7,88 (s, 1H), 6,85 (m, 1H), 6,47 (m, 1H), 6,12 (s, 1H), 3,91-3,52 (m, 5H), 3,13 (m, 1H), 3,03 (m, 2H), 2,94 (m, 1H), 2,39 (s, 3H), 2,15 (s, 6H), 2,06 (m, 1H), 1,88 (d, $J = 11,5$ Hz, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,28 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H).

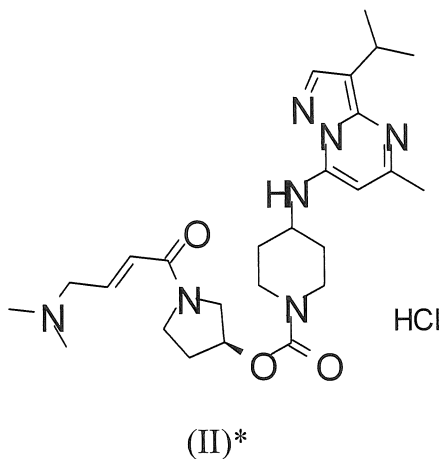
Tổng hợp [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat theo cách khác.

Hòa tan [(3S)-pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (550 g, 1,4 mol) trong THF (5,5 L, 10,0 mL/g) ở 15-30°C. Bổ sung hydroclorua axit (E)-4-(dimethylamino)but-2-enoic

(278 g, 1,2 đương lượng) và TEA (1,17 L, 6,0 đương lượng) ở 15-30°C và khuấy trong 40 phút. Bổ sung 50% propylphosphonic anhydrit trong EtOAc (1,68 L, 1,2 đương lượng) ở 15-30°C và khuấy trong 12 giờ. Lọc và trao đổi dung môi dịch lọc với isopropyl axetat trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung dung dịch nước NaOH 2M (2,75 L, 5 mL/g) và khuấy trong 20 phút ở 25-30°C. Chiết pha hữu cơ và rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (2,75 L, 5 mL/g). Làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung heptan (3,85 L, 7 mL/g) và THF (16,5 L, 3 mL/g) ở 15-30°C. Khuấy trong 1 giờ và lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (440 g, hiệu suất 63,2%). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7,86 (s, 1H), 6,83 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H), 6,43 (dd, *J* = 34,3, 14,9 Hz, 1H), 6,08 (s, 1H), 5,26 (d, *J* = 24,2 Hz, 1H), 4,85 (s, 2H), 4,22 – 4,01 (m, 2H), 3,90 – 3,76 (m, 2H), 3,61 – 3,47 (m, 1H), 3,36 – 3,21 (m, 2H), 3,17 – 3,11 (m, 2H), 3,12 – 2,98 (m, 2H), 2,47 (s, 3H), 2,28 – 2,21 (m, 7H), 2,16 – 2,00 (m, 3H), 1,68 – 1,48 (m, 2H), 1,30 (d, *J* = 6,2 Hz, 6H).

Ví dụ 2

Tổng hợp [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hydroclorua.



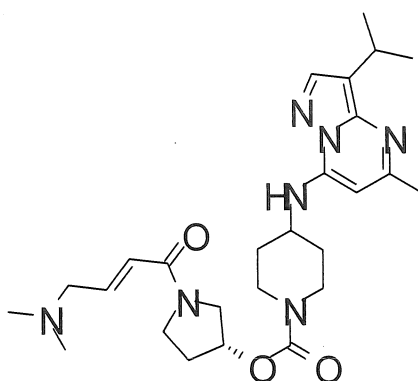
[*Lưu ý rằng như được chỉ ra ở đây trong ví dụ 2, tâm bất đối có hướng thay đổi và dạng đồng phân đối ảnh S được mô tả một cách khác biệt hơn so với như được chỉ ra ở các ví dụ trên đây trong cấu trúc (II).] Bổ sung HCl (1M trong EtOAc (0,589 mL, 0,590 g, 0,589 mmol, 1,07 đương lượng) vào dung dịch chứa [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-

pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (0,283 g, 0,549 mmol) trong axeton (5,5 mL) ở 23°C, và khuấy hỗn hợp trong 5 giờ. Cô đặc trong chân không để thu được [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hydroclorua (0,244 g, 81%) ở dạng chất rắn màu trắng. ES/MS m/z 498 (M+H).

¹H NMR (CD₃OD) δ 1,34 (d, 6H), 1,66 (m, 2H), 2,11 (m, 2H), 2,20 (m, 1H), 2,30 (m, 1H), 2,54 (s, 3H), 2,90 (s, 6H), 3,12 (m, 2H), 3,28 (dq, 1H), 3,74 (m, 4H), 3,95 (dd, 2H), 4,16 (m, 2H), 4,63 (m, 1H), 5,32 (m, 1H), 6,22 (s, 1H), 6,78 (m, 2H), 7,94 (s, 1H).

Ví dụ 3

Tổng hợp [(3R)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat.



(III)*

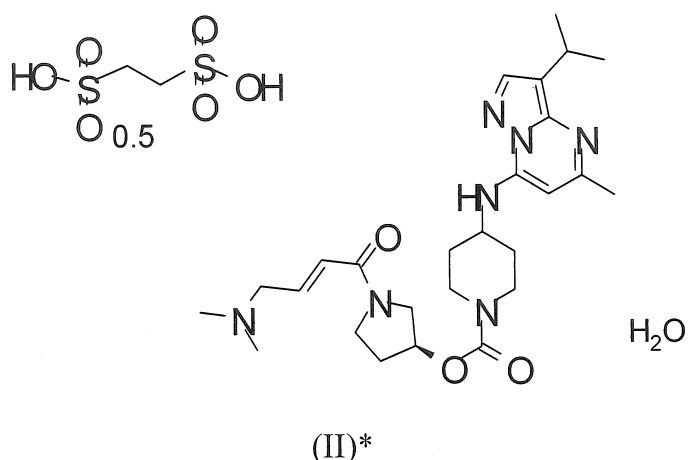
[*Lưu ý rằng như được chỉ ra ở đây trong ví dụ 3, tâm bất đối có hướng thay đổi và dạng đồng phân đối ảnh R được mô tả một cách khác biệt hơn so với như được chỉ ra ở các ví dụ trên đây trong cấu trúc (III).] Bổ sung N,N-diisopropyletylamin (0,4 mL, 2,0 mmol) vào dung dịch chứa [(3R)-pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (170 mg, 0,43 mmol), axit (E)-4-(dimethylamino)but-2-enoic; hydroclorua (150 mg, 0,90 mmol) và HATU (343 mg, 0,87 mmol) trong DMF (4 mL). Khuấy ở RT. Sau 5 phút, cô đặc hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần còn lại bằng cột SCX-2 rửa giải bằng 10% DCM: MeOH sau đó MeOH (2 N NH₃). Cô đặc phần bazơ

trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế phần còn lại qua dây cột Claricep C pha đảo ISCO rửa giải bằng NH_4CO_3 pH 9/ACN để tạo ra [(3R)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (188 mg) ở dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối (m/z): 498 (M+1).

^1H NMR (400,21 MHz, DMSO): 7,86 (s, 1 H), 7,41 (m, 1 H), 6,63 (m, 1 H), 6,37 (m, 1 H), 6,13 (s, 1 H), 5,16 (m, 1H), 4,09-3,92 (m, 2H), 3,78 (m, 2 H), 3,56 (m, 2 H), 3,13(m, 1 H), 3,03 (m, 2 H), 2,93 (m, 1 H), 2,39 (s, 3 H), 2,14 (s, 6 H), 2,06 (m, 1 H) 1,88 (m, 2 H), 1,60 (m, 2 H), 1,28 (d, J= 6,8 Hz, 6 H).

Ví dụ 4

Tổng hợp tinh thể [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hemi-edisylat hydrat



[*Lưu ý rằng như được chỉ ra ở đây trong ví dụ 4, tâm bất đối có hướng thay đổi và dạng đồng phân đối ảnh S được mô tả một cách khác biệt hơn so với như được chỉ ra ở các ví dụ trên đây trong cấu trúc (II).] Đưa 2,0 g [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat vào 8 mL axeton đồng thời khuấy từ ở nhiệt độ trong phòng. Trong lọ riêng biệt, hòa tan 505 mg hydrat của axit 1,2-etandisulfonic trong 6 mL axeton. Bổ sung dung dịch axit vào dung dịch bazơ tự do và trộn ở RT. Khuấy mẫu sao cho việc khuấy là kỹ, bổ sung thêm dung môi để pha

loãng huyền phù đặc nếu cần. Tạo huyền phù đặc đối với hỗn dịch này qua đêm ở 50°C. Sau khi khuấy qua đêm, làm nguội huyền phù đặc còn lại đến 20°C. Tách chất rắn bằng cách lọc chân không trên giấy lọc và làm khô bánh lọc thu được chứa chất rắn màu trắng tạo chỗ trên thiết bị lọc (2,1 g, hiệu suất 88%).

Thu được các nhiễu xạ đồ XRD của chất rắn dạng tinh thể trên máy nhiễu xạ tia X qua bột Bruker D4 Endeavor, có lắp nguồn CuK α ($\lambda = 1,54060$ Å) và bộ dò Vantec, vận hành ở 35 kV và 50 mA. Quét mẫu ở góc 2θ giữa 4 và 40°, với cỡ bước 0,008° ở góc 2θ và tốc độ quét 0,5 giây/bước, và với độ phân kỳ 0,6 mm, bộ phận chống tán xạ cố định 5,28, và khe phát hiện 9,5 mm. Đưa bột khô vào bộ phận chứa mẫu thạch anh và tạo ra bề mặt mịn bằng bản kính. Thu thập nhiễu xạ đồ dạng tinh thể ở nhiệt độ trong phòng và độ ẩm tương đối. Đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì cường độ tương đối của các đỉnh nhiễu xạ có thể thay đổi do sự định hướng được ưu tiên xuất phát từ các yếu tố như hình thái tinh thể hoặc dạng tinh thể. Khi xuất hiện tác động của sự định hướng được ưu tiên, thì cường độ đỉnh bị thay đổi, nhưng các vị trí đỉnh đặc trưng của dạng đa hình là không thay đổi. Xin xem, *ví dụ*, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995. Ngoài ra, cũng đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì các vị trí đỉnh ở góc có thể thay đổi một chút. Ví dụ, các vị trí đỉnh có thể bị dịch chuyển do sự thay đổi nhiệt độ hoặc độ ẩm mà tại đó mẫu được phân tích, sự dịch chuyển mẫu hoặc sự có mặt hay không có mặt của chất nội chuẩn. Trong trường hợp này, độ sai khác vị trí đỉnh $\pm 0,2$ ở 2θ sẽ tính đến các biến đổi khả dĩ này mà không ảnh hưởng đến việc nhận dạng một cách rõ ràng dạng tinh thể được chỉ ra. Việc khẳng định dạng tinh thể có thể được thực hiện dựa vào tổ hợp duy nhất bất kỳ gồm các đỉnh khác biệt (theo đơn vị ° 2θ), điển hình là các đỉnh nổi bật hơn. Điều chỉnh nhiễu xạ đồ dạng tinh thể, thu thập được ở nhiệt độ trong phòng và độ ẩm tương đối, dựa trên các đỉnh tiêu chuẩn NIST 675 ở 8,853 và 26,774 độ 2θ .

Mẫu hemi-edisylat hydrat dạng tinh thể đã được chuẩn bị được mô tả đặc trưng bởi nhiễu xạ đồ XRD sử dụng bức xạ CuK α là có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2-theta) như được mô tả trong bảng dưới đây, và cụ thể là có một đỉnh ở 18,5° kết

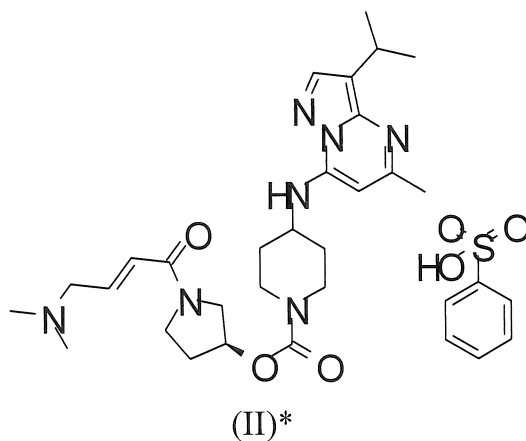
hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm 21,5°, 16,7°, và 15,2°; với dung sai đối với các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Các đỉnh nhiễu xạ tia X qua mẫu bột của hemi-edisylat hydrat dạng tinh thể

Hemi-edisylat hydrat dạng tinh thể		
Đỉnh	Góc ($^{\circ}$ 2-Theta) $\pm$ 0,2 $^{\circ}$	Cường độ tương đối (% so với đỉnh cường độ lớn nhất)
1	7,0	14,90%
2	10,3	36,50%
3	12,6	14,50%
4	15,2	47,70%
5	16,7	58,40%
6	18,5	100,00%
7	19,8	16,10%
8	21,5	63,20%
9	23,2	17,50%
10	24,3	10,90%

Ví dụ 5

Tổng hợp [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat besylat dạng tinh thể



[*Lưu ý rằng như được chỉ ra ở đây trong ví dụ 5, tâm bất đối có hướng thay đổi và dạng đồng phân đối ảnh S được mô tả một cách khác biệt hơn so với như được chỉ ra ở các ví dụ trên đây trong cấu trúc (II).] Đưa 1998 mg [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat vào 15 mL axeton đồng thời khuấy ở 1000 rpm ở RT. Bỏ sung 650 mg axit benzensulfonic (hòa tan trong 5 mL axeton). Khuấy mẫu ở 1000 rpm ở RT trong một giờ, và sau một thời gian, dung dịch vẫn đục, và huyền phù đặc chứa chất rắn màu trắng được tạo ra. Tách chất rắn màu trắng bằng cách lọc chân không trên giấy lọc. Làm khô mẫu trong tủ sấy chân không trong 1 giờ ở 70°C (2,23 g, hiệu suất 85%).

Tổng hợp [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat besylat dạng tinh thể

Hòa tan [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-metyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat (440 g, 1,1 mol) trong EtOAc (1,4 L) và axeton (357 mL) ở 15-30°C. Gia nhiệt đến 50-55°C. Hòa tan monohydrat của axit benzensulfonic (156 g, 0,89 đương lượng) trong EtOAc (709 mL) và axeton (166 mL) và bỏ sung vào hỗn hợp phản ứng ở 5-10 mL/phút ở 50-55°C. Khuấy trong 1 giờ. Làm nguội đến 15-30°C và khuấy trong 12 giờ. Lọc và làm khô bánh lọc ướt trong môi trường nitơ để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (525 g, hiệu suất 72,9%). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7,89 (s, 1H), 7,85 – 7,79 (m, 2H), 7,43 – 7,39 (m, 3H), 6,82 – 6,66 (m, 2H), 6,15 (s, 1H), 5,27 (d, J = 21,5 Hz, 1H), 4,11 (d, J = 32,9 Hz, 2H), 3,94 – 3,79 (m, 4H), 3,33 – 3,18 (m, 2H), 3,10-2,97 (m, 2H), 2,84 (s, 6H), 2,49 (s, 3H), 2,25 – 1,94 (m, 5H), 1,68 – 1,51 (m, 2H), 1,31 (d, J = 6,8 Hz, 6H).

Thu được các nhiễu xạ đồ XRD của chất rắn dạng tinh thể về cơ bản là như được mô tả trong ví dụ 4. Mẫu besylat dạng tinh thể đã được chuẩn bị được mô tả đặc trưng bởi nhiễu xạ đồ XRD sử dụng bức xạ CuKα là có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2-theta) như được mô tả trong bảng dưới đây, và cụ thể là có một đỉnh ở 21,5° kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm 12,4°, 17,3°, và 15,8°; với

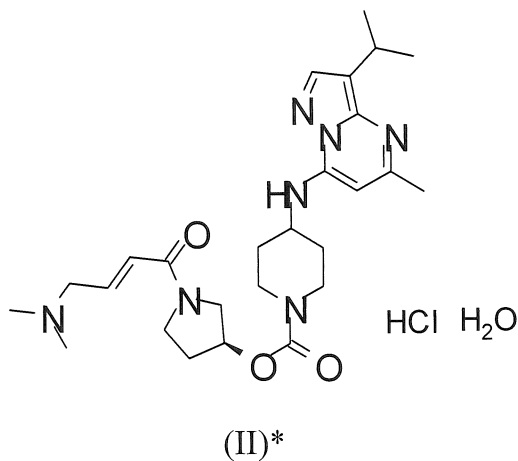
dung sai đối với các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của besylat dạng tinh thể

Besylat dạng tinh thể		
Đỉnh	Góc ($^{\circ}$ 2-Theta) $\pm$ 0,2 $^{\circ}$	Cường độ tương đối (% so với đỉnh cường độ lớn nhất)
1	6,3	46,30%
2	9,5	26,30%
3	10,7	26,30%
4	12,4	98,70%
5	15,8	52,00%
6	16,5	45,20%
7	17,3	56,60%
8	21,5	100,00%
9	23,4	36,80%
10	24,9	32,10%

Ví dụ 6

Tổng hợp [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hydroclorua dạng tinh thể



[*Lưu ý rằng như được chỉ ra ở đây trong ví dụ 6, tâm bất đối có hướng thay đổi và dạng đồng phân đối ảnh S được mô tả một cách khác biệt hơn so với như được chỉ ra ở các ví dụ trên đây trong cấu trúc (II).] Đưa 557 mg [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat vào 4 mL axeton đồng thời khuấy ở 1000 rpm ở RT. Bổ sung 1200 μ L HCl (1M trong etyl axetat, 1,07 đương lượng). Khuấy mẫu ở 1000 rpm qua đêm để thu được huyền phù đặc chứa chất rắn màu trắng. Tách chất rắn màu trắng bằng cách lọc chân không trên giấy lọc. Làm khô bánh lọc thu được chứa chất rắn màu trắng tại chỗ trên thiết bị lọc dưới dòng khí trong 10 phút (385 mg, hiệu suất 64%).

Thu được các nhiễu xạ đồ XRD của chất rắn dạng tinh thể về cơ bản là như được mô tả trong ví dụ 4. Mẫu hydroclorua hydrat dạng tinh thể đã được chuẩn bị được mô tả đặc trưng bởi nhiễu xạ đồ XRD sử dụng bức xạ CuK α là có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2-theta) như được mô tả trong bảng dưới đây, và cụ thể là có một đỉnh ở 18,9° kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm 5,5°, 15,5°, và 9,7°; với dung sai đối với các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Các đỉnh nhiễu xạ tia X qua mẫu bột của hydroclorua dạng tinh thể

Hydroclorua dạng tinh thể		
Đỉnh	Góc ($^{\circ}$ 2-Theta) +/- 0,2 $^{\circ}$	Cường độ tương đối (% so với đỉnh cường độ lớn nhất)
1	5,5	79,40%
2	6,2	54,40%
3	9,2	31,50%
4	9,7	56,10%
5	11,1	26,70%
6	14,2	29,80%
7	15,5	61,70%
8	18,9	100,00%
9	19,5	30,80%
10	23,4	40,40%

Thử nghiệm sinh học

Thử nghiệm sau đây chứng tỏ rằng hợp chất theo sáng chế là chất ức chế hoạt tính CDK7. Kết quả của các thử nghiệm này cũng chỉ ra rằng hợp chất theo sáng chế ức chế quá trình truyền tín hiệu CDK7 ở các tế bào ung thư. Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế ức chế sự tăng sinh các dòng tế bào ung thư và sự sinh trưởng khối u ở mô hình khối u ghép dị loài của bệnh ung thư.

“IC₅₀” dùng để chỉ nồng độ của một chất mà tạo ra 50% đáp ứng ức chế tối đa có thể có đối với chất này hoặc, theo cách khác, dùng để chỉ nồng độ của một chất mà tạo ra 50% sự thay thế của phối tử gắn kết đặc hiệu với thụ thể này; Các trị số IC₅₀ tương đối được xác định bằng cách sử dụng thiết bị phát huỳnh quang bằng cách tính toán mức ức chế theo phần trăm đối với các mẫu đối chứng “MIN” và “MAX” trên đĩa và sau đó làm khớp mười điểm dữ liệu đáp ứng liều lượng với phương trình logic bốn thông số.

Thử nghiệm hoạt tính CDK7 và CDK9 Kinaza

Mục đích của thử nghiệm này là để xác định khả năng của hợp chất theo sáng chế đối với việc ức chế hoạt tính kinaza phức CDK7/CyclinH/Mat1. Để chứng minh xem liệu các hợp chất được bao hàm trong sáng chế có thể hiện ái lực bất kỳ đối với CDK7, CDK7 và CDK9, thử nghiệm hóa sinh được thực hiện mà không ủ sơ bộ enzyme với hợp chất hoặc có ủ sơ bộ trong 3 giờ. Các thử nghiệm chức năng đưa ra chứng cứ về việc liệu các hợp chất theo sáng chế có thể hiện khả năng ức chế hoạt tính CDK7 và CDK9 kinaza hay không. Tất cả các phối tử, dung môi, và chất phản ứng được sử dụng trong các thử nghiệm sau đây là sẵn có từ các nguồn thương mại, hoặc có thể dễ dàng được tổng hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Việc xác định IC₅₀ đối với CDK7 và CDK9 được xác định như sau.

Thử nghiệm hóa sinh đối với sự ức chế của CDK7/CyclinH/MAT1

Hoạt tính IC₅₀ của chất ức chế được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết lọc (FB - filter binding) nhãn phóng xạ sử dụng enzyme tái tổ hợp ở người đã được tinh chế với sự có mặt của ATP/[³³P]ATP và cơ chất peptit. Các nồng độ ATP được chọn là ở hoặc ở gần Km enzyme đối với ATP.

Các phản ứng được thực hiện trong các đĩa polystyren 96 lỗ trong thể tích cuối là 25 μL mỗi lỗ. Trộn lần 5 μL hợp chất thử nghiệm trong 20% DMSO, 10 μL dung dịch cơ chất (cuốn theo ATP/33PATP và CDK7/9) và 10 μL dung dịch enzym. Dung dịch cơ chất được chuẩn bị để tạo ra nồng độ cuối là 100 μM ATP/[^{33}P]ATP (NEN 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$, 3000 Ci/mmol) và 250 μM CDK7/9 peptit ((YSPTSPSYPTSPSYPTSPSKKKK) (SEQ ID NO: 1)) được pha loãng trong dung dịch đệm kinaza chứa 4 mM MgCl_2 , 0,01% TRITONTM X-100, 2 mM DTT và 20 mM HEPES. Dung dịch enzym được điều chế đến nồng độ cuối là 1nM enzym CDK7/CyclinH/Mat1 [Prokinase 0366-0360-4 Lot 002)] được pha loãng trong dung dịch đệm kinaza. Hợp chất thử nghiệm được pha loãng 1:3 theo dãy nồng độ trong 20% DMSO để tạo ra đường cong 10 điểm ở nồng độ ban đầu 20 μM . Dung dịch đệm DMSO 20% riêng rẽ không chứa hợp chất thử nghiệm được dùng làm đối chứng cao (hoạt tính đầy đủ khi không có mặt chất ức chế bất kỳ), 500 mM EDTA được dùng để xác định mức đường nền khi không có mặt hoạt tính enzym (đối chứng thấp). Sau khi trộn 5 μL hợp chất với 10 μL dung dịch enzym, đĩa được ủ trong 0 hoặc 180 phút ở 22°C. Sau thời gian này, phản ứng được khởi đầu bằng cách bổ sung 10 μL dung dịch cơ chất và ủ trong 50 phút ở 22°C. Phản ứng được chấm dứt bằng cách bổ sung 80 μL dung dịch orthophosphoric 10% lạnh. Đĩa lọc (đĩa lọc đục, không vô trùng) được rửa trước bằng 10 μL dung dịch orthophosphoric 10% mỗi lỗ. 100 μL hỗn hợp được chuyển đến thiết bị lọc phosphoxenuloza và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 45 phút. Các đĩa lọc được rửa bằng 200 μL axit orthophosphoric 0,5% 3 lần trên thiết bị xử lý đĩa lọc. Sự kết hợp của ^{33}Pi (được đếm theo “cpm”) được xác định bằng cách bổ sung 80 μL MICROSCINTTM vào mỗi lỗ và đọc trên thiết bị đếm sau một giờ. Dữ liệu được xử lý nhờ công cụ GENEDATA SCREENER[®]. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương trình logic không tuyến tính 4 thông số (đường cong đáp ứng theo nồng độ logic bốn thông số): $Y = \text{đáy} + [(\text{đỉnh} - \text{đáy}) / (1 + (x / \text{IC}_{50})^{\text{độc}})]$ trong đó $Y = \%$ ức chế, $X = \text{nồng độ tạo ra sự ức chế } y\%$, Đáy = giá trị tối thiểu của y đạt được bởi đường cong, Đỉnh = giá trị tối đa của y đạt được bởi đường cong và Độc = độ dốc của đường cong ở IC_{50} . $\% \text{Ức chế} = [(\text{Cực đại trung tuyến} - x / \text{Cực đại trung tuyến} - \text{Cực tiểu trung tuyến})] \cdot 100$

IC₅₀: nồng độ của hợp chất làm giảm đáp ứng đã cho (liên kết phối tử, đáp ứng enzym) đi 50%.

Các hợp chất được mô tả trong các ví dụ 1 và 3 thể hiện IC₅₀ bằng 0,0173 μ M và 0,0487 μ M ở CDK7 không ủ sơ bộ, tương ứng. Sau 3 giờ ủ sơ bộ enzym CDK7 bằng hợp chất nêu ở các ví dụ 1 và 3, chúng thể hiện IC₅₀ bằng 0,00237 μ M và 0,00506 μ M, tương ứng. Dữ liệu này chỉ ra rằng các hợp chất ở các ví dụ 1 và 3 đều ức chế CDK7.

Thử nghiệm ức chế hoạt tính CDK9/CyclinT1 kinaza:

Hoạt tính IC₅₀ của chất ức chế được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm gắn kết lọc đánh dấu phóng xạ (FB) sử dụng enzym tái tổ hợp ở người đã được tinh chế với sự có mặt của ATP và cơ chất peptit. Các nồng độ ATP được chọn là ở hoặc ở gần K_m enzym đối với ATP. Các phản ứng được thực hiện trong các đĩa polystyren 96 lỗ trong thể tích cuối là 25 μ L mỗi lỗ. Trộn lẫn 5 μ L hợp chất thử nghiệm trong 20% DMSO, 10 μ L dung dịch cơ chất (cuộn theo ATP/[³³P]ATP và CDK7/9) và 10 μ L dung dịch enzym. Dung dịch cơ chất được chuẩn bị để tạo ra nồng độ cuối là 100 μ M ATP/[³³P]ATP (NEN 10uCi/ μ L, 3000 Ci/mmol) và 200 μ M CDK7/9 peptit ((YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (SEQ ID NO: 1)) được pha loãng trong dung dịch đệm kinaza chứa 4 mM MgCl₂, 0,0025% TRITON™ X-100, 1,58 mM DTT và 15,80 mM HEPES. Dung dịch enzym được điều chế đến nồng độ cuối là 7,5 nM enzym CDK9/cyclinT1 [Prokinase 0371-0345-1 (Lot 004)] được pha loãng trong dung dịch đệm kinaza. Các hợp chất thử nghiệm được pha loãng 1:3 theo dãy nồng độ trong 20% DMSO để tạo ra đường cong 10 điểm ở nồng độ ban đầu 20 μ M. Dung dịch đệm DMSO 20% riêng rẽ không chứa hợp chất thử nghiệm được dùng làm đối chứng cao (hoạt tính đầy đủ khi không có mặt chất ức chế bất kỳ), 500 mM EDTA được dùng để xác định mức đường nền khi không có mặt hoạt tính enzym (đối chứng thấp). Sau khi trộn 5 μ L hợp chất với 10 μ L dung dịch enzym, đĩa được ủ trong 0 hoặc 180 phút ở 22°C. Sau thời gian này, phản ứng được khởi đầu bằng cách bổ sung 10 μ L dung dịch cơ chất và ủ trong 60 phút ở 22°C. Phản ứng được chấm dứt bằng cách bổ sung 80 μ L dung dịch ortophosphoric 10% lạnh. Các đĩa lọc (đĩa lọc đục không vô trùng) được rửa trước bằng 10 μ L dung dịch

orthophosphoric 10% mỗi lỗ. 100 μ L hỗn hợp được chuyển đến thiết bị lọc phosphoxenluloza và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 45 phút. Các đĩa lọc được rửa bằng 200 μ L axit orthophosphoric 0,5% 3 lần trên thiết bị xử lý đĩa lọc. 80 μ L MICROSCINT™ được bổ sung vào mỗi lỗ và đọc trên thiết bị đếm sự phóng xạ của chất điện ly sau một giờ. Dữ liệu được xử lý nhờ công cụ GENEDATA - SCREENER®. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương trình logic không tuyến tính 4 thông số (đường cong đáp ứng theo nồng độ logic bốn thông số): $Y = \text{đáy} + [(\text{đỉnh}-\text{đáy}) / (1 + (x / IC_{50})^{\text{dốc}})]$ trong đó $Y = \%$ ức chế, $X = \text{nồng độ tạo ra sự ức chế } y\%$, Đáy = giá trị tối thiểu của y đạt được bởi đường cong, Đỉnh = giá trị tối đa của y đạt được bởi đường cong và Dốc = độ dốc của đường cong ở IC_{50} . $\% \text{Ức chế} = [(Cực đại trung tuyến - x / Cực đại trung tuyến - Cực tiểu trung tuyến)] \cdot 100$ IC_{50} : nồng độ của hợp chất mà làm giảm đáp ứng cho trước (liên kết phối tử, đáp ứng enzym) đi 50%. IC_{50} tương đối: nồng độ tạo ra một nửa đáp ứng cực đại của hợp chất.

Các hợp chất được mô tả trong các ví dụ 1 và 3 thể hiện IC_{50} bằng 5,93 μ M và 2,45 μ M đối với CDK9 (ủ sơ bộ 3 giờ), tương ứng. Dữ liệu này chỉ ra rằng các hợp chất ở các ví dụ 1 và 3 không ức chế tiềm năng hoạt tính CDK9.

Cùng nhau, dữ liệu từ các thử nghiệm nêu trên chứng tỏ rằng các hợp chất ở các ví dụ 1 và 3 ức chế chọn lọc CDK7 so với CDK9.

Thử nghiệm cơ chế tế bào CDK7 và CDK9

Mục đích của các thử nghiệm này là để xác định khả năng hợp chất ức chế quá trình truyền tín hiệu CDK7 và CDK9 ở các tế bào ung thư *in vitro*.

Thử nghiệm nhạy cảm trên cơ sở tế bào (Rbp2) (Ser2) p-CTD (S2) miền tận cùng phospho-carboxyl

Tế bào HCT116 (ATCC CCL-247) được nuôi cấy trên môi trường được cải biến McCoy's 5A được bổ sung 10% FBS, 1% NaPyr và 1% Pen/Strep và được cấy trên đĩa (trước khi đạt được độ nhập dòng 70%) trên các đĩa 96 lỗ đáy bằng ở mật độ 5.000 tế bào trên mỗi lỗ trong thể tích 100 μ L. Sau đó các tế bào được ủ qua đêm trong tủ ủ nuôi cấy tế bào (5% CO_2 , độ ẩm tương đối 95% (Relative Humidity - RH)

và 37°C) và để gắn vào đĩa. Sáng hôm sau, tế bào được cho dùng liều hợp chất. Các chất ức chế hợp chất trước tiên được hòa tan ở 60 μM trong môi trường nuôi cấy chứa 0,6% DMSO. Sau đó, các dung dịch pha loãng của hợp chất theo dãy nồng độ (1:3) được điều chế trong khoảng từ 60 μM đến 0,003 μM . Tế bào được cho dùng liều bằng cách bổ sung 50 μL từ đĩa pha loãng theo dãy nồng độ để phân tích đĩa chứa tế bào được gắn với 100 μL môi trường tạo ra nồng độ DMSO cuối là 0,2% với khoảng liều lượng nồng độ hợp chất cuối nằm trong khoảng từ 20 đến 0,001 μM . Đối với điểm cực đại, môi trường chứa 0,2% DMSO được sử dụng và đối với điểm cực tiểu, hợp chất tham chiếu được pha loãng ở nồng độ cuối 0,83 μM trong môi trường sinh trưởng chứa 0,2% DMSO được sử dụng. Sau khi dùng liều hợp chất, các đĩa chứa tế bào được ủ ở 37°C và 5% CO_2 trong 4 giờ. Môi trường sinh trưởng được lấy ra một cách cẩn thận và các tế bào được cố định bằng cách bổ sung 100 μL para-formaldehyt 4% trong 30 phút ở RT. Các tế bào được rửa một lần bằng PBS và được ủ với 100 μL MeOH lạnh trong 15 phút ở RT để thấm qua tế bào. Các tế bào được rửa hai lần bằng PBS (100 μL /mỗi lần) và được phong bế bằng 100 μL /lỗ BSA/PBS 1% trong 30 phút ở RT. 50 μL dung dịch pha loãng kháng thể sơ cấp 1:1000 (kháng-phospho CTD Ser2 Abcam, cat# ab5095-100) trong BSA/PBS 1% được bổ sung vào mỗi lỗ, các đĩa được đậy kín và được ủ qua đêm ở 4°C.

Ngày tiếp theo, tế bào được rửa ba lần bằng PBS (100 μL /lỗ) và được ủ với 50 μL /lỗ kháng thể thứ cấp (dung dịch pha loãng 1:2000, IgM dê kháng thể ALEXA FLUOR™ 488) trong PBS trong 1 giờ ở RT. Sau khi rửa 3 lần bằng PBS (100 μL /lỗ), 100 μL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNAaza và dung dịch pha loãng propidi iodua 1:1000 trong PBS được bổ sung vào mỗi lỗ. Các đĩa được đậy và ủ 1 giờ ở RT trên bàn (được bảo vệ khỏi ánh sáng). Các đĩa được phân tích trên Acumen trên FL2 (cường độ trung bình), và FL3 (cường độ tổng). Các đĩa phát huỳnh quang được quét với ACUMEN EXPLORER™ [thiết bị đếm tế bào qua dòng chảy bằng vi đĩa huỳnh quang quét laze được sản xuất bởi TTP LABTECH LTD] để xác định miền tận cùng kháng-phospho-carboxyl ở Serine 2 (pCTD). Việc phân tích hình ảnh được dựa trên các tín hiệu huỳnh quang của tế bào để nhận biết các tế bào dương tính. Các tế bào dương tính pCTD (S2) được nhận biết bằng cường độ trung bình cao hơn ngưỡng từ

500-530. Cường độ tổng ở 575-640 từ propidi iodua/ADN được sử dụng để nhận biết các tế bào riêng rẽ. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính pCTD.

IC₅₀ được xác định bằng cách khớp đường cong với bốn thông số logic đối với mỗi đầu ra có sử dụng GENE DATA™. Các hợp chất được mô tả trong các ví dụ 1 và 3 thể hiện IC₅₀ tương đối >20 μ M và 3,52 μ M đối với phosphoCTD (S2), tương ứng. Dữ liệu này chỉ ra rằng cả ví dụ 1 và 3 đều không ức chế tiềm năng CDK9 trong các tế bào.

Thử nghiệm nhạy cảm trên cơ sở tế bào (Rbp2) (Ser5) p-CTD (S5) miễn tận cùng phospho-carboxyl

Tế bào HCT116 (ATCC CCL-247) được nuôi cấy trên môi trường được cải biến McCoy's 5A được bổ sung 10% FBS, 1% NaPyr và 1% Pen/Strep và được cấy trên đĩa (trước khi đạt được độ nhập dòng 70%) trên các đĩa 96 lỗ đáy bằng ở mật độ 5.000 tế bào trên mỗi lỗ trong thể tích 100 μ L. Các tế bào được ủ qua đêm trong tủ ủ nuôi cấy tế bào (5% CO₂, 95% độ ẩm tương đối (RH) và 37°C) và được để gắn vào đĩa. Sáng hôm sau, tế bào được cho dùng liều hợp chất. Các chất ức chế hợp chất được hòa tan ở 60 μ M trong môi trường nuôi cấy chứa 0,6% DMSO. Sau đó, các dung dịch pha loãng của hợp chất theo dãy nồng độ (1:3) được điều chế trong khoảng từ 60 μ M đến 0,003 μ M. Các tế bào được dùng liều với việc bổ sung 50 μ L từ đĩa pha loãng theo dãy nồng độ để phân tích đĩa chứa tế bào đã được gắn với 100 μ L môi trường tạo ra nồng độ DMSO cuối cùng là 0,2% với khoảng liều lượng nồng độ hợp chất cuối nằm trong khoảng từ 20 đến 0,001 μ M. Đối với điểm cực đại, môi trường chứa 0,2% DMSO được sử dụng và đối với điểm cực tiểu, hợp chất tham chiếu được pha loãng ở nồng độ cuối 0,83 μ M trong môi trường sinh trưởng chứa 0,2% DMSO được sử dụng. Sau khi dùng liều hợp chất, các đĩa chứa tế bào được ủ ở 37°C và 5% CO₂ trong 4 giờ. Môi trường sinh trưởng được lấy ra một cách cẩn thận và các tế bào được cố định bằng cách bổ sung 100 μ L para-formaldehyt 4% trong 30 phút ở RT. Các tế bào được rửa một lần bằng PBS và được ủ với 100 μ L MeOH lạnh trong 15 phút ở RT để thấm qua tế bào. Ngoài ra, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS (100 μ L/mỗi lỗ) và được phong bế bằng 100 μ L/lỗ BSA/PBS 1% trong 30 phút ở RT. 50 μ L dung dịch pha loãng kháng thể sơ cấp 1:1000 (kháng-phosphoCTD Ser5

Bethyl Laboratories cat# A300-655A) trong BSA/PBS 1% được bổ sung vào mỗi lỗ, các đĩa được đậy và ủ qua đêm ở 4°C.

Ngày tiếp theo tế bào được rửa ba lần bằng PBS (100 μ L/lỗ) và được ủ với 50 μ L/lỗ kháng thể thứ cấp (dung dịch pha loãng 1:2000, IgM dê kháng thể ALEXA FLUOR™ 488) trong PBS trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa 3 lần bằng PBS (100 μ L/lỗ), 100 μ L 50 μ g/mL RNaza (Sigma) và dung dịch pha loãng propidi iodua 1:1000 trong PBS được bổ sung vào mỗi lỗ. Các đĩa được đậy và ủ trong 1 giờ ở RT trên bàn (được bảo vệ khỏi ánh sáng). Các đĩa được phân tích trên Acumen trên FL2 (cường độ trung bình), và FL3 (cường độ tổng). Các đĩa phát huỳnh quang được quét với ACUMEN EXPLORER™ [thiết bị đếm tế bào qua dòng chảy bằng vi đĩa huỳnh quang quét laze được sản xuất bởi TTP LABTECH LTD] để xác định miền tận cùng kháng-phospho-carboxyl ở Serine 5 (pCTD). Việc phân tích hình ảnh được dựa trên các tín hiệu huỳnh quang của tế bào để nhận biết các tế bào dương tính. Các tế bào dương tính pCTD (S5) được nhận biết bằng cường độ trung bình cao hơn ngưỡng từ 500-530. Cường độ tổng ở 575-640 từ propidi iodua/ADN được sử dụng để nhận biết các tế bào riêng rẽ. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính pCTD. IC₅₀ được xác định bằng cách khớp đường cong với bốn thông số logic đối với mỗi đầu ra có sử dụng GENE DATA™.

Các hợp chất được mô tả trong các ví dụ 1 và 3 thể hiện IC₅₀ tương đối bằng 0,148 μ M và 0,198 μ M đối với pCTD Ser5, tương ứng. Dữ liệu này chỉ ra rằng cả ví dụ 1 và 3 ức chế hoạt tính tế bào CDK7.

Thử nghiệm nhạy cảm trên cơ sở tế bào cMyc

Tế bào HCT116 (ATCC CCL-247) được nuôi cấy trên môi trường được cải biến McCoy's 5A được bổ sung 10% FBS, 1% NaPyr và 1% Pen/Strep và được cấy trên đĩa (trước khi đạt được độ nhập dòng 70%) trên các đĩa 96 lỗ đáy bằng ở mật độ 5.000 tế bào trên mỗi lỗ trong thể tích 100 μ L. Sau đó các tế bào được ủ qua đêm trong tủ ủ nuôi cấy tế bào (5% CO₂, độ ẩm tương đối 95% (Relative Humidity - RH) và 37°C) và để gắn vào đĩa. Sáng hôm sau, tế bào được cho dùng liều hợp chất. Các chất ức chế hợp chất được hòa tan ở 60 μ M trong môi trường nuôi cấy chứa 0,6%

DMSO. Sau đó, các dung dịch pha loãng của hợp chất theo dãy nồng độ (1:3) được điều chế trong khoảng từ 60 μM đến 0,003 μM . Các tế bào được dùng liều với việc bổ sung 50 μL từ đĩa pha loãng theo dãy nồng độ để phân tích đĩa chứa tế bào đã được gắn với 100 μL môi trường tạo ra nồng độ DMSO cuối cùng là 0,2% với khoảng liều lượng nồng độ hợp chất cuối nằm trong khoảng từ 20 μM đến 0,001 μM . Đối với điểm cực đại, môi trường chứa 0,2% DMSO được sử dụng và đối với điểm cực tiểu, hợp chất tham chiếu được pha loãng ở nồng độ cuối 0,83 μM trong môi trường sinh trưởng chứa 0,2% DMSO được sử dụng. Sau khi dùng liều hợp chất, các đĩa chứa tế bào được ủ ở 37°C và 5% CO_2 trong 4 giờ. Môi trường sinh trưởng được lấy ra một cách cẩn thận và các tế bào được cố định bằng cách bổ sung 100 μL para-formaldehyt 4% trong 30 phút ở RT. Các tế bào được rửa một lần bằng PBS và được ủ với 100 μL MeOH lạnh trong 15 phút ở RT để thấm qua tế bào. Ngoài ra, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS (100 μL /mỗi lần) và được phong bế bằng 100 μL /lỗ BSA/PBS 1% trong 30 phút ở RT. 50 μL dung dịch pha loãng kháng thể sơ cấp 1:1000 (kháng thể kháng-c-Myc [Y69] Abcam, cat# ab32072) trong BSA/PBS 1% được bổ sung vào mỗi lỗ, các đĩa được đậy kín và được ủ qua đêm ở 4°C. Ngày tiếp theo, tế bào được rửa ba lần bằng PBS (100 μL /lỗ) và được ủ với 50 μL /lỗ kháng thể thứ cấp (dung dịch pha loãng 1:2000, IgM dê kháng thể ALEXA FLUOR™ 488) trong PBS trong 1 giờ ở RT. Sau khi rửa 3 lần bằng PBS (100 μL /lỗ), 100 μL RNAase 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và dung dịch pha loãng propidi iodua 1:1000 (Invitrogene) trong PBS được bổ sung vào mỗi lỗ. Các đĩa được đậy và ủ trong 1 giờ ở RT trên bàn (được bảo vệ khỏi ánh sáng). Các đĩa được phân tích trên Acumen trên FL2 (cường độ trung bình), và FL3 (cường độ tổng). Các đĩa phát huỳnh quang được quét với ACUMEN EXPLORER™ [thiết bị đếm tế bào qua dòng chảy bằng vi đĩa huỳnh quang quét laze được sản xuất bởi TTP LABTECH LTD] để xác định miền tận cùng kháng-phospho-carboxyl ở Serine 5 (pCTD). Việc phân tích hình ảnh được dựa trên các tín hiệu huỳnh quang của tế bào để nhận biết các tế bào dương tính. Các tế bào dương tính pCTD (S5) được nhận biết bằng cường độ trung bình cao hơn ngưỡng từ 500-530. Cường độ tổng ở 575-640 từ propidi iodua/ADN được sử dụng để nhận biết các tế bào riêng rẽ. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính pCTD. IC_{50} được xác định bằng cách khớp đường cong với bốn thông số logic đối với mỗi đầu ra có sử

dụng GENE DATA™.

Các hợp chất được mô tả trong các ví dụ 1 và 3 thể hiện IC₅₀ tương đối bằng 0,0828 μ M và 0,0573 μ M đối với cMyc. Dữ liệu này chỉ ra rằng các hợp chất ở cả ví dụ 1 và 3 ức chế sự phiên mã của cMyc ở các tế bào HCT116.

Thí nghiệm profile chọn lọc: Profile Prokinaza WT

Profile ức chế kinaza của hợp chất được xác định bằng cách xác định các giá trị hoạt tính còn lại ở các nồng độ trong mẫu đơn lẻ trong thử nghiệm 320 protein kinaza kiểu đại. Các hợp chất được thử nghiệm ở 20 μ M, 2 μ M, 0,2 μ M và 0,02 μ M trong mẫu đơn lẻ. Nồng độ DMSO cuối cùng trong tất cả các hỗn hợp phản ứng (bao gồm các mẫu đối chứng cao và thấp) là 1%.

Thử nghiệm protein kinaza

Thử nghiệm đo phóng xạ protein kinaza (Thử nghiệm hoạt tính 33PANQINASE®, ProQinase) được sử dụng để xác định hoạt tính kinaza của 320 protein kinaza. Tất cả các thử nghiệm kinaza được tiến hành trong đĩa 96 lỗ FLASHPLATES™ trong thể tích phản ứng 50 μ L. Hỗn hợp phản ứng được hút bằng pipet làm 4 bước theo thứ tự sau:

1. 10 μ L dung dịch ATP không phóng xạ (trong H₂O)
2. 25 μ L dung dịch đệm thử nghiệm/ hỗn hợp [γ -33P]-ATP
3. 5 μ L mẫu thử nghiệm trong 10% DMSO
4. 10 μ L hỗn hợp enzym/cơ chất

Thử nghiệm đối với tất cả các protein kinaza chứa 70 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μ M Na-orthovanadat, 1,2 mM DTT, ATP (lượng có thể thay đổi, tương ứng với ATP-Km biểu kiến của kinaza tương ứng, xem bảng 1), [γ -33P]-ATP (khoảng 8 x 1005 cpm mỗi lỗ), protein kinase (lượng có thể thay đổi; xem bảng 1), và cơ chất (lượng có thể thay đổi; xem bảng 1). Tất cả các thử nghiệm PKC (ngoại trừ thử nghiệm PKC-mu và PKC-nu) còn bao gồm 1 mM CaCl₂, 4 mM EDTA, 5 μ g/mL Phosphatidylserin và 1 μ g/mL 1,2-Dioleoyl-glycerol. Các thử nghiệm CAMK1D, CAMK2A, CAMK2B, CAMK2D, CAMK2G, CAMK4,

CAMKK1, CAMKK2, DAPK2,EEF2K, MYLK, MYLK2 và MYLK3 còn bao gồm 1 $\mu\text{g/mL}$ Calmodulin và 0,5 mM CaCl_2 . Thử nghiệm PRKG1 và PRKG2 còn bao gồm 1 μM cGMP. Thử nghiệm DNA-PK còn bao gồm 2,5 $\mu\text{g/mL}$ ADN.

Hỗn hợp phản ứng protein kinaza được ủ ở 30 °C trong 60 phút. Dừng phản ứng bằng 50 μL 2% (v/v) H_3PO_4 , các đĩa được hút chất lỏng và được rửa hai lần bằng 200 μL 0,9% (w/v) NaCl. Sự kết hợp của ^{33}Pi (đếm theo “cpm”) được xác định bằng thiết bị đếm sự phóng xạ của chất điện ly trong vi đĩa. Tất cả các thử nghiệm protein kinaza được thực hiện với hệ thống robot BeckmanCoulter BIOMEK® 2000/SL. Tất cả các protein kinaza được cung cấp bởi ProQinase được biểu hiện ở các tế bào côn trùng Sf9 hoặc ở *E.coli* dưới dạng protein dung hợp GST tái tổ hợp hoặc protein được gắn nhãn His, hoặc ở dạng có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn có hoạt tính enzym. Tất cả các kinaza được sản xuất từ các ADN bổ trợ và được tinh chế bằng sắc ký ái lực GSH hoặc kim loại được cố định. Nhãn ái lực được loại ra từ một số kinaza trong quá trình tinh chế. Việc tinh chế protein kinaza được xét nghiệm bằng cách nhuộm SDS-PAGE/Coomassie, việc nhận biết được kiểm tra bằng phổ khối. Kinaza từ nhà cung cấp bên ngoài (CAR = Carma Biosciences Inc.; INV = Life Technologies (Invitrogen Corporation™); MIL = Merck-Millipore (Millipore Corporation™), xem bảng 1) được biểu hiện, tinh chế và kiểm tra chất lượng bởi các tài liệu của nhà cung cấp. Nồng độ của các enzym và cơ chất đối với các thử nghiệm được chỉ ra trong bảng 1.

Đánh giá dữ liệu thô

Đối với mỗi kinaza, giá trị trung bình của cpm của ba lỗ được xác định là "đối chứng thấp" (n=3). Giá trị này ảnh hưởng đến việc gắn kết không đặc hiệu của chất có hoạt tính phóng xạ với đĩa khi không có mặt protein kinaza nhưng với sự có mặt của cơ chất. Ngoài ra, đối với mỗi kinaza, giá trị trung bình của cpm của ba lỗ khác được lấy làm "đối chứng cao", nghĩa là hoạt tính đầy đủ khi không có mặt chất ức chế bất kỳ (n=3). Sự khác biệt giữa mẫu đối chứng cao và thấp của mỗi enzym được lấy là hoạt tính 100%. Như một phần của việc đánh giá dữ liệu, đối chứng thấp của mỗi kinaza được trừ đi từ giá trị đối chứng cao cũng như từ "các giá trị hợp chất" tương ứng của chúng. Hoạt tính còn lại (theo %) đối với mỗi hợp chất được tính

bằng cách sử dụng công thức sau: Res. Hoạt tính còn lại (%) = 100 X [(tín hiệu của hợp chất – đối chứng thấp) / (đối chứng cao – đối chứng thấp)]. Các IC₅₀ không tiêu chuẩn được tính bằng cách sử dụng bảng tính excel tùy biến cùng với XLFit Add-in. Do số điểm dữ liệu thấp, (4) XL-Fit tính toán IC₅₀ không tiêu chuẩn bằng cách sử dụng phương trình bốn thông số trong đó ba thông số được chốt ở các giá trị cố định.

Phương trình là:

$$Y=B+((A-B))/ [1+(x/C)] ^D$$

A: Giá trị cực tiểu của hoạt tính, Còn được biết đến như là giá trị đáy. Được cố định ở 0

B: Giá trị cực đại của hoạt tính, Còn được biết đến như là giá trị đỉnh. Được cố định ở 100

C: Điểm uốn của đường cong

D: Độ dốc Hill. Được cố định ở 1

Y: Biến phụ thuộc (nghĩa là biến mà có thể đo ở dạng tín hiệu)

X: Biến độc lập (nghĩa là biến mà có thể điều chỉnh, như, liều lượng, nồng độ, v.v.)

Cách tính IC₅₀ không tiêu chuẩn là chỉ định các giá trị ngẫu nhiên cho thông số C và lặp đi lặp lại bước này. Sau đó thuật toán này xác định sự chênh lệch về tổng bình phương số dư và tìm kiếm các lần lặp liên tiếp ở đó sự thay đổi số dư được hội tụ. Khi đạt đến giới hạn hội tụ, dung dịch được đề cập đến như là tối ưu và quá trình làm khớp thông số kết thúc.

CDK12 và CDK13 (ProQinase) được thử nghiệm về cơ bản như trên nhưng riêng biệt ở 10 nồng độ (2 x 10⁵ M đến 6 x 10¹⁰ M) bằng cách sử dụng các dung dịch pha loãng nửa-logarit. Đối với 10 điểm, phân tích hoạt tính còn lại đối với mỗi nồng độ và các giá trị IC₅₀ của hợp chất được tính bằng cách sử dụng QUATTRO® WORKFLOW™ V3.1.1. Mô hình phù hợp để xác định IC₅₀ là "Đáp ứng xích-ma (độ dốc thay đổi)" với các thông số "đỉnh" được cố định ở 100% và "đáy" ở 0%.

Phương pháp phù hợp được sử dụng là phương pháp làm khớp bình phương tối thiểu. Dữ liệu được chỉ ra trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Kinaza	Kinaza	Nồng độ kinaza	Nồng độ ATP	Cơ chất	Cơ chất	IC50
Tên	Họ	nM	μM	Tên	μg/50μL	μM
CDK7/CycH/MAT1	CMGC	3,3	3	RBER-CHKtide	2	0,0928
CDK9/CycT1	CMGC	2,2	1	RBER-CHKtide	2	6,32
CDK1/CycB1	CMGC	7	1	RBER-CHKtide	2	20,000
CDK2/CycE1	CMGC	1,5	1	RBER-CHKtide	1	20,000
CDK4/CycD1	CMGC	3,3	3	RBER-CHKtide	2	2,830
CDK6/CycD1	CMGC	3,2	3	RBER-CHKtide	2	8,079
CDK8/CycC	CMGC	8,3	1	RBER-IRStide	1	10,922
CDK16/CycY	CMGC	3,2	0,3	GSK3(14-27)	2	9,073
CDK19/CycC	CMGC	30,9	3	RBER-IRStide	2	7,414
CDK12/CycK	CMGC	14,7	0,3	RBER-IRStide	2	14,780
CDK13/CycK	CMGC	29,2	0,3	RBER-CDC25tide	1	20,000

Dữ liệu này chỉ ra rằng hợp chất ở ví dụ 1 là cực kỳ chọn lọc đối với CDK7 từ nhóm kinaza điển hình.

Thử nghiệm tăng sinh tế bào

Dữ liệu trong bảng 2 chỉ ra rằng hợp chất ở ví dụ 1 ức chế sự tăng sinh và khả năng sống sót của các dòng tế bào ung thư được định rõ. Các dòng tế bào được cấy trên đĩa ở mật độ 5000 tế bào trên mỗi lỗ trong 100 μL môi trường sinh trưởng mỗi lỗ vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ màu trắng. Xem bảng 2 về thông tin môi trường nuôi cấy và dòng tế bào. Các đĩa được ủ ở 37 °C và 5% CO_2 . Ngày tiếp theo, dung dịch pha loãng theo dãy nồng độ của hợp chất thử nghiệm được điều chế bằng cách pha loãng hợp chất 1:3 trong DMSO đối với 10 điểm. Đĩa DMSO có nồng độ cuối được pha loãng 1000 lần. Ngoài chất ức chế CDK7, cột DMSO đơn lẻ được bao gồm ở dạng mẫu đối chứng sinh trưởng cực đại và cột cuối cùng 10 μM staurosporine được bao gồm ở dạng mẫu đối chứng ức chế sinh trưởng cực đại. Sau đó, đĩa pha loãng 10 lần được điều chỉnh bằng cách bổ sung 2 μL mỗi lỗ từ đĩa DMSO được pha loãng 1000 lần vào 198 μL OMEM mỗi lỗ (Life Technologies, Carlsbad, CA, cat#31985-070). Các tế bào được xử lý bằng hợp chất đã chỉ ra bằng cách bổ sung 11 μL mỗi lỗ từ đĩa 10X OMEM vào đĩa tế bào chứa 100 μL môi trường sinh trưởng mỗi lỗ đối với nồng độ cuối 1X. Các đĩa được đặt trở lại vào tủ ủ ở 37°C và 5% CO_2 . Bảy ngày sau khi bổ sung hợp chất, các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và được để cân bằng đến RT. Chất phản ứng CELL TITER GLO® được làm tan giá ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được điều chế bằng cách trộn một lọ dung dịch đệm thử nghiệm với một lọ cơ chất và xoay nhẹ để trộn. Tiếp theo, chất phản ứng CELL TITER GLO® được bổ sung vào đĩa chứa tế bào, 100 μL mỗi lỗ, và đặt vào thiết bị lắc đĩa chuẩn độ (Titer Plate Shaker) ở tốc độ đặt ở mức 2 trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau 15 phút ủ ở thiết bị lắc, đọc sự phát quang, 1 giây mỗi lỗ, bằng cách sử dụng Wallac VICTOR2™. Các đường cong đáp ứng liều xích-ma và hồi quy không tuyến tính được sử dụng để tính toán nồng độ ức chế nửa cực đại (IC_{50}) với phần mềm Graphpad Prism 6.

Bảng 2

Dòng tế bào	Mô học	IC ₅₀ (μM)	Số catalog	Thông tin môi trường
HCT116	Bệnh ung thư đại trực tràng	0,04601	ATCC# CCL-247	McCoy's 5A (Gibco 16600) + 10% FBS (Hyclone SH30071.03)
MCF7	Bệnh ung thư vú	0,03201	ATCC# HTB-22	RPMI 1640 với L-Glutamin (Gibco 11875)+ 10% FBS (Hyclone SH30071,03)
HCC1806	Bệnh ung thư vú	0,02553	ATCC# CRL-2335	RPMI 1640 với HEPES & L-Glutamin (Gibco 22400)+ 10% FBS (Gibco cat#10082)
NCI-H460	Bệnh ung thư phổi	0,0479	ATCC# HTB-177	RPMI 1640 với HEPES & L-Glutamin (Gibco 22400)+ 10% FBS (Gibco cat#10082)
NCI-H446	Bệnh ung thư phổi	0,01419	ATCC# HTB-171	RPMI 1640 với HEPES & L-Glutamin (Gibco 22400)+ 1mM natri pyruvat (Gibco 11360) + 10% FBS (Hyclone SH30071,03)
A2780	Bệnh ung thư buồng trứng	0,02651	ATCC# CRL-2772	RPMI 1640 với L-Glutamin (Gibco 11875)+ 10% FBS (Hyclone SH30071,03)
SNU-16	Bệnh ung thư dạ dày	0,02312	ATCC# CRL-5974	RPMI 1640 với HEPES & L-Glutamin (Gibco 22400)+ 1mM natri pyruvat (Gibco 11360) + 10% FBS (Hyclone SH30071,03)

Dữ liệu này chỉ ra rằng hợp chất ở ví dụ I ức chế sự sinh trưởng *in vitro* của các dòng tế bào ung thư từ nhiều mô khác nhau bao gồm ruột kết, vú, phổi, buồng trứng và dạ dày, theo cách phụ thuộc liều.

Mô hình khối u ghép dị loài

Mục đích của thử nghiệm này là để xác định sự giảm thể tích khối u khi đáp ứng với hợp chất ở ví dụ 1. Để đánh giá hiệu lực in vivo của hợp chất thử nghiệm, nhiều mô hình khối u ghép dị loài được sử dụng. Tóm lại, $5-10 \times 10^6$ tế bào khối u trong hỗn hợp MATRIGEL® 1:1 (tổng thể tích 0,2 mL) được tiêm dưới da vào chuột cái trụi lông thiếu tuyến ức (Envigo, Harlan laboratories) đối với phần lớn mô hình khối u ghép dị loài. Các giống chuột nhắt thay thế được sử dụng để thiết lập các mảnh ghép dị loài MDAMB468 (NOD SCID Gamma, Jackson labs), CT26 và EMT6 (BALB/c, Envigo, Harlan Laboratories). Sau khi để các khối u đạt đến kích thước mong muốn $\sim 300-500 \text{ mm}^3$, chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm gồm 6-8 con để nghiên cứu hiệu lực. Hợp chất thử nghiệm được cho dùng bằng ống thông qua đường miệng (PO) ở các liều dùng và chế độ liều đã được chỉ ra. Sự sinh trưởng khối u và thể trọng được giám sát theo thời gian để đánh giá hiệu lực và các dấu hiệu liên quan đến tính độc.

Hợp chất thử nghiệm được bào chế trong 5% N-metyl-2-pyrrolidon (NMP) trong 1% hydroxyethylxenluloza, 0,25% polysorbate 80, 0,05% chất chống tạo bọt trong nước tinh khiết (HEC) và được dùng bằng ống thông qua đường miệng (thể tích cuối 0,2 mL) ở các liều lượng được chỉ ra trong bảng 4. Hợp chất thử nghiệm được bào chế hằng tuần và được bảo quản ở 4°C. Các chất dẫn thuốc được dùng cho các nhóm đối chứng theo phác đồ được sử dụng trên đây bằng cách sử dụng thể tích 0,2 mL mỗi liều. Chuột được cho dùng liều bằng ống thông qua đường miệng và các mẫu khối u được thu gom ở thời điểm kết thúc và được bảo quản ở -80°C.

Kích thước khối u và thể trọng được ghi lại và được phân tích hai tuần một lần. Máu được thu gom bằng cách sử dụng thẻ DBS (vết máu khô) 2 giờ sau khi dùng liều và ở thời điểm kết thúc. Các khối u được thu gom ở thời điểm kết thúc nghiên cứu, được cắt thành 3 phần và được làm lạnh đột ngột để tiếp xúc với điều kiện của môi trường và phân tích protein, hoặc được đặt trong RNeasy lysis buffer để phân tích ARN. Các mẫu khối u được làm lạnh đông và được bảo quản ở -80°C.

Hợp chất ở ví dụ 1 biểu thị hoạt tính chống khối u đáng kể ở các mô hình ghép dị loài ung thư ở người (Bảng 3).

Bảng 3: Tóm tắt về hiệu quả đơn chất nêu trong ví dụ 1 *in-vivo* ($\Delta T/C$) trên nhiều mô hình khối u ghép dị loài được thử nghiệm ở các mức liều khác nhau như đã chỉ ra.

Mô hình	Mô học	Các đột biến	Liều lượng hợp chất nêu trong ví dụ 1 (mg/kg)	Phác đồ	Trung bình $\Delta T/C$
A2780	Buồng trứng	ARID1A	20	QDx35	-41
COLO205	Buồng trứng		20	QDx28	-4
CT26	Đại trực tràng		20	QDx24	52
EMT6	Vú		20	QDx28	17
H441	Phổi		20	QDx35	0
H460	Phổi	ARID1A	20	QDx35	16
HCC1806	Vú	KMT2C	20	QDx28	-87
HCT116	Đại trực tràng	KMT2C	25	QDx21	-17
MDAMB468	Vú	ARID1A, RB1	20	QDx28	-91
MIAPACA2	Tuyến tụy	ARID1A	20	QDx35	10
MKN45	Dạ dày	KMT2C	20	QDx35	57
MDAMB231	Vú		20	QDx35	-25

Delta T/C (%) được tính toán khi thể tích khối u tới hạn trong nhóm điều trị là ở mức hoặc trên mức thể tích khối u đường cơ sở trên đây. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$. Ở đây, T và C tương ứng là thể tích khối u tới hạn trung bình trong nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng. T₀ và C₀ là thể tích khối u đường cơ sở trung bình trong các nhóm này. *: Có nghĩa ($p < 0,05$)

Nghiên cứu chỉ thị sinh học

Mục đích của nghiên cứu này là để đánh giá các chỉ thị sinh học dự báo tiềm năng đối với các hợp chất theo sáng chế.

Các dòng tế bào ung thư được mô tả sơ lược để đánh giá hoạt tính chống tăng sinh của hợp chất thử nghiệm *in-vitro*. Sự đột biến, số lượng bản sao và thông tin biểu hiện gen của các gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* và/hoặc *RB1* đối với các dòng tế bào ung thư thu được từ cơ sở dữ liệu COSMIC (cancer.sanger.ac.uk) và

cBioportal (<http://www.cbioportal.org/>). Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường sinh trưởng và được cấy vào đĩa 96 lỗ trong 100 μ L môi trường sinh trưởng/lỗ ở mật độ 5000 tế bào/lỗ khi được ủ qua đêm ở 37°C, 5% CO₂. Các tế bào được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường được khuyến cáo bởi nhà cung cấp và các điều kiện đã được biết rõ trong lĩnh vực, chẳng hạn với RPMI 1640 kèm theo hoặc không kèm theo HEPES & L-Glutamin (Thermo SH30255,01) và 1mM natri pyruvat, và 10% FBS (Gibco cat#10082). Đĩa pha loãng trung gian 1000X được điều chế bằng cách tạo ra dung dịch làm việc 10 mM chứa mẫu thử nghiệm trong DMSO và tiến hành pha loãng 1:3 trong DMSO cho 10 điểm. Đĩa phân liều 10X được chuẩn bị bằng cách bổ sung 2 μ L từ đĩa pha loãng trung gian 1000X vào 198 μ L OPTIMEM® + 10% FBS và trộn kỹ. Sau đó, đĩa chứa tế bào được xử lý bằng cách bổ sung 11 μ L từ đĩa phân liều 10X vào đĩa chứa tế bào 100 μ L/lỗ để đạt được nồng độ cuối 1X. Staurosporine được sử dụng làm mẫu đối chứng ức chế sinh trưởng cực đại ở nồng độ cuối là 5 μ M. Đĩa chứa tế bào được ủ trong 7 ngày ở 37°C, 5% CO₂. Bảy ngày sau khi xử lý, dung dịch đệm thử nghiệm Cell Titer-Glo® (Promega cat# G7571) và cơ chất được lấy ra từ -20°C và được để cân bằng đến RT. Dung dịch đệm thử nghiệm được bổ sung vào cơ chất và được xoáy nhẹ để trộn. Chất phản ứng CELL TITER-GLO® (100 μ L/lỗ) được bổ sung vào đĩa chứa tế bào và được ủ ở RT trong 15 phút. Sau 15 phút, mức phát quang được đọc bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa. Dữ liệu được phân tích trên Excel và được lập đồ thị trên GraphPad Prism. Phân tích thống kê và giá trị p được tính toán bằng cách sử dụng thử nghiệm t không tham số Mann-Whitney bằng cách sử dụng GraphPad Prism.

Tóm tắt dữ liệu tăng sinh được chỉ ra trong bảng 4. Tác dụng chống tăng sinh của hợp chất thử nghiệm được phân loại thành không cảm nhận được ($IC_{50} \geq 1 \mu$ M), kìm tế bào ($IC_{50} < 1 \mu$ M và % ức chế <70%) hoặc gây độc tế bào ($IC_{50} < 1 \mu$ M và % ức chế $\geq 70\%$). Các dòng tế bào mang đột biến bất hoạt hoặc mất chức năng (loss of function - LOF) ở gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* hoặc *RBI* biểu thị đáp ứng gây độc tế bào đối với các hợp chất nêu trong ví dụ 1 lớn hơn đáng kể so với các dòng tế bào còn lại trong danh sách (Bảng 5). Ngược lại, các dòng tế bào không mất chức năng (non-LOF) biểu thị đáp ứng kìm tế bào (%) cao hơn khi đáp ứng lại các hợp

chất nêu trong ví dụ 1.

Ngoài ra, một số mô hình khối u ghép dị loài mang các đột biến này được sử dụng để đánh giá hiệu lực của hợp chất nêu trong ví dụ 1 như phương pháp đơn trị (Bảng 3).

Tóm tắt các nghiên cứu về hiệu lực và hoạt tính chống khối u ($\Delta T/C$) được chỉ ra trong bảng 3. Hợp chất nêu trong ví dụ 1 thể hiện hiệu lực mạnh mẽ ở các mô hình khối u khác nhau, với sự thoái lui có nghĩa đáng lưu ý ở các mô hình khối u mang đột biến ở các gen *ARID1A*, *KMT2C* hoặc *RBI*. Cùng với nhau, các phát hiện này chỉ ra rằng các đột biến bất hoạt ở gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* hoặc *RBI* đưa ra phác đồ chọn lọc tiềm năng cho bệnh nhân để điều trị bằng hợp chất nêu trong ví dụ 1 đối với nhiều loại ung thư.

Bảng 4: Tóm tắt về $\log\text{-GI}_{50}$ (nM) chống tăng sinh và mức ức chế sinh trưởng (%) đối với các dòng tế bào ung thư khác nhau như đã chỉ ra. Các dòng tế bào được xử lý trong 7 ngày và được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm CellTiter-Glo®.

Dòng tế bào	Thông tin môi trường	Mô học	Tác dụng chống tăng sinh			Đột biến LOF ở (các) gen			
			IC ₅₀ (μM)	% ức chế	Kết quả	<i>ARID1A</i>	<i>KMT2C</i>	<i>KMT2D</i>	<i>RBI</i>
22RV1	A	Tuyến tiền liệt	0,028	77	Gây độc tế bào	Có			
A2058	B	Da	0,030	97	Gây độc tế bào				Có
A2780	C	Buồng trứng	0,052	74	Gây độc tế bào	Có			
A375	B	Da	0,055	86	Gây độc tế bào				
A549	D	Phổi	0,139	64	Kìm tế bào				
A673	B	Xương	0,014	96	Gây độc tế bào				
AN3CA	E	Nội mạc tử	0,05	67	Kìm tế	Có			

		cung	0		bào				
AZ521	F	Dạ dày	0,03 6	76	Gây độc tế bào				
BT20	B	Vú	0,37 3	45	Kìm tế bào				
C33A	F	Nội mạc tử cung	0,01 4	79	Gây độc tế bào	Có		Có	
CACO2	B	Ruột	0,18 9	60	Kìm tế bào				
CAOV3	B	Buồng trứng	0,01 9	96	Gây độc tế bào		Có		Có
CCRFC EM	C	Máu	0,04 0	96	Gây độc tế bào				
COLO2 01	C	Ruột	0,12 3	61	Kìm tế bào				
COLO3 20	C + 0,8 ug/mL Puromycin	Ruột	0,18 9	73	Gây độc tế bào				
CORL3 11	C	Phổi	0,09 5	75	Gây độc tế bào				
CORL8 8	C	Phổi	4,20 0	34	Không cảm nhận được				Có
COV31 8	C	Buồng trứng	>10	40	Không cảm nhận được				
CT26	C + 0,8 ug/mL Puromycin	Ruột	>10	-47	Không cảm nhận được				
DMS11 4	C	Phổi	0,01 4	65	Kìm tế bào				
DMS27 3	G	Phổi	0,01 9	80	Gây độc tế bào				Có
DMS53	C	Phổi	0,11 8	66	Kìm tế bào				
DMS79	C + 0,8 ug/mL	Phổi	0,35 4	50	Kìm tế bào				Có

	Puromycin								
DU145	F	Tuyến tiền liệt	0,036	74	Gây độc tế bào		Có		Có
EBC1	C + 1 ug/mL Puromycin	Phổi	0,047	83	Gây độc tế bào				
EGL1	H		0,041	95	Gây độc tế bào				
EVSAT	G + 2 ug/mL Puromycin	Vú	0,040	79	Gây độc tế bào				Có
GL261	C	Não	0,038	85	Gây độc tế bào				
HCC1143	C	Vú	>10	37	Không cảm nhận được		Có		
HCC1187	I	Vú	0,027	73	Gây độc tế bào				Có
HCC1569	C	Vú	0,067	45	Kìm tế bào				Có
HCC1806	C	Vú	0,014	99	Gây độc tế bào		Có		
HCC2218	C	Vú	0,560	41	Kìm tế bào				Có
HCC4006	C	Phổi	0,028	57	Kìm tế bào				
HCC44	C	Phổi	0,131	48	Kìm tế bào				
HCC70	I	Vú	0,038	89	Gây độc tế bào				Có
HCC827	C	Phổi	0,055	69	Kìm tế bào				
HCT116	J	Ruột	0,041	88	Gây độc tế bào		Có		
HCT8	C	Ruột	0,981	3	Kìm tế bào				
HEC108	F	Nội mạc tử	0,03	90	Gây độc	Có	Có		

		cung	1		tế bào				
HEC1A	J	Nội mạc tử cung	0,16 2	56	Kìm tế bào	Có	Có		
HEP3B2 17	F	Gan	0,03 3	66	Kìm tế bào				Có
HEPG2	F	Gan	0,02 8	78	Gây độc tế bào				
HEYA8	C	Buồng trứng	0,11 2	89	Gây độc tế bào	Có	Có	Có	
HGC27	F	Dạ dày	0,06 8	78	Gây độc tế bào				
HL60	C	Máu	0,04 5	87	Gây độc tế bào				
HLE	B	Gan	0,03 0	77	Gây độc tế bào		Có		Có
HLF	B	Gan	0,01 7	100	Gây độc tế bào		Có		Có
HOS	C	Xương	0,09 0	72	Gây độc tế bào		Có		
HS294T	K	Da	0,02 0	84	Gây độc tế bào				
HS766T	L	Tuyến tụy	0,06 2	72	Gây độc tế bào	Có			
HT	C	Máu	0,13 1	64	Kìm tế bào				
HT1197	E	Đường tiết niệu	0,28 1	55	Kìm tế bào	Có		Có	
HUH1	M	Gan	0,12 8	72	Gây độc tế bào	Có			
HUH28	A	Mật	2,89 6	32	Không cảm nhận được	Có			Có
HUH7	N	Gan	0,17 5	64	Kìm tế bào				
IGROV 1	C	Buồng trứng	0,07 2	70	Gây độc tế bào	Có	Có		
IMR32	O	CNS	0,00 2	100	Gây độc tế bào	Có			
JHH4	B	Gan	0,16 6	65	Kìm tế bào				

JHH7	C	Gan	0,02 7	88	Gây độc tế bào				
JURKA T	P	Máu	0,06 1	98	Gây độc tế bào	Có	Có		
K562	C	Máu	>10	- 191	Không cảm nhận được				
Karpas1 106	C	Máu	0,02 6	98	Gây độc tế bào				
KARPA S299	C	Máu	0,06 9	78	Gây độc tế bào				
KE97	C	Máu	0,15 8	58	Kìm tế bào				
KELLY	C	CNS	0,05 8	80	Gây độc tế bào				
KLE	Q	Nội mạc tử cung	0,02 8	65	Kìm tế bào		Có		Có
KP4	L	Tuyến tụy	0,03 6	65	Kìm tế bào				
KPL1	G + 2 ug/mL Puromycin	Vú	0,66 8	43	Kìm tế bào				
KURA MOCHI	C	Buồng trứng	0,05 2	88	Gây độc tế bào				
KYSE1 50	R	Thực quản	0,04 2	64	Kìm tế bào				
KYSE1 80	C	Thực quản	0,10 3	68	Kìm tế bào				
KYSE2 70	R	Thực quản	>10	- 180	Không cảm nhận được				Có
KYSE3 0	S	Thực quản	0,07 6	76	Gây độc tế bào				
KYSE5 20	C	Thực quản	>10	50	Không cảm nhận được				
KYSE7	C	Thực quản	0,12	70	Gây độc	Có			

0			6		tế bào				
LI7	M	Gan	0,13 2	76	Gây độc tế bào				
LN18	T	CNS	0,01 5	91	Gây độc tế bào		Có		
LN229	T	CNS	0,03 6	63	Kìm tế bào				
LNCAP	P	Tuyến tiền liệt	0,05 9	74	Gây độc tế bào	Có	Có		
LS411N	C	Ruột	1,00 0	45	Không cảm nhận được	Có	Có		
M14	L	Da	0,03 2	85	Gây độc tế bào	Có			
MCF7	F	Vú	0,15 5	58	Kìm tế bào				
MDAM B157	P	Vú	0,86 6	39	Kìm tế bào				
MDAM B231	U	Vú	2,81 6	23	Không cảm nhận được				
MDAM B453	U	Vú	0,03 9	56	Kìm tế bào				
MDAM B468	B	Vú	0,00 8	100	Gây độc tế bào	Có			Có
MDAPC A2B	U	Tuyến tiền liệt	6,27 3	17	Không cảm nhận được		Có		
MDST8	B	Ruột	0,04 9	88	Gây độc tế bào				
MHCC9 7H	V	Gan	0,24 3	59	Kìm tế bào				
MHCC9 7L	V	Gan	0,52 6	45	Kìm tế bào				
MKN1	C	Dạ dày	0,02 3	80	Gây độc tế bào				
MKN45	C	Dạ dày	0,05 6	79	Gây độc tế bào	Có			

MKN7	C	Dạ dày	>10	39	Không cảm nhận được			Có	
MKN74	C	Dạ dày	0,073	71	Gây độc tế bào				Có
MOLT4	C	Máu	0,040	99	Gây độc tế bào		Có	Có	
MX1	C	Vú	0,045	72	Gây độc tế bào				Có
NCIH1048	W	Phổi	0,004	95	Gây độc tế bào		Có		Có
NCIH1092	C	Phổi	0,683	42	Kìm tế bào				
NCIH1155	B	Phổi	0,043	51	Kìm tế bào				Có
NCIH1299	A	Phổi	0,195	44	Kìm tế bào				
NCIH1436	C	Phổi	0,195	56	Kìm tế bào	Có			
NCIH146	C + 0,8 ug/mL Puromycin	Phổi	0,030	77	Gây độc tế bào				Có
NCIH1666	C	Phổi	0,161	59	Kìm tế bào				
NCIH1703	C	Phổi	0,040	92	Gây độc tế bào				
NCIH1734	C	Phổi	0,024	76	Gây độc tế bào				Có
NCIH1975	C	Phổi	0,021	90	Gây độc tế bào				Có
NCIH2030	X	Phổi	5,374	9	Không cảm nhận được				
NCIH2081	W	Phổi	0,442	44	Kìm tế bào			Có	Có
NCIH209	C + 0,8 ug/mL Puromycin	Phổi	0,040	83	Gây độc tế bào				

	n								
NCIH21 22	C	Phôi	0,07 8	85	Gây độc tế bào				
NCIH21 96	C	Phôi	0,12 3	63	Kìm tế bào				Có
NCIH22 28	C	Phôi	0,27 6	57	Kìm tế bào				Có
NCIH22 6	C	Phôi	1,19 7	43	Không cảm nhận được				
NCIH23 47	C + 0,8 ug/mL Puromycin	Phôi	0,66 1	45	Kìm tế bào				
NCIH35 8	C	Phôi	0,04 2	93	Gây độc tế bào				
NCIH44 1	C	Phôi	0,01 4	84	Gây độc tế bào				
NCIH44 6	C	Phôi	0,01 3	95	Gây độc tế bào			Có	Có
NCIH46 0	C	Phôi	0,04 7	97	Gây độc tế bào	Có			
NCIH52 0	C	Phôi	0,08 2	77	Gây độc tế bào				
NCIH52 2	C	Phôi	0,10 7	50	Kìm tế bào				
NCIH52 4	C	Phôi	0,03 7	92	Gây độc tế bào				Có
NCIH52 6	C	Phôi	0,01 8	94	Gây độc tế bào				
NCIH59 6	C	Phôi	0,92 2	46	Kìm tế bào				Có
NCIH69	C	Phôi	0,17 3	68	Kìm tế bào				Có
NCIH72 7	C	Phôi	0,11 7	56	Kìm tế bào				
NCIH82	C	Phôi	0,69 9	22	Kìm tế bào				Có
NIHOV CAR3	Y	Buồng trứng	0,04 0	96	Gây độc tế bào				

NUGC3	C	Dạ dày	0,03 0	81	Gây độc tế bào	Có	Có	Có	
NUGC4	C	Dạ dày	0,01 9	83	Gây độc tế bào				
OAW42	Z	Buồng trứng	0,13 6	88	Gây độc tế bào	Có			
OCUM1	N	Dạ dày	0,02 7	82	Gây độc tế bào	Có			
OV90	C	Buồng trứng	0,03 4	61	Kìm tế bào				
OVCAR 5	Y	Buồng trứng	0,08 6	74	Gây độc tế bào				
OVCAR 8	C	Buồng trứng	0,06 5	90	Gây độc tế bào				Có
OZ	AA	Gan	0,05 0	77	Gây độc tế bào				
PANC1	L	Tuyến tụy	0,07 1	47	Kìm tế bào				
PATU8 988T	C	Tuyến tụy	0,20 1	55	Kìm tế bào				
PLCPR F5	BB	Gan	>10	41	Không cảm nhận được				
Raw264 .7	C		0,35 5	62	Kìm tế bào				
RKO	B	Ruột	0,11 8	61	Kìm tế bào	Có			
RT112	P	Đường tiết niệu	0,03 2	87	Gây độc tế bào				
SAOS2	CC	Xương	0,02 8	66	Kìm tế bào				Có
SH10TC	C	Dạ dày	0,14 7	58	Kìm tế bào				Có
SHSY5 Y	DD	CNS	0,05 9	95	Gây độc tế bào				
SiHa	F	Nội mạc tử cung	0,10 5	58	Kìm tế bào				
SJRH30	C	Mô mềm	0,03 9	62	Kìm tế bào				
SKHEP	BB	Gan	0,11	71	Gây độc				

1			8		tế bào				
SKMEL 28	B	Da	0,09 8	61	Kìm tế bào				
SKMES 1	F	Phổi	0,02 8	80	Gây độc tế bào			Có	
SKOV3	J	Buồng trứng	>10	27	Không cảm nhận được	Có			
SKUT1	E	Mô mềm	0,04 1	89	Gây độc tế bào	Có			Có
SNU1	C	Dạ dày	0,10 5	68	Kìm tế bào	Có	Có		
SNU107 9	EE	Mật	0,03 8	89	Gây độc tế bào	Có			
SNU119 6	EE	Mật	0,04 3	68	Kìm tế bào				
SNU16	C	Dạ dày	0,01 7	84	Gây độc tế bào				Có
SNU245	EE	Mật	1,08 9	-5	Không cảm nhận được				
SNU308	EE	Mật	0,18 4	61	Kìm tế bào				
SNU387	X	Gan	>10	12	Không cảm nhận được				
SNU398	M	Gan	0,02 1	85	Gây độc tế bào				
SNU423	M	Gan	>10	40	Không cảm nhận được	Có			
SNU449	C	Gan	1,52 1	8	Không cảm nhận được	Có			
SNU475	M	Gan	3,91 7	28	Không cảm				

					nhận được				
SNU478	EE	Mật	0,03 2	92	Gây độc tế bào				Có
SNU5	FF	Dạ dày	0,03 9	79	Gây độc tế bào	Có			
SNU739	C	Gan	>10	47	Không cảm nhận được				
SNU869	EE	Mật	0,05 2	60	Kìm tế bào				
SW1271	U	Phổi	0,02 4	67	Kìm tế bào				
SW48	U	Ruột	0,00 5	89	Gây độc tế bào	Có	Có		
SW480	U	Ruột	0,03 6	90	Gây độc tế bào	Có		Có	
SW626	U		1,10 5	39	Không cảm nhận được				
SW780	U	Đường tiết niệu	0,07 4	68	Kìm tế bào				
SW837	U	Ruột	0,06 8	55	Kìm tế bào				
SW900	U	Phổi	3,80 6	13	Không cảm nhận được				
T47D	GG	Vú	0,04 5	68	Kìm tế bào	Có			
T84	HH	Ruột	0,30 8	61	Kìm tế bào				Có
T98G	O	CNS	1,37 1	44	Không cảm nhận được				
TCCSU P	E	Đường tiết niệu	0,04 0	61	Kìm tế bào	Có			
TFK1	II	Mật	0,04	87	Gây độc				

			0		tế bào				
TGW	O	Não	0,07 0	63	Kìm tế bào				
THP1	C	Máu	0,04 2	81	Gây độc tế bào				
TOV112 D	JJ	Buồng trứng	0,02 5	81	Gây độc tế bào				
TOV21 G	C	Buồng trứng	0,06 1	73	Gây độc tế bào	Có	Có		
TYKNU	O	Buồng trứng	0,07 2	83	Gây độc tế bào		Có		
U118M G	B	CNS	1,17 0	42	Không cảm nhận được				
U87MG	O	CNS	7,35 6	-5	Không cảm nhận được				
UACC8 12	U	Vú	0,07 6	58	Kìm tế bào	Có			
UACC8 93	U	Vú	4,15 0	-51	Không cảm nhận được				Có
UMUC3	E	Đường tiết niệu	0,16 1	70	Gây độc tế bào				
ZR751	C	Vú	0,04 3	69	Kìm tế bào				

Thông tin môi trường:

- A. RPMI 1640 (Gibco 11835, Gibco 22400-089, hoặc Hyclone Cat # SH30027)
+ 10% FBS (Gibco cat#10082)
- B. DMEM với L-Glutamin (Thermo cat#SH30022) + NaPyr + NEAA + HEPES
+ 10% FBS (Gibco cat#10082)
- C. RPMI 1640 với HEPES & L-Glutamin (Gibco 22400) + 1mM Na Pyruvat +
10% FBS(Gibco cat#10082)
- D. Môi trường F-12K (Cat#30-2004)+ 10% FBS (Gibco cat#10082)

- E. EMEM (CellGro cat#17-305-CV) + L-Glutamin + Na Pyruvat + Na Bicarbonat + 10% FBS (Gibco cat#10082)
- F. EMEM (CellGro cat#17-305-CV) + L-Glutamin + Na Pyruvat + Na Bicarbonat + NEAA+ 10% FBS (Gibco cat#10082)
- G. DMEM (Gibco 11995) + 1mM Na Pyruvat + 10% FBS(Gibco cat#10082)
- H. DMEM Glucoza cao (Hyclone Cat # SH30022) + 10 % HI FBS (Gibco Cat # 10082) + 1X NEAA (Hyclone SH30328)
- I. RPMI 1640 được cải biến ATCC (Gibco A1049101) + 1mM Na Pyruvat + 10% FBS(Gibco cat#10082)
- J. McCoy's 5A + 10% FBS (Gibco cat#10082)
- K. DMEM (Gibco 11965) + 10% FBS
- L. MEM Eagle với muối của Earle (Gibco 11095-080) + 1% NEAA + 1% NaPyr + 10% FBS (Gibco cat#10082)
- M. RPMI-1640 với L-glutamin và HEPES + 10% FBS được làm bất hoạt bởi nhiệt
- N. DMEM với L-Glutamin (Thermo cat#SH30022) + Na Pyruvat + 10% FBS (Gibco cat#10082)
- O. MEM (Gibco 11095) + Na Pyruvat + NEAA + 10% FBS (Gibco cat#10082)
- P. RPMI 1640 với HEPES & L-Glutamin (Thermo SH30255.01 hoặc Gibco 11835) + 1mM natri pyruvat + 10% FBS(Gibco cat#10082)
- Q. DMEM:F12 w/ 2,5 mM L-glutamin, 15 mM HEPES + 0,5 mM NaPyr + 10% FBS
- R. 49% RPMI 1640 + 49% Ham's F12 + 2% h.i. FBS
- S. 45% RPMI 1640 + 45% Ham's F12 + 10% h.i. FBS
- T. DMEM (Gibco 11965) + 1mM Na Pyruvat + 5% FBS (Gibco cat#10082)
- U. Leibovitz's L15 (Gibco cat#11415-064) + 10% FBS (Gibco cat#10082), No

CO₂

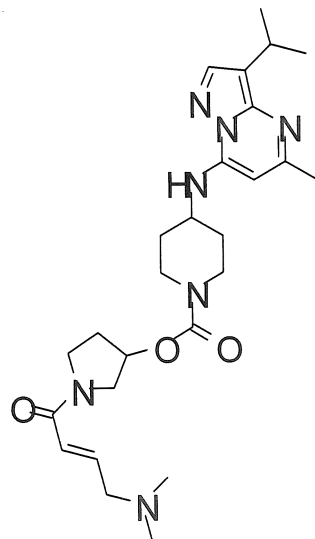
- V. DMEM với hàm lượng Glu & L-gln cao + 10% FBS được làm bất hoạt bởi nhiệt + NaPyr + NEAA + HEPES
- W. DMEM:F12 (1:1) + ITS + 10nM Hydrocortisone + 10nM beta-Estradiol + 4,5mM L-glut + 5% FBS (Gibco cat#10082)
- X. RPMI-1640 với L-glutamin và HEPES + 10% FBS
- Y. RPMI 1640 với HEPES & L-Glutamin (Gibco 22400) + 1mM Na Pyruvat + NEAA + 20% FBS(Gibco cat#10082)
- Z. DMEM + 2mM Glutamin + 1mM natri pyruvat (NaP) + 20 IU/l Insulin bò + 10% FBS(Gibco cat#10082)
- AA. Môi trường Williams' E (Gibco Cat # 12551) + 10% FBS
- BB. MEM + 10% FBS + NaPyr + NEAA + HEPES + 1,5g/L NaHCO₃
- CC. McCoy's 5A (Gibco 16600) + 15% FBS (Gibco cat#10082)
- DD. 1:1 MEM (11095): F12 (CellGro 10-080-CV) + 10% FBS (Gibco cat#10082)
- EE. RPMI-1640 với glutamin và HEPES (Hyclone Cat # SH30255) + 10% FBS (Gibco Cat # 16000) + 1X NaPyr
- FF. Môi trường của Dulbecco được cải biến bởi Iscove w/L-glutamin, 25mMHEPES [GIBCO 12440-053]+20% FBS
- GG. RPMI 1640 với HEPES & L-Glutamin (không chứa đỏ phenol) + 1mM Na Pyruvat + 10% FBS(Gibco cat#10082)
- HH. 1:1 Hams F12: DMEM + L-Glutamin + 5% FBS (Gibco cat#10082)
- II. RPMI-1640 (Hyclone Cat # SH30027) + 10% FBS được làm bất hoạt bởi nhiệt (Gibco Cat # 10082)
- JJ. Hỗn hợp 1:1 gồm môi trường MCDB 105 chứa natri bicarbonat ở nồng độ cuối 1,5 g/L và môi trường 199 chứa natri bicarbonat ở nồng độ cuối 2,2 g/L + 15% FBS

Bảng 5: Phân bố (%) tác dụng chống tăng sinh của hợp chất nêu ở ví dụ 1 đối với các dòng tế bào ung thư mang đột biến LOF.

	Gây độc tế bào ($IC_{50} < 1\mu M$, %Ức chế. ≥ 70)	Kìm tế bào ($IC_{50} < 1\mu M$, %Ức chế. < 70)	Không cảm nhận được ($IC_{50} \geq 1\mu M$, %Ức chế. < 70)
Thế đột biến ARID1A	64%, n=25	23%, n=9	13%, n=5
Thế đột biến KMT2D	76%, n=19	12%, n=3	12%, n=3
Thế đột biến KMT2C	70%, n=7	20%, n=2	10%, n=1
Thế đột biến RB1	54%, n=22	37%, n=15	10%, n=4
Khác	40%, n=41	44%, n=45	17%, n=17

YÊU CẦU BẢO HỘ

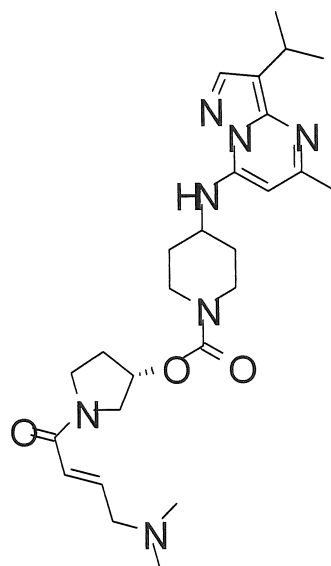
1. Hợp chất có công thức (I)



(I)

hoặc muối được dụng của nó.

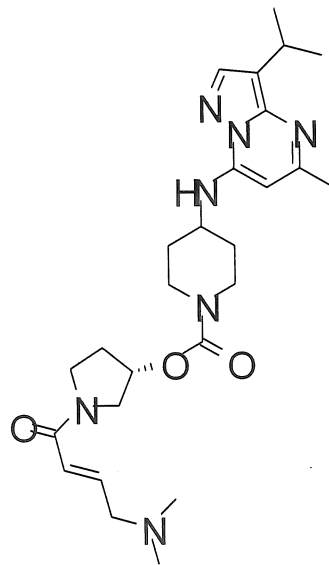
2. Hợp chất theo điểm 1 có công thức (II)



(II)

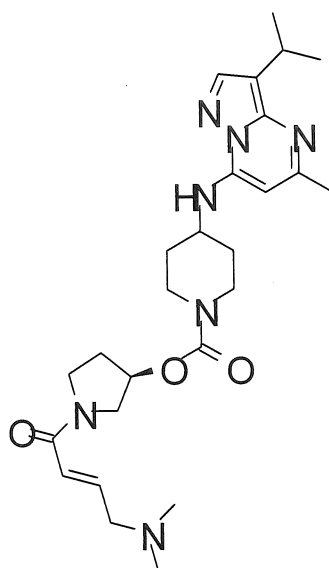
hoặc muối được dụng của nó.

3. Hợp chất theo điểm 2 có công thức (II)



(II)

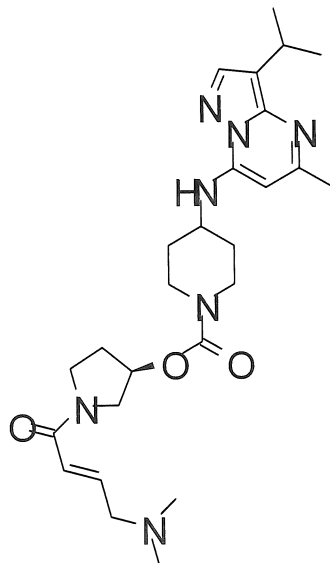
4. Hợp chất theo điểm 1 có công thức (III)



(III)

hoặc muối được dụng của nó.

5. Hợp chất theo điểm 4 có công thức (III)



(III).

6. Hợp chất hoặc muối của nó theo điểm 2, trong đó hợp chất này là muối clorua, besylat, hoặc hemi-edisylat.

7. Hợp chất hoặc muối của nó theo điểm 4, trong đó hợp chất này là muối clorua, besylat, hoặc hemi-edisylat.

8. Hợp chất hoặc muối của nó theo điểm 2 ở dạng muối kết tinh.

9. Hợp chất hoặc muối của nó theo điểm 8, trong đó hợp chất này là [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo-[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat besylat ở dạng tinh thể được đặc trưng bởi phổ nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh đặc trưng sử dụng bức xạ CuK α , ở $2\theta \pm 0,2^\circ$, xuất hiện ở $21,5^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm $12,4^\circ$, $17,3^\circ$, và $15,8^\circ$.

10. Hợp chất hoặc muối của nó theo điểm 8, trong đó hợp chất này là [(3S)-1-[(E)-4-(dimethylamino)but-2-enoyl]pyrrolidin-3-yl] 4-[(3-isopropyl-5-methyl-pyrazolo-[1,5-a]pyrimidin-7-yl)amino]piperidin-1-carboxylat hemi-edisylat hydrat được đặc trưng bởi phổ nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh đặc trưng sử dụng bức xạ CuK α , ở $2\theta \pm 0,2^\circ$, xuất hiện ở $18,5^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm

21,5°, 16,7°, và 15,2°.

11. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc muối dược dụng của nó, kết hợp với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

12. Dược phẩm theo điểm 11 chứa một hoặc nhiều chất trị liệu khác.

Danh mục trình tự

<110> Eli Lilly and Company

<120> HỢP CHẤT HỮU ÍCH ĐỂ ỨNG DỤNG CHẾ CDK7 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

<130> X21687

<150> ES 17382778.3

<151> 2017-11-16

<150> ES 18382034.9

<151> 2018-01-23

<150> ES 18382546.2

<151> 2018-07-20

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1

Tyr	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ser
1				5				10						15	

Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Lys	Lys	Lys	Lys
			20				25	