



(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)



1-0025634

(51)⁷ C07D 401/14; A61K 31/4545; A61P 35/00 (13) B

(21) 1-2017-01624

(22) 06/11/2015

(86) PCT/US2015/059390 06/11/2015

(87) WO2016/077161 19/05/2016

(30) 62/079,742 14/11/2014 US

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/08/2017 353A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

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

(72) HENRY, James Robert (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT AMINOPYRIDIN CÓ TÁC DỤNG LÀM CHẤT ỨC CHẾ KINAZA
AURORA A VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất aminopyridin, hoặc muối dược dụng của nó, mà có khả năng ức chế kinaza Aurora A và, do đó là hữu dụng trong điều trị bệnh ung thư. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này hoặc muối của nó.

Lĩnh vực kĩ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất aminopyridin, hoặc các muối được dụng của chúng, mà có khả năng ức chế kinaza Aurora A và có thể hữu dụng trong điều trị ung thư.

Tình trạng kĩ thuật của sáng chế

Các kinaza Aurora là họ của các kinaza serin/threonin và là các chất điều biến chủ chốt của quá trình nguyên phân. Có ba thể tương tự của các kinaza Aurora, A, B, và C của người, trong đó Aurora A đã được chỉ thị ở ung thư có nguồn gốc mô đa dạng và có thể có các đặc tính sinh khối u khi được biểu hiện quá mức.

Sự lệch bội lẻ hoặc sự không ổn định về gen là một trong những dấu hiệu thường thấy nhất của ung thư. Cụ thể hơn, sự ức chế Aurora B cảm ứng sự nội nguyên phân và sự đa bội sau đó là một trong số các con đường chính cho sự bất ổn định gen. Ngoài ra, kiểu hình nội nguyên phân/đa bội ADN có thể vẫn có nhiều sự phân chia tế bào mà không hoàn toàn tiêu diệt các tế bào ung thư. Theo cách khác, sự ức chế chọn lọc Aurora A dẫn đến ngừng phân bào ở nhiều tế bào ung thư. Sự ngừng phân bào thường tiến tiếp tục phát triển đến sự chết hoặc chết theo chương trình của tế bào ung thư, đó là thuộc tính mong muốn hơn nhiều đối với thuốc điều trị ung thư thon là sự sự nội nguyên phân/đa bội ADN bởi các chất ức chế Aurora B hoặc chất ức chế kép Aurora A/B. Ngoài ra, các chất ức chế Aurora B và các chất ức chế kép Aurora A/B cụ thể trong phát triển lâm sàng đã được ghi nhận là thể hiện tính sự giảm bạch cầu trung tính và độc tính với tủy xương ở các bệnh nhân trong khi các chất ức chế Aurora A tương đối chọn lọc trong phát triển lâm sàng không thể hiện các rối loạn này. Do đó, mong muốn là ức chế chọn lọc Aurora A và làm giảm hoặc tránh sự ức chế Aurora B hoặc sự ức chế kép Aurora A/B. Do đó, sự ức chế Aurora A chọn lọc có thể hữu dụng cho điều trị ung thư.

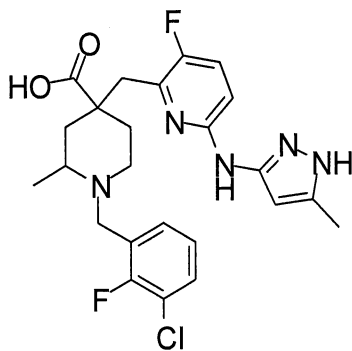
Các chất ức chế Aurora A là đã biết trong lĩnh vực này. WO 2008/026768, EP 2062887, và WO2009/104802 bộc lộ các hợp chất aminopyridin cụ thể có hoạt tính ức chế chọn lọc Aurora A. WO 2013/129443 bộc lộ các hợp chất piperidin cụ thể có hoạt tính ức chế chọn lọc Aurora A.

Vẫn có nhu cầu tìm ra các chất ức chế Aurora A thay thế để điều trị ung thư. Ngoài ra, cũng có nhu cầu tìm ra các chất ức chế Aurora A mà làm giảm hoặc tránh sự ức chế Aurora B hoặc sự ức chế kép Aurora A/B.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

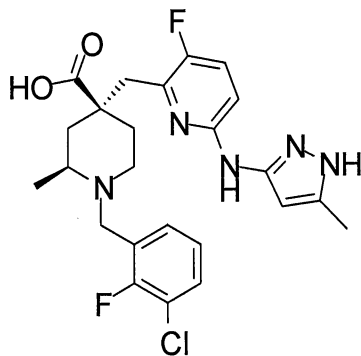
Mục đích của sáng chế là đề xuất các chất ức chế Aurora A mà có thể là hữu dụng trong điều trị ung thư. Ngoài ra, sáng chế đề xuất các chất ức chế Aurora A chọn lọc cụ thể mà có thể làm giảm sự ức chế Aurora B hoặc sự ức chế kép Aurora A/B.

Sáng chế đề xuất hợp chất là axit 1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic:



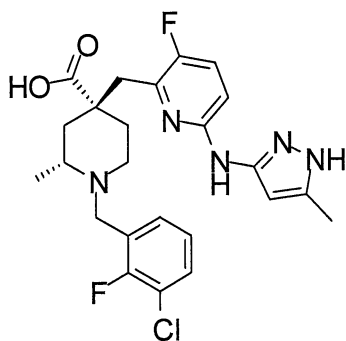
hoặc muối được dụng của nó.

Tốt hơn là, sáng chế đề xuất hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm axit (2S,4S)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic:



và

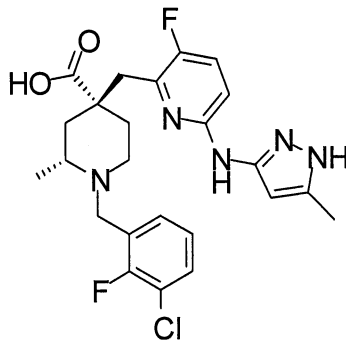
Axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic:



;

hoặc muối được dụng của nó.

Tốt hơn là, sáng chế đề xuất hợp chất là axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic:



hoặc muối được dụng của nó.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất hợp chất là axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic.

Theo phương án cụ thể, sáng chế cũng đề xuất hợp chất là axit (2S,4S)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic.

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic, hoặc muối được dụng của nó, và chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng. Sáng chế đề xuất được phẩm chứa axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic, và chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng.

Phần mô tả này bộc lộ phương pháp điều trị ung thư bao gồm bước cho bệnh nhân cần dùng lượng hữu hiệu axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic, hoặc muối được dụng của nó. Phần mô tả này cũng bộc lộ phương pháp điều trị ung thư bao gồm bước cho bệnh nhân cần dùng lượng hữu hiệu axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic.

Sáng chế đề xuất axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic, hoặc

muối được dùng của nó, để dùng trong điều trị bệnh. Sáng chế đề xuất axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic, hoặc muối được dùng của nó, để dùng trong điều trị ung thư. Sáng chế đề xuất được phẩm để dùng trong điều trị ung thư, được phẩm này chứa axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic, hoặc muối được dùng của nó.

Sáng chế cũng đề xuất axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic để dùng trong điều trị bệnh. Sáng chế đề xuất axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic để dùng trong điều trị ung thư. Sáng chế đề xuất được phẩm để dùng trong điều trị ung thư, được phẩm này chứa axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic, hoặc muối được dùng của nó, trong sản xuất thuốc để điều trị ung thư. Phần mô tả này cũng bộc lộ việc sử dụng axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic trong sản xuất thuốc để điều trị ung thư.

Sáng chế đề xuất muối tert-butylamin của axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic ở dạng tinh thể. Sáng chế cũng đề xuất muối tert-butylamin của axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic ở dạng tinh thể khác biệt ở chỗ mô hình nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh đặc trưng, trong $2\theta \pm 0,2^\circ$, xuất hiện ở $17,0^\circ$ phối hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm bao gồm $11,5^\circ$, $23,2^\circ$, và $15,0^\circ$.

Sáng chế đề xuất muối amoni của axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic ở dạng tinh thể. Sáng chế cũng đề xuất muối amoni của axit (2R,4R)-1-[(3-

clo-2-flo-phenyl)methyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]-metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic ở dạng tinh thể khác biệt ở chỗ mô hình nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh đặc trưng, ở $2\theta \pm 0,2^\circ$, xuất hiện ở $4,6^\circ$ phối hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm bao gồm $13,8^\circ$, $17,2^\circ$, và $15,9^\circ$.

Ngoài ra, sáng chế còn mô tả các phương pháp và sử dụng được ưu tiên, trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư kết trực tràng, ung thư dạ dày, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư vú âm tính với ba thụ thể hormon, ung thư cổ tử cung, ung thư đầu và cổ, ung thư thực quản, ung thư buồng trứng, ung thư phổi tế bào không nhỏ, và u lympho không Hodgkin. Các bệnh ung thư ưu tiên là ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú âm tính với ba thụ thể hormon, ung thư cổ tử cung, và ung thư đầu và cổ.

Sáng chế cũng đề xuất axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)methyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl)metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic, hoặc muối được dụng của nó, để dùng đồng thời, tách biệt hoặc nối tiếp phối hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu hóa học trong điều trị ung thư.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trên đây và trong toàn bộ bản mô tả, các thuật ngữ sau, trừ khi có quy định khác, sẽ được hiểu là có các ý nghĩa sau đây:

"Chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng" là môi trường thường được chấp nhận trong lĩnh vực đề cập các tác nhân có hoạt tính về mặt sinh học cho động vật có vú, ví dụ, người.

"Các muối được dụng" hoặc "muối được dụng" đề cập đến muối hoặc các muối vô cơ và hữu cơ không độc một cách tương đối của hợp chất theo sáng chế.

"Lượng hữu hiệu" là lượng hợp chất hoặc muối được dụng của nó, theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa hợp chất hoặc muối được dụng của nó theo sáng chế mà sẽ gây ra đáp ứng sinh học hoặc đáp ứng y học hoặc tác dụng điều trị mong muốn trên mô, hệ thống, động vật, động vật có vú hoặc người mà nhà nghiên cứu, bác sĩ thú y, bác sĩ y khoa, hoặc bác sĩ lâm sàng nhắm đến.

Các thuật ngữ "sự điều trị", "điều trị", "việc điều trị" và thuật ngữ tương tự, có nghĩa là bao gồm việc làm chậm hoặc đảo chiều sự tiến triển của chứng rối loạn. Các thuật ngữ này cũng bao gồm việc giảm nhẹ, cải thiện, làm yếu, loại bỏ hoặc giảm một hoặc nhiều triệu chứng của chứng rối loạn hoặc tình trạng, ngay cả khi chứng rối loạn

hoặc tình trạng thực tế không được loại bỏ và ngay cả khi sự tiến triển của bản thân chúng rối loạn hoặc tình trạng không được làm chậm hoặc được đảo ngược.

Hợp chất theo sáng chế có khả năng phản ứng, ví dụ, với một số các axit và bazơ vô cơ để tạo thành các muối dược dụng. Các muối dược dụng như vậy và các phương pháp thông thường để điều chế chúng là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION và USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 66, No. 1, January 1977.

Hợp chất theo sáng chế tốt hơn là được tạo dạng bào chế ở dạng dược phẩm sử dụng chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng và được dùng theo nhiều đường. Tốt hơn là, các dược phẩm này là để dùng theo đường miệng. Các dược phẩm này và các quy trình bào chế chúng là đã được biết rõ trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Remington: The Science và Practice of Pharmacy (A. Gennaro, *et al.*, eds., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005).

Lượng hợp chất theo sáng chế thực tế được dùng sẽ được xác định bởi bác sĩ trong các trường hợp tương ứng, bao gồm tình trạng được điều trị, đường dùng lựa chọn, hợp chất thực tế theo sáng chế được dùng, tuổi, thể trọng, và sự đáp ứng của từng bệnh nhân, và độ nặng của các triệu chứng của bệnh nhân. Các liều dùng hàng ngày thường rơi vào khoảng 1 đến 1000 mg. Trong một số trường hợp, mức liều dưới giới hạn dưới của khoảng nêu trên cũng có thể lớn hơn mức đủ, trong khi trong các trường hợp khác vẫn có thể sử dụng liều lớn hơn. Mức liều có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này.

Hợp chất theo sáng chế, hoặc các muối dược dụng của chúng, có thể được điều chế bằng nhiều quy trình đã biết trong lĩnh vực này, cũng như các quy trình được mô tả trong phần điều chế và các ví dụ dưới đây. Các bước tổng hợp cụ thể cho mỗi phương pháp được mô tả có thể được kết hợp theo nhiều cách khác nhau để tạo thành các hợp chất theo sáng chế, hoặc các muối dược dụng của chúng.

Các chất phản ứng và nguyên liệu ban đầu thường là dễ dàng có được đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phản ứng khác có thể được tạo thành bởi các kỹ thuật tiêu chuẩn của hóa học hữu cơ và hóa học dị vòng, các kỹ thuật mà đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, và các quy trình được mô tả trong các ví dụ dưới đây bao gồm bất kỳ quy trình mới nào. Các

ví dụ điều chế và ví dụ dưới đây minh họa thêm cho sáng chế. Trừ khi có ghi chú khác đi, các hợp chất được minh họa ở đây được gọi tên và đánh số sử dụng Accelrys Draw 4,1.

Các chất đồng phân, các chất đồng phân đối ảnh, và các chất đồng phân không đối quang riêng lẻ có thể được tách riêng hoặc được phân giải bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này ở thời điểm thuận tiện bất kỳ trong quy trình tổng hợp các hợp chất bằng các phương pháp như kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký không đối xứng (*xem, ví dụ, Enantiomers, Racemates, và Resolutions (J. Jacques, et al., John Wiley và Sons, Inc., 1981)*).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu hợp chất theo sáng chế chứa ít nhất một tâm không đối xứng. Cụ thể hơn, hợp chất theo sáng chế chứa hai tâm không đối xứng. Sáng chế dự tính tất cả các đồng phân đối ảnh hoặc đồng phân không đối quang riêng rẽ, cũng như các hỗn hợp của các chất đồng phân đối ảnh và đồng phân không đối quang này của các hợp chất bao gồm các raxemat. Ưu tiên là hợp chất theo sáng chế tồn tại ở dạng đồng phân đối ảnh hoặc đồng phân không đối quang đơn lẻ. Đồng phân đối ảnh hoặc đồng phân không đối quang 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 hoặc đồng phân không đối quang 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.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết được rằng hợp chất với vòng pyrazolyl có thể tồn tại ở dạng cặp các tautome trong đó hydro có thể di chuyển giữa hai nitơ trên vòng pyrazolyl.

Hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế theo các phương pháp tổng hợp đã được biết rõ và được hiểu trong lĩnh vực. Các điều kiện phản ứng thích hợp cho các bước của các phản ứng này là đã được biết rõ trong lĩnh vực và các thay thế thích hợp của dung môi và các chất đồng phản ứng là theo người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Tương tự, sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực rằng các chất tổng hợp trung gian có thể được phân tách và/hoặc tinh chế bằng các kỹ thuật đã biết rõ khác nhau khi cần hoặc mong muốn, và rằng sau đó, có thể sử dụng các chất trung gian khác nhau một cách trực tiếp trong các bước tổng hợp tiếp theo với việc làm tinh chế thêm một chút hoặc không tinh chế. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình

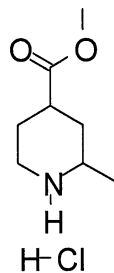
trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng trong một số trường hợp, thứ tự của các gốc được đưa ra là không quan trọng. Thứ tự cụ thể của các bước yêu cầu để điều chế hợp chất theo sáng chế là phụ thuộc vào hợp chất cụ thể được tổng hợp, hợp chất khởi đầu, và sự chịu trách nhiệm tương đối của các gốc được thế, là như được hiểu rõ bởi nhà hóa học có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Tất cả các phân tử thế, trừ khi được chỉ khác đi, là như được xác định trước đây, và tất cả các chất phản ứng là đã được biết rõ và được hiểu trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ sau có ý nghĩa được chỉ ra dưới đây: “ADP” đề cập đến adenosine 5'-diphosphat; “ATP” đề cập đến adenosine 5'-triphosphat; “BSA” đề cập đến albumin huyết thanh bò; “ADN” đề cập đến axit deoxyribonucleic; “DMSO” đề cập đến dimethyl sulfoxit; “DTT” đề cập đến dithiothreitol; “EDTA” đề cập đến axit etylenđiamintetraaxetic; “EGTA” đề cập đến axit etylen glycol tetraaxetic; “FBS” đề cập đến huyết thanh bào thai bò; “IVTI” đề cập đến sự ức chế đích *in vivo*; “HEPES” đề cập đến axit 4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-etansulfonic; “MEM” đề cập đến môi trường thiết yếu tối thiểu; “MS” đề cập đến phổ khối; “NMR” đề cập đến cộng hưởng từ hạt nhân; “PBS” đề cập đến muối đệm phosphat; “MSR” đề cập đến tỷ lệ có nghĩa tối thiểu; “PMSF” đề cập đến phenylmetylsulfonyl florua; “PNPP” đề cập đến hexahydrat của muối 4-nitrophenyl phosphat dinatri; “psi” đề cập đến pao trên inso vuông; “SCLC” đề cập đến ung thư phổi tế bào nhỏ. “TAME” đề cập đến Nalpha-4-Tosyl-L-arginine metyl este hydroclorua; “TED” đề cập đến liều ngưỡng hiệu quả; “TPCK” đề cập đến tosyl phenylalanyl clometyl keton.

Ví thực hiện hiện sáng chế

Ví dụ điều chế 1

Metyl 2-metylpiperidin-4-carboxylat hydroclorua

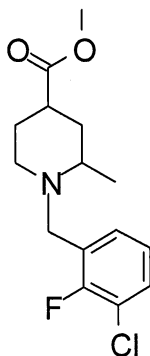


Nạp PtO₂ (11,5 g) vào bình phản ứng, sau đó làm sạch bình bằng N₂ và làm ướt bằng axit axetic (225 ml). Thêm metyl 2-clo-6-metyl-pyridin-4-carboxylat (125 g) và axit axetic (1000 ml) vào hỗn hợp dạng hồ. Đóng bình phản ứng, làm sạch bình bằng

N₂, và sau đó làm sạch bình bằng H₂ và điều áp bằng H₂. Đun hỗn hợp phản ứng ở 60 °C trong hydro ở 60 psi trong 7 giờ. Chạy hai phản ứng riêng biệt trong cùng quy mô và điều kiện phản ứng. Lọc hỗn hợp phản ứng của mỗi phản ứng và kết hợp dịch lọc. Cô đặc dịch lọc trong chân không để tạo thành dầu đặc chứa một ít axit axetic. Thêm methyl tert-butyl ete (2 L) vào dầu đặc và khuấy ở nhiệt độ phòng. Thu chất rắn thu được, rửa bằng methyl tert-butyl ete (2x 1000 mL) và làm khô trong chân không ở 35 °C để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục ở dạng chất rắn màu trắng (400 g). ¹H NMR (CDCl₃) 1,55 (δ, *J*=6,3 Hz, 3H); 1,85 (q, *J*=12,3 Hz, 1H); 2,23-1,98 (m, 3H); 2,59-2,46 (m, 1H); 2,85 (dt, *J*=13,0, 3,5 Hz, 1H); 3,20-3,06 (m, 1H); 3,53 (br d, *J*=12,6 Hz, 1H); 3,69 (s, 3H); 9,7 (br s, 1H)

Ví dụ điều chế 2

Metyl 1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylat

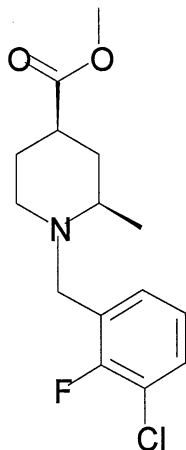


Thêm methyl 2-methylpiperidin-4-carboxylat hydroclorua (205,4 g, 1,06 mol), 1-(bromometyl)-3-clo-2-flo-benzene (261 g, 1,17 mol), acetonitrile (2050 mL) và kali carbonat (293 g, 2,12 mol) vào bình đáy tròn ba cổ (1 L). Khuấy hỗn hợp phản ứng với hồi lưu trong 18 giờ. Sau đó dừng gia nhiệt, lọc chất rắn, và sau đó rửa sạch chất rắn bằng axetonitril (2x 250 mL). Cô đặc dịch lọc trong chân không để tạo thành sản phẩm thô màu xanh lá cây. Hòa tan trong methyl tert-butyl ete (2500 ml), thêm CELITE®, khuấy sau đó lọc. Rửa dịch lọc bằng nước. Chiết các chất hữu cơ bằng 1,25N nước axit clohydric (2000 ml) sau đó với nước axit clohydric 1M (1000 ml). Kết hợp các dịch chiết chứa nước và kiềm hóa đến pH ~ 12 với nước natri hydroxit 48% (250 g). Chiết bằng methyl tert-butyl ete (3L). Làm khô các chất hữu cơ qua magie sulfat, lọc và cô đặc

để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục ở dạng dầu màu nâu (272,8 g). MS (m/z): 300 (M+1).

Ví dụ điều chế 3

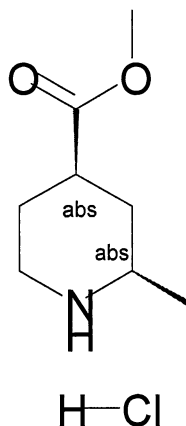
Metyl (2R, 4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylat



Phân tách các chất đồng phân đối ảnh của metyl 1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylat (272,8 g) sử dụng sắc kí bất đối với chất lỏng siêu tới hạn. Pha tĩnh: Chiralpak IC, pha động: 3% rượu isopropylic và 0,2% dimetyletylamin. Thu chất đồng phân đối ảnh được rửa giải thứ nhất ($R_T = 1,73$ phút). Thu chất đồng phân đối ảnh được rửa giải thứ hai là hợp chất nêu ở đề mục (158 g, hiệu suất 49,7%; $R_T = 2,19$ phút; MS (m/z): 300 (M+1)). Các điều kiện phân tích: Pha tĩnh: Chiralpak IC, pha động: 5% rượu isopropylic / 0,2% isopropyl amin, dòng 3 mL/phút, nhiệt độ: 35°C.

Ví dụ điều chế 4

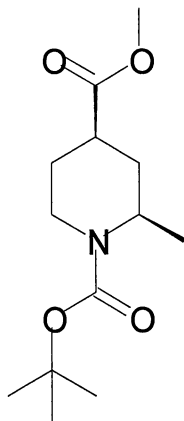
Metyl (2R,4R)-2-metylpiperidin-4-carboxylat hydroclorua



Thêm methyl (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylat (250g, 0,834 mol), 1,2-dicloetan (1200 ml) và 1-cloetyl cloformat (112 ml, 1,04 mol) thành 4000 ml bình ba cổ. Khuấy ở 70°C với dụng cụ khuấy cơ khí trong 72 giờ. Thêm 1-cloetyl cloformat (30 ml, 0,227 mol) và khuấy có hồi lưu trong 6 giờ. Cho hỗn hợp làm lạnh xuống 60°C và thêm pha phễu thêm metanol (250 ml) trong 30-45 phút. Khuấy ở 60-65°C trong 18 giờ. Thêm metanol (400 ml) và khuấy ở 65-68°C trong 5 giờ. Để hỗn hợp nguội đến nhiệt độ môi trường và khuấy qua đêm. Cô đặc trong chân không thành dạng hồ. Pha loãng hồ với etyl axetat (1500 ml) và khuấy đến 0°C trong 30 phút. Thu chất rắn và rửa bằng etyl axetat (1000 ml) để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục là chất rắn màu xám (136,5 g, hiệu suất 84,5%). ^1H NMR (399,81 MHz, d_6 -DMSO): δ 1,22 (d, $J=6,5$ Hz, 3H), 1,53-1,43 (m, 1H), 1,73-1,62 (m, 1H), 1,99-1,91 (m, 2H), 2,71-2,63 (m, 1H), 2,89-2,83 (m, 1H), 3,15-3,12 (m, 1H), 3,23-3,20 (m, 1H), 3,59 (s, 3H), 9,03 (br, s, 1H), 9,44 (br, s, 1H).

Ví dụ điều chế 5

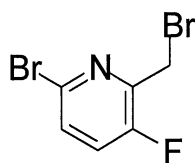
O1-tert-butyl O4-metyl (2R,4R)-2-metylpiiperidin-1,4-dicarboxylat



Thêm methyl (2R,4R)-2-methylpiperidin-4-carboxylat hydroclorua (136 g, 0,702 mol) và diclometan (1500 ml) vào bình đáy tròn ba cổ 4L được trang bị dụng cụ khuấy phía trên. Thêm diisopropyletylamine (250 ml) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong vài phút. Thêm 4-pyridinamin-N,N-dimetyl (9,0 g, 0,74 mol). Làm lạnh trong bể đá/nước. Thêm dung dịch của di-tert-butyldicarbonat (192 g, 0,88 mol) trong diclometan (300 ml) từ từ trong ~30 phút, duy trì nhiệt độ giữa 5-10 °C. Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ phòng và khuấy qua đêm. Thêm dung dịch axit oxalic 10% (2L) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Tách các lớp. Rửa các chất hữu cơ bằng axit oxalic 5 % (1L). Rửa các chất hữu cơ bằng nước, sau đó là NaCl bão hòa, làm khô qua natri sulfat, lọc và cô đặc trong chân không. Hòa tan trong diclometan (250 ml). Gắn vào đệm silic đioxit (250 g) được làm ướt bằng diclometan. Rửa giải bằng diclometan (3L). Cô đặc dịch lọc trong chân không và giữ trong chân không trong vài giờ để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (146 g, hiệu suất 80,8%) là dầu màu vàng nhạt. ^1H NMR (399,80 MHz, CDCl_3): δ 1,05 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,42 (s, 9H), 1,76-1,66 (m, 1H), 1,99-1,94 (m, 3H), 2,55 (quintet, J = 5,8 Hz, 1H), 3,10-3,02 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,85-3,78 (m, 1H), 4,18-4,10 (m, 1H).

Ví dụ điều chế 6

6-Bromo-2-(bromometyl)-3-flu-pyridin

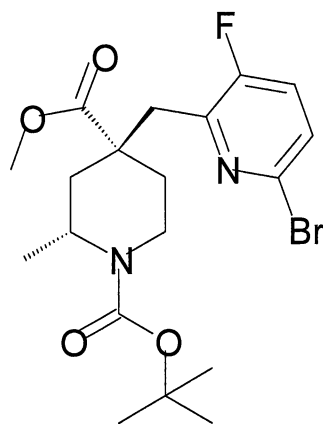


Thêm 6-bromo-3-flu-2-metyl-pyridin (50 g, 0,263 mol), N-bromosuccinimit (100 g, 0,562 mol) và carbon tetrachlorua (500 ml) vào bình đáy tròn ba cổ 1000 ml được trang bị thiết bị ngưng tụ hồi lưu và đường cấp nitơ. Trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng,

thêm từng phần 2,2'-azobis(isobutyronitril). Khuấy phản ứng trong 72 giờ ở 78 °C. Cho hỗn hợp nguội đến nhiệt độ phòng và lọc chất rắn ra. Rửa chất rắn bằng toluen (2 X 100 ml). Cô đặc dịch lọc đến ~ 250 ml, pha loãng bằng tetrahydrofuran (300 ml) và làm lạnh đến 0-5 °C. Trong môi trường nitơ, thêm dung dịch diethyl phosphit (37 ml, 0,288 mol) và triethylamin (40 ml, 0,287 mol) trong tetrahydrofuran (100 ml) từ từ trong 30 phút. Làm ấm từ từ hỗn hợp đến nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Cô đặc trong chân không. Thêm nước đá lạnh và khuấy đến khi hỗn hợp ở nhiệt độ phòng. Thu chất rắn và rửa bằng nước (2 X 200 ml). Làm khô chất rắn trong chân không. Hòa tan trong diclometan (500 ml) và lọc qua đệm silic đioxit. Rửa sạch đệm bằng diclometan (250 ml). Cô đặc dịch lọc trong chân không, pha loãng bằng các hexan (500 ml) và cô đặc trong chân không đến ~100 ml. Thu chất rắn và rửa bằng các hexan (100 ml) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (48,0 g, hiệu suất 67,8%) là chất rắn màu trắng. Thu chất rắn từ chất lỏng gốc và làm khô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (5,2 g, hiệu suất 7,35%) là chất rắn màu trắng. ^1H NMR (399,80 MHz, CDCl_3): δ 4,51 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 7,31-7,25 (m, 1H), 7,42 (dd, $J = 3,5, 8,6$ Hz, 1H).

Ví dụ điều chế 7

O1-tert-butyl O4-metyl (2R,4R)-4-[(6-bromo-3-fluor-2-pyridyl)metyl]-2-methylpiperidin-1,4-dicarboxylat



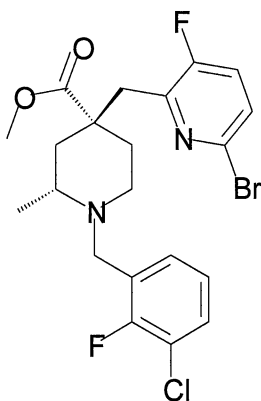
Thêm O1-tert-butyl-O4-metyl (2R, 4R)-2-methylpiperidin-1,4-dicarboxylat (48,1 g, 0,187 mol) trong tetrahydrofuran (470 ml) vào bình đáy tròn ba cổ dung tích 3 L và làm lạnh hỗn hợp đến -78 °C. Thêm lithi diisopropylamit (10% khối lượng) trong

hexan (112,2 ml, 0,224 mol) từng giọt trong 30 phút duy trì nhiệt độ bên trong nhỏ hơn

-71°C. Khuấy ở -78 °C trong 1,5 giờ. Thêm dung dịch 6-bromo-2-(bromometyl)-3-flopyridin (60,4 g, 0,225 mol) trong tetrahydrofuran (470 ml) từng giọt trong 1 giờ duy trì nhiệt độ bên trong nhỏ hơn -71°C. Khuấy ở -78°C trong 1 giờ. Ngừng phản ứng bằng cách thêm dung dịch nước amoni clorua bão hòa (150 ml). Thu chất rắn thu được, hòa tan trong nước (500 ml) và chiết bằng etyl axetat (1000 ml). Kết hợp các dịch chiết, làm khô qua natri sulfat, lọc và cô đặc trong chân không. Lặp lại phản ứng này bằng 57,22 g O1-tert-butyl-O4-metyl (2R, 4R)-2-metylpiperidin-1,4-dicarboxylat trong cùng điều kiện phản ứng và kết hợp các vật liệu thu được để tinh chế. Tinh chế vật liệu kết hợp bằng sắc kí trên silica gel (5-15% gradient hexan/etyl axetat) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (168,2 g) là dầu màu vàng nhạt. ^1H NMR (399,80 MHz, CDCl_3): δ 0,98 (d, $J=7,1$ Hz, 3H), 1,43 (s, 9H), 1,76 (dd, $J=6,0, 13,8$ Hz, 1H), 2,02 (s, 2H), 2,23 (dt, $J=13,9, 2,1$ Hz, 1H), 3,09-2,98 (m, 3H), 3,71 (s, 3H), 3,90-3,87 (m, 1H), 4,40-4,37 (m, 1H), 7,19 (t, $J=8,5$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J=3,4, 8,6$ Hz, 1H).

Ví dụ điều chế 8

Metyl (2R,4R)-4-[(6-bromo-3-flo-2-pyridyl)metyl]-1-[(3-clo-2-flophenyl)metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylat

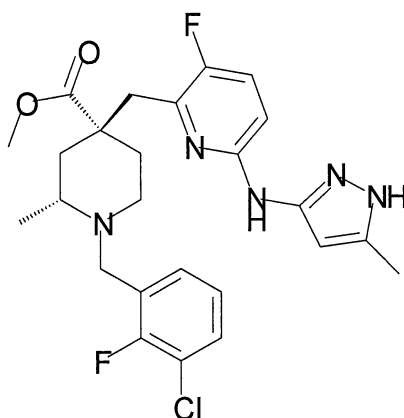


Thêm O1-tert-butyl-O4-metyl (2R,4R)-4-[(6-bromo-3-flo-2-pyridyl)metyl]-2-metyl-piperidin-1,4-dicarboxylat (168,2 g, 0,378 mol) trong 1,4-dioxan (945 ml) vào bình đáy tròn ba cổ dung tích 4 L. Thêm từ từ trong 20 phút axit clohydric (4 M trong 475 mL 1,4-dioxan, 1,9 mol). Khuấy ở nhiệt độ phòng trong 21 giờ sau đó ở 50°C trong 4 giờ. Thu chất rắn và làm khô trong chân không ở 45°C trong 1 giờ. Cô đặc dịch lọc thành chất rắn và làm khô hoàn toàn. Thêm các chất rắn kết hợp, kali cacbonat (105 g, 0,76 mol) và axetonitril (1200 ml) vào bình đáy tròn ba cổ dung tích 3 L. Khuấy ở nhiệt

độ phòng trong 20 phút sau đó thêm 3-clo-2-flobenzyl bromua (101,3 g, 0,453 mol). Khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày. Lọc hỗn hợp qua CELITE®. Cô đặc dịch lọc thành dầu màu vàng. Tinh chế dầu bằng sắc kí trên silica gel (gradient 100 % diclometan đối với 7 % metyl-tert-butylete trong diclometan trong 70 phút) để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (153 g, 0,314 mol) là dầu màu vàng. MS (m/z): 489 (M+1).

Ví dụ điều chế 9

Metyl (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[(3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl)metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylat



Thêm rượu tert-butylic (9,4 ml) bình phản ứng trong lò vi sóng và loại oxy bằng cách phun nitơ trong 5 phút. Thêm paladi(II) axetat (0,044 g, 0,196 mmol) và 2-di-tert-butylphosphino-2',4',6'-triospropylbiphenyl (0,251 g, 0,58 mol). Thêm nước (0,014 ml) từ dưới bề mặt dung dịch. Đun nóng hỗn hợp sử dụng máy kích thích vi sóng đến 100 °C trong 2 phút. Thêm dung dịch chất xúc tác này qua bơm tiêm vào hỗn hợp sau đây.

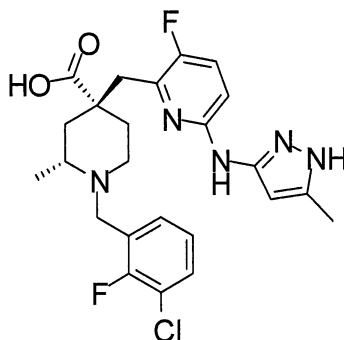
Thêm metyl (2R,4R)-4-[(6-bromo-3-flo-2-pyridyl)metyl]-1-[(3-clo-2-flophenyl)-metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylat (9,4 g, 0,019 mol), 5-metyl-1H-pyrazole-3-amine (2,07 g, 0,021 mol) và rượu tert-butylic (65 ml) vào bình đáy tròn ba cổ dung tích 3 L. Đun hỗn hợp 40-45 °C và phun nitơ trong 10 phút. Thêm xesi cacbonat (14,5 g, 0,045 mol) và dung dịch chất xúc tác, nêu trên đây, vào hỗn hợp. Khuấy ở 40-45 °C trong 3,5 giờ. Phản ứng không hoàn toàn. Điều chế hỗn hợp bổ sung của paladi(II) axetat (0,0088 g, 0,039 mmol), 2-di-tert-butylphosphino-2',4',6'-triospropylbiphenyl (0,050 g, 0,103 mmol), nước (2,8 µL) và rượu tert-butylic (2 ml). Đun hỗn hợp này sử dụng máy kích thích vi sóng đến 100 °C trong 2 phút và sau đó thêm nó vào hỗn hợp phản ứng không hoàn toàn. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 40-45 °C trong 2 giờ. Pha loãng

hỗn hợp bằng etyl axetat (100 mL), lọc qua đệm CELITE® và rửa đệm bằng etyl axetat (100 mL). Cô đặc trong chân không. Lặp lại phản ứng bằng 129,35 g metyl (2R,4R)-4-[(6-bromo-3-flo-2-pyridyl)metyl]-1-[(3-clo-2-flophenyl)metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylat trong cùng điều kiện phản ứng như mô tả trên đây và kết hợp các vật liệu thô để tinh chế.

Kết hợp hai sản phẩm phản ứng thô. Tinh chế vật liệu bằng sắc kí trên silica gel 30% etyl axetat trong 1:1 diclometan/hexan đối với 100% etyl axetat để thu được 95 g chất rắn màu hồng. Thêm chất rắn vào bình dung tích 4 L với SILIAMETS® THIOL (120 g) và diclometan (2 L). Khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Lọc hỗn hợp qua CELITE®. Cô đặc dịch lọc đến khô để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (93,3 g) là bột màu trắng. MS (m/z): 504 (M+1).

Ví dụ 1

Axit (2R,4R)-1-[(3-Clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic

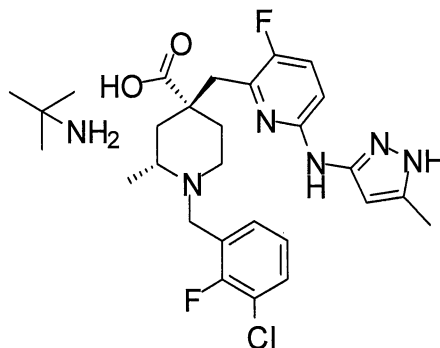


Thêm metyl (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[(3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylat (19,95 g, 0,040 mol), axit clohydric (36,5% khối lượng) và nước (140 ml, 1,63 mol) vào bình đáy tròn ba cổ dung tích 1 L. Khuấy ở 93-96 °C trong 17 giờ. Làm lạnh đến nhiệt độ phòng và cô đặc trong chân không. Hòa tan phần còn lại trong nước (1000 ml) và làm lạnh trong bể đá. Điều chỉnh độ pH đến 6,5 với natri hydroxit 5N. Thu chất rắn thu được và rửa bằng nước. Chiết dịch lọc chứa nước 10 % iospropanol/diclometan (3 x 500 ml). Làm khô và cô đặc thành chất rắn. Kết hợp hai chất rắn và hòa tan trong etanol (200 ml). Pha loãng bằng etyl axetat (1500 ml) và khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Lọc và cô đặc trong chân không thành chất rắn. Hòa tan chất rắn trong 5 % metanol/diclometan, pha loãng bằng etyl axetat (500 ml) và cô đặc thành 300 ml. Lọc chất rắn ra. Lặp lại phản

ứng với 61,9 g methyl (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)methyl]-4-[(3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl)methyl]-2-methylpiperidin-4-carboxylat trong cùng điều kiện phản ứng như được mô tả trên đây. Kết hợp dịch lọc từ hai phản ứng. Cô đặc các dịch lọc kết hợp thành ~ 600 ml và pha loãng bằng hexan (600 ml). Thu chất rắn và làm khô trong chân không ở 50 °C qua đêm. Cô đặc các chất lỏng gốc trong chân không đến khô và làm khô chất rắn trong chân không ở 50 °C qua đêm. Kết hợp các chất rắn để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (63,44 g). MS (m/z): 490 (M+1). $[\alpha]^{20}_D + 17,3^\circ$ (c 1,00, EtOH).

Ví dụ 2

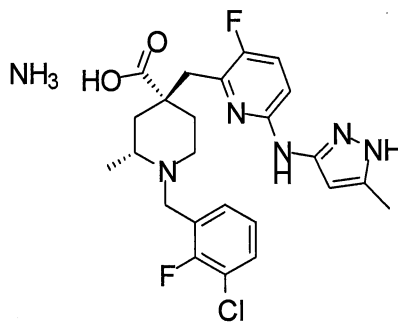
Muối *tert*-Butylamin của axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)methyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl)methyl]-2-methyl-piperidin-4-carboxylic



Thêm axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)methyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl)methyl]-2-methyl-piperidin-4-carboxylic (580 mg) trong 4 mL axeton. Hòa tan chất rắn để tạo thành dung dịch màu vàng trong trong khi khuấy ở 60°C (nhiệt độ đĩa)/1000 vòng/phút. Thêm *tert*-butylamin (150 μ L, 1,20 đương lượng, 99,5%) vào dung dịch và quan sát thấy kết tủa. Tạo hỗn hợp thành dạng hồ trong 10 phút nữa ở 60°C và sau đó làm lạnh dạng hồ này đến nhiệt độ phòng. Lọc chất rắn bằng lọc chân không và làm khô chất rắn trong lò chân không ở 60 °C để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (635 mg, hiệu suất 95,26%).

Ví dụ 3

Muối amoni của axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)methyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl)methyl]-2-methyl-piperidin-4-carboxylic



Thêm axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic (154 mg) trong 2 mL axeton. Hòa tan chất rắn thành dung dịch màu vàng trong trong khi khuấy ở 60°C (nhiệt độ đĩa)/1000 vòng/phút. Thêm amoni hydroxit (29,8%, 50 μ L, 1,22 đương lượng) vào dung dịch và quan sát thấy kết tủa. Tạo hỗn hợp thành dạng hồ trong 2 giờ nữa ở 60°C và sau đó làm lạnh dạng hồ này đến nhiệt độ phòng. Quan sát thấy dạng hồ đặc của chất rắn màu trắng sáng. Lọc chất rắn bằng lọc chân không và làm khô chất rắn trong lò chân không ở 60 °C để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (145 mg, hiệu suất 90,81%).

Nhiều xạ bột tia X của hợp chất của Ví dụ 2 và 3

Thu được các nhiễu xạ đồ XRD của các chất rắn dạng tinh thể bằng cách sử dụng máy nhiễu xạ bột tia X Bruker D4 Endeavor, có lắp nguồn CuK α λ = 1,54060 Å (0,154060 nm) và cảm biến Vantec, vận hành ở 35 kV và 50 mA. Mẫu được quét trong khoảng góc nhiễu xạ 2 θ từ 4 đến 40°, với bước góc nhiễu xạ 2 θ là 0,009° và tốc độ quét là 0,5 giây/bước, và độ phân kỳ là 0,6 mm, bộ chống tán xạ cố định 5,28, và khe cảm biến 9,5 mm. Bột khô được đưa vào bộ chứa mẫu bằng thạch anh và tạo bề mặt trơn bằng cách sử dụng con trượt thủy tinh. Nhiễu xạ đồ dạng tinh thể được thu thập ở nhiệt độ môi trường xung quanh và độ ẩm tương đối. Đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể xác định bất kỳ nào đó, 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 yếu tố hình thái tinh thể hoặc yếu tố ngoại 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. 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 xác định bất kỳ nào đó, 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 của 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, sai khác vị trí đỉnh về góc nhiễu xạ 2θ là $\pm 0,2$ thì sẽ tính đến khả năng do các biến đổi khả dĩ nêu trên mà không ảnh hưởng đến việc nhận diện một cách rõ ràng dạng tinh thể được phân tích. Có thể khẳng định dạng tinh thể dựa trên tổ hợp duy nhất các đỉnh có tính phân biệt (theo đơn vị $^\circ$ của góc nhiễu xạ 2θ), thường là các đỉnh nổi trội hơn hẳn. Các nhiễu xạ đồ dạng tinh thể, được thu thập ở nhiệt độ môi trường xung quanh và độ ẩm tương đối, được điều chỉnh theo các đỉnh tiêu chuẩn NIST 675 ở góc nhiễu xạ 2θ là 8,853 và 26,774 độ.

Mẫu đã chuẩn bị ở Ví dụ 2 khác biệt ở chỗ kiểu XRD sử dụng phát xạ CuK α khi có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2-theta) như được mô tả trong Bảng 1 dưới đây, và cụ thể là có các đỉnh ở 17,0 $^\circ$ phối hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm bao gồm 11,5 $^\circ$, 23,2 $^\circ$, và 15,0 $^\circ$; với dung sai đối với các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Bảng 1: Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của hợp chất của Ví dụ 2

Đỉnh	Góc ($^\circ$ 2-Theta) $\pm$ 0,2 $^\circ$	Cường độ tương đối (% so với đỉnh cường độ cao nhất)
1	8,0	24,6
2	11,5	57,1
3	14,0	26,4
4	15,0	42,3
5	17,0	100,0
6	19,3	24,9
7	21,0	37,1
8	23,2	45,1
9	24,0	30,9
10	26,1	23,7

Mẫu đã chuẩn bị ở Ví dụ 3 khác biệt ở chỗ kiểu XRD sử dụng phát xạ CuK α khi có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2-theta) như được mô tả trong Bảng 2 dưới đây, và cụ thể là có các đỉnh ở 4,6 $^\circ$ phối hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm bao gồm 13,8 $^\circ$, 17,2 $^\circ$, và 15,9 $^\circ$; với dung sai đối với các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Bảng 2: Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của hợp chất của Ví dụ 3

Đỉnh	Góc ($^{\circ}$ 2-Theta) $\pm$ 0,2 $^{\circ}$	Cường độ tương đối (% so với đỉnh cường độ cao nhất)
1	4,6	100,0
2	9,3	38,1
3	9,9	26,1
4	10,5	39,4
5	13,8	72,2
6	15,9	62,7
7	17,2	66,6
8	18,5	40,3
9	21,3	52,3
10	28,1	49,8

Cấu trúc tinh thể tia X của kinaza Aurora A sử dụng Ví dụ 3

Vùng xúc tác của kinaza Aurora A (các gốc 125-391 của trình tự NP_003591) được biểu hiện trong các tế bào côn trùng *Sf9* với thể poly-Histidin đầu N tách được bởi proteaza TEV. Protein được biểu hiện được phân tách bằng cách liên kết với cột niken tạo chelat. Sau khi tách thể histidin, protein được tinh chế tiếp bằng cách đưa qua cột sắc kí loại kích thước (16/600 S200; GE Lifesciences) được làm cân bằng trong đệm chứa natri phosphat 50mM pH 7,0, NaCl 250mM, EDTA 1mM, DTT 5mM, và β , γ -imidoadenosin 5'-triphosphat (AMP-PNP) 0,1mM. Protein kinaza Aurora A được tinh chế ở nồng độ 8,3 mg/ml được bổ sung với AMP-PNP bổ sung tới nồng độ cuối là 2 mM, và được kết tinh ở 21 $^{\circ}$ C bằng cách khuếch tán hơi. Sự kết tinh được thực hiện bằng cách trộn 0,8 μ L protein với 0,8 μ L dung dịch chứa MES 100mM, pH 4,6, PEG 3350 23% và amoni sulfat 150mM, và được cân bằng với cùng dung dịch chứa trong các khay nhỏ giọt nằm ngang. Tinh thể đơn của kinaza Aurora A trong phức hợp với AMP-PNP được ngâm qua đêm trong dung dịch chứa 2 mM của Ví dụ 3, và chuyển vào dung dịch chứa polyetylen glycol 400 20%, và làm đông nhanh trong nitơ lỏng. Dữ liệu nhiễu xạ tia X đến 1,96 Å được thu từ tinh thể đông ở Lilly Research Laboratories Collaborative Access Team Beam-Line (LRL-CAT APS 31ID) ở nguồn photon cao, Argonne, IL. Các tia X ở bước sóng 0,9793 Å được sử dụng để thu các khung 180 trong khoảng dao động 1 $^{\circ}$, với khoảng cách phát hiện là 185 mm. Cấu trúc kinaza Aurora A sử dụng Ví dụ 3 được đo bởi Molecular Replacement và được lọc đến yếu tố R là 20,6% và không R là 25,6%. Kết quả là với ví dụ 3 và đưa ra hóa học lập thể. Hóa học lập thể cho Ví dụ 1 và 2 cũng được đưa ra vì Ví dụ 1 sử dụng làm vật liệu khởi đầu để điều chế Ví dụ 2 và 3.

Bảng 3: Các tọa độ phối trí của phối tử dẫn đến từ việc điều trị của các tinh thể Aurora A với Ví dụ 3

ATOM	X	Y	Z	Yếu tố B
C1	112,063	-22,352	4,479	42,62
C2	112,093	-21,548	5,620	40,92
C3	106,478	-13,876	6,709	30,97
C4	112,494	-21,851	3,250	39,63
C5	106,509	-14,173	5,352	32,26
C6	109,743	-16,303	3,016	23,86
C7	112,557	-20,234	5,530	49,20
C8	107,454	-14,403	7,543	30,71
C9	112,992	-19,735	4,307	46,02
C10	112,961	-20,539	3,170	49,13
C11	108,433	-15,216	6,985	29,52
C12	110,350	-16,658	1,793	21,45
C13	107,527	-15,000	4,893	27,64
C14	108,526	-15,780	2,647	22,41
C15	107,800	-17,220	8,960	40,44
C16	109,027	-18,128	6,966	34,87
C17	110,137	-17,883	9,201	32,43
C18	110,391	-18,481	6,358	28,24
C19	111,482	-18,224	8,537	32,71
C20	109,128	-17,256	8,229	32,98
C21	111,684	-17,267	1,564	24,45
C22	112,398	-18,885	9,578	37,45
C23	112,608	-19,345	6,737	32,82
C24	109,500	-15,812	7,858	33,06
N25	108,492	-15,529	5,670	28,42
N26	108,483	-15,845	1,290	23,85
N27	109,585	-16,379	0,739	22,58
N28	111,302	-19,083	7,346	32,56
N29	107,540	-15,286	3,509	30,18
O30	106,690	-17,266	8,449	39,38
O31	108,001	-17,113	10,295	42,47
F32	107,438	-14,126	8,849	36,03
F33	113,435	-18,468	4,239	56,09
CL34	113,500	-19,908	1,663	70,06

Các kết quả của các thử nghiệm sau chứng minh rằng hợp chất của Ví dụ 1 theo sáng chế là chất ức chế Aurora A. Ngoài ra, các kết quả của các thử nghiệm sau chứng minh rằng hợp chất của Ví dụ 1 là chất ức chế chọn lọc Aurora A mà làm giảm sự ức chế Aurora B hoặc sự ức chế kép Aurora A/B. Cũng như vậy, các kết quả của các thử nghiệm sau chứng minh rằng hợp chất của Ví dụ 1 làm giảm sự ngừng phân bào của

chu trình tế bào bằng cách ức chế hoạt tính của kinaza Aurora. Ngoài ra, hợp chất của Ví dụ 1 chứng minh Aurora A, không phải Aurora B, kinaza hướng đích sự ức chế *in vivo* với các mẫu khối u ghép khác loại, cũng như hiệu quả phát triển chống khối u đáng kể trong mẫu chuột trụi lông mắc ung thư phổi tế bào nhỏ NCI-H446.

Thử nghiệm kinaza Aurora A

Thử nghiệm này đo khả năng thử nghiệm của các hợp chất trong việc ức chế hoạt tính kinaza Aurora A *in vitro* bằng cách đo phân cực huỳnh quang của ADP bằng thiết bị TRANSCREENER trong mẫu đĩa 96 giếng màu đen (CORNING® COSTAR® 3694). Chuẩn bị dung dịch trong đệm kinaza [axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazineetansulfonic (HEPES) 50mM, pH 7,4, MgCl₂ 4mM, TRITON™ X-100 0,01% và dithiothreitol (DTT) 2 mM] với adenosin triphosphat (ATP) và vòng hoạt hóa kinaza Aurora A (ENOGEN®, #326861) ở nồng độ cuối tương ứng là 20 μ M ATP và 150 μ M vòng hoạt hóa kinaza Aurora A. Enzym Aurora A được thêm vào dung dịch với nồng độ cuối là 0,096 ng/ μ L. Các hợp chất thử nghiệm được pha loãng theo dãy 1:3 trong 20% dimetyl sulfoxit (DMSO) để tạo thành đường cong đáp ứng 10 điểm ở các nồng độ cuối bắt đầu ở 20 μ M. Đệm DMSO một mình không có hợp chất thử nghiệm được sử dụng làm đối chứng dương (hoạt tính đầy đủ của Aurora A khi vắng mặt chất ức chế). Đối chứng âm là hỗn hợp phản ứng đầy đủ cộng với 100 nM axit etylendiamintetraaxetic (EDTA) để xác định mức cơ sở của adenosin 5'-diphosphat (ADP). Thêm dung dịch enzym Aurora A đã được chuẩn bị vào đĩa chứa các hợp chất thử nghiệm và các đối chứng dương và đối chứng âm và ủ sơ bộ hỗn hợp trong 30 phút ở 22 °C. Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm ATP và dung dịch vòng hoạt hóa kinaza Aurora A và kéo dài trong 30 phút ở 22 °C. Phản ứng sau đó được dừng bằng cách thêm 25 μ L (1:1 thể tích:thể tích) của hỗn hợp phát hiện ADP chứa chất đánh dấu gần hồng ngoại đối với ADP, kháng thể ADP và đệm dừng và phát hiện (Bellbrook Labs cat # 3003-10K). Các đĩa được giữ trong bóng tối trong ít nhất 2 giờ để cho phép sự thay thế của chất đánh dấu ADP Alexa633 (được liên kết với kháng thể ADP2) bởi ADP được tạo ra trong phản ứng kinaza, và sự giảm phân cực huỳnh quang được xác định (Ultra384, Tecan). Đường cong tiêu chuẩn của ADP/ATP trong đệm kinaza trên đây được sử dụng để xác định sự chuyển đổi của ADP đối với các hợp chất thử nghiệm.

Sự khác biệt giữa giá trị trung bình của các đối chứng dương và đối chứng âm được lấy là 100% hoạt tính. Sự hiệu chỉnh đường cong logic 4 thông số được sử dụng để tạo ra các giá trị IC_{50} sử dụng phần mềm ActivityBase™ (IDBS, Alameda CA). Thử nghiệm biểu diễn tỷ lệ có nghĩa tối thiểu (Minimum Significant Ratio - MSR) là ≤ 3 .

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được thử nghiệm trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Hợp chất của Ví dụ 1 được xác định là có IC_{50} là $1,12 \pm 0,15$ nM ($n=4$). Thử nghiệm sinh hóa Aurora A đạt đến giới hạn phát hiện thử nghiệm thấp đến mức IC_{50} ghi nhận được có thể không phản ánh hiệu lực ức chế chính xác của hợp chất *in vitro*; tuy nhiên, bản thân thử nghiệm là hợp lệ về mặt thống kê đến mức dữ liệu này đưa ra kết quả IC_{50} của hợp chất chứng minh trong thử nghiệm. Do đó, các kết quả chỉ ra rằng Ví dụ 1 ức chế hoạt tính kinaza Aurora A *in vitro*.

Thử nghiệm kinaza Aurora B

Thử nghiệm này đo khả năng thử nghiệm của các hợp chất trong việc ức chế hoạt tính kinaza Aurora B *in vitro* bằng cách đo phân cực huỳnh quang của ADP bằng thiết bị TRANSCREENER trong mẫu đĩa 96 giếng màu đen (CORNING COSTAR 3694). Chuẩn bị dung dịch enzym Aurora B trong đệm kinaza (HEPES 37,5 mM, pH 7,4, $MgCl_2$ 6,25 mM, TRITON™ X-100 0,0075% và DTT 2,5 mM) với enzym Aurora B (các nồng độ cuối là 0,39 ng/ μ L), peptit INCEP 0,1 μ M (GenScript, #92480_1, các nồng độ cuối 0,1 μ M), ATP (nồng độ cuối 10 μ M), và Histon H3 (Anaspec, #KLH08-4, nồng độ cuối 5 μ M). Các hợp chất thử nghiệm được pha loãng theo dãy 1:3 trong 20% DMSO để tạo thành đường cong đáp ứng 10 điểm ở các nồng độ cuối bắt đầu ở 20 μ M. Đệm DMSO một mình không có hợp chất được sử dụng làm đối chứng dương (hoạt tính đầy đủ của Aurora B khi vắng mặt chất ức chế). Đối chứng âm là hỗn hợp phản ứng đầy đủ cộng với EDTA 100 nM để xác định mức cơ sở của ADP. Thêm dung dịch enzym Aurora B đã được chuẩn bị vào đĩa chứa các hợp chất thử nghiệm và các đối chứng dương và đối chứng âm. Ủ sơ bộ hỗn hợp trong 30 phút ở 22 °C. Dung dịch ATP và Histon H3 trên đây được thêm vào để bắt đầu phản ứng và đĩa được ủ trong 45 phút ở 22 °C. Phản ứng được dừng bằng cách thêm 25 μ L (1:1 thể tích:thể tích) của hỗn hợp phát hiện ADP chứa chất đánh dấu gần hồng ngoại đối với ADP, kháng thể ADP và đệm dừng và phát hiện (Bellbrook Labs cat # 3003-10K). Các đĩa được giữ trong bóng tối trong ít nhất 2 giờ để cho phép sự thay thế của chất đánh dấu ADP Alexa633 (được liên

kết với kháng thể ADP2) bởi ADP được tạo ra trong phản ứng kinaza trước khi sự phân cực huỳnh quang được xác định (Ultra384, Tecan). Đường cong tiêu chuẩn của ADP/ATP trong đệm kinaza mô tả trên đây được thiết lập để xác định sự chuyển đổi của ADP đối với hợp chất thử nghiệm..

Sự khác biệt giữa giá trị trung bình của đối chứng dương và đối chứng âm được lấy là 100% hoạt tính. Sự hiệu chỉnh đường cong logic 4 thông số được sử dụng để tạo ra các giá trị IC_{50} sử dụng phần mềm ActivityBase™ (IDBS, Alameda CA). Thử nghiệm biểu diễn tỷ lệ có nghĩa tối thiểu (Minimum Significant Ratio - MSR) là ≤ 3 .

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được thử nghiệm trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Hợp chất của Ví dụ 1 được xác định là có IC_{50} là 1510 ± 668 nM ($n=5$). Các kết quả chỉ ra rằng Ví dụ 1 ức chế hoạt tính kinaza Aurora B *in vitro* ít hơn *ức chế* hoạt tính kinaza Aurora A *in vitro*.

Histon H3 phospho-Ser10 và thử nghiệm đa kiểu hình dựa trên hàm lượng ADN tế bào

Thử nghiệm đo sự ức chế Aurora A gây cảm ứng sự ngừng phân bào. Sự ức chế Aurora A cảm ứng sự ngừng phân bào được đo bằng sự tăng của chất đánh dấu sự phân bào H3 phospho-Ser10, sự tăng hàm lượng ADN 4N (G2/M), và các kiểu hình ức chế sự tăng sinh tế bào với sự điều trị bằng hợp chất trong 24 giờ sử dụng Acumen Explorer™ (Máy đếm dòng quét vi đĩa huỳnh quang Laser (TTP LabTech LTD, UK)). Các tế bào Hela từ bộ sưu tập môi trường kiểu Mỹ (American Type Culture Collection -ATCC) được đặt ở 5000 tế bào/giếng trong đĩa BD BIOCOAT™ poly-D-lysin 96 giếng (Becton Dickinson, catalog # 356640) và được ủ ở 37 °C trong 24 giờ trong 5 % CO₂ trong môi trường cần thiết tối thiểu (Minimum Essential Media -MEM) (ví dụ, Gibco, catalog # 31095) với 10% huyết thanh bào thai bò (Fetal Bovine Serum -FBS) (ví dụ Gibco, catalog #16000), 1% các axit amin không cần thiết (ví dụ Gibco, catalog #11140), 1% natri pyruvat (ví dụ Gibco catalog #11360) và 1% Penicillin-Streptomycin (ví dụ Gibco, catalog #15140). Các tế bào được xử lý bằng cách thêm các hợp chất thử nghiệm vào môi trường, phân liều ở 10 điểm là mức pha loãng theo dãy 1:3 trong khoảng 20 μ M đến 0,001 μ M, và với nồng độ DMSO cuối là 0,25%. Sau 24 phơi nhiễm với các hợp chất, các tế bào được cố định với PREFER™ (Anatech LTD., catalog # 414) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, được rửa một lần bằng nước muối đệm phosphat (phosphat buffered saline -PBS) và được tạo khả năng thấm bằng 0,1% TRITON® X100 trong

dung dịch PBS trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào được rửa hai lần bằng PBS và được phong bế bằng 1% albumin huyết thanh bò (BSA) trong PBS (ví dụ Sigma, catalog # A7030) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Kháng thể đa dòng sơ cấp kháng histon H3 phospho-Ser10 của thỏ (Millipore, catalog # 06-570) được thêm ở 1:1000 trong PBS với 1% BSA đối với tế bào và được ủ qua đêm ở 4°C. Sau hai lần rửa bằng PBS, các tế bào được ủ với kháng thể thứ cấp của dê được dán nhãn Alexa 488 kháng IgG của thỏ tỷ lệ 1:1000 trong PBS (Invitrogen cat # A11008) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau hai lần rửa nữa với PBS, dung dịch chứa 10 µg/mL propidi iodua (Invitrogen catalog # P3566) và 50 µg/mL Ribonucleaza A (Sigma catalog # R-6513) trong PBS được thêm vào để nhuộm nhân. Các đĩa huỳnh quang được quét bằng ACUMEN EXPLORER™ [Máy đếm tế bào quét vi đĩa huỳnh quang Laser (bao gồm kích thích laser 488 nm ion agon và phát hiện bằng nhiều đèn nhân quang điện, sản xuất bởi TTP LabTech Ltd.) để đo hàm lượng histon H3 phospho-Ser10 và ADN. Sự phân tích hình ảnh được dựa trên các tín hiệu huỳnh quang tế bào để nhận diện các tế bào ở các tập hợp khác nhau. Các đầu ra của thử nghiệm là phần trăm của sự ức chế sự tăng sinh tế bào, phần trăm của các tế bào dương tính với histon H3 phospho-Ser10, phần trăm của 2N (chu trình tế bào G1 hoặc hàm lượng ADN diploid trong đó N đề cập đến bộ thể đơn của các nhiễm sắc thể, hàm lượng ADN haploid) và phần trăm của 4N plus >4N (chu trình tế bào G2/M và cao hơn) của các profin biểu đồ tần suất ADN. Các trị số IC₅₀ và EC₅₀ được xác định bằng hiệu chỉnh đường cong đến logic bốn thông số cho mỗi thông số đầu ra sử dụng ACTIVITY BASE™.

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được thử nghiệm trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Hợp chất của Ví dụ 1 thể hiện sự ngừng phân bào với EC₅₀ của 108±15 nM (n=4) để tăng Histon H3 P-Ser10, EC₅₀ là 108±27 nM (n=4) để tăng hàm lượng 4N-ADN, và IC₅₀ là 52,9±27 nM (n=4) đối với sự ức chế tăng sinh tế bào, một cách tương ứng.

Thử nghiệm dựa trên tế bào ức chế Aurora B histon H3 phospho-Ser10

Thử nghiệm đo sự giảm histon H3 phospho-Ser10 cảm ứng bởi sự ức chế Aurora B với một giờ điều trị bằng hợp chất thử nghiệm. Các tế bào NCI-H446 từ bộ sưu tập môi trường kiểu Mỹ (American Type Culture Collection -ATCC) được đặt ở 12000 tế bào/giếng trong đĩa BD BIOCOAT™ poly-D-lysin 96 giếng (Becton Dickinson, catalog

356640) và được ủ ở 37 °C trong 24 giờ trong 5 % CO₂ trong môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (ví dụ Gibco, catalog # 52400) với sự bổ sung FBS 10% (ví dụ Gibco, catalog #16000) và 1% Penicillin-Streptomycin (ví dụ Gibco, catalog #15140). Các tế bào được xử lý bằng cách thêm các hợp chất thử nghiệm vào môi trường, phân liều ở 10 điểm là mức pha loãng theo dãy 1:3 trong khoảng 40 μ M đến 0,002 μ M, và với nồng độ DMSO cuối là 0,2%. Sau một giờ phơi nhiễm với các hợp chất thử nghiệm, các tế bào được cố định bằng 16% formaldehyt trong PBS (nồng độ cuối 4% từ dung dịch khối của Formaldehyde 37%, Sigma catalog # F1635) trong 45 phút ở nhiệt độ phòng, được rửa một lần bằng PBS và tạo tính thấm bằng metanol lạnh trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các tế bào được rửa một lần bằng 0,1% TRITON® X100 trong dung dịch PBS, hai lần bằng PBS và phong bế bằng 3% Skim Milk trong PBS (Difco, catalog # 232100) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Kháng thể đa dòng sơ cấp kháng histon H3 phospho-Ser10 của thỏ (Millipore, catalog # 06-570) được thêm ở 1:1000 trong PBS với 3% sữa tách béo trong PBS đối với các tế bào và được ủ qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa một lần bằng 0,1% TRITON® X100 trong dung dịch PBS và hai lần bằng PBS, các tế bào được ủ với kháng thể thứ cấp của dê được dán nhãn Alexa 488 kháng IgG của thỏ tỷ lệ 1:1000 trong PBS (Invitrogen cat # A11008) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau hai lần rửa nữa với PBS, dung dịch chứa 10 μ g/mL propidi iodua (Invitrogen catalog # P3566) và 50 μ g/mL Ribonucleaza A (Sigma catalog # R-6513) trong PBS được thêm vào để nhuộm nhân. Các đĩa huỳnh quang được quét bằng ACUMEN EXPLORER™ [Máy đếm tế bào quét vi đĩa huỳnh quang Laser (bao gồm kích thích laser 488 nm ion agon và phát hiện bằng nhiều đèn nhân quang điện, sản xuất bởi TTP LabTech Ltd.) để đo sự phosphoryl hóa của hàm lượng histon H3 phospho-Ser10 và ADN. Sự phân tích hình ảnh được dựa trên các tín hiệu huỳnh quang tế bào để nhận diện các tế bào ở các tập hợp khác nhau. Thông số đầu ra của thử nghiệm là phần trăm của các tế bào dương tính với Histon H3 phospho-Ser10. Các trị số IC₅₀ được xác định bằng cách hiệu chỉnh đường cong đến logic bốn thông số cho mỗi thông số đầu ra sử dụng Genedata Screener®.

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được thử nghiệm trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Hợp chất của Ví dụ 1 thể hiện IC₅₀ ức chế Aurora B ở 1467 ± 456 nM (n=4). Cùng với dữ liệu của nghiệm dựa trên tế bào Aurora A phosphor-

Thr288 MSD, được đưa ra dưới đây, Ví dụ 1 thể hiện sự chọn lọc của Aurora A so với Aurora B.

Chuẩn bị sản phẩm phân giải tế bào và dịch chiết histon

Đây là phương pháp để chuẩn bị các dịch phân giải tế bào để sử dụng cho thử nghiệm ức chế phosphoryl Aurora A bằng ELISA Meso Scale Discovery (MSD) sau đây. Sản phẩm phân giải tế bào ung thư phổi tế bào nhỏ (Small cell lung cancer -SCLC) H446 được chuẩn bị theo mô tả của nhà sản xuất MSD (http://www.meso-scale.com/CatalogSystemWeb/Documents/Phospho_Aurora_A_Thr288_WCL.pdf) sử dụng đệm phân giải (Tris 25 mM, pH 7,5; Leupeptin 10 µg/mL; Trypsin-Chymotrypsin 10 µg/mL; tosyl phenylalanyl clometyl keton (TPCK) 10 µg/mL; Aprotinin 10 µg/mL; β-glyxerophosphat 60 mM; Triton X-100 1%; natri pyrophosphat ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) 2,5 mM; NaCl 150 mM; EDTA 15 mM; axit etylen glycol tetraaxetic (EGTA) 5 mM; Nalpha-4-Tosyl-L-arginin metyl este hydroclorua (TAME) 2 mM; 4-nitrophenyl phosphat dinatri muối hexahydrat (PNPP) 15 mM; benzamidin 5 mM; natri vanadate 1 mM; natri florua 10 mM; phenylmetansulfonylfluorua (PMSF) 50 µg/mL; DTT 1 mM; axit okadaic 1 µM; Microcystin 1 µM). Nồng độ protein trong dịch nổi được đo bằng thử nghiệm Biorad DC-Protein (#500-0111, BioRad) và 25µL của 1mg/mL sản phẩm phân giải tế bào được sử dụng cho thử Aurora A phosphor-Thr288 MSD.

Thử nghiệm dựa trên Aurora A phospho-tế bào MSD Thr288

Mục đích của thử nghiệm là để đo hoạt tính ức chế kinaza Aurora A trong môi trường nuôi cấy tế bào. Thử nghiệm được thực hiện sử dụng đĩa ELISA Meso Scale Discovery (MSD) 96 giếng (#K150 JCD Whole Cell Lysate Kit, Meso Scale Discovery, MD).

Đĩa A MULTI-SPOT® Phospho-Aurora A Singleplex được phong bế bằng 150 µL/giếng dung dịch phong bế A (nồng độ cuối 3% BSA). Lắc đĩa ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ và rửa bằng đệm MSD Tris Wash ba lần. Phân tán 25µL sản phẩm phân giải tế bào nồng độ 1 mg/mL vào đĩa MULTI-SPOT® Phospho-Aurora MSD. Ủ hỗn hợp thêm 3 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa hỗn hợp bằng đệm MSD Tris Wash ba lần. Kháng thể phát hiện (Phospho-T288 SULFO-TAGTM kháng Aurora A) được pha loãng 50x trong 1% đệm pha loãng kháng thể BSA (1 phần của 3% BSA với 2 phần đệm rửa MSD; 0,02%

chất phong bế D-R), và 25 µl/giếng được thêm vào đĩa được lắc trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Đĩa được rửa 3 lần bằng đệm MSD TrisWash trước khi thêm 150 µL/giếng đệm đọc 2X MSD vào đĩa và đĩa được đọc trên máy MSD SECTOR™ Imager 6000. Phần trăm sự ức chế được xác định là $[(100 - (\text{giá trị MSD} - \text{giá trị ức chế tối đa MSD})) / (\text{giá trị ức chế tối thiểu MSD} - \text{giá trị ức chế tối đa MSD})] * 100$. Thuật ngữ “tối đa” và “tối thiểu” được xác định bằng 2 µM hợp chất đối chứng dương alisertib so với một mình đối chứng âm DMSO.

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được thử nghiệm trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Hợp chất Ví dụ 1 thể hiện sự ức chế Aurora A với 1 giờ điều trị bằng hợp chất trong tế bào với IC_{50} ở $1,4 \pm 1,1$ nM (n=2). Dữ liệu thể hiện rằng Ví dụ 1 chứng minh hoạt tính ức chế kinaza Aurora A trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Chuẩn bị sản phẩm phân giải protein khối u và dịch chiết histon

Đây là phương pháp chuẩn bị sản phẩm phân giải khối u ghép khá loại và dịch chiết histon được sử dụng trong các thử nghiệm ức chế đích *in vivo* (IVTI) sau đây. Các mẫu khối u được làm lạnh trong nitơ lỏng và được đặt trong các tấm và hồ và giã trên bình chứa đá khô. Các mẫu mô khối u được nghiền bằng chày và các mô khối u được tán vụn được chuyển vào ống chứa các hạt Lysing Maxtrix D (#6913-500; Biomedicals MP Lysing Maxtrix D) và 0,6mL đệm phân giải (Tris 25 mM, pH 7,5; Leupeptin 10 µg/mL; Trypsin-Chymotrypsin 10 µg/mL; TPCK 10 µg/mL; Aprotinin 10 µg/mL; β-glyxerophosphat 60 mM; Triton X-100 1%; natri pyrophosphat ($Na_2H_2P_2O_7$) 2,5 mM; NaCl 150 mM; EDTA 15 mM; EGTA 5 mM; Nalpha-4-Tosyl-L-arginin metyl este hydroclorua (TAME) 2 mM; PNPP 15 mM; benzamidine 5 mM; natri vanadat 1 mM; natri florua 10 mM; PMSF 50 µg/mL; DTT 1 mM; axit okadaic 1 µM; microxystin 1 µM) cộng với viên nén không chứa EDTA (#1873580; Roche). Các ống được lắc mạnh trong 30 giây ở tốc độ 6,0 trong Bio101 fastPrep (#Bio 101; Thermo Seweant). Sản phẩm phân giải khối u được chuẩn bị theo mô tả của nhà sản xuất MSD (http://www.meso-scale.com/CatalogSystemWeb/Documents/Phospho_Aurora_A_Thr288_WCL.pdf). Nồng độ protein trong dịch nổi được xác định bằng thử nghiệm Biorad DC-Protein (#500-0111).

Bộ kit chiết histon tổng (#OP-0006; EpiQuik) được sử dụng để chiết histon tổng từ các pelet mô khối u trong bước ly tâm trên đây theo mô tả của nhà sản xuất (<http://www.epigentek.com/docs/OP-0006.pdf>). Nồng độ protein được đo bởi thử nghiệm Biorad DC-Protein (#500-0111; BioRad), và 25 μ L protein chiết histon 0,25mg/mL được sử dụng cho các thử nghiệm IVTI histon H3 phospho-Ser10.

Thử nghiệm phospho-Thr288 MSD ức chế Aurora A *in vivo* (Aurora A *in vivo* target inhibition - IVTI)

Mục đích của thử nghiệm là để đo sự ức chế kinaza Aurora A *in vivo* với các mẫu mô ghép khác loại. Thực hiện thử nghiệm với đĩa ELISA Meso Scale Discovery (MSD) 96 giếng. Đĩa MULTI-SPOT® Phospho-Aurora A Singleplex (K150 JCD Whole Cell Lysate Kit; Meso Scale Discovery, MD) được nạp 150 μ L/giếng dung dịch phong bế A (nồng độ cuối 3% BSA). Lắc đĩa ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ và rửa bằng đệm TrisWash ba lần. Các sản phẩm phân giải khối u được chuẩn bị từ phương pháp phân giải khối u trên đây đến 1 mg/mL và 25 μ L/giếng được phân tán vào đĩa MULTI-SPOT® Phospho-Aurora MSD. Ủ hỗn hợp thêm 3 giờ ở nhiệt độ phòng, và rửa ba lần bằng đệm rửa TrisWash. Kháng thể phát hiện Phospho-T288 SULFO-TAGTM kháng Aurora A trong đệm pha loãng kháng thể BSA 1% (kháng thể được pha loãng 50x vào đệm với 1 phần của BSA 3% cộng với 2 phần đệm rửa; 0,02% chất phong bế D-R) với lượng 25 μ L/giếng được thêm vào đĩa và lắc đĩa trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa đĩa ba lần bằng đệm TrisWash, thêm 150 μ L/giếng 2X đệm Read T vào đĩa, và sau đó đọc luôn trên máy MSD SECTOR™ Imager 6000. Phần trăm ức chế được xác định là $[100 - (\text{giá trị đọc MSD trung bình của nhóm điều trị bằng hợp chất} / \text{giá trị đọc MSD của trung bình của nhóm dùng tá dược})] * 100$.

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được thử nghiệm trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Hợp chất của Ví dụ 1 thể hiện TED₅₀ của 2,13 mg/kg với mẫu mô ghép khác loại H446 ở chuột trụi lông (Threshold Effective Dose) trong nghiên cứu đáp ứng liều 3 giờ sau khi phân liều. Dữ liệu thể hiện rằng Ví dụ 1 chứng minh sự ức chế kinaza Aurora A *in vivo* với các mẫu mô ghép khác loại ở TED xác định.

Thử nghiệm histon H3 phospho-Ser10 MSD ức chế đích Aurora B *in vivo* (IVTI)

Mục đích của thử nghiệm là đo hoạt tính ức chế kinaza Aurora B *in vivo* với các mẫu mô ghép khác loại bằng cách xác định sự ức chế histon H3 phospho-Ser10 vì đó là chất nền xuôi dòng trực tiếp của kinaza Aurora B. Thực hiện thử nghiệm với đĩa ELISA Meso Scale Discovery (MSD) 96 giếng. Dung dịch phong bế-A (nồng độ cuối 3% BSA) được thêm vào đĩa MULTI-SPOT® Histon H3 4-Spot (Cat# K150 EWD-3 JCD Whole Cell Lysate Kit, Meso Scale Discovery, MD) ở 150 µL/giếng và lắc đĩa ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa ba lần với đệm MSD TrisWash, dịch chiết histon được chuẩn bị đến 0,25mg/mL với sản phẩm phân giải khối u được phân tán lên đĩa MSD ở 25µL/giếng. Ủ hỗn hợp thêm 3 giờ ở nhiệt độ phòng, rửa 3 lần bằng đệm MSD TrisWash. Kháng thể phát hiện SULFO-TAG kháng histon H3 phospho-Ser10 được pha loãng 50x vào 3 mL đệm pha loãng kháng thể BSA 1% (1ml BSA 3% với 2 mL đệm rửa MSD; 0,01% chất phong bế D-M), và 25 µL/giếng được thêm vào đĩa và lắc đĩa ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, rửa đĩa 3 lần bằng đệm MSD TrisWash. Thêm 150 µL/giếng đệm 2X MSD Read T vào giếng. Đọc đĩa luôn bằng máy MSD SECTOR™ Imager 6000. Phần trăm ức chế được xác định là $[100 - (\text{giá trị đọc MSD trung bình của nhóm điều trị bằng hợp chất} / \text{giá trị đọc MSD của trung bình của nhóm dùng tá dược})] * 100$.

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được thử nghiệm trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Hợp chất của Ví dụ 1 thể hiện sự ức chế hơn 50% histon H3 phospho-Ser10 trong thử nghiệm trong nghiên cứu đáp ứng liều ở 30 mg/kg 3 giờ sau khi phân liều, và trong tiến trình nghiên cứu ở 50 mg/kg 1 giờ sau khi phân liều. Kết quả này gợi ý rằng Ví dụ 1 không ức chế Aurora B *in vivo* với các mẫu mô ghép khác loại ở các liều xác định.

Hiệu quả phát triển chống khối u ở mẫu ghép khác loại chuột trụ lông SCLC NCI-H446

Thử nghiệm này là để đo sự ức chế phát triển khối u *in vivo* trong các mẫu ghép khác loại chuột trụ lông SCLC NCI-H446 và SCLC NCI-H69. Tất cả các nghiên cứu *in vivo* được thực hiện theo The Institutional Animal Care và Use Protocols. Đối với các mẫu ghép khác loại, các tế bào ung thư phổi tế bào nhỏ NCI-H446 của người và các tế bào ung thư phổi tế bào nhỏ NCI-H69 của người là được duy trì như được khuyến nghị bởi nhà cung cấp. Các tế bào được thu, rửa và được tái tạo huyền phù trong hỗn hợp tỷ

lệ 1:1 của môi trường không huyết thanh và Matrigel (354234, Becton Dickinson). Sau đó, các tế bào được cấy vào chuột cái trụi lông thiếu tuyến ức (Harlan Laboratories) dưới da gần sườn phải ở 5×10^6 tế bào/chuột. Thể tích khối u được ước tính bằng cách sử dụng công thức: $v = \frac{1}{2} \times w^2 \times 0,536$ trong đó l = đường kính đo được lớn hơn và w = đường kính vuông góc nhỏ hơn. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm SAS (SAS Institutes Inc, Cary, NC).

Khi thể tích khối u đạt đến 150 mm^3 ở chuột trụi lông, các động vật được ngẫu nhiên hóa theo thể tích khối u và cho dùng hợp chất thử nghiệm trong dạng bào chế sử dụng tá dược là 20% hydroxypropyl beta cyclodextrin (HPBCD)/25mM đệm phosphat pH8, với độ pH được điều chỉnh đến pH 9 với NaOH 1N. Mười động vật được sử dụng trên nhóm dùng tá dược và nhóm điều trị. Ở mỗi thời điểm lấy, các nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng dùng tá dược. Thể tích khối u đưa ra là giá trị trung bình với các sai số tiêu chuẩn cho mỗi nhóm điều trị.

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được thử nghiệm trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Hợp chất của Ví dụ 1 chứng minh hiệu quả phát triển chống khối u đáng kể trong mẫu chuột trụi lông ghép khác loại ung thư phổi tế bào nhỏ NCI-H446 và ở mẫu chuột trụi lông ghép khác loại ung thư phổi tế bào nhỏ NCI-H69.

Bảng 4: Sự ức chế phát triển khối u ghép khác loại SCLC H446 *in vivo* với điều trị bằng Ví dụ 1

Phác đồ điều dùng	Thể tích khối u trung bình (mm ³)	Thể tích khối u SE (mm ³)	Giá trị p	Delta T/C (%)	Mức thoái triển (%)
Tá dược	698,61	319,434	không xác định	không xác định	không xác định
Ví dụ 1 30 mg/kg; BIDx21	106,19	22,729	<,001*	không xác định	-45,8
Ví dụ 1 50 mg/kg; BIDx21	31,62	4,340	<,001*	không xác định	-83,9

Phân tích thể tích khối u được dựa trên Log 10 và cấu trúc hiệp phương sai SpatialPower.

*:đáng kể ($p < 0,05$); NA: Không áp dụng.

Delta T/C (%) được tính toán ở ngày 30 khi thể tích khối u trong nhóm điều trị là ở mức hoặc trên mức thể tích khối u đường cơ sở trên đây (ngày 16).

Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$ trong đó 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.

Mức thoái triển (%) được tính toán khi thể tích tới hạn là ở dưới đường cơ sở. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / T_0$ trong đó T₀ là thể tích khối u đường cơ sở trung bình trong các nhóm điều trị.

Bảng 5: Sự ức chế phát triển khối u ghép khác loại SCLC H69 *in vivo* với điều trị bằng Ví dụ 1

Phác đồ điều dùng	Thể tích khối u trung bình (mm ³)	Thể tích khối u SE (mm ³)	Giá trị p	Delta T/C (%)	Mức thoái triển (%)
Tá dược	687,61	95,175	không xác định	không xác định	không xác định
Ví dụ 1 30 mg/kg; BIDx14	73,35	9,269	<,001*	không xác định	-63,6
Ví dụ 1 50 mg/kg; BIDx14	72,32	8,035	<,001*	không xác định	-63,1

Phân tích thể tích khối u được dựa trên Log 10 và cấu trúc hiệp phương sai SpatialPower.

*:Đáng kể ($p < 0,05$); NA: Không áp dụng.

Delta T/C (%) được tính toán ở ngày 30 khi thể tích khối u trong nhóm điều trị là ở mức hoặc trên mức thể tích khối u đường cơ sở trên đây (ngày 16).

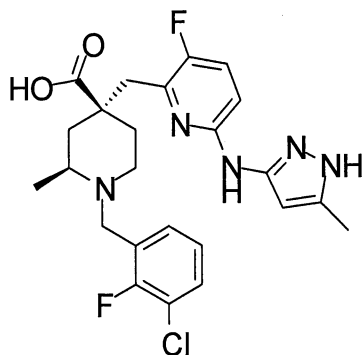
Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$ trong đó T và C tương ứng là thể tích khối u tới hạn trung bình trong nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng. T₀ và C₀ là thể tích khối u đường cơ sở trung bình trong các nhóm này.

Mức thoái triển (%) được tính toán khi thể tích tới hạn là ở dưới đường cơ sở. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / T_0$ trong đó T₀ là thể tích khối u đường cơ sở trung bình trong các nhóm điều trị.

YÊU CẦU BẢO HỘ

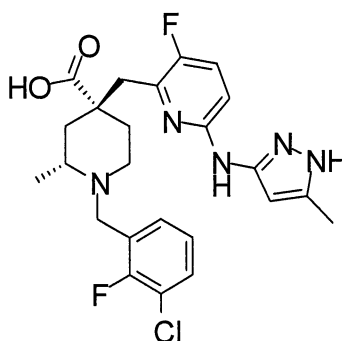
1. Hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:

Axit (2S,4S)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic:



và

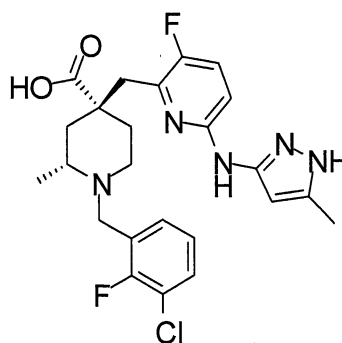
Axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic:



;

hoặc muối được dụng của nó.

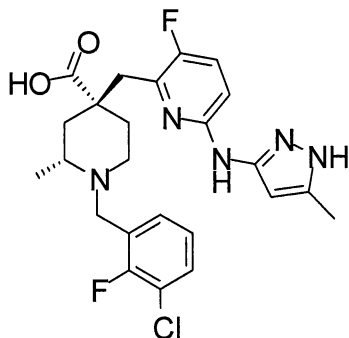
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flo-phenyl)-metyl]-4-[[3-flo-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic:



;

hoặc muối được dụng của nó.

3. Hợp chất theo điểm 2, trong đó hợp chất này là axit (2R,4R)-1-[(3-clo-2-flu-phenyl)-metyl]-4-[[3-flu-6-[(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]-2-pyridyl]metyl]-2-metyl-piperidin-4-carboxylic:



4. Dược phẩm chứa hợp chất hoặc muối theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.