



(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)



1-0049703

(51)^{2020.01} C07D 487/04; A61K 31/506; A61P 35/00; C07D 519/00; C07D 471/04; A61K 31/4375; C07D 401/14 (13) B

(21) 1-2021-00246

(22) 21/06/2019

(86) PCT/CN2019/092239 21/06/2019

(87) WO/2019/242719 26/12/2019

(30) PCT/CN2018/092194 21/06/2018 CN

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/03/2021 396A

(73) BETTA PHARMACEUTICALS CO., LTD (CN)

355 Xingzhong Road, Yuhang, Hangzhou, Zhejiang 311100, China

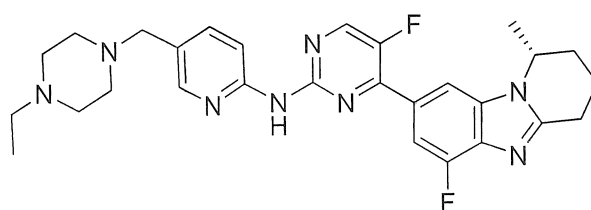
(72) WANG, Yiqian (CN); ZHANG, Chunhui (CN); Wang, Jiabing (US); DING, Lieming (CN).

(74) Công ty Luật TNHH ADMC (ADMC)

(54) HỢP CHẤT Ở DẠNG TINH THỂ ĐỂ ỨC CHẾ HOẠT TÍNH CDK4/6, DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HỢP CHẤT NÀY

(21) 1-2021-00246

(57) Sáng chế đề cập đến muối của hợp chất (R)-N-(5-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)pyridin-2-yl)-5-fluoro-4-(6-fluoro-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)pyrimidin-2-amin (hợp chất I) có công thức cấu trúc (I) hoặc muối này ở dạng tinh thể, và còn đề cập đến phương pháp điều chế muối của hợp chất I và/hoặc muối này ở dạng tinh thể, dược phẩm chứa muối và/hoặc muối ở dạng tinh thể. Các hợp chất và muối theo sáng chế hữu dụng để điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý.



Hợp chất I

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến muối và dạng tinh thể của hợp chất (R)-N-(5-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)pyridin-2-yl)-5-fluor-4-(6-fluor-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)pyrimidin-2-amin; sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế hợp chất và dạng tinh thể của nó và hợp chất trung gian có liên quan, dược phẩm chứa chúng và việc sử dụng chúng để ức chế hoạt tính CDK 4/6. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng có liên quan đến sự điều biến CDK 4/6 bằng cách sử dụng ít nhất một trong số các hợp chất hoặc dạng tinh thể và dược phẩm nêu trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các kinaza phụ thuộc cyclin (cyclin-dependent kinases - CDKs), là lớp protein kinaza serin/threonin, có liên quan đến sự điều hòa chu trình tế bào, sự khởi đầu phiên mã và kiểm soát các đợt chuyển hóa nhất định. Các phức CDK-cyclin được tạo thành bởi các CDK và cyclin khác nhau, và nếu hoạt tính CDK không được điều hòa, sự tăng sinh tế bào là nằm ngoài khả năng kiểm soát, sự bất ổn của hệ gen (đột biến ADN tăng, mất đoạn nhiễm sắc thể và tương tự) và sự bất ổn của nhiễm sắc thể (thay đổi số nhiễm sắc thể) có thể trực tiếp hoặc gián tiếp được gây ra.

Các CDK có trên 20 phân nhóm, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 và tương tự có liên quan đến sự điều hòa chu trình tế bào; CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 và tương tự có liên quan đến sự điều hòa phiên mã; và các kinaza khác bao gồm CDK3, CDK5, và tương tự. CDK4/6 (các kinaza phụ thuộc cyclin 4 và 6) là các yếu tố chính để điều hòa chu trình tế bào, sự đột biến trong chu trình tế bào có liên quan đến bệnh ung thư chủ yếu tồn tại trong các quy trình biến đổi G1 và G1/S, CDK4/6 và cyclin D kết hợp để tạo thành phức kinaza hoạt động, thông qua sự phosphoryl hóa của sản phẩm pRb của gen ức chế khối u Rb, yếu tố phiên mã đã liên kết E2F được giải phóng; sự phiên mã các gen có liên quan đến pha S được khởi đầu, làm cho tế bào đi qua điểm kiểm soát, và

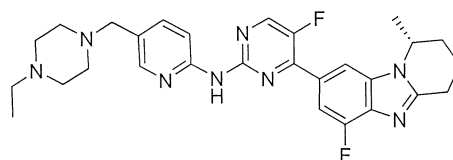
chuyển từ pha G1 sang pha S. Sự hoạt hóa đặc hiệu CDK4/6 có liên quan mật thiết đến sự tăng sinh của một số khối u. Khoảng 80% khối u ở người có bất thường về con đường cyclin D-CDK4/6-INK4-Rb. Các chất ức chế CDK4/6 ngăn chặn chu trình tế bào trong pha G1 và do đó hoạt động để ức chế sự tăng sinh khối u.

Sự phát triển thuốc hướng đích CDK4/6 kinaza là lĩnh vực quan trọng, và đích chống khối u này có ưu điểm ở chỗ: (1) Hầu hết các tế bào tăng sinh đều phụ thuộc sự tăng sinh CDK2 hoặc CDK4/6, nhưng các chất ức chế CDK4/6 không thể hiện tính độc tế bào của "các chất ức chế pan-CDK", như giảm tủy xương và các đáp ứng ở ruột; (2) Các thử nghiệm tiền lâm sàng thể hiện rằng nếu mức cyclin D tăng lên hoặc P16 INK 4a bị bất hoạt, độ nhạy của tế bào với thuốc có thể tăng, và việc hướng đích các thuốc có thể tăng ở phạm vi nhất định do hiện tượng này ở tế bào khối u so với tế bào bình thường.

Đơn Quốc tế số PCT/CN2017/117950 mô tả lớp dẫn xuất benzimidazol hữu dụng làm chất ức chế CDK 4/6 protein kinaza, hầu hết chúng hữu hiệu để ức chế CDK 4 và CDK 6. Do vẫn còn những nhu cầu chưa được đáp ứng về tùy chọn điều trị các bệnh qua trung gian kinaza, các tác giả sáng chế đã sàng lọc tiếp các dạng muối của dẫn xuất benzimidazol và dạng tinh thể của chúng để đáp ứng nhu cầu y tế của bệnh nhân.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến muối và dạng tinh thể của hợp chất (R)-N-(5-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)pyridin-2-yl)-5-fluor-4-(6-fluor-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)pyrimidin-2-amin như thể hiện trong công thức I:



Công thức I (hợp chất I)

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Giản đồ XRD của dạng tinh thể A của hợp chất II (mẫu nhỏ, mẻ số: 1072P04-

A14S01).

Fig. 2: Giảm đồ XRD của dạng tinh thể B.

Fig. 3: Giảm đồ XRD của dạng tinh thể C của hợp chất II.

Fig. 4: Giảm đồ XRD của dạng vô định hình của hợp chất II.

Fig. 5: Giảm đồ XRD của dạng tinh thể D của hợp chất III.

Fig. 6: Giảm đồ XRD của dạng tinh thể E của hợp chất III.

Fig. 7: Giảm đồ XRD của dạng tinh thể F của hợp chất III.

Fig. 8: Giảm đồ XRD của dạng tinh thể G của hợp chất III.

Fig. 9: Giảm đồ XRD của dạng vô định hình của hợp chất III.

Fig. 10: Giảm đồ XRD của dạng tinh thể A của hợp chất II (mẫu nhỏ, mẻ số: 1072P04-A14S01) ở các điều kiện ổn định khác nhau. Từ dưới lên, ý nghĩa của các dòng lần lượt từ ① đến ④ được mô tả sau đây:

- ① Giảm đồ XRD của dạng tinh thể A của hợp chất II trong 0 ngày;
- ② Giảm đồ XRD của dạng tinh thể A của hợp chất II ở 25°C, trong độ ẩm 60% trong 10 ngày;
- ③ Giảm đồ XRD của dạng tinh thể A của hợp chất II ở 40°C, trong độ ẩm 75% trong 10 ngày;
- ④ Giảm đồ XRD của dạng tinh thể A của hợp chất II ở 80°C, trong điều kiện khô trong 24 giờ.

Fig. 11: Giảm đồ DSC của dạng tinh thể A của hợp chất II. Hoành độ (trục X) là nhiệt độ theo đơn vị °C; tung độ (trục Y) là dòng nhiệt theo đơn vị w/g.

Fig. 12: Giảm đồ XRD của dạng tinh thể A của hợp chất II (mẫu thí điểm (pilot), mẻ số: 20170903).

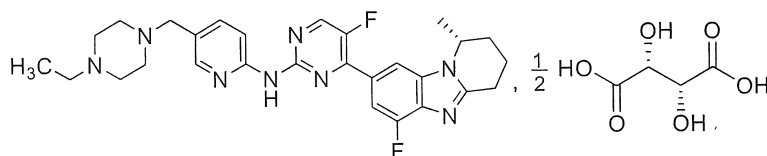
Trong các Fig. 1- Fig. 10 và Fig. 12 trên đây, hoành độ (trục X) là góc nhiễu xạ 2θ theo đơn vị “°”; tung độ (trục Y) là cường độ nhiễu xạ theo đơn vị “số đếm”.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các muối của hợp chất có công thức I

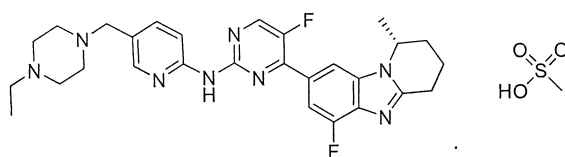
Theo một số phương án, muối được tạo thành bởi axit và hợp chất I. Muối có thể tồn tại ở các dạng vật lý khác nhau. Chẳng hạn, muối có thể ở dạng dung dịch, huyền phù hoặc ở dạng rắn. Theo một số phương án, muối của hợp chất là dạng rắn. Khi hợp chất ở dạng rắn, hợp chất này có thể là dạng định hình, dạng tinh thể hoặc hỗn hợp của chúng. Các muối của hợp chất I với hai axit được thử nghiệm dưới đây. Các muối lần lượt là muối của axit tartaric và muối của axit metansulfonic. Theo một số phương án, muối của axit tartaric là muối của axit L-tartaric. Công thức của muối axit L-tartaric và muối axit metansulfonic của hợp chất I được thể hiện dưới dạng công thức II và công thức III:

Muối axit L-tartaric của hợp chất I (hợp chất có công thức II, hợp chất II)



Công thức II (hợp chất II)

Muối axit metansulfonic của hợp chất I (hợp chất có công thức III, hợp chất III)



Công thức III (hợp chất III)

Sáng chế cũng đề xuất các dạng tinh thể khác nhau của hợp chất II và hợp chất III được mô tả trên đây. Chẳng hạn,

Dạng tinh thể A của hợp chất II

Sáng chế đề xuất dạng tinh thể A của hợp chất II.

Theo một số phương án, dạng tinh thể A của hợp chất II có thể được nhận dạng bằng phương pháp nhiễu xạ bột tia X. Theo một số phương án, giảm độ nhiễu xạ bột tia

X của dạng tinh thể A của hợp chất II có các đỉnh đặc trưng ở góc nhiễu xạ 2θ là $4,4\pm0,2^\circ$, $23,6\pm0,2^\circ$ và $26,9\pm0,2^\circ$. Để thuận tiện, sáng chế được gọi là dạng tinh thể A.

Theo một số phương án, giản đồ nhiễu xạ bột tia X của dạng tinh thể A có các đỉnh đặc trưng ở góc nhiễu xạ 2θ là $4,4\pm0,2^\circ$, $8,7\pm0,2^\circ$, $10,8\pm0,2^\circ$, $18,4\pm0,2^\circ$, $23,6\pm0,2^\circ$ và $26,9\pm0,2^\circ$.

Theo một số phương án, giản đồ nhiễu xạ bột tia X của dạng tinh thể A có các đỉnh đặc trưng ở góc nhiễu xạ 2θ là $4,4\pm0,2^\circ$, $8,7\pm0,2^\circ$, $10,8\pm0,2^\circ$, $15,9\pm0,2^\circ$, $18,4\pm0,2^\circ$, $23,6\pm0,2^\circ$ và $26,9\pm0,2^\circ$.

Theo một số phương án, dạng tinh thể A của hợp chất II theo sáng chế có thể được nhận dạng bằng phương pháp đo nhiệt lượng quét vi sai. Theo một số phương án, dạng tinh thể A có giản đồ đo nhiệt lượng quét vi sai chủ yếu như được thể hiện trên Fig. 11. Trong giản đồ DSC, dạng tinh thể A có đỉnh thu nhiệt ở khoảng $230,1\sim233,1^\circ\text{C}$. Kết quả của phép đo nhiệt lượng quét vi sai được xác định bằng DSC 200F3 240-20-0954-L của hãng NETZSCH (khí sục: nitơ; tốc độ dòng: 60mL/phút; tốc độ gia nhiệt: $10^\circ\text{C}/\text{phút}$, khoảng thử nghiệm: $30^\circ\text{C}\sim300^\circ\text{C}$).

Theo một số phương án, dạng tinh thể A của hợp chất II theo sáng chế có hàm lượng axit L-tartaric khoảng từ 12,01% đến 13,27%, mà có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký ion, phát hiện độ dẫn điện, và tính toán hàm lượng thành phần chính bằng cách sử dụng phương pháp ngoại chuẩn.

Theo một số phương án, dạng tinh thể A của hợp chất II theo sáng chế có thể được nhận dạng bằng ^1H NMR, kết quả ^1H NMR là như sau: ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ ppm: 1,01-1,04 (t, 3H, CH₃, J=5,3Hz), 1,50-1,52 (d, 3H, CH₃, J=6,5Hz), 1,93-1,95 (m, 2H, CH₂), 2,03-2,06 (m, 1H, CH₂), 2,16-2,19 (m, 1H, CH₂), 2,50 (s, 8H, CH₂), 2,57 (s, 2H, CH₂), 2,93-3,09 (m, 2H, CH₂), 3,47 (s, 1H, CH₂), 4,02 (s, 1H, CH), 4,79 (s, 1H, CH), 7,68-7,70 (d, 1H, CH, J=10,5), 7,71-7,73 (d, 1H, Ar-H, J=12,5), 8,12 (s, 1H, Ar-H), 8,20 (s, 1H, Ar-H), 8,21 (s, 1H, Ar-H), 8,68-8,69 (d, 1H, Ar-H, J=3,5), 10,03 (s, 1H, N-H).

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể A là $\geq 85\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể A là $\geq 95\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể A là $\geq 99\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể A là $\geq 99,5\%$.

Tốt hơn, nếu dạng tinh thể A là anhydrat.

Dạng tinh thể A của hợp chất II được đề xuất theo sáng chế các đặc tính về khả năng kết tinh tốt, độ hút ẩm thấp, và độ ổn định tốt, và có độ khả dụng sinh học theo đường uống chấp nhận được.

Dạng tinh thể B của hợp chất II

Sáng chế cũng đề xuất dạng tinh thể của hợp chất II, để thuận tiện, dạng này được gọi là dạng tinh thể B theo sáng chế. Dạng tinh thể B có giản đồ nhiễu xạ bột tia X chủ yếu như được thể hiện trong Fig. 2.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể B là $\geq 85\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể B là $\geq 95\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể B là $\geq 99\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể B là $\geq 99,5\%$.

Tốt hơn, nếu dạng tinh thể B là anhydrat.

Dạng tinh thể C của hợp chất II

Sáng chế cũng đề xuất dạng tinh thể khác của hợp chất II, để thuận tiện, dạng này được gọi là dạng tinh thể C theo sáng chế. Dạng tinh thể C có giản đồ nhiễu xạ bột tia X chủ yếu như được thể hiện trong Fig. 3.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể C là $\geq 85\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể C là $\geq 95\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể C là $\geq 99\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể C là $\geq 99,5\%$.

Sáng chế đề xuất dạng vô định hình của hợp chất II hoặc solvat của nó, dạng vô định hình chủ yếu có giản đồ nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trong Fig. 4.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của dạng tinh thể A, dạng tinh thể B và/hoặc dạng tinh thể C của hợp chất II.

Sáng chế còn đề xuất các phương án ưu tiên về được phẩm được mô tả trên đây:

Tốt hơn, nếu được phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của dạng tinh thể A, dạng tinh thể B và/hoặc dạng tinh thể C của hợp chất II, và tá dược, chất phụ trợ hoặc chất mang được dụng.

Tốt hơn, nếu được phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của dạng tinh thể A của hợp chất II, và tá dược, chất phụ trợ hoặc chất mang được dụng.

Tốt hơn, nếu được phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của dạng tinh thể A, dạng tinh thể B và/hoặc dạng tinh thể C của hợp chất II, và ít nhất một thành phần hoạt tính khác.

Tốt hơn, nếu được phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của dạng tinh thể A của hợp chất II, và ít nhất một thành phần hoạt tính khác.

Tốt hơn, nếu được phẩm là dạng bào chế dùng đường uống.

Tốt hơn, nếu được phẩm là viên nén hoặc viên nang.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng dạng tinh thể A, dạng tinh thể B và/hoặc dạng tinh thể C của hợp chất II trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng ở bệnh nhân, trong đó bệnh, rối loạn hoặc tình trạng được trung gian bởi CDK, như CDK4 và/hoặc CDK6.

Sáng chế cũng đề xuất các phương án ưu tiên về dạng tinh thể A, dạng tinh thể B và/hoặc dạng tinh thể C của hợp chất II.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là bệnh ung thư và/hoặc bệnh tăng sinh.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là ung thư đại tràng, ung thư trực tràng, ung thư tế bào vò, đa u tủy, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư thực quản tế bào vảy, sarcom mỡ, u lympho tế bào T, u hắc sắc tố, ung thư tụy, ung thư não hoặc ung thư phổi.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là ung thư vú.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh lý ở bệnh nhân bằng cách cho sử dụng dạng tinh thể A, dạng tinh thể B và/hoặc dạng tinh thể C của hợp chất II cho bệnh nhân.

Sáng chế còn đề xuất các phương án ưu tiên về phương pháp điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý ở bệnh nhân bằng dạng tinh thể A, dạng tinh thể B và/hoặc dạng tinh thể C của hợp chất II bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý:

Tốt hơn, bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là qua trung gian CDK, như CDK4 và/hoặc CDK6.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là bệnh ung thư và/hoặc bệnh tăng sinh.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là ung thư đại tràng, ung thư trực tràng, ung thư tế bào vò, đa u tủy, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư thực quản tế bào vảy, sarcom mỡ, u lympho tế bào T, u hắc sắc tố, ung thư tụy, ung thư não hoặc ung thư phổi.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là ung thư vú.

Dạng tinh thể D của hợp chất III

Sáng chế đề xuất dạng tinh thể của hợp chất III và/hoặc solvat của nó, để thuận tiện, sáng chế này gọi là dạng tinh thể D. Dạng tinh thể D có giảm độ nhiễu xạ bột tia X chủ yếu như được thể hiện trong Fig. 5.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể D là $\geq 85\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể D là $\geq 95\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể D là $\geq 99\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể D là $\geq 99,5\%$.

Tốt hơn, nếu dạng tinh thể D là anhydrat.

Dạng tinh thể E của hợp chất III

Sáng chế đề xuất dạng tinh thể của hợp chất III và/hoặc solvat của nó, để thuận tiện, sáng chế gọi là dạng tinh thể E. Dạng tinh thể E có giản đồ nhiễu xạ bột tia X chủ yếu như được thể hiện trong Fig. 6.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể E là $\geq 85\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể E là $\geq 95\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể E là $\geq 99\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể E là $\geq 99,5\%$.

Tốt hơn, nếu dạng tinh thể E là dihydrat.

Dạng tinh thể F của hợp chất III

Sáng chế đề xuất dạng tinh thể của hợp chất III và/hoặc solvat của nó, để thuận tiện, sáng chế gọi là dạng tinh thể F. Dạng tinh thể F có giản đồ nhiễu xạ bột tia X chủ yếu như được thể hiện trong Fig. 7.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể F là $\geq 85\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể F là $\geq 95\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể F là $\geq 99\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể F là $\geq 99,5\%$.

Tốt hơn, nếu dạng tinh thể F là hydrat 1,5.

Dạng tinh thể G của hợp chất III

Sáng chế đề xuất dạng tinh thể của hợp chất III và/hoặc solvat của nó, để thuận tiện, sáng chế gọi là dạng tinh thể G. Dạng tinh thể G có giản đồ nhiễu xạ bột tia X chủ yếu như được thể hiện trong Fig. 8.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể G là $\geq 85\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể G là $\geq 95\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể G là $\geq 99\%$.

Tốt hơn, nếu độ tinh khiết của dạng tinh thể G là $\geq 99,5\%$.

Tốt hơn, nếu dạng tinh thể G là hydrat 2,5.

Sáng chế cũng đề xuất dạng vô định hình của hợp chất III và/hoặc solvat của nó, dạng vô định hình này có giảm độ nhiều xạ bột tia X chủ yếu như được thể hiện trong Fig. 9.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của dạng tinh thể D, dạng tinh thể E, dạng tinh thể F và/hoặc dạng tinh thể G của hợp chất III.

Sáng chế cũng đề xuất các phương án ưu tiên về dược phẩm:

Tốt hơn, nếu dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của dạng tinh thể D, dạng tinh thể E, dạng tinh thể F và dạng tinh thể G của hợp chất III, và tá dược, chất phụ trợ hoặc chất mang dược dụng.

Tốt hơn, nếu dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của dạng tinh thể D, dạng tinh thể E, dạng tinh thể F và dạng tinh thể G của hợp chất III, và ít nhất một thành phần hoạt tính khác.

Tốt hơn, nếu dược phẩm là dạng bào chế dùng đường uống.

Tốt hơn, nếu dược phẩm là viên nén hoặc viên nang.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng dạng tinh thể D, dạng tinh thể E, dạng tinh thể F và/hoặc dạng tinh thể G của hợp chất III trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý ở bệnh nhân, trong đó, bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là qua trung gian CDK, như CDK4 và/hoặc CDK6.

Sáng chế cũng đề xuất các phương án ưu tiên về sử dụng dạng tinh thể D, dạng tinh thể E, dạng tinh thể F và/hoặc dạng tinh thể G của hợp chất III:

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là bệnh ung thư và/hoặc bệnh tăng sinh.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là ung thư đại tràng, ung thư trực tràng, ung thư tế bào vảy, đa u tủy, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư thực quản tế bào vảy, sarcom mô, u lympho tế bào T, u hắc sắc tố, ung thư tụy, ung thư não hoặc ung thư phổi.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là ung thư vú.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý ở bệnh nhân bằng cách cho bệnh nhân sử dụng dạng tinh thể D, dạng tinh thể E, dạng tinh thể F và/hoặc dạng tinh thể G của hợp chất III.

Sáng chế cũng đề xuất các phương án ưu tiên về phương pháp điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý ở bệnh nhân bằng cách cho bệnh nhân dạng tinh thể D, dạng tinh thể E, dạng tinh thể F và/hoặc dạng tinh thể G của hợp chất III:

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là qua trung gian CDK, như CDK4 và/hoặc CDK6.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là bệnh ung thư và/hoặc bệnh tăng sinh.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là ung thư đại tràng, ung thư trực tràng, ung thư tế bào vò, đa u tủy, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư thực quản tế bào vảy, sarcom mỡ, u lympho tế bào T, u hắc sắc tố, ung thư tụy, ung thư não hoặc ung thư phổi.

Tốt hơn, nếu bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là ung thư vú.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dạng tinh thể của muối của hợp chất I, dạng tinh thể này được điều chế bằng các bước sau:

- 1) tạo huyền phù (R)-N-(5-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)pyridin-2-yl)-5-fluoro-4-(6-fluoro-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)pyrimidin-2-amin (hợp chất I) trong nước và/hoặc dung môi hữu cơ hòa tan trong nước, để thu được huyền phù;
- 2) gia nhiệt huyền phù này đến 50°C hoặc cao hơn;
- 3) giữ nhiệt độ ở 50°C hoặc cao hơn, bổ sung axit vào huyền phù này, và thực hiện xử lý axit hóa, thu được dung dịch trong suốt;
- 4) làm mát dung dịch trong suốt này đến nhiệt độ trong phòng, lọc trong khi khuấy, làm khô bánh lọc, thu được dạng tinh thể của muối của hợp chất I.

Chẳng hạn, axit là axit L-tartaric ở bước 3), dạng tinh thể ở bước 4) là dạng tinh thể của muối axit L-tartaric của hợp chất I.

Chẳng hạn, axit là axit metansulfonic ở bước 3), dạng tinh thể ở bước 4) là dạng tinh thể của muối axit metansulfonic của hợp chất I.

Theo một số phương án, dạng tinh thể A của hợp chất II được điều chế bằng các bước sau đây:

Hòa tan hợp chất I trong metanol ở 50-70°C để thu được dung dịch trong suốt, hòa tan axit L-tartaric trong metanol, bổ sung từng giọt dung dịch axit L-tartaric trong metanol vào dung dịch hợp chất I trong metanol, lọc sau khi khuấy, làm khô bánh lọc ở 40-70°C, thu được dạng tinh thể A của hợp chất II.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế dạng tinh thể B của hợp chất II, bao gồm:

Bổ sung nước và axeton vào dạng tinh thể A của hợp chất II, thu được dung dịch trong suốt, khuấy sau khi lọc, sau đó khuấy ở 0-20°C, kết tủa chất rắn, làm khô sau khi ly tâm, thu được dạng tinh thể B của hợp chất II.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế dạng tinh thể C của hợp chất II, bao gồm:

Trong khi khuấy, 1-03 (100g), metanol khan (1L) lần lượt được bổ sung vào bình phản ứng 2L, gia nhiệt đến 65°C. Sau khi hỗn hợp phản ứng được làm trong trong 0,5 giờ, dung dịch axit L-tartaric trong metanol (dung dịch chứa 30,09g axit tartaric trong 100mL metanol khan) được bổ sung vào từng giọt. Thời gian nhỏ giọt được kiểm soát trong 45-60 phút. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, dung dịch này được cho phản ứng ở 65°C trong 4 giờ. Sau đó, dung dịch axit L-tartaric trong metanol (dung dịch chứa 7,48g axit tartaric trong 100mL metanol khan) được bổ sung vào. Thời gian nhỏ giọt được kiểm soát trong 30-45 phút. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, dung dịch này được cho phản ứng ở 65 °C trong 1,5 giờ. Sau đó, dung dịch axit L-tartaric trong metanol (dung dịch chứa 8,55g axit tartaric trong 100mL metanol khan) được bổ sung vào. Thời gian nhỏ giọt được kiểm soát trong 30-45 phút. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, dung

dịch này được cho phản ứng ở 65 °C trong 1,5 giờ. Dung dịch này được làm mát xuống dưới 10°C, lọc, bánh lọc được rửa bằng metanol (100mL×2), sau đó làm khô trong chân không ở 45°C trong 36 giờ, thu được 109,4g bột tinh thể màu vàng, là muối axit L-tartaric của hợp chất II. Bột này được nhận dạng bằng phương pháp nhiễu xạ bột tia X. Kết quả thể hiện rằng dạng tinh thể này là dạng tinh thể C của muối axit L-tartaric của hợp chất II.

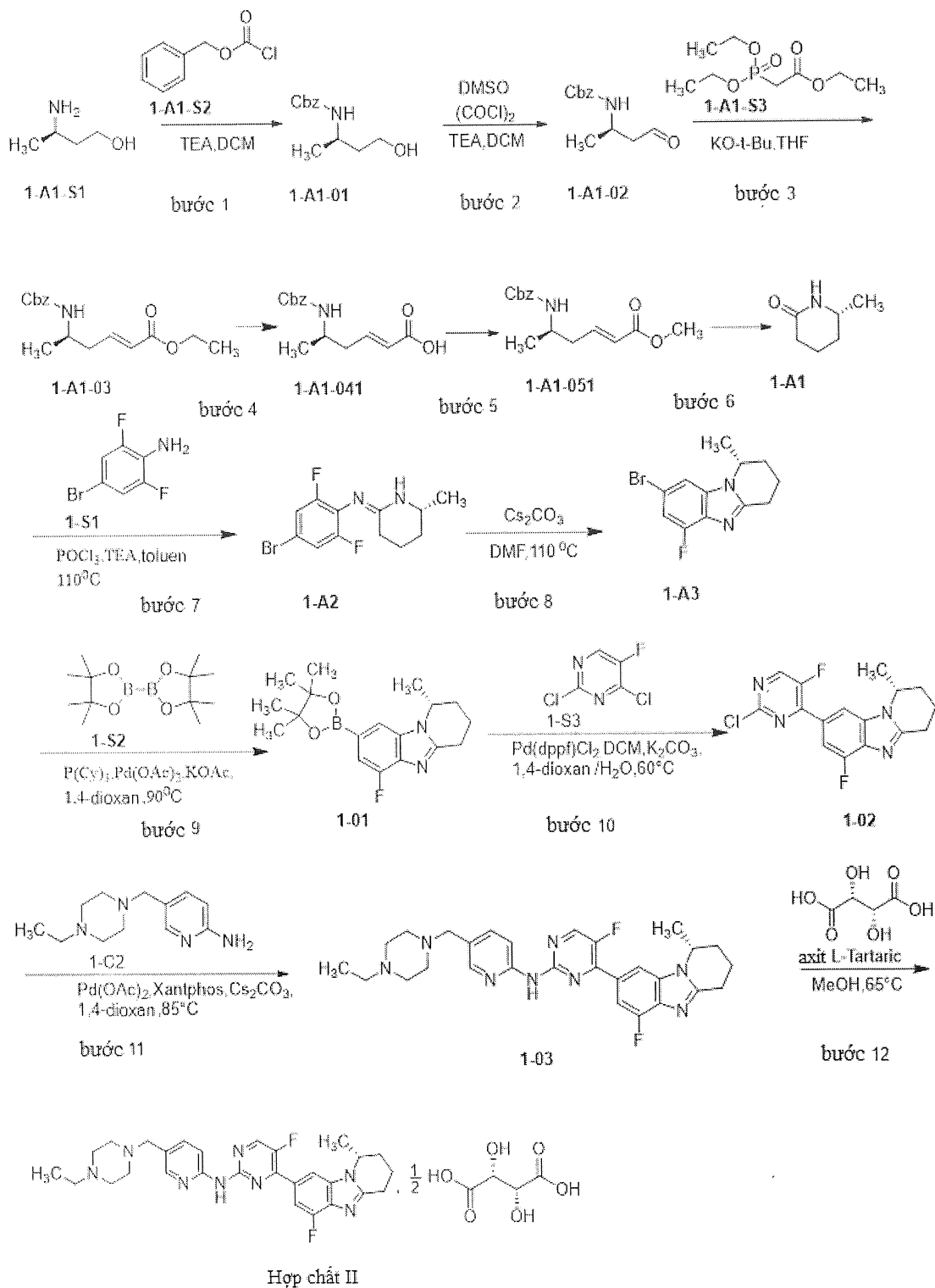
Theo một số phương án, phương pháp điều chế dạng vô định hình của hợp chất II, bao gồm:

Trifloetanol được bổ sung vào dạng tinh thể A của hợp chất II, thu được dung dịch trong suốt, sau đó dung dịch trong suốt này được cô đặc trong áp suất giảm, và thu được dạng vô định hình của hợp chất II.

Dạng vô định hình của hợp chất II dễ dàng tạo ra dạng B của hợp chất II do tác động của độ ẩm trong môi trường ở nhiệt độ trong phòng.

Dạng vô định hình của hợp chất II dễ dàng được chuyển hóa thành dạng tinh thể B của hợp chất II do tác động của nước ở nhiệt độ trong phòng.

Ví dụ, sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều chế muối axit L-tartaric (hợp chất II) của (R)-N-(5-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)pyridin-2-yl)-5-flo-4-(6-flo-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)pyrimidin-2-amin, bao gồm:



Theo một số phương án, phương pháp điều chế dạng tinh thể D của hợp chất III, bao gồm:

hợp chất I được hòa tan trong metanol ở 50-70°C, axit metansulfonic được hòa tan

trong metanol. Dung dịch axit metansulfonic trong metanol được bổ sung từng giọt vào dung dịch hợp chất I. Sau khi khuấy, isopropyl ete được bổ sung vào từng giọt, chất rắn được kết tủa chậm, lọc, bánh lọc được làm khô ở 40-70°C, thu được chất rắn. Isopropyl ete được bổ sung từng giọt vào nước cái, lọc sau khi khuấy, bánh lọc được làm khô ở 40-70°C, thu được chất rắn. Chất rắn thu được trên đây được làm khô liên tục, thu được dạng tinh thể D của hợp chất III.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế dạng tinh thể E của hợp chất III, bao gồm:

Dạng tinh thể D của hợp chất III được để ở nhiệt độ trong phòng trong độ ẩm 52%RH trong 1-4 ngày, thu được dạng tinh thể E của hợp chất III.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế dạng tinh thể F của hợp chất III, bao gồm:

Dạng tinh thể E của hợp chất III được để ở nhiệt độ trong phòng trong độ ẩm 44%RH trong 1-14 ngày, thu được dạng tinh thể F của hợp chất III.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế dạng tinh thể G của hợp chất III, bao gồm:

Dạng tinh thể D của hợp chất III được để ở nhiệt độ trong phòng trong độ ẩm 97%RH trong 1-4 ngày, thu được dạng tinh thể G của hợp chất III.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế dạng vô định hình của hợp chất III, bao gồm:

Dạng tinh thể D của hợp chất III được hòa tan trong nước, sau đó hỗn hợp này được cô đặc trong áp suất giảm, thu được chất rắn nhớt, là dạng vô định hình của hợp chất III.

Dạng vô định hình của hợp chất III không bền khi tăng quy mô lên 50 mg, dạng này chuyển hóa thành dạng tinh thể.

Tất cả các dạng tinh thể theo sáng chế gần như tinh khiết.

Thuật ngữ "gần như tinh khiết" như được sử dụng ở đây nghĩa là ít nhất 85% khối lượng, tốt hơn là ít nhất 95% khối lượng, tốt hơn nữa là ít nhất 99% khối lượng, tốt nhất

là ít nhất 99,5% khối lượng dạng tinh thể trong hợp chất có công thức I có mặt trong sáng chế, đặc biệt là dạng A, dạng B và/hoặc dạng C.

Như được mô tả ở đây, các dạng tinh thể mới có thể được nhận dạng bằng giản đồ nhiễu xạ bột tia X, tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng cường độ đỉnh và/hoặc tình trạng đỉnh nhiễu xạ bột tia X có thể thay đổi từ điều kiện thử nghiệm này đến điều kiện thử nghiệm khác, như các điều kiện thử nghiệm nhiễu xạ và/hoặc các cách vận hành khác nhau, v.v. Đồng thời, giá trị 2θ đo được có sai số khoảng $\pm 0,2^\circ$ do độ chính xác của các thiết bị khác nhau là khác nhau. Tuy nhiên, đã biết rằng giá trị cường độ tương đối của đỉnh phụ thuộc nhiều hơn so với vị trí của đỉnh vào các đặc tính nhất định của mẫu được đo, như kích cỡ tinh thể trong mẫu, định hướng của tinh thể và độ tinh khiết của vật liệu cần phân tích. Do đó, có thể thể hiện độ lệch cường độ đỉnh trong khoảng $\pm 20\%$ hoặc cao hơn. Tuy nhiên, bất kể sai số thí nghiệm, sai số thiết bị và định hướng ưu tiên, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này cũng có thể thu được đủ thông tin để nhận dạng dạng tinh thể từ dữ liệu XRD đưa ra trong sáng chế.

Theo sáng chế, "có giản đồ nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trong Fig. 1" hoặc "có giản đồ nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trong Fig. 2" nghĩa là giản đồ nhiễu xạ bột tia X thể hiện đỉnh chính như được thể hiện trong Fig. 1 hoặc Fig. 2, trong đó đỉnh chính được so sánh với đỉnh cao nhất trong Fig. 1 hoặc Fig. 2 mà cường độ của nó được đặt là 100%. Các đỉnh đó có giá trị cường độ tương đối cao hơn 10%, tốt hơn cao hơn 30%.

Theo sáng chế, "bổ sung metanol/axeton" và tương tự trong phương pháp điều chế dạng tinh thể có nghĩa là metanol được bổ sung trước và sau đó axeton được bổ sung vào, và tương tự, "etanol/nước" nghĩa là etanol được bổ sung trước và sau đó nước được bổ sung vào; ngoài ra, "trifloetanol/etyl axetat" nghĩa là trifloetanol được bổ sung trước và sau đó etyl axetat được bổ sung vào. Tương tự, ví dụ, "dung môi 1/dung môi 2" nghĩa là dung môi 1 được bổ sung vào trước và sau đó dung môi 2 được bổ sung vào; và "dung môi 2/dung môi 1" nghĩa là dung môi 2 được bổ sung vào trước và sau đó là dung môi 1.

Theo sáng chế, thuật ngữ "lượng hữu hiệu điều trị" chỉ lượng hợp chất/dạng tinh thể, khi được dùng cho đối tượng, là đủ để có tác dụng điều trị bệnh, rối loạn hoặc triệu chứng trong việc điều trị bệnh, hoặc ít nhất một triệu chứng lâm sàng của bệnh hoặc rối loạn. "Lượng hữu hiệu điều trị" có thể thay đổi theo hợp chất, bệnh, rối loạn, và/hoặc triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn, mức độ nghiêm trọng của bệnh, rối loạn, và/hoặc triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn, độ tuổi của bệnh nhân được điều trị, và/hoặc thể trọng của bệnh nhân được điều trị, v.v.. Trong trường hợp cụ thể bất kỳ, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ xác định được lượng thích hợp. Cũng có thể xác định bằng thử nghiệm thông thường. "Lượng hữu hiệu điều trị" trong trường hợp liệu pháp kết hợp chỉ tổng lượng đối tượng kết hợp hữu hiệu để điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý.

Tất cả các dạng liều của dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực dược, chẳng hạn, bằng cách trộn thành phần hoạt tính với một hoặc nhiều thành phần phụ trợ và sau đó bào chế dạng liều mong muốn.

"Chất mang dược dụng" chỉ các chất mang dược thông thường thích hợp cho dạng bào chế mong muốn, chẳng hạn: chất pha loãng, tá dược như nước, các dung môi hữu cơ khác nhau, và tương tự; chất độn như tinh bột, sacaroza, và tương tự; chất kết dính như các dẫn xuất xenluloza, alginat, gelatin và polyvinylpyrrolidon (PVP); chất làm ẩm như glyxerol; chất gây rã như aga-aga, canxi cacbonat và natri bicacbonat; chất tăng cường hấp thụ như các hợp chất amoni bậc bốn; chất hoạt động bề mặt như rượu xetylic; chất mang hấp thụ như cao lanh và bentonit; chất làm trơn như talc, canxi stearat, magie stearat, polyetylen glycol, và tương tự, có thể được bổ sung thêm vào dược phẩm cùng với các chất phụ trợ dược dụng khác, như chất phân tán, chất làm ổn định, chất làm đặc, chất tạo phức, chất đệm, chất tăng cường tính thấm, polyme, chất tạo hương, chất tạo ngọt, và chất tạo màu. Các chất phụ trợ thích hợp cho dạng liều mong muốn và phương thức sử dụng mong muốn tốt hơn là được sử dụng.

Thuật ngữ "bệnh, rối loạn", hoặc "tình trạng bệnh lý" chỉ bệnh, rối loạn, bệnh, triệu chứng, hoặc chỉ định bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được minh hoạ tiếp bằng các ví dụ sau đây, nhưng sáng chế không được hiểu là chỉ giới hạn trong phạm vi của các ví dụ này. Trong các kỹ thuật hoặc phương pháp trong các ví dụ sau, khi mà các điều kiện cụ thể không được mô tả cụ thể, chúng có thể được chọn từ các phương pháp và điều kiện thông thường.

Các chữ viết tắt:

Cbz-Cl: Benzyl cloroformat;

DCM: Diclometan;

DMF: N, N- Dimetylformamit;

DMSO: Dimetyl sulfoxit;

DSC: Đo nhiệt lượng quét vi sai;

DVS: Hấp thụ hơi động lực;

EtOH: Etanol;

EtOAc: Etyl axetat;

KOAc: Kali axit axetic;

KO-t-Bu: Kali tert-butoxit;

MeOH: metanol;

P(Cy)₃: Trixyclohexylphosphin;

Pd(OAc)₂: Paladi axetat;

Pd(dppf)Cl₂: [1,1'-Bis(diphenylphosphino)feroxen] paladi diclorua;

RT: nhiệt độ trong phòng;

RH: Độ ẩm tương đối;

TGA: Phân tích nhiệt trọng;

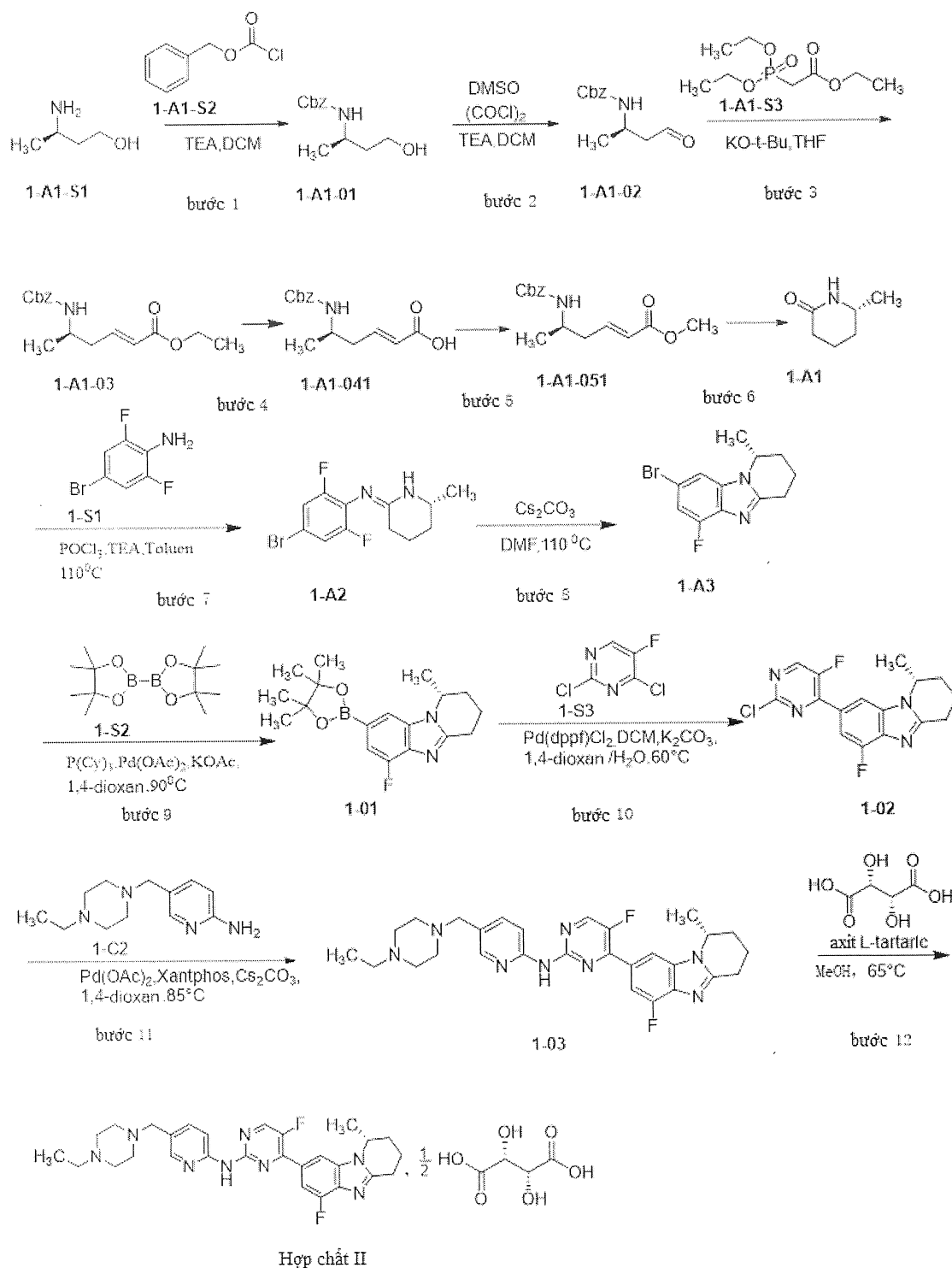
TEA: Trietanolamin;

THF: Tetrahydrofuran;

Xantphos: 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthen;

XRD: Giảm độ nhiễu xạ bột tia X.

Ví dụ 1: Tổng hợp dạng tinh thể A của hợp chất II



Tổng hợp hợp chất 1-A1-01 (bước 1)

DCM (20L), 1-A1-S1(300g) và Et₃N(390g) được bổ sung vào bình phản ứng 50L, và làm mát đến dưới -5°C, sau đó Cbz-Cl (570g) được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp nêu trên trong 5 giờ. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và cho phản ứng, theo dõi bằng TLC (EtOAc: hexan=1:3) đến khi phản ứng hoàn thành. Bổ sung nước (1,5L) vào hỗn hợp phản ứng, sau đó axit clohydric đặc (80mL) được bổ sung chậm từng giọt, độ pH được điều chỉnh đến 1-2. Pha hữu cơ được tách và sau đó rửa bằng 15 L nước, làm khô bằng Na₂SO₄ khan trong 0,5 giờ, lọc để loại bỏ tác nhân làm khô, dịch lọc được thu gom và cô đặc. Thu được 730g hợp chất 1-A1-01 (thô) dưới dạng chất lỏng dầu màu vàng nhạt với hiệu suất 95,4%.

Tổng hợp hợp chất 1-A1-02 (bước 2)

Bổ sung 720mL DCM, DMSO (90g) vào bình phản ứng 20L, hỗn hợp này được khuấy và làm mát đến dưới -65°C trong nitơ, sau đó COCl₂ được bổ sung từng giọt vào trong 2 giờ. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, hỗn hợp này được khuấy trong 20 phút ở nhiệt độ dưới -65°C; sau đó dung dịch 1-A1-01 trong DCM (143g/500mL DCM) được bổ sung từng giọt vào trong 40 phút. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, hỗn hợp này được cho phản ứng trong 15 phút ở nhiệt độ dưới -65°C. Ở nhiệt độ dưới -65°C, TEA được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp này trong 2 giờ. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến -20°C, sau đó 250L nước được bổ sung vào, độ pH được điều chỉnh đến 1-2 bằng HCl. Pha hữu cơ được tách và sau đó rửa bằng nước (1L×2), làm khô bằng Na₂SO₄ khan, lọc để loại bỏ tác nhân làm khô, dịch lọc được thu gom và cô đặc. Thu được 432g hợp chất 1-A1-02 thô dưới dạng chất lỏng dầu màu vàng. Sản phẩm thô này được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

Tổng hợp hợp chất 1-A1-03 (bước 3)

400mL THF, KOt-Bu (215g) được bổ sung vào bình phản ứng 1L, và làm mát đến 5-15°C, triethyl phosphonoacetat (430g) được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp này trong 50 phút. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt. Dung dịch 1-A1-02 trong THF (431g/100mL THF) được bổ sung từng giọt trong 1 giờ ở nhiệt độ dưới 15°C. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, theo dõi bằng TLC (EtOAc: hexan=1:3) đến khi phản ứng hoàn thành. Bổ sung

NaCl bão hòa (1,5L) vào hỗn hợp phản ứng, pha THF được thu gom. Pha nước được chiết bằng DCM (2L), sau đó pha hữu cơ được làm khô bằng Na_2SO_4 khan trong 0,5 giờ, lọc để loại bỏ tác nhân làm khô, dịch lọc được thu gom và cô đặc. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột. Thu được 390g hợp chất 1-A1-03 dưới dạng chất lỏng dầu màu vàng nhạt.

Tổng hợp hợp chất 1-A1-041 (bước 4)

Dung dịch nước NaOH (301g NaOH /1,5L nước) được bổ sung vào dung dịch 1-A1-03 trong THF (601g/2,3L THF), và gia nhiệt đến hồi lưu trong 3-4 giờ trong bình phản ứng 5L. Hỗn hợp thu được được làm mát đến 40-50°C, để yên và tách, pha hữu cơ (THF) được thu gom và cô đặc để tạo ra chất rắn. Chất rắn này được hòa tan trong nước (20L), pha nước được chiết lần lượt bằng metyl tertiary butyl ete (2L), EtOAc (2L), metyl tertiary butyl ete (2L). Sau đó, pha nước được điều chỉnh đến độ pH 1-2 bằng HCl đặc, và chiết hai lần bằng EtOAc (1,5L, 3L). Pha hữu cơ được kết hợp, và làm khô bằng Na_2SO_4 khan trong 0,5 giờ, lọc để loại bỏ tác nhân làm khô, dịch lọc được thu gom và cô đặc để tạo ra chất rắn. Chất rắn này được tạo huyền phù đặc với isopropyl ete (3L) trong 2 giờ, lọc để tạo ra chất rắn. Chất rắn này được rửa bằng isopropyl ete (1L). Chất rắn này được làm khô trong 3-4 giờ ở 50°C bằng cách thổi khí. Thu được 331g hợp chất 1-A1-041 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt với hiệu suất 52,7%.

Tổng hợp hợp chất 1-051 (bước 5)

Hợp chất 1-A1-041 (600g), metanol (25L), H_2SO_4 đặc được bổ sung vào bình phản ứng 50L, và gia nhiệt đến hồi lưu trong 3-4 giờ. Sau khi phản ứng hoàn thành, hỗn hợp phản ứng được làm mát đến nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp này được cô đặc, bổ sung DCM (15L) vào phần cặn thu được, sau đó hỗn hợp này được điều chỉnh đến độ pH=9-10 bằng K_2CO_3 . Pha hữu cơ được thu gom, làm khô bằng Na_2SO_4 khan trong 0,5 giờ, lọc để loại bỏ tác nhân làm khô, dịch lọc được thu gom và cô đặc. Thu được 6,37kg hợp chất 1-A1-051 dưới dạng chất rắn màu trắng đục với hiệu suất 97,3%.

Tổng hợp hợp chất 1-A1 (bước 6)

Hợp chất 1-A1-051(500g), metanol(1,8L) và Pd/C được bổ sung vào bình phản

úng 2L, hệ thống được thay không khí bằng nitơ, và thay nitơ bằng hydro lần lượt ba lần. Hỗn hợp này được gia nhiệt đến 85°C, và cho phản ứng ở 3,0MPa trong khí quyển hydro trong 3 giờ. Hỗn hợp thu được được làm mát đến nhiệt độ trong phòng, lọc để loại bỏ Pd/C, thu gom pha hữu cơ, và pha hữu cơ này được cô đặc để tạo ra chất rắn màu vàng nhạt. Bổ sung isopropyl ete (3L) vào chất rắn này và kết tinh ở -20°C trong 1 giờ, lọc để tạo ra chất rắn, chất rắn này được rửa bằng isopropyl ete (500mL). Thu được 234g hợp chất 1-A1 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt với hiệu suất 90,5%.

Tổng hợp hợp chất 1-A2 (bước 7)

POCl₃ (413g) được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp 1-A1(200g) và 4-bromo-2,6-difloanilin (410g) toluen (1,2L) trong bình phản ứng 50L trong 1 giờ. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, Et₃N được bổ sung từng giọt vào trong bể nước đá trong 1 giờ. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, hỗn hợp này được gia nhiệt đến 110 °C và cho phản ứng trong 1 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm mát đến 2-10°C, 1L nước được bổ sung vào, và hỗn hợp này được điều chỉnh đến độ pH=9-10 bằng K₂CO₃ bão hòa, và chiết hai lần bằng EtOAc (1,5L, 1L), kết hợp pha hữu cơ. Sau đó, pha hữu cơ được chiết bằng 2L NaCl bão hòa, và làm khô bằng Na₂SO₄ khan trong 0,5 giờ, lọc để loại bỏ tác nhân làm khô, dịch lọc được thu gom và cô đặc để tạo ra chất rắn. Chất rắn này được tạo huyền phù đặc với isopropyl ete (1L) trong 10 phút, lọc. Thu được 460g hợp chất 1-A2 dưới dạng chất rắn màu vàng.

Tổng hợp hợp chất 1-A3 (bước 8)

Hỗn hợp 1-A2 (450g), DMF (2L), Cs₂CO₃ (700g) được khuấy ở 110°C trong 24 giờ trong bình phản ứng. Theo dõi bằng TLC đến khi phản ứng hoàn thành. Bổ sung EtOAc (3L) vào hỗn hợp thu được, lọc để loại bỏ các tạp chất rắn, dịch lọc được chiết bằng NaCl bão hòa (1L×5), và pha hữu cơ được làm khô bằng Na₂SO₄ khan trong 0,5 giờ, cô đặc để tạo ra chất rắn, sau đó chất rắn này được tạo huyền phù đặc với methyl tertiary butyl ete (1L×2) trong 30 phút, lọc. Thu được 382g hợp chất 1-A3 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt với hiệu suất 90,10%.

Tổng hợp hợp chất 1-01 (bước 9)

Hợp chất 1-A3(380g), Bis(pinacolato)diboron (400g), KOAc(340g), Pd(OAc)₂

(6g), $P(Cy)_3$ (7g), 1,4-dioxan được bổ sung vào bình phản ứng, hỗn hợp này được gia nhiệt đến $90^\circ C$ và cho phản ứng trong 2 giờ trong nitơ. Theo dõi bằng TLC đến khi phản ứng hoàn thành. Hỗn hợp thu được được làm mát đến nhiệt độ trong phòng, lọc, dịch lọc được cô đặc để loại bỏ 1,4-dioxan, phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột bằng n-hexan và DCM, sau đó sản phẩm thu được được tạo huyền phù đặc với n-hexan (1,2L) trong 1 giờ. Thu được 334g hợp chất 1-01 dưới dạng chất rắn màu xám với hiệu suất 70,10%.

Tổng hợp hợp chất 1-02 (bước 10)

Hỗn hợp 1-01 (128g), 1,4-dioxan (1L), 1-S3 (85g), K_2CO_3 (110g), $Pd(dppf)Cl_2$.DCM được gia nhiệt đến $60^\circ C$ và cho phản ứng trong 4 giờ trong nitơ trong bình ba cổ dung tích 2L. Hỗn hợp phản ứng được làm mát đến nhiệt độ trong phòng, và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để loại bỏ 1,4-dioxan. Bổ sung DCM (1,5L) và nước (1,1L) vào phần cặn, khuấy, để yên và tách. Pha nước được chiết bằng DCM (10L). Pha hữu cơ kết hợp được chiết bằng HCl 0,5% (1L $\times$ 2), và sau đó bằng NaCl bão hòa. Pha hữu cơ được làm khô bằng khan Na_2SO_4 (500g), lọc để loại bỏ tác nhân làm khô, dịch lọc được cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung EtOAc (0,5L) vào phần cặn và khuấy trong 30 phút để kết tủa chất rắn, lọc. Chất rắn này được rửa bằng EtOAc (0,5L), sau đó làm khô ở $45^\circ C$ trong 3 giờ trong chân không, thu được chất rắn màu vàng (120g).

Tổng hợp hợp chất 1-03 (bước 11)

Hỗn hợp 1-02 (100g), 1,4-dioxan (1L), 1-C2 (80g), Cs_2CO_3 (163g), $Pd(OAc)_2$ (2g) và 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimetylxanthen (Xantphos) (4g) được khuấy ở $85^\circ C$ trong bình ba cổ dung tích 2L trong nitơ. Sau khi phản ứng hoàn thành, dung dịch thu được được làm mát đến nhiệt độ trong phòng, lọc để tạo ra chất rắn, chất rắn này được rửa bằng EtOAc. Sau đó, chất rắn này được bổ sung vào hỗn hợp DCM (1,5L) và nước (1,1L), khuấy, để yên, và lớp hữu cơ được tách ra. Sau đó, pha nước được chiết bằng DCM (700mL). và pha hữu cơ được kết hợp, sau đó rửa bằng nước (700mL $\times$ 2). Pha hữu cơ được làm khô bằng Na_2SO_4 khan (700g). Na_2SO_4 được loại bỏ bằng cách lọc, dịch lọc được cô đặc. Bổ sung metanol (0,5L) vào phần cặn và gia nhiệt đến $55\sim 65^\circ C$ trong 0,5 giờ, sau đó làm mát đến nhiệt độ trong phòng, lọc để tạo ra chất rắn, chất rắn

này được rửa bằng EtOAc 500mL. Chất rắn này được làm khô ở 45°C trong chân không trong 8 giờ. Thu được 111,79 g hợp chất 1-03 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Tổng hợp hợp chất II (bước 12)

Hợp chất 1-03 (500g), metanol khan (3,8L) được bổ sung vào bình phản ứng 10L và gia nhiệt đến 65°C. Sau khi hỗn hợp này được khuấy để tạo thành dung dịch trong suốt trong 0,5 giờ, dung dịch axit L-tartaric trong metanol (150,89g axit tartaric được hòa tan trong 500mL metanol khan) được bổ sung từng giọt vào. Thời gian nhỏ giọt được kiểm soát trong khoảng 45-60 phút. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, hỗn hợp này được khuấy ở 65°C trong 4 giờ, dung dịch axit L-tartaric trong metanol (35,58g axit tartaric được hòa tan trong 250mL metanol khan) được bổ sung từng giọt liên tục. Thời gian nhỏ giọt được kiểm soát trong khoảng 30-45 phút. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, hỗn hợp này được khuấy ở 65°C trong 1 giờ nữa, dung dịch axit L-tartaric trong metanol (36,55g axit tartaric được hòa tan trong 250mL metanol khan) được bổ sung từng giọt liên tục. Thời gian nhỏ giọt được kiểm soát trong khoảng 30-45 phút. Sau khi hoàn thành việc nhỏ giọt, hỗn hợp này được khuấy ở 65°C trong 1,5 giờ nữa. Hỗn hợp này được làm mát đến 20-30°C, lọc, bánh lọc được rửa bằng metanol (400mL×2), sau đó làm khô ở 45°C trong 36 giờ trong chân không. Thu được 530,64g hợp chất II dưới dạng bột tinh thể màu vàng nhạt. Dạng tinh thể đã thể hiện là dạng tinh thể A của hợp chất II theo phương pháp nhiễu xạ bột tia X.

Ví dụ 2: Kết quả phát hiện bằng XRD

Mẫu nhỏ của hợp chất II (mẻ số: 1072 P 04-A 14 S 01) và mẫu thí điểm của hợp chất II (mẻ số: 20170903) được tổng hợp bằng phương pháp theo ví dụ 1, sau đó mẫu nhỏ và mẫu thí điểm này sau đó xác định đặc tính bằng XRD.

Theo một phương án của sáng chế, phân tích XRD của mẫu nhỏ (mẻ số: 1072P04-A14S01) được thực hiện bằng nhiễu xạ kế SoliPharmausing Bruker D8 Advance. Các thiết bị phát hiện và thông số phát hiện được thể hiện trong bảng 1, dữ liệu của giản đồ XRD được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 1: Thiết bị phát hiện và thông số phát hiện XRD của mẫu nhỏ

Thiết bị	nhiều xạ bột tia X (XRD) & thiết bị gia nhiệt theo giai đoạn XRD	
Thiết bị	Nhiều xạ kế Bruker D8 Advance	
Chỉ số kỹ thuật	Bước sóng đích đồng: Bức xạ $K\alpha=1,54\text{\AA}$ (40kV, 40mA), góc kế θ -2 θ , đơn sắc kế Mo, bộ phát hiện Lynxeye	
Nguyên liệu định chuẩn	Al_2O_3	
Phần mềm tiếp nhận	Diffra Plus XRD Commander	
Phần mềm phân tích	MDI Jade 6	
Thông số trong phương pháp	Mô tả đĩa mẫu không phản xạ	Đường kính 24,6mm $\times$ độ dày 1,0mm
	Nhiệt độ thay đổi bảng gia nhiệt đĩa mẫu	Đĩa đồng
	Góc phát hiện	3~40°
	Độ dài bước	0,02°/bước
	Tốc độ	0,2s/bước

Bảng 2: Dữ liệu XRD của mẫu nhỏ

Đỉnh#	2 θ (°)	Cường độ tương đối (I%)
1	4,4	100,0
2	8,8	19,3
3	10,9	24,3
4	16,0	25,1
5	18,5	25,4
6	23,7	32,0
7	27,0	44,5

Theo một phương án khác, phân tích XRD của mẫu thí điểm (mẻ số: 20170903) được thực hiện bởi Beijing Center for Physical & Chemical Analysis bằng nhiều xạ kế D8-Advance Xradiation, phương pháp tham chiếu là JY/T 009-1996 《Các quy tắc chung để đo nhiễu xạ đa tinh thể tia X》. Thiết bị phát hiện và thông số phát hiện được thể hiện trong bảng 3, dữ liệu XRD được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 3: Thiết bị phát hiện và thông số phát hiện XRD của mẫu thí điểm

Thiết bị		Nhiều xạ kế D8-Advance X radiation
Chi số kỹ thuật		Bước sóng đích đồng: 1,5406nm
		Điện áp vận hành: 40kV
		Dòng điện vận hành: 40mA
Điều kiện thử nghiệm	Vùng quét 2θ	3~40°
	Độ dài bước	0,02°/bước
	Thời gian lưu	0,1 giây/bước

Bảng 4: Dữ liệu XRD của mẫu thí điểm

Đỉnh#	$2\theta(^{\circ})$	Cường độ tương đối (I%)
1	4,4	100,0
2	8,7	20,9
3	10,8	19,8
4	15,9	14,0
5	18,4	17,5
6	23,6	22,6
7	26,9	34,6

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ thấy được rằng trong quá trình thu nhận giản đồ XRD, dữ liệu liên quan có thể được xử lý khoa học thích hợp, như xử lý hiệu chuẩn theo đường cơ sở, để giảm sai số. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này cũng sẽ thấy được rằng có thể có một số thay đổi về góc 2θ hoặc mức độ tách, v.v., của giản đồ XRD thu được khi vận hành trong các điều kiện phòng thí nghiệm khác. Cần hiểu rằng giản đồ XRD của dạng tinh thể A của hợp chất II theo sáng chế không chỉ giới hạn ở giản đồ nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trong Fig. 1 hoặc Fig. 12, và các tinh thể có giản đồ nhiễu xạ bột tia X gần như trùng với giản đồ được thể hiện trong Fig. 1 hoặc Fig. 12 cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 3: Độ ổn định của dạng tinh thể

Thiết bị phát hiện và phương pháp của giản đồ nhiễu xạ bột tia X theo sáng chế được thể hiện trong bảng 1. Dạng tinh thể A của hợp chất II, dạng tinh thể D của hợp

chất III và dạng tinh thể F của hợp chất III được làm khô ở 80°C trong 24 giờ, hoặc 25°C, độ ẩm 60%RH trong 10 ngày, hoặc 40°C, 75%RH trong 10 ngày, và giản đồ XRD được thể hiện trong Fig. 10, kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5: Kết quả thử nghiệm độ ổn định của các dạng tinh thể khác nhau của hợp chất II

Dạng tinh thể của hợp chất	80°C, 24 giờ	25°C, 60%RH, 10 ngày	40°C, 75%RH, được đặt 10 ngày
dạng tinh thể A của hợp chất II	XRD không thay đổi	XRD không thay đổi	XRD không thay đổi
dạng tinh thể D của hợp chất III	XRD không thay đổi	XRD thay đổi	XRD thay đổi
dạng tinh thể F của hợp chất III	XRD thay đổi	XRD thay đổi	XRD thay đổi

Giản đồ XRD của dạng tinh thể A của hợp chất II trong các điều kiện khác nhau được thể hiện trên Fig. 10. Như được thể hiện trong hình vẽ này, dạng tinh thể A của hợp chất II được làm khô ở 80°C trong 24 giờ, 25°C, hoặc 60%RH trong 10 ngày, 40°C, 75%RH trong 10 ngày, dạng tinh thể này không bị thay đổi, điều này thể hiện rằng dạng tinh thể A của hợp chất II có độ ổn định tốt.

Ngoài ra, dạng tinh thể B của hợp chất II là dạng tinh thể nửa bền là tinh thể yếu, và dạng tinh thể B được gia nhiệt đến 180°C có thể chuyển hóa thành dạng tinh thể A.

Ví dụ 4: Xác định độ ổn định thời gian dài của dạng tinh thể

Các mẫu dạng tinh thể A của hợp chất I và hợp chất II lần lượt được đặt ở 25°C ± 2°C, và độ ẩm tương đối 60% ± 10% trong 18 tháng. Và các mẫu lần lượt được phát hiện bằng HPLC ở 0 tháng, 3 tháng và 18 tháng, và kết quả là như được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6: Kết quả về dạng tinh thể A của hợp chất I và hợp chất II ở 0 tháng, 3 tháng và 18 tháng được phát hiện bằng HPLC

Loại phát hiện	thời gian	Mẫu	
		hợp chất I	Dạng tinh thể A của hợp chất II
Hàm lượng tạp chất đơn tối đa (%)	0 tháng	0,04%	0,05%
	3 tháng	0,10%	0,05%
	18 tháng	0,22%	0,06%
Tổng hàm lượng tạp chất (%)	0 tháng	0,11%	0,10%
	3 tháng	0,17%	0,13%
	18 tháng	1,0%	0,21%
Hàm lượng > 0,1% số tạp chất chưa biết (s)	0 tháng	0	0
	3 tháng	0	0
	18 tháng	4	0

Như được thể hiện trong bảng 6, có thể thấy rằng sau 18 tháng, cả hàm lượng tạp chất đơn tối đa và tổng hàm lượng tạp chất của hợp chất I là cao hơn 3 lần so với của dạng tinh thể A của hợp chất II. Dạng tinh thể A của hợp chất II tạo ra các tạp chất với lượng nhỏ hơn 0,1% sau 18 tháng, trong khi hợp chất I tạo ra bốn tạp chất với lượng lớn hơn 0,1%. Độ ổn định của dạng tinh thể A của hợp chất II được cải thiện đáng kể so với hợp chất I.

Ví dụ 5: Xác định độ hút ẩm động lực (Dynamic moisture sorption - DVS)

Các thiết bị và phương pháp xác định độ hút ẩm động lực theo sáng chế được thể hiện trong bảng 7, kết quả DVS được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 7: Thiết bị và phương pháp xác định độ hút ẩm động lực

Thiết bị	Thiết bị xác định độ hút ẩm động lực (DVS)
Thiết bị	TA Instruments Q5000TGA
Phần mềm điều khiển	Thermal Advantage
Phần mềm phân tích	Universal Analysis
Khay mẫu	Chén platin

Lượng phát hiện mẫu	1-10mg	
Khí bảo vệ	nitơ	
Tốc độ dòng khí	10mL/phút	
Tiêu chuẩn đánh giá	Không hút ẩm	Không quá 0,2%
	Hút ẩm nhẹ	Trên 0,2%, nhưng không quá 2,0%
	Dễ hút ẩm	Trên 2%, nhưng không quá 15%
	Siêu hút ẩm	Trên 15%

Bảng 8: Kết quả xác định DVS

Dạng tinh thể của hợp chất	Sự thay đổi khối lượng trong khoảng độ ẩm 0%RH - 80%RH
Dạng tinh thể A của hợp chất II	5,3%
Dạng tinh thể B của hợp chất II	5,5%
Dạng tinh thể D của hợp chất III	17,2%
Dạng tinh thể F của hợp chất III	16,6%

Dạng tinh thể A và dạng tinh thể B của hợp chất II: mức thay đổi về khối lượng trong khoảng độ ẩm 0% RH đến 80% RH là khoảng 5,3% và 5,5%, trong khi đối với dạng tinh thể D và dạng tinh thể F của hợp chất III: mức thay đổi về khối lượng trong khoảng độ ẩm 0% RH đến 80% RH là khoảng 17,2% và 16,6%. Từ đó có thể thấy rằng dạng tinh thể của hợp chất II ít hút ẩm hơn so với dạng tinh thể của hợp chất III và thích hợp hơn để điều chế các chế phẩm rắn.

Ví dụ 6: Xác định độ hòa tan

Thử nghiệm độ hòa tan được thực hiện trên dạng tinh thể A của hợp chất II, dạng tinh thể D của hợp chất III, và hợp chất I. kết quả về độ hòa tan trong nước ở nhiệt độ trong phòng được thể hiện trong bảng 9. Có thể thấy rằng các dạng tinh thể khác nhau của hợp chất II có đặc tính cải thiện độ hòa tan khác nhau, và dạng tinh thể A của hợp chất II thể hiện đặc tính hòa tan tuyệt vời.

Bảng 9: Kết quả độ hòa tan của các dạng tinh thể khác nhau của hợp chất II

Dạng tinh thể của hợp chất	Độ hòa tan trong nước ở nhiệt độ trong phòng	Phân loại độ hòa tan
Dạng tinh thể A của hợp chất II	100-200mg/mL	Dễ tan
Dạng tinh thể D của hợp chất III	50-100mg/mL	Hòa tan
hợp chất I	<1mg/mL	Rất ít tan

Lưu ý: Tiêu chuẩn phân loại độ hòa tan là theo các quy định tương ứng trong bốn trường hợp tổng quát trong Dược điển của Trung Quốc (2015).

Ví dụ 7: Thử nghiệm dược động học

Tổng số 12 chuột cống SD được chia thành hai nhóm, 6 chuột mỗi nhóm, một nửa là chuột đực và một nửa là chuột cái. 30mg/kg dạng tinh thể A của hợp chất II và hợp chất I được cho dùng đường uống bằng ống thông riêng rẽ mỗi ngày một lần.

Trong mẫu huyết tương trên đây, protein được kết tủa bằng axetonitril, dịch nổi được pha loãng 3 lần bằng nước, và 5 μ L được phát hiện bằng LC-MS/MS, kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng 10:

Bảng 10: Kết quả thử nghiệm dược động học

hợp chất	Cách dùng	Liều dùng (mg/kg)	AUC _{cuối} (h*ng/mL)
hợp chất I	Đường miệng	30	27670
Dạng tinh thể A của hợp chất II	Đường miệng	30	47032

Như được thể hiện trong bảng trên đây, so với hợp chất I, dạng tinh thể A của hợp chất II được hấp thụ in vivo tốt hơn.

Ví dụ 8: Thử nghiệm ức chế CDK4/6 của hợp chất I

Để chứng tỏ rằng các hợp chất thể hiện ái lực với các CDK kinaza (CDK4 / CycD3, CDK6 / cycD3), thử nghiệm CDK kinaza được thực hiện.

Các đệm phản ứng được điều chế như sau: đệm kinaza bazơ cho DK6 (50mM HEPES, pH7,5; 0,0015% Brij-35; 10mM MgCl₂; 2mM DTT); đệm kinaza bazơ cho

CDK4 (20mM HEPES, pH7,5; 0,01% Triton X-100; 10mM MgCl₂; 2mM DTT); đệm ngừng phản ứng (100mM HEPES, pH7,5; 0,015% Brij-35; 0,2% chất phản ứng phủ # 3; 50mM EDTA)

Quy trình phản ứng enzym:

1) Pha loãng hợp chất đến 50X của nồng độ cao nhất mong muốn cuối cùng trong phản ứng bằng DMSO 100%. Chuyển 100μL dịch pha loãng hợp chất này vào giếng trong đĩa 96 giếng. Sau đó, pha loãng hợp chất hàng loạt bằng cách chuyển 30μL vào 60μL DMSO 100% trong giếng tiếp theo và cứ như vậy để có tổng số 10 nồng độ. Bổ sung 100μL DMSO 100% vào hai giếng trống để làm đối chứng không chứa hợp chất và đối chứng không chứa enzym trong cùng đĩa 96 giếng. Đánh dấu đĩa này là đĩa gốc.

2) Chuẩn bị đĩa trung gian bằng cách chuyển 10μL hợp chất từ đĩa gốc sang đĩa 96 giếng mới chứa 90μL đệm kinaza làm đĩa trung gian.

3) Chuyển 5μL hợp chất từ đĩa trung gian 96 giếng vào đĩa 384 giếng theo bộ đôi.

4) Bổ sung 10μL dung dịch enzym 2,5x vào từng giếng của đĩa thử nghiệm 384 giếng.

5) Ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút.

6) Bổ sung 10μL dung dịch cơ chất 2,5x đã chuẩn bị bằng cách bổ sung peptit được đánh dấu FAM và ATP trong đệm kinaza bazơ. Nồng độ phản ứng của các enzym và cơ chất là như trong bảng sau (bảng 11):

Bảng 11: Nồng độ phản ứng của enzym và cơ chất

Enzym	Enzym (nM)	ATP (μM)	Peptit	Nồng độ peptit (μM)
CDK4	10	280	P8	3
CDK6	15	800	P8	3

7) Ủ ở 28°C trong khoảng thời gian đã định.

8) Bổ sung 25μL đệm ngừng phản ứng để dừng phản ứng.

9) Thu thập dữ liệu trên thước kẹp. Sau đó chuyển các giá trị chuyển đổi thành giá trị ức chế.

Tỷ lệ phần trăm ức chế = $(\text{max} - \text{chuyển đổi}) / (\text{max} - \text{min}) * 100$

Ở đây “max” là giá trị của đối chứng DMSO; “min” là giá trị của đối chứng thấp.

10) Khớp đường cong bằng cách sử dụng tỷ lệ phần trăm ức chế trong excel XLFit tích hợp phiên bản 4.3.1 để thu được các giá trị IC_{50} . Phương trình được sử dụng là: $Y = \text{Đáy} + (\text{Đỉnh} - \text{Đáy}) / (1 + (IC_{50}/X)^{\text{độ dốc}})$.

Kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị IC_{50} được thể hiện trong bảng 12.

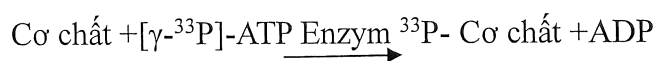
Bảng 12: Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế CDK4/6

Mẫu	$IC_{50}(\text{CDK4})/\text{nM}$	$IC_{50}(\text{CDK6})/\text{nM}$
LY283521 9	2	22
hợp chất I	1,9	22

Ví dụ 9: Hoạt tính ức chế và thử nghiệm chọn lọc trên các phân lớp khác của CDK kinaza ở mức độ phân tử

Hợp chất I được sử dụng làm hợp chất thử nghiệm, và so sánh với thuốc đối chứng dương (Abemaciclib) để so sánh hoạt tính ức chế CDK kinaza và tính đặc hiệu chọn lọc giữa chúng.

Cơ chế của phương pháp này được thể hiện trong công thức (IV). Kinaza xúc tác sự phosphoryl hóa cơ chất protein để đánh dấu ^{33}P trên ATP được đánh dấu ^{33}P ($\gamma\text{-}^{33}\text{P}$ -ATP) thành cơ chất protein trong hệ phản ứng, hệ phản ứng này được tạo vết trên màng trao đổi ion P81, và màng này được rửa kỹ bằng đệm phosphat 0,75%; cơ chất đã phosphoryl hóa có hoạt tính phóng xạ được để lại trên màng, và hoạt tính kinaza được phản ánh qua việc ghi lại cường độ nhãn phóng xạ của cơ chất protein.



Công thức (IV)

Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Prism4 (GraphPad), và không thức khớp đường cong là:

$Y = \text{Đáy} + (\text{Đỉnh} - \text{Đáy}) / (1 + 10^{((\text{Log}IC_{50} - X) * \text{Độ dốc}))}$; trong đó, Y là tỷ lệ phần

trăm ức chế (%); X là logarit của nồng độ chất ức chế.

Kết quả: Thông qua việc sàng lọc các CDK kinaza khác nhau, đã phát hiện rằng hợp chất I có IC_{50} lớn hơn $0,4\mu M$ đối với ức chế CDK1/2/7/9, trị số này cao hơn hàng chục đến hàng nghìn lần so với trị số của CDK4/6 (xem bảng 13).

Bảng 13: Hoạt tính ức chế CDK kinaza

Kinaza	IC_{50} (nM)	
	LY2835219	hợp chất 2b
CDK1/xyclin B	308	1683
CDK2/xyclin E	90	441
CDK7/xyclin H	2071	664
CDK9/xyclin T1	111	649

Kết luận: Ở mức độ phân tử, hợp chất I theo sáng chế thể hiện hiệu quả ức chế mạnh đối với CDK4/6, và hiệu quả ức chế yếu đối với CDK1/2/7/9, điều này cho thấy rằng hợp chất I là chất ức chế CDK4/6 kinaza có độ chọn lọc tuyệt vời. Ngoài ra, độ chọn lọc của hợp chất I giữa CDK1/2/9 và CDK4/6 là cao hơn đáng kể so với độ chọn lọc của LY2835219 (Abemaciclib).

Ví dụ 10: Tác dụng kìm hãm khối u trong mô hình động vật ghép khác loài JeKo-1

Các tế bào JeKo-1 được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 chứa 20% huyết thanh thai bò. Các tế bào JeKo-1 sinh trưởng ở pha lũy tiến được thu gom và tạo huyền phù lại trong PBS đến nồng độ thích hợp để cấy khối u dưới da cho chuột nhắt NOD/SCID. 70 chuột nhắt cái được cấy dưới da bên phải bằng 5×10^6 tế bào JeKo-1 đã tạo huyền phù lại trong PBS và matrigel (1:1). Khi thể tích khối u trung bình đạt 134mm^3 , các chuột được chia nhóm ngẫu nhiên theo kích cỡ khối u và được cho dùng thuốc. 48 chuột được chia thành nhóm thử nghiệm, và còn lại 22 chuột không được sử dụng trong thử nghiệm. Thể tích khối u được tính toán là: đường kính dài $\times$ đường kính ngắn²/2. Thử nghiệm được chia thành nhóm đối chứng dung môi, nhóm thử nghiệm sử dụng thuốc đại diện hợp chất I (10mg/kg), nhóm thử nghiệm sử dụng thuốc đại diện hợp chất I (25mg/kg), nhóm thử nghiệm sử dụng thuốc đại diện hợp chất I (50 mg/kg), nhóm thử nghiệm sử dụng thuốc đại diện hợp chất I (100mg/kg), tổng số có 6 nhóm mỗi nhóm gồm 8 chuột nhắt, và các chuột nhắt được cho dùng đường uống bằng ống thông mỗi

ngày một lần và sau đó tiếp tục sử dụng trong 19 ngày. Hiệu lực được đánh giá theo tỷ lệ ức chế sự phát triển của khối u TGI, kết quả được thể hiện trong bảng 14.

Công thức tính toán là như sau: $TGI (\%) = (C-T)/C \times 100\%$ (C và T lần lượt là khối lượng trung bình của khối u trong nhóm đối chứng dung môi và khối lượng trung bình của khối u trong nhóm được điều trị). Giá trị TGI (%) càng cao chứng tỏ hiệu lực càng tốt; và ngược lại.

Kết quả: hợp chất I chứng tỏ hoạt tính chống khối u tuyệt vời.

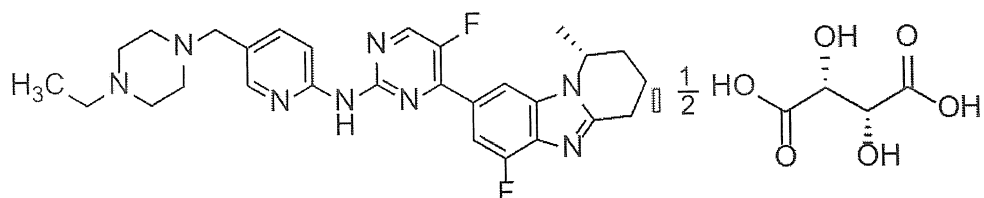
Bảng 14: Đánh giá hiệu quả chống khối u của hợp chất I đại đối với mô hình ghép khác loài JeKo-1

Nhóm	Liều dùng (mg/kg)	Tỷ lệ ức chế sự phát triển của khối u tương đối TGI (%)	Giá trị p ^a
Đối chứng dung môi	--	--	--
hợp chất I	10	42,7	0,087
hợp chất I	25	73,8	0,003
hợp chất I	50	98,3	0,001
hợp chất I	100	104,5	0,001

Lưu ý: a: giá trị p là phân tích so sánh về thể tích khối u volume đối với nhóm điều trị và nhóm đối chứng dung môi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức II ở dạng tinh thể,



công thức II

trong đó, mẫu nhiễu xạ bột tia X của hợp chất ở dạng tinh thể này có các đỉnh đặc trưng ở góc nhiễu xạ 2θ là $4,4\pm 0,2^\circ$, $23,6\pm 0,2^\circ$ và $26,9\pm 0,2^\circ$.

2. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 1, trong đó, mẫu nhiễu xạ bột tia của hợp chất ở dạng tinh thể này có các đỉnh đặc trưng ở góc nhiễu xạ 2θ là $4,4\pm 0,2^\circ$, $8,7\pm 0,2^\circ$, $10,8\pm 0,2^\circ$, $18,4\pm 0,2^\circ$, $23,6\pm 0,2^\circ$ và $26,9\pm 0,2^\circ$.

3. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 2, trong đó, mẫu nhiễu xạ bột tia X của hợp chất ở dạng tinh thể này có các đỉnh đặc trưng ở góc nhiễu xạ 2θ là $4,4\pm 0,2^\circ$, $8,7\pm 0,2^\circ$, $10,8\pm 0,2^\circ$, $15,9\pm 0,2^\circ$, $18,4\pm 0,2^\circ$, $23,6\pm 0,2^\circ$ và $26,9\pm 0,2^\circ$.

4. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3, trong đó, hợp chất ở dạng tinh thể này có mẫu nhiễu xạ bột tia X về cơ bản như được thể hiện trên Fig. 1.

5. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3, trong đó, hợp chất ở dạng tinh thể này có mẫu nhiễu xạ bột tia X về cơ bản như được thể hiện trên Fig. 12.

6. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 1, trong đó, hợp chất ở dạng tinh thể này được điều chế bằng các bước sau:

1) tạo huyền phù hợp chất (R)-N-(5-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)pyridin-2-yl)-5-fluoro-4-(6-fluoro-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl)pyrimidin-2-amin (hợp chất I) trong nước và/hoặc dung môi hữu cơ tan trong nước, thu được huyền phù;

2) đun nóng huyền phù này đến 50°C hoặc cao hơn;

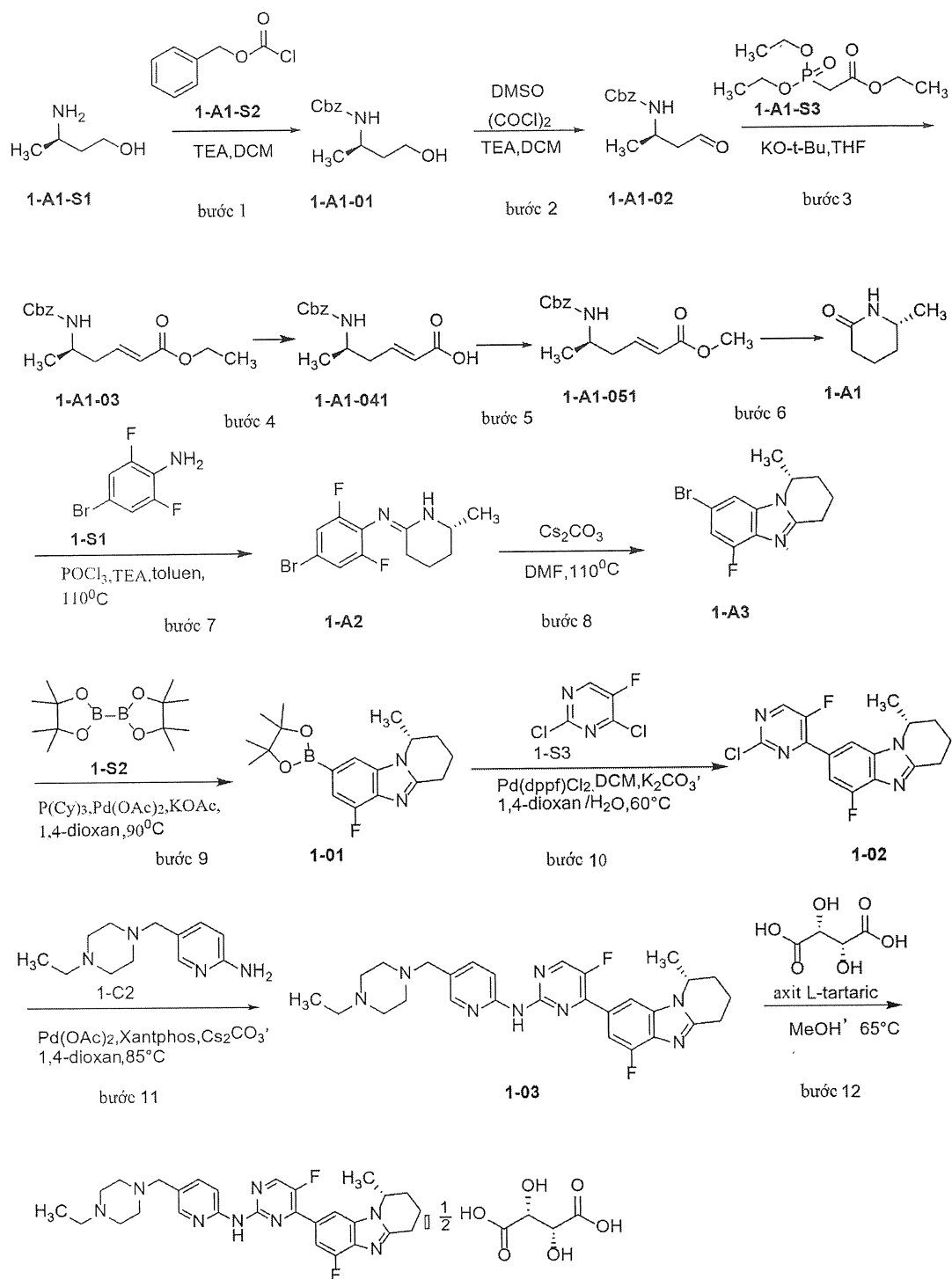
3) giữ nhiệt độ ở 50°C hoặc cao hơn, bổ sung axit L-tartaric vào huyền phù này, và thực hiện việc xử lý axit hóa, thu được dung dịch trong; và

4) làm nguội dung dịch trong này đến nhiệt độ phòng, lọc có khuấy, làm khô bánh lọc, và thu được hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 1.

7. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 1, trong đó, hợp chất ở dạng tinh thể này được điều chế bằng các bước sau đây:

hòa tan hợp chất I trong metanol ở 50-70°C để thu được dung dịch trong, hòa tan axit L-tartaric trong metanol, bổ sung từng giọt dung dịch axit L-tartaric trong metanol vào dung dịch chứa hợp chất I trong metanol, lọc sau khi khuấy, làm khô bánh lọc ở 40-70°C, thu được hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 1.

8. Phương pháp điều chế hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 1, bao gồm các bước:



9. Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 1, và các tá dược, chất phụ trợ và/hoặc chất mang dược dụng.

1/7

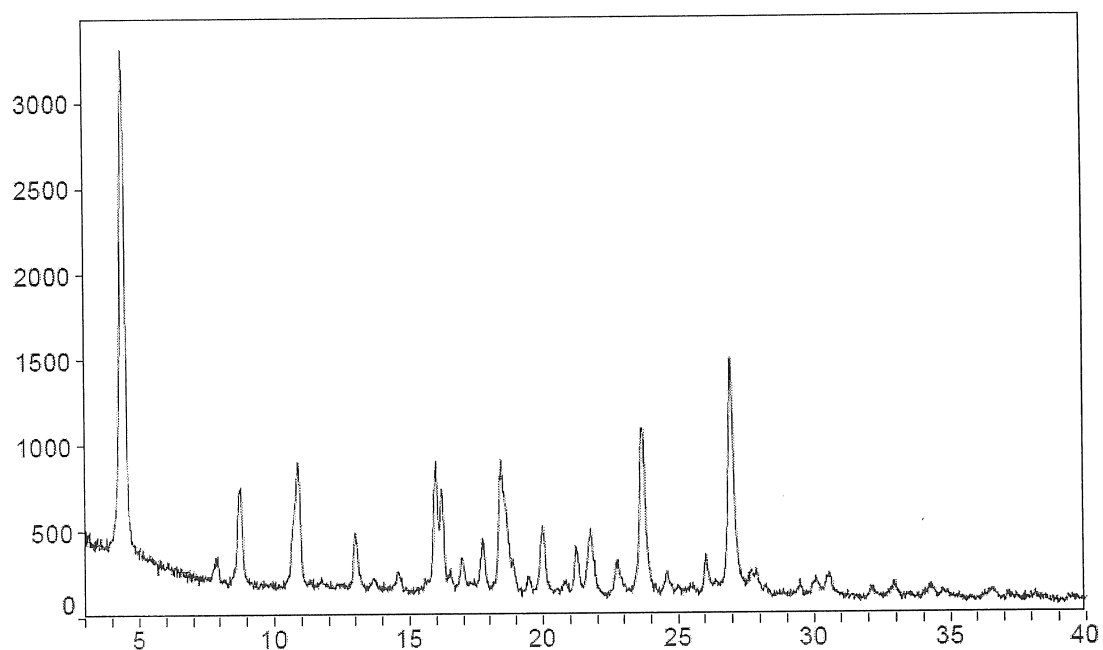


Fig. 1

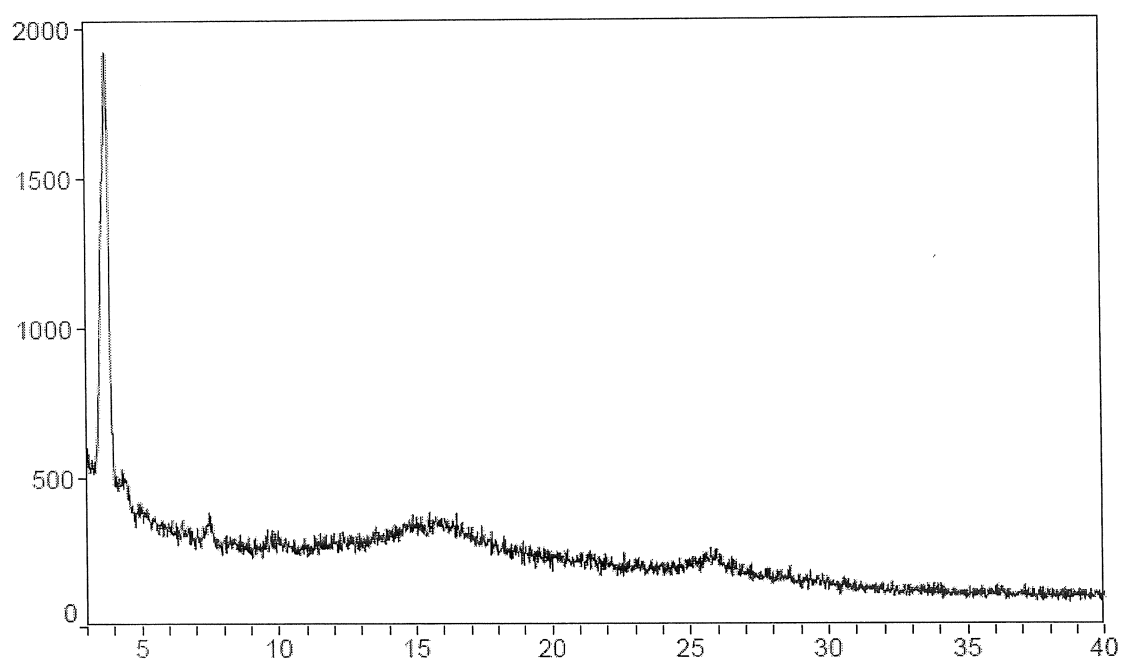


Fig. 2

2/7

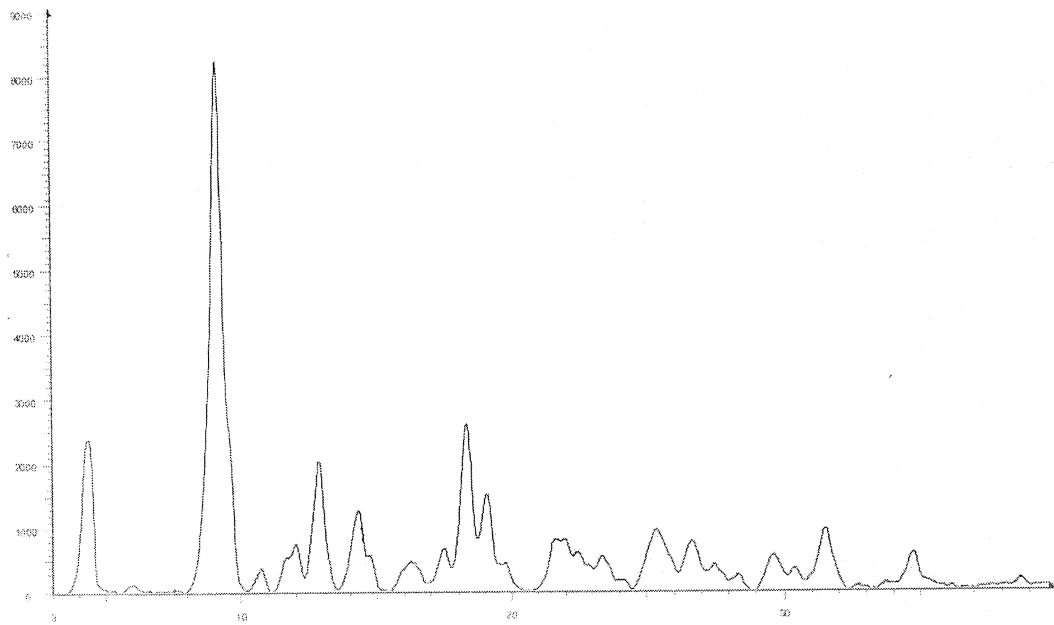


Fig. 3

3/7

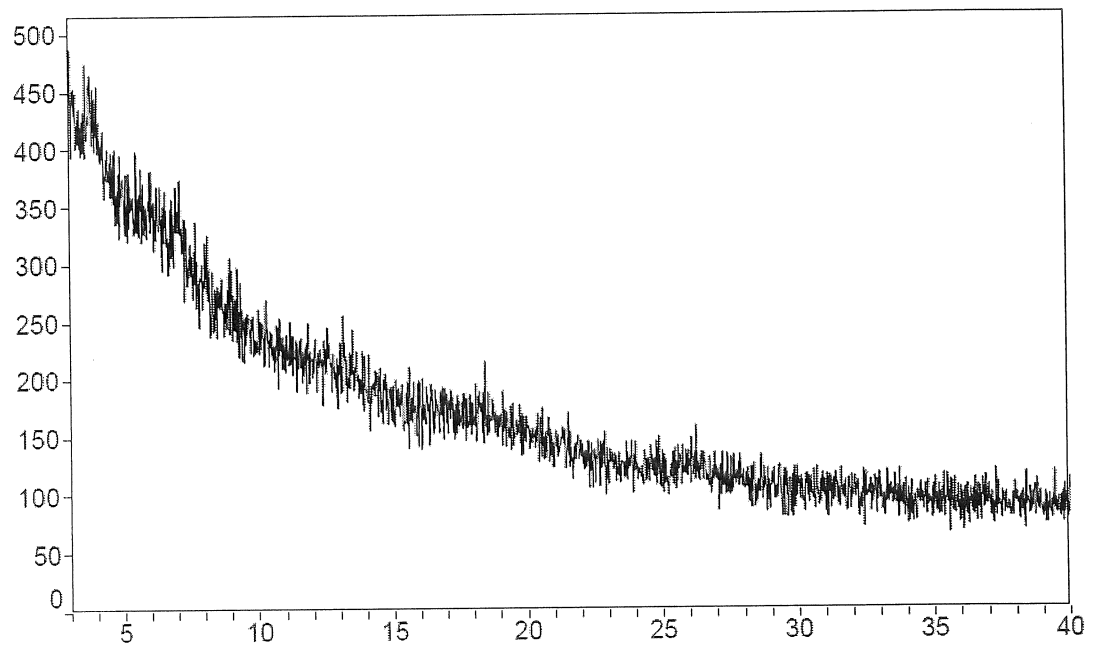


Fig. 4

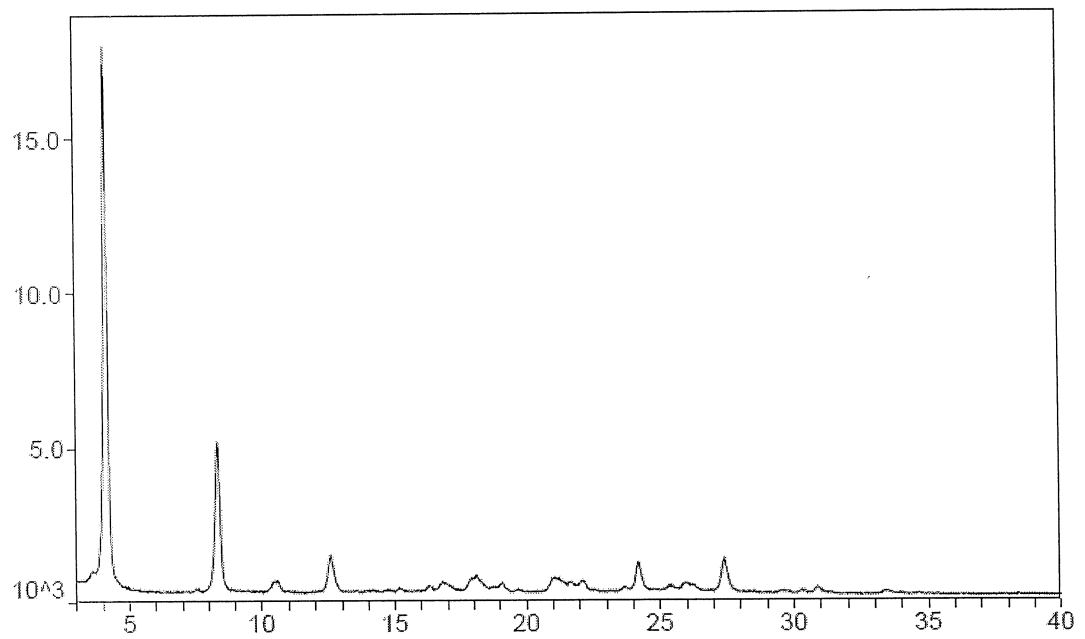


Fig. 5

4/7

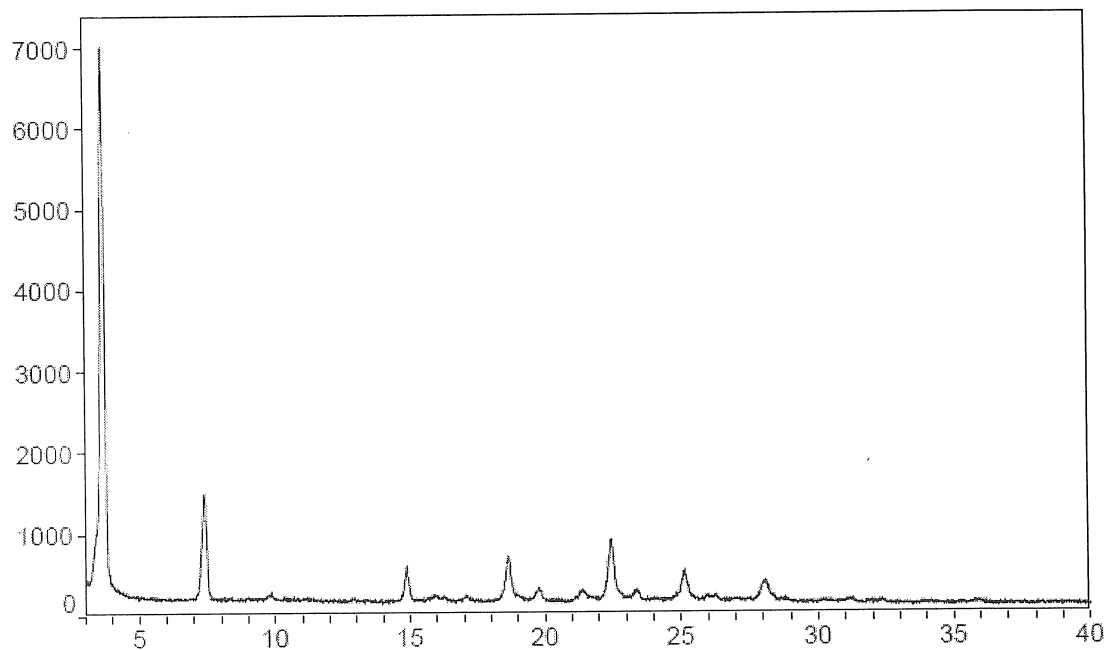


Fig. 6

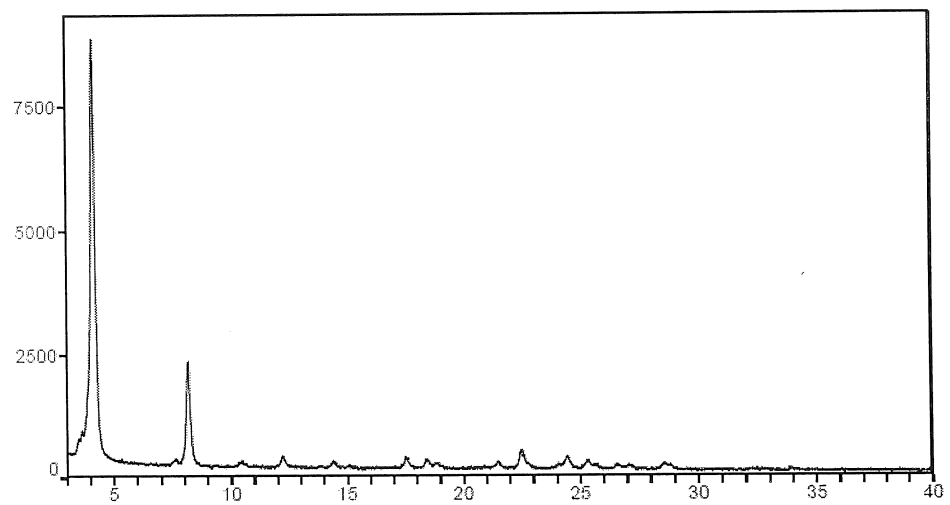


Fig. 7

5/7

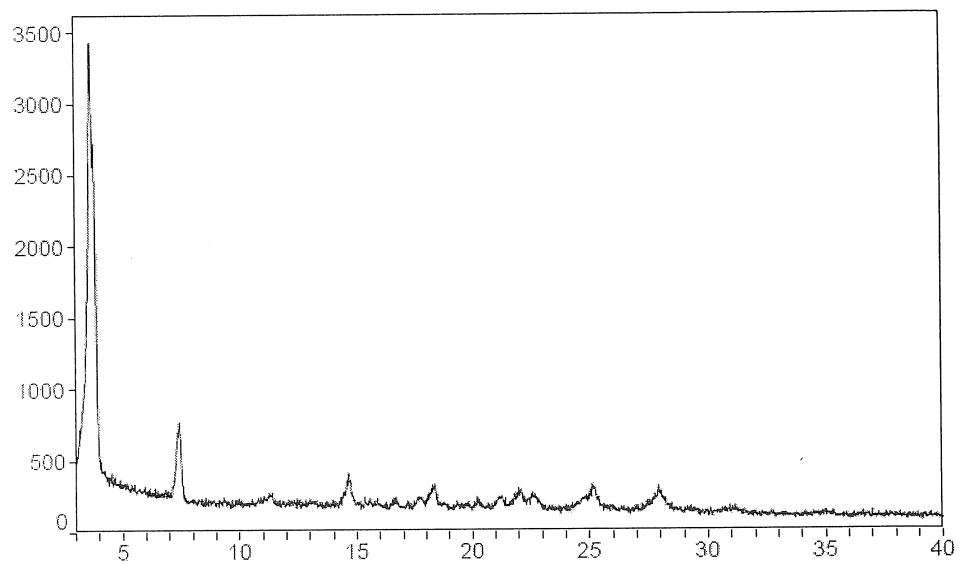


Fig. 8

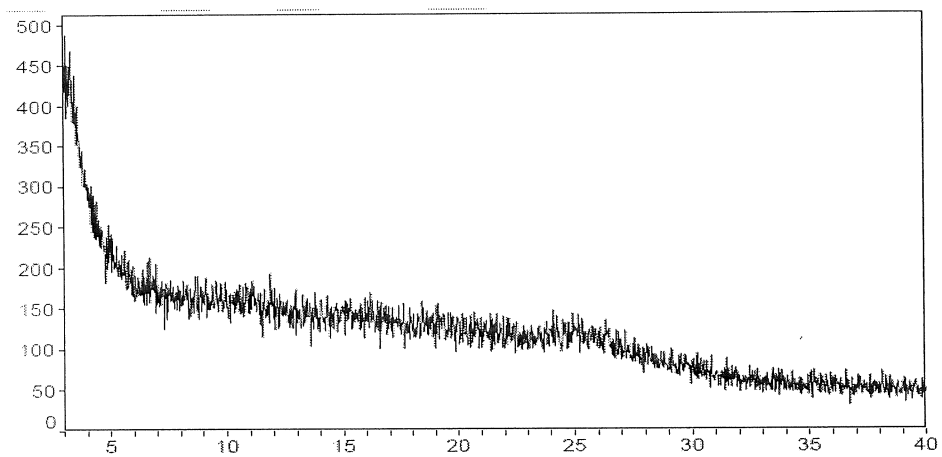


Fig. 9

6/7

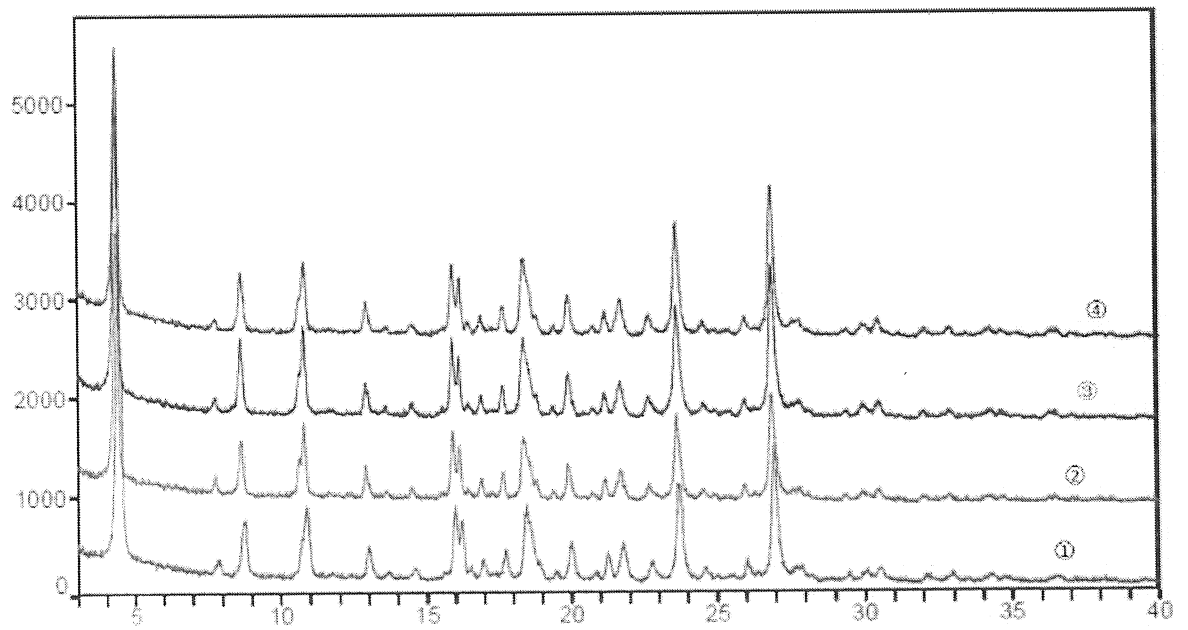


Fig. 10

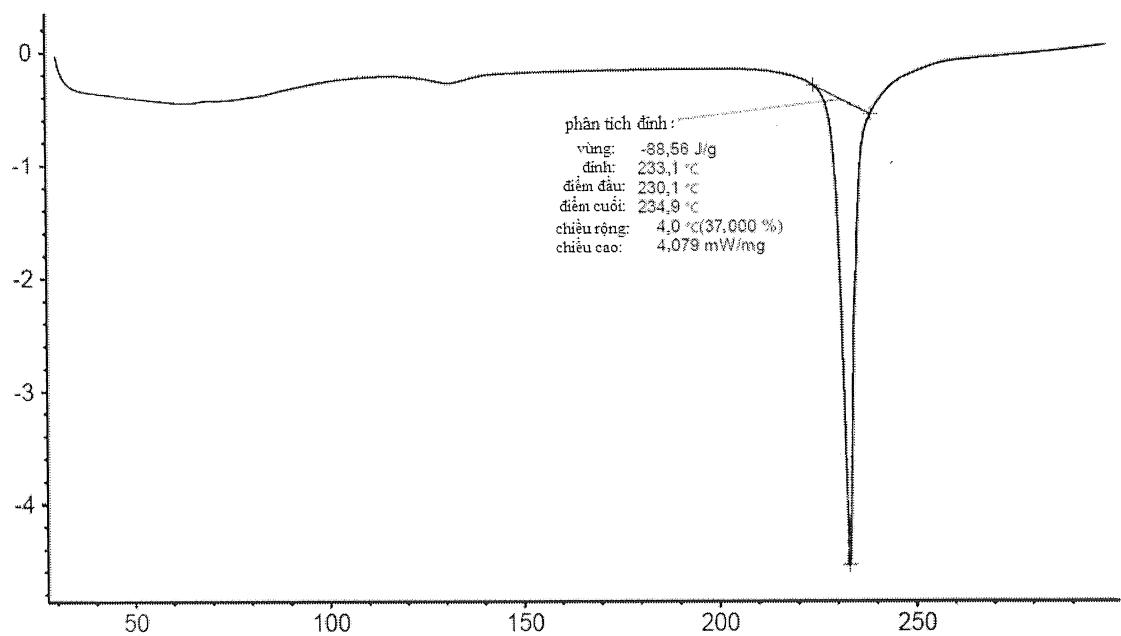


Fig. 11

7/7

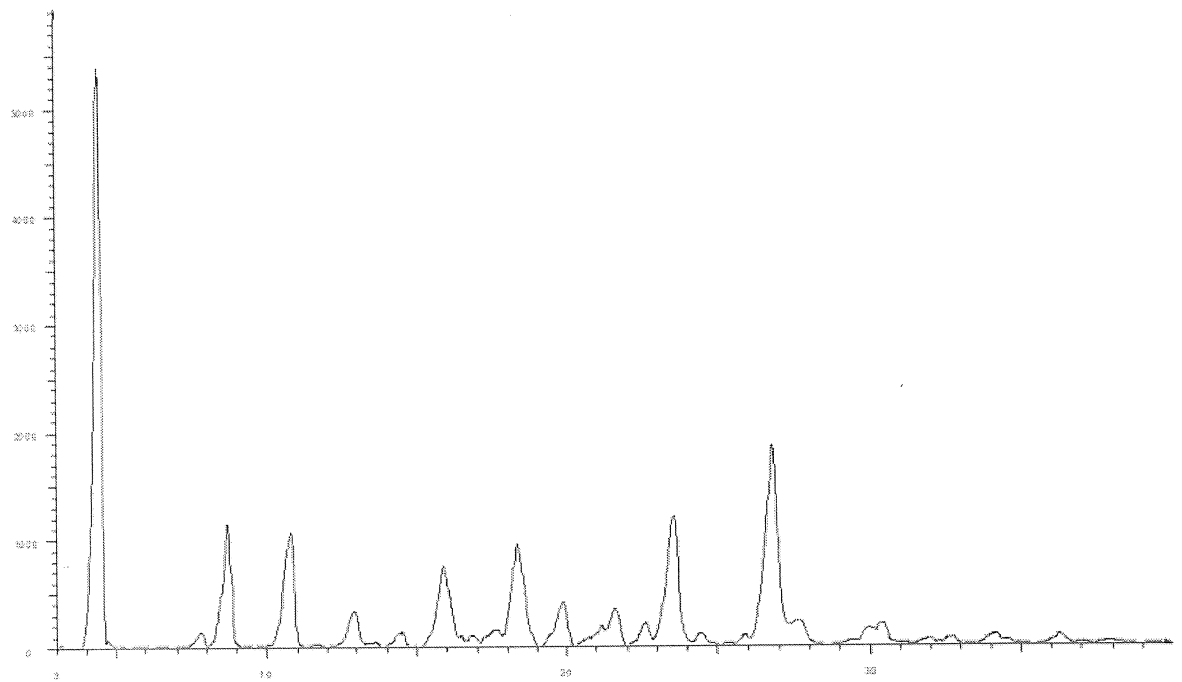


Fig. 12