



(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)



1-0026137

(51)⁷ C07D 471/04; A61K 31/437; A61P
19/02

(13) B

(21) 1-2012-00218

(22) 25/06/2010

(86) PCT/EP2010/059064 25/06/2010

(87) WO 2010/149769 29/12/2010

(30) 61/220,688 26/06/2009 US

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/04/2013 301A

(73) GALAPAGOS NV (BE)

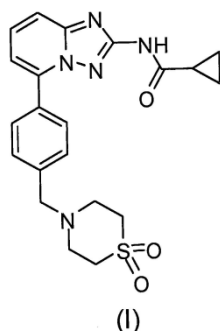
Generaal De Wittelaan L11/A3, B-2800 Mechelen, Belgium

(72) MENET, Christel Jeanne Marie (FR); SMITS, Koen Kurt (BE).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT 5-PHENYL-[1,2,4]TRIAZOLO[1,5-A]PYRIDIN-2-YL
CARBOXAMIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất ức chế JAK, hợp chất này có thể được bào chế dưới dạng dược phẩm, và có thể được sử dụng để ngăn ngừa và điều trị nhiều tình trạng bệnh lý ở động vật có vú kể cả người, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thải ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và/hoặc bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất là chất ức chế JAK thuộc họ tyrosin kinaza gây ra các tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thải ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và/hoặc bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6. Cụ thể, hợp chất theo sáng chế ức chế JAK1 và JAK2. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất hợp chất theo sáng chế, dược phẩm chứa hợp chất theo sáng chế được sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thải ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và/hoặc bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các Janus kinaza (JAK) là tyrosin kinaza ở tế bào chất có vai trò truyền tín hiệu xytokin từ thụ thể màng đến các yếu tố phiên mã STAT. Bốn thành viên thuộc họ JAK là JAK1, JAK2, JAK3 và TYK2. Khi gắn kết xytokin với thụ thể của nó, các thành viên thuộc họ JAK tự phosphoryl hóa và/hoặc transphosphoryl hóa với nhau, sau đó là quá trình phosphoryl hóa các STAT để chúng di chuyển vào nhân để điều biến quá trình phiên mã. Quá trình truyền tín hiệu nội bào JAK-STAT sử dụng interferon, hầu hết là các interleukin, cũng như nhiều loại xytokin và yếu tố nội tiết như EPO, TPO, GH, OSM, LIF, CNTF, GM-CSF và PRL (Vainchenker W. *et al.* (2008)).

Việc kết hợp nghiên cứu mô hình di truyền và chất ức chế JAK phân tử nhỏ đã phát hiện ra khả năng điều trị của một số JAK. JAK3 được xác nhận bởi bộ gen di truyền của chuột nhắt và người là đích ức chế miễn dịch (O'Shea J. *et al.* (2004)). Chất ức chế JAK3 được sử dụng thành công trong phát triển lâm sàng, ban đầu là với chứng thải ghép cơ quan và sau này cũng được chỉ định cho các trường hợp viêm-miễn dịch khác như bệnh viêm đa khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis - RA), bệnh vẩy nến và bệnh Crohn (<http://clinicaltrials.gov/>).

TYK2 là đích tiềm năng của bệnh viêm-miễn dịch, được xác nhận bởi nghiên cứu bộ gen di truyền của người và nghiên cứu bất hoạt trên chuột nhắt (Levy D. và

Loomis C. (2007)).

JAK1 là đích mới của bệnh viêm-miễn dịch. JAK1 dị đime hóa với các JAK khác để truyền tín hiệu gây tiền viêm do xytokin. Do vậy, việc ức chế JAK1 và/hoặc các JAK khác được mong đợi là có tác dụng điều trị bệnh đối với hàng loạt các tình trạng bệnh lý viêm cũng như các bệnh khác do việc truyền tín hiệu qua trung gian JAK.

Thoái hóa sụn là dấu hiệu phân biệt với các bệnh khác, trong số các bệnh đó thì bệnh viêm đa khớp dạng thấp và bệnh viêm xương khớp (osteoarthritis - OA) là các bệnh phổ biến nhất. Bệnh viêm đa khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis - RA) là bệnh thoái hóa khớp mạn tính, đặc trưng ở chỗ cấu trúc khớp bị viêm và bị phá hủy. Khi bệnh không được kiểm tra, nó thường dẫn đến mất chức năng đáng kể và gây đau do mất tính năng của khớp và thậm chí chết sớm. Do vậy, mục đích của việc điều trị bệnh RA không chỉ là từ từ làm giảm bệnh mà còn tiến đến thuyên giảm để làm ngừng sự phá hủy khớp. Bên cạnh mức độ nghiêm trọng do hậu quả của bệnh, tỷ lệ mắc bệnh RA cao (0,8% số người lớn mắc phải trên toàn thế giới) gây ảnh hưởng lớn đến xã hội và kinh tế. (Đối với bệnh RA, tác giả sáng chế đề cập đến tài liệu của Smolen và Steiner (2003); Lee và Weinblatt (2001); Choy và Panayi (2001); O'Dell (2004) và Firestein (2003)).

Bệnh viêm xương khớp (còn được gọi là OA, hoặc bệnh viêm khớp thoái hóa) là dạng viêm khớp thường gặp nhất và được đặc trưng bởi sự mất đi khớp sụn, thường liên quan đến chứng phì đại ở xương và gây đau đớn. Để xem thêm các tài liệu về bệnh viêm xương khớp, các tác giả sáng chế viện dẫn tài liệu của Wieland *et al.* (2005).

Bệnh viêm xương khớp rất khó điều trị. Hiện nay, chưa có phương pháp điều trị hiệu quả và phương pháp điều trị mới chỉ tập trung vào việc giảm đau và ngăn ngừa khớp bị ảnh hưởng không trở nên biến dạng. Các phương pháp điều trị thông thường bao gồm việc sử dụng thuốc kháng viêm không steroid (NSAID). Mặc dù các chất bổ sung vào khẩu phần ăn như chondroitin và glucosamin sulphat được coi là sự lựa chọn an toàn và hiệu quả để điều trị bệnh viêm xương khớp, nhưng thử nghiệm lâm sàng gần đây cho thấy cả hai cách điều trị này không làm giảm cơn đau liên quan đến bệnh viêm xương khớp. (Clegg *et al.*, 2006).

Sự kích thích quá trình đồng hóa, phong bế quá trình dị hóa, hoặc kết hợp hai phương pháp này, có thể làm ổn định sụn, và có thể khôi phục tổn thương, do vậy ngăn ngừa sự tiến triển bệnh. Các phương pháp điều trị để điều chỉnh các tổn thương khớp sụn xuất hiện khi bị bệnh viêm xương khớp đã phát triển, nhưng đến nay chưa có phương pháp nào trong số đó có khả năng điều tiết sự tái tạo khớp sụn *in situ* và *in vivo*. Đồng thời, vẫn chưa có thuốc viêm xương khớp làm giảm bệnh này.

Vandeghinste *et al.* (WO 2005/124342) đã phát hiện ra JAK1 là đích mà việc ức chế nó có liên quan đến việc điều trị đối với một số bệnh bao gồm OA. Sự bất hoạt gen JAK1 ở chuột nhắt chứng minh rằng JAK1 đóng vai trò thiết yếu và rất cần thiết trong quá trình phát triển: chuột nhắt JAK1^{-/-} bị giết trong vòng 24 giờ sau khi sinh và sự phát triển của lymphô bào bị suy giảm mạnh. Hơn nữa, các tế bào JAK1^{-/-} không hoặc ít làm hoạt hóa xytokin bằng cách sử dụng thụ thể xytokin lớp II, thụ thể xytokin này sử dụng cấu trúc dưới phân tử gama-c để truyền tín hiệu và họ thụ thể xytokin sử dụng cấu trúc dưới phân tử gp130 để truyền tín hiệu (Rodig *et al.*, 1998).

Các nhóm khác liên quan đến sự truyền tín hiệu JAK-STAT trong sinh học tế bào sụn. Li *et al.* (2001) đã cho thấy rằng Oncostatin M kích thích sự biểu hiện gen MMP và TIMP3 trong tế bào sụn sơ cấp bằng cách hoạt hóa con đường truyền tín hiệu JAK/STAT và MAPK. Osaki *et al.* (2003) cho thấy rằng tác dụng ức chế qua trung gian interferon-gama của collagen II trong tế bào sụn liên quan đến việc truyền tín hiệu JAK-STAT. IL1-beta cảm ứng quá trình dị hóa sụn bằng cách giảm sự biểu hiện của các thành phần nền, và bằng cách kích thích sự biểu hiện của collagenaza và nitric oxit syntaza cảm ứng (NOS₂), mà điều tiết sự sản xuất nitric oxit (NO). Otero *et al.*, (2005) đã cho thấy rằng leptin và IL1-beta đã kích thích một cách hiệp đồng quá trình sản xuất NO hoặc sự biểu hiện ARN thông tin NOS₂ trong tế bào sụn, và được phong bế bởi chất ức chế JAK. Legendre *et al.* (2003) cho thấy rằng thụ thể IL6/IL6 kích thích quá trình điều hòa giảm của collagen II có gen nền đặc hiệu sụn, lõi aggrecan và protein liên kết trong tế bào sụn của khớp bò, và quá trình này được điều tiết bởi quá trình truyền tín hiệu JAK/STAT. Do vậy, các quan sát này gợi ý vai trò đối với hoạt tính JAK kinaza trong việc nội cân bằng sụn và cơ hội điều trị bằng chất ức chế JAK kinaza.

Các thành viên thuộc họ JAK liên quan đến các tình trạng bệnh lý khác bao

gồm rối loạn tăng sinh tủy (O'Sullivan *et al*, 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506), trong đó các đột biến trong JAK2 đã được xác định. Điều này chỉ ra rằng chất ức chế JAK, cụ thể là JAK2 cũng có thể được sử dụng để điều trị rối loạn tăng sinh tủy. Ngoài ra, họ JAK, cụ thể là JAK1, JAK2 và JAK3, cũng liên quan đến các bệnh ung thư, cụ thể là bệnh ung thư bạch cầu, ví dụ bệnh ung thư bạch cầu tủy bào cấp tính (O'Sullivan *et al*, 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506; Xiang *et al.*, 2008, "Identification of somatic *JAK1* mutations in patients with acute myeloid leukemia" Blood First Edition Paper, công bố đầu tiên trên mạng ngày 26 tháng 12 năm 2007; DOI 10.1182/blood-2007-05-090308) và bệnh ung thư bạch cầu nguyên bào lymphô cấp tính (Mullighan *et al*, 2009) hoặc khối u rắn ví dụ sarcoma cơ trơn tử cung (Constantinescu *et al.*, 2007, Trends in Biochemical Sciences 33(3): 122-131), bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Tam *et al.*, 2007, British Journal of Cancer, 97, 378 – 383). Các kết quả này chỉ ra rằng chất ức chế JAK, cụ thể là JAK1 và/hoặc JAK2, cũng có thể có khả năng điều trị bệnh ung thư (bệnh ung thư bạch cầu và khối u rắn, ví dụ sarcoma cơ trơn tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt).

Ngoài ra, bệnh Castleman, đa u tủy, bệnh viêm cầu thận màng tăng sinh, bệnh vẩy nến, và sarcoma Kaposi có khả năng là do việc tăng tiết cytokin IL-6, tác dụng sinh học của chúng được điều tiết bởi quá trình truyền tín hiệu JAK-STAT nội bào (Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto and Tadami Kishimoto, Arthritis Res 2002, 4 (suppl 3):S233-S242). Kết quả này cho thấy rằng chất ức chế JAK, cũng có thể có khả năng điều trị bệnh này.

WO 2009/047514 bộc lộ hợp chất [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin và [1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin có tác dụng ức chế chức năng tyrosin kinaza thụ thể AXL. WO 2009/017954 bộc lộ chất ức chế [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin của JAK2 kinaza. WO 03/010167 bộc lộ dẫn xuất 8-metoxi-(1,2,4)triazolo(1,5-a)pyridin và việc sử dụng chúng làm phối tử thụ thể adenosin.

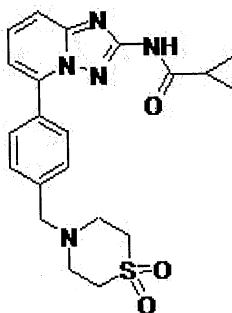
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các phương pháp điều trị hiện nay chưa thỏa đáng và do vậy vẫn cần tìm ra các hợp chất khác có thể được sử dụng để điều trị bệnh thoái hóa khớp, ví dụ bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm đa khớp dạng thấp và bệnh loãng xương, cụ thể là bệnh viêm xương khớp. Do vậy, sáng chế đề cập đến hợp chất, các phương pháp sản xuất hợp

chất này và được phẩm chứa hợp chất này cùng với chất mang được dụng thích hợp. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất theo sáng chế trong việc bào chế thuốc để điều trị bệnh thoái hóa khớp. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chất ức chế JAK mới thể hiện hoạt lực *in vivo* được cải thiện đáng kể.

Sáng chế dựa trên việc phát hiện rằng hợp chất theo sáng chế có tác dụng làm chất ức chế JAK và hữu dụng để điều trị tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thái ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và/hoặc bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6. Theo một khía cạnh cụ thể, hợp chất này là chất ức chế JAK1 và JAK2. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất hợp chất này, được phẩm chứa hợp chất này được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thái ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và/hoặc bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):



Hợp chất theo sáng chế là chất ức chế JAK mới, thể hiện hoạt lực *in vivo* được cải thiện đáng kể so với hợp chất khác tương tự về cấu trúc. Theo một phương án cụ thể, hợp chất theo sáng chế là chất ức chế JAK1 và JAK2. Cụ thể là nó thể hiện hoạt lực tăng ở nồng độ tiếp xúc *in vivo* thấp hơn so với hợp chất tương tự về cấu trúc. Việc sử dụng hợp chất có các cải tiến này được dự định đạt được kết quả ở liều lượng yêu cầu thấp hơn (và do vậy chế độ liều lượng được cải thiện).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế, và chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng được dụng. Hơn nữa, hợp chất theo sáng chế, có thể sử dụng trong dược phẩm và các phương pháp điều trị được bộc lộ ở đây, có thể được bào chế và sử dụng trong y tế. Theo khía cạnh này của sáng chế, được

phẩm có thể còn chứa thêm các thành phần hoạt tính khác thích hợp để sử dụng kết hợp với hợp chất theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho động vật có vú mắc cảm hoặc bị đau đớn bởi tình trạng bệnh lý được nêu trên, và cụ thể là tình trạng bệnh lý liên quan đến hoạt tính JAK bất thường, ví dụ tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thải ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6, phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu dược phẩm hoặc hợp chất theo sáng chế như được nêu trong bản mô tả này. Theo phương án cụ thể, tình trạng bệnh lý này liên quan đến hoạt tính bất thường của JAK1 và JAK2.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh lý được chọn từ các bệnh được nêu ở đây, cụ thể là các tình trạng bệnh lý liên quan đến hoạt tính JAK bất thường, ví dụ tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thải ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6.

Theo một phương pháp khác về khía cạnh điều trị, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho động vật có vú mắc cảm hoặc bị đau đớn bởi tình trạng bệnh lý có nguyên nhân liên quan tới hoạt tính JAK bất thường như được nêu trong bản mô tả này, và bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu dược phẩm hoặc hợp chất theo sáng chế để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh lý. Theo một khía cạnh cụ thể, tình trạng bệnh lý này có nguyên nhân liên quan đến hoạt tính bất thường của JAK1 và JAK2.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh lý có nguyên nhân liên quan tới hoạt tính JAK bất thường.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tổng hợp hợp chất theo sáng chế, bằng con đường và quy trình tổng hợp tương ứng được mô tả dưới đây.

Do đó, mục đích chính của sáng chế là đề xuất hợp chất mới, mà có thể biến đổi hoạt tính của JAK và vì thế ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh bất kỳ có thể có nguyên nhân liên quan. Theo một khía cạnh cụ thể, hợp chất theo sáng chế điều biến hoạt tính của

JAK1 và JAK2.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất hợp chất có thể điều trị hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc triệu chứng của bệnh, như tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thải ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6, có thể liên quan tới hoạt tính của JAK, cụ thể là JAK1 và JAK2.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất dược phẩm có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa nhiều tình trạng bệnh lý, bao gồm bệnh liên quan đến hoạt tính JAK như tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thải ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6. Theo phương án cụ thể, bệnh này liên quan đến hoạt tính của JAK1 và JAK2.

Các mục đích và ưu điểm khác sẽ trở nên hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan dựa trên việc xem xét phân mô tả chi tiết dưới đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Các định nghĩa dưới đây được dự định để có nghĩa như được nêu dưới đây và hữu dụng giúp hiểu phân mô tả và phạm vi được dự định của sáng chế.

Khi mô tả sáng chế, có thể bao gồm hợp chất, dược phẩm chứa hợp chất này và phương pháp sử dụng hợp chất và dược phẩm này, các thuật ngữ sau, nếu có mặt, có nghĩa như sau trừ khi có quy định khác. Nên hiểu rằng khi được mô tả ở đây, các gốc bất kỳ được xác định dưới đây có thể được thế bằng nhiều phần tử thế, và các định nghĩa tương ứng được dự định để bao gồm các gốc được thế như vậy trong phạm vi của chúng như được nêu dưới đây. Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ ‘được thế’ là như được xác định dưới đây. Nên hiểu rằng thuật ngữ ‘nhóm’ và ‘gốc’ có thể được dùng thay thế cho nhau khi được sử dụng ở đây.

Dạng số ít dùng để chỉ một hoặc nhiều hơn một (tức là ít nhất là một). Ví dụ “chất tương tự” dùng để chỉ một chất tương tự hoặc nhiều hơn một chất tương tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ ‘JAK’ dùng để chỉ họ Janus kinaza (JAK) là tyrosin kinaza ở tế bào chất mà truyền tín hiệu xytokin từ thụ thể

màng đến các yếu tố phiên mã STAT. Bốn thành viên thuộc họ JAK là JAK1, JAK2, JAK3 và TYK2 và thuật ngữ JAK có thể dùng để chỉ toàn bộ các thành viên thuộc họ JAK hoặc một hoặc nhiều thành viên thuộc họ JAK như trong phạm vi của phần mô tả.

‘Dược dụng’ có nghĩa là được phê chuẩn hoặc được chấp nhận bởi cơ quan điều hành liên bang hoặc cơ quan chính phủ hoặc các cơ quan tương ứng ở các quốc gia khác ngoài Mỹ, hoặc được liệt kê trong dược điển Mỹ hoặc các dược điển được chấp nhận rộng rãi khác để sử dụng cho động vật, và cụ thể hơn là người.

‘Muối dược dụng’ dùng để chỉ muối của hợp chất theo sáng chế là dược dụng và mang hoạt tính dược lý mong muốn của hợp chất gốc. Cụ thể, các muối này là không độc, có thể là muối cộng axit vô cơ hoặc hữu cơ và muối cộng bazơ. Cụ thể, các muối này bao gồm: (1) muối cộng axit, được tạo thành với axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, và dạng tương tự; hoặc được tạo thành với axit hữu cơ như axit axetic, axit propionic, axit hexanoic, axit xyclopentanpropionic, axit glycolic, axit pyruvic, axit lactic, axit malonic, axit succinic, axit malic, axit maleic, axit fumaric, axit tartaric, axit citric, axit benzoic, axit 3-(4-hydroxybenzoyl) benzoic, axit cinnamic, axit mandelic, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit 1,2-etan-disulfonic, axit 2-hydroxyetansulfonic, axit benzensulfonic, axit 4-clobensensulfonic, axit 2-naphtalensulfonic, axit 4-toluensulfonic, axit camphorsulfonic, axit 4-metylbi-cyclo[2,2,2]-oct-2-en-1-carboxylic, axit glucoheptonic, axit 3-phenylpropionic, axit trimetylaxetic, axit tert-butylaxetic, axit lauryl sulfuric, axit gluconic, axit glutamic, axit hydroxynaphtic, axit salixylic, axit stearic, axit muconic, và dạng tương tự; hoặc (2) muối được tạo ra khi proton có tính axit có mặt trong hợp chất gốc hoặc được thay thế bằng ion kim loại, ví dụ ion kim loại kiềm, ion kiềm thổ, hoặc ion nhôm; hoặc kết hợp với bazơ hữu cơ như etanolamin, dietanolamin, trietanolamin, N-metylglucamin và dạng tương tự. Các muối còn bao gồm, ví dụ, natri, kali, canxi, magie, amoni, tetraalkylamoni, và dạng tương tự; và khi hợp chất chứa nhóm chức bazơ, muối của axit hữu cơ hoặc axit vô cơ không độc, như hydroclorua, hydrobromua, tartrat, mesylat, axetat, maleat, oxalat và dạng tương tự. Thuật ngữ ‘cation dược dụng’ dùng để chỉ ion trái dấu cation chấp nhận được của nhóm chức axit. Các cation được lấy làm ví dụ là natri, kali, canxi,

magie, amoni, cation tetraalkylamoni, và dạng tương tự.

‘Chất dẫn thuốc được dùng’ dùng để chỉ chất pha loãng, chất hỗ trợ, tá dược hoặc chất mang được dùng với hợp chất theo sáng chế.

‘Solvat’ dùng để chỉ dạng của hợp chất kết hợp với dung môi, thường là bằng phản ứng dung môi phân. Sự liên kết vật lý này bao gồm liên kết hydro. Dung môi thông thường bao gồm nước, etanol, axit axetic và dạng tương tự. Hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế, ví dụ, ở dạng tinh thể và có thể được solvat hóa hoặc hydrat hoá. Các solvat thích hợp bao gồm solvat được dùng, như hydrat, và còn bao gồm solvat có hệ số tỷ lệ và solvat không có hệ số tỷ lệ. Trong một số trường hợp nhất định, solvat có khả năng phân lập, ví dụ khi một hoặc nhiều phân tử dung môi được kết hợp trong lưới tinh thể của tinh thể rắn. ‘Solvat’ gồm pha dung dịch và solvat có khả năng phân lập. Các solvat điển hình bao gồm hydrat, etanolat và metanolat.

‘Đối tượng’ bao gồm người. Thuật ngữ ‘người’, ‘bệnh nhân’ và ‘đối tượng’ được sử dụng thay thế cho nhau ở đây.

‘Lượng cho tác dụng điều trị bệnh’ nghĩa là lượng hợp chất, khi được dùng cho đối tượng để điều trị bệnh, đủ để có tác dụng điều trị bệnh. ‘Lượng cho tác dụng điều trị bệnh’ có thể khác nhau phụ thuộc vào hợp chất, bệnh và mức độ nghiêm trọng, tuổi tác, cân nặng, v.v., của đối tượng cần được điều trị.

‘Ngăn ngừa’ hoặc ‘việc ngăn ngừa’ dùng để chỉ việc làm giảm nguy cơ mắc phải hoặc sự phát triển của bệnh hoặc rối loạn (tức là, khiến cho ít nhất một trong số các triệu chứng lâm sàng của bệnh không phát triển ở đối tượng mà có thể tiếp xúc với tác nhân gây bệnh, hoặc có khả năng mắc bệnh trước khi bệnh khởi phát).

Thuật ngữ ‘phòng ngừa’ liên quan tới ‘việc ngăn ngừa’, và dùng để chỉ biện pháp hoặc quy trình mà mục đích của nó là để ngăn ngừa, chứ không phải là điều trị hoặc chữa bệnh. Ví dụ không giới hạn về biện pháp phòng ngừa có thể bao gồm việc dùng vaccin; dùng heparin có trọng lượng phân tử thấp cho bệnh nhân nằm viện có nguy cơ bị chứng huyết khối, ví dụ, do không di chuyển; và sử dụng chất chống sốt rét như cloroquin, trước khi đến thăm các vùng địa lý mà tại đó bệnh sốt rét là đặc hữu hoặc có nguy cơ cao mắc phải bệnh sốt rét.

‘Điều trị’ hoặc ‘việc điều trị’ bệnh hoặc rối loạn bất kỳ, theo một phương án, để chỉ việc làm giảm bệnh hoặc rối loạn (tức là kìm hãm bệnh hoặc làm giảm sự biểu hiện, mức độ hoặc tính nghiêm trọng của ít nhất một trong số các triệu chứng lâm sàng của chúng). Theo một phương án khác, ‘điều trị’ hoặc ‘việc điều trị’ dùng để chỉ việc làm giảm ít nhất một thông số vật lý, mà có thể không thể nhận biết bởi đối tượng. Theo một phương án khác, ‘điều trị’ hoặc ‘việc điều trị’ dùng để chỉ việc điều biến bệnh hoặc rối loạn, về mặt vật lý, (ví dụ, ổn định các triệu chứng có thể nhận biết), về mặt sinh lý, (ví dụ, ổn định các thông số vật lý), hoặc cả hai. Theo một phương án khác, ‘điều trị’ hoặc ‘việc điều trị’ dùng để chỉ việc làm chậm sự tiến triển của bệnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ ‘(các) tình trạng bệnh lý viêm’ dùng để chỉ nhóm gồm các tình trạng bệnh lý bao gồm, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp tự phát vị thành niên, bệnh vẩy nến, bệnh dị ứng đường thở (ví dụ, bệnh hen, viêm mũi), bệnh viêm ruột (ví dụ, bệnh Crohn, bệnh viêm ruột kết), tình trạng bệnh lý do nội độc tố gây ra (ví dụ, biến chứng sau phẫu thuật bắc cầu hoặc trạng thái nội độc tố mạn tính góp phần gây ra ví dụ suy tim mạn tính), và các bệnh liên quan đến sụn, như bệnh liên quan đến khớp. Các thuật ngữ cụ thể như bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh dị ứng đường thở (ví dụ, bệnh hen) và bệnh viêm ruột.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ ‘(các) bệnh tự miễn’ dùng để chỉ nhóm bệnh bao gồm bệnh tắc nghẽn đường thở, bao gồm các tình trạng bệnh lý như COPD, bệnh hen (ví dụ, bệnh hen nội sinh, bệnh hen ngoại sinh, bệnh hen do bụi, bệnh hen suyễn) cụ thể là bệnh hen mạn tính hoặc lâu năm (ví dụ, bệnh hen đáp ứng muộn và quá mẫn đường thở), chứng viêm phế quản, bao gồm bệnh hen phế quản, bệnh luput ban đỏ toàn thân (SLE), bệnh đa xơ cứng, bệnh đái tháo đường tuýp I và biến chứng liên quan đến chúng, bệnh eczema dị ứng (bệnh viêm da dị ứng), bệnh viêm da tiếp xúc và bệnh viêm da chàm, bệnh viêm ruột (ví dụ, bệnh Crohn và bệnh viêm ruột kết mạn loét), bệnh xơ vữa động mạch và bệnh xơ cứng cột bên teo cơ. Cụ thể là thuật ngữ này dùng để chỉ COPD, bệnh hen, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh đái tháo đường tuýp I và bệnh viêm ruột.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “(các) bệnh tăng sinh” chỉ

các tình trạng bệnh lý như bệnh ung thư (ví dụ, sacôm cơ trơn tử cung hoặc bệnh ung thư tuyến tiền liệt), rối loạn tăng sinh tủy (ví dụ, bệnh đa hồng cầu, tăng tiểu cầu tiên phát và chứng xơ hóa tủy xương), bệnh bạch cầu (ví dụ, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính và bệnh bạch cầu nguyên bào lymphô cấp tính), đa u tủy, bệnh vẩy nến, chứng tái phát hẹp (van tim), viêm cứng bì hoặc chứng xơ hóa. Cụ thể, các thuật ngữ này dùng để chỉ bệnh ung thư, bệnh bạch cầu, đa u tủy và bệnh vẩy nến.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ ‘bệnh ung thư’ dùng để chỉ sự phát triển của các tế bào ác tính hoặc lành tính trong da hoặc trong các cơ quan của cơ thể, ví dụ nhưng không giới hạn ở, vú, tuyến tiền liệt, phổi, thận, tụy, dạ dày hoặc ruột. Bệnh ung thư có xu hướng thâm nhiễm sang mô lân cận và xâm lấn (di căn) đến các cơ quan ở xa, ví dụ xương, gan, phổi hoặc não. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ bệnh ung thư bao gồm các loại tế bào khối u di căn, như, nhưng không giới hạn ở, u hắc sắc tố, u bạch huyết, bệnh ung thư bạch cầu, sacôm tế bào sợi, bệnh sacôm cơ vân, và u tế bào nón và các loại caxinôm mô, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, bệnh ung thư trực tràng-kết tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ và bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư dạ dày, u nguyên bào xộp, bệnh ung thư gan nguyên phát, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và sacôm cơ trơn tử cung.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ ‘bệnh bạch cầu’ dùng để chỉ bệnh khối u máu và cơ quan tạo máu. Các bệnh này có thể gây ra ở tủy xương và rối loạn chức năng hệ miễn dịch, làm cho đối tượng rất mẫn cảm với sự nhiễm khuẩn và chảy máu. Cụ thể, thuật ngữ bệnh bạch cầu được dùng để chỉ bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (AML) và bệnh bạch cầu nguyên bào lymphô cấp tính (ALL).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ ‘bệnh thải ghép’ dùng để chỉ sự đào thải cấp tính hoặc mạn tính các tế bào, mô hoặc các mảnh ghép cùng hoặc khác loại cơ quan rắn, ví dụ đảo tụy, các tế bào mầm, tủy xương, da, cơ, mô sùng, mô noron, tim, phổi, tim-phổi kết hợp, thận, gan, ruột, tụy, khí quản hoặc thực quản, hoặc bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ ‘bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn’ bao gồm các tình trạng bệnh lý như bệnh viêm xương

khớp, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh viêm đa khớp dạng thấp vị thành niên, bệnh khớp Gút, bệnh khớp nhiễm trùng hoặc lây nhiễm, bệnh khớp phản ứng, chứng loạn dưỡng phản xạ thần kinh giao cảm, chứng đau loạn dưỡng, hội chứng Tietze hoặc bệnh viêm sụn sườn, bệnh đau cơ, bệnh viêm sụn xương, bệnh viêm khớp do nguyên nhân thần kinh hoặc thuộc bệnh thần kinh, bệnh khớp, dạng cục bộ của bệnh khớp như viêm dây thần kinh thị giác do bệnh viêm xương khớp, bệnh Mseleni và bệnh Handigodu; thoái hóa do bệnh đau cơ, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh cứng da và bệnh viêm cứng khớp đốt sống.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ '(các) dị tật sụn bẩm sinh' bao gồm các tình trạng bệnh lý như bệnh hủy sụn di truyền, bệnh loạn sản sụn và bệnh loạn sản giả sụn, cụ thể, nhưng không giới hạn ở, tật tai nhỏ, tật không tai ngoài, bệnh loạn sản sụn phân tán xương, và các rối loạn liên quan.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ '(các) bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6' bao gồm các tình trạng bệnh lý như bệnh Castleman, đa u tủy, bệnh vảy nến, sacôm Kaposi và/hoặc bệnh viêm cầu thận màng tăng sinh.

'Hợp chất theo sáng chế', và dạng tương đương, bao gồm hợp chất có công thức như được nêu ở đây, bao gồm muối được dụng và solvat, ví dụ hydrat, và solvat của muối được dụng trong phạm vi cho phép. Tương tự, khi đề cập đến các sản phẩm trung gian, có thể được bảo hộ hoặc không, bao gồm muối, và solvat của chúng, trong phạm vi cho phép.

Dẫn xuất khác của hợp chất theo sáng chế có hoạt tính ở cả dạng axit và dẫn xuất axit của chúng, nhưng dạng natri axit thường có ưu điểm hơn về khả năng hòa tan, độ tương hợp mô, hoặc giải phóng chậm ở động vật có vú (xem Bundgard, H., Design of Prodrugs, pp. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ 'biến thể đồng vị' dùng để chỉ hợp chất có chứa tỷ lệ không có trong tự nhiên của chất đồng vị ở một hoặc nhiều nguyên tử cấu thành nên hợp chất này. Ví dụ, 'biến thể đồng vị' của một hợp chất có thể có chứa một hoặc nhiều chất đồng vị không phóng xạ, như ví dụ, đơteri (^2H hoặc D), cacbon 13 (^{13}C), nitơ 15 (^{15}N), hoặc dạng tương tự. Nên hiểu là trong hợp chất nếu việc thay thế đồng vị được thực hiện, các nguyên tử sau, nếu có mặt, có thể khác nhau, sao cho ví dụ, hydro bất kỳ có thể là $^2\text{H}/\text{D}$, cacbon bất kỳ có thể là ^{13}C , hoặc

nitơ bất kỳ có thể là ^{15}N , và sự có mặt và sự thay thế các nguyên tử này có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan. Tương tự, sáng chế có thể bao gồm việc điều chế các biến thể đồng vị bằng chất đồng vị phóng xạ, ví dụ, khi hợp chất tạo thành có thể được sử dụng làm thuốc và/hoặc nghiên cứu sự phân bố mô cơ chất. Chất đồng vị phóng xạ triti, tức là ^3H , và cacbon 14, tức là ^{14}C , đặc biệt hữu dụng cho mục đích này do chúng dễ dàng kết hợp và dễ phát hiện. Ngoài ra, hợp chất này có thể được điều chế sao cho được thể bởi chất đồng vị phát xạ pozitron, như ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O và ^{13}N , và có thể hữu dụng trong thử nghiệm chụp ảnh cắt lớp nhờ phát xạ pozitron (Positron Emission Topography - PET) để xác định sự chiếm giữ thụ thể cơ chất.

Tất cả các biến thể đồng vị của các hợp chất được nêu trong bản mô tả này, phóng xạ hoặc không, được dùng để bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

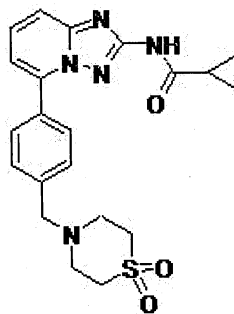
‘Chất hỗ biến’ dùng để chỉ hợp chất có các dạng thay thế cho nhau của cấu trúc hợp chất cụ thể, và khác nhau về sự dịch chuyển của các nguyên tử hydro và electron. Như vậy, hai cấu trúc có thể là tương đương thông qua sự chuyển dịch của electron π và nguyên tử (thường là H). Ví dụ, enol và keton là chất hỗ biến do chúng nhanh chóng được chuyển hóa lẫn nhau khi được xử lý bằng axit hoặc bazơ. Ví dụ khác về chất hỗ biến là dạng aci- và nitro- của phenylnitrometan, tương tự được tạo thành bằng cách xử lý với axit hoặc bazơ.

Dạng chất hỗ biến có thể liên quan đến việc đạt được hoạt tính hóa học và hoạt tính sinh học tối ưu của hợp chất được quan tâm.

Hợp chất

Sáng chế dựa trên việc phát hiện rằng hợp chất theo sáng chế là chất ức chế JAK và hữu ích để điều trị tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thải ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất hợp chất này, dược phẩm chứa hợp chất này và hợp chất này được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thải ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6 bằng cách sử dụng hợp chất theo sáng chế. Theo phương án cụ thể, hợp chất theo sáng chế là chất ức chế JAK1 và JAK2.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):



Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế không phải là biến thể đồng vị.

Hợp chất theo sáng chế là chất ức chế JAK mới. Cụ thể, hợp chất này là chất ức chế hoạt lực của JAK1 và JAK2, tuy nhiên nó cũng ức chế cả TYK2 và JAK3 có hoạt lực thấp hơn.

Hợp chất theo sáng chế có hoạt lực *in vivo* được cải thiện đáng kể. Việc cải thiện này là đặc biệt và ngạc nhiên hơn thậm chí với các hợp chất tương tự về cấu trúc. Việc sử dụng hợp chất có hoạt lực được cải thiện này có thể dẫn đến yêu cầu liều lượng thấp hơn (và do vậy chế độ liều lượng được cải thiện).

Dược phẩm

Khi được sử dụng làm dược phẩm, hợp chất theo sáng chế thường được dùng dưới dạng dược phẩm. Dược phẩm này có thể được bào chế theo cách đã biết trong lĩnh vực dược phẩm và bao gồm ít nhất một hợp chất có hoạt tính. Nói chung, hợp chất theo sáng chế được dùng với lượng cho hiệu quả điều trị bệnh. Lượng hợp chất được dùng trong thực tế thường được xác định bởi bác sĩ, dựa trên trường hợp cụ thể, bao gồm tình trạng bệnh lý cần được điều trị, đường dùng được chọn, hợp chất thực tế được dùng, tuổi tác, cân nặng, và khả năng đáp ứng của bệnh nhân cụ thể, mức độ nghiêm trọng của triệu chứng ở bệnh nhân và yếu tố tương tự.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua nhiều đường dùng bao gồm đường miệng, trực tràng, qua da, dưới da, trong khớp, trong tĩnh mạch, trong cơ và trong mũi. Phụ thuộc vào đường dùng dự định, tốt hơn nếu hợp chất theo sáng chế được bào chế ở dạng chế phẩm dùng để tiêm hoặc chế phẩm dùng qua đường miệng hoặc thuốc mỡ, như thuốc xức ngoài da hoặc cao dán để dùng qua da.

Chế phẩm để sử dụng qua đường miệng có thể là dạng dung dịch lỏng lượng

lớn, hoặc hỗn dịch hoặc bột lượng lớn. Tuy nhiên, thông thường hơn, chế phẩm theo sáng chế có dạng liều đơn vị để hỗ trợ việc định liều chính xác. Thuật ngữ ‘dạng liều đơn vị’ dùng để chỉ đơn vị rời rạc về mặt vật lý thích hợp để làm liều đơn nhất cho đối tượng là người và động vật có vú khác, mỗi đơn vị này chứa lượng xác định trước của nguyên liệu hoạt tính được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn, khi kết hợp với tá dược, chất dẫn thuốc hoặc chất mang thích hợp. Dạng liều đơn vị điển hình bao gồm chế phẩm lỏng được nạp sẵn trong ống tiêm hoặc xy lanh định liều hoặc viên tròn, viên nén, viên nang hoặc dạng tương tự trong trường hợp chế phẩm rắn. Trong các chế phẩm này, hợp chất theo sáng chế thường là thành phần nhỏ (từ khoảng 0,1% đến khoảng 50% trọng lượng hoặc tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1% đến khoảng 40% trọng lượng) với phần còn lại là chất dẫn thuốc hoặc chất mang khác nhau và chất hỗ trợ xử lý hữu dụng để tạo thành dạng liều lượng mong muốn.

Dạng lỏng thích hợp để dùng qua đường miệng có thể bao gồm chất dẫn thuốc chứa nước hoặc không chứa nước thích hợp cùng với dung dịch đệm, chất tạo hỗn dịch và chất phân tán, chất tạo màu, chất tạo vị và dạng tương tự. Dạng rắn có thể bao gồm, ví dụ, bất kỳ một trong số các thành phần sau, hoặc hợp chất có bản chất tương tự: chất kết dính như xenluloza vi tinh thể, gồm tragacan hoặc gelatin; tá dược như tinh bột hoặc lactoza, chất phân rã như axit alginic, Primogel, hoặc tinh bột ngô; chất làm trơn như magie stearat; chất trượt như silicon dioxit keo; chất làm ngọt như sucroza hoặc sacarin; hoặc chất tạo vị như bạc hà, metyl salixilat, hoặc chất tạo vị cam.

Chế phẩm tiêm được thường dựa trên nước muối vô trùng tiêm được hoặc nước muối đệm phosphat khác hoặc chất mang tiêm được đã biết trong lĩnh vực. Như nêu trên, hoạt chất trong chế phẩm này thường là thành phần phụ, chiếm từ 0,05% đến 10% trọng lượng với phần còn lại là chất mang tiêm được và dạng tương tự.

Chế phẩm dùng qua da thường được bào chế dưới dạng thuốc mỡ dùng tại chỗ hoặc kem chứa (các) hoạt chất, thường có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến khoảng 20% trọng lượng, tốt hơn là từ khoảng 0,1% đến khoảng 20% trọng lượng, tốt hơn là từ khoảng 0,1% đến khoảng 10% trọng lượng, và tốt hơn nữa là từ khoảng 0,5% đến khoảng 15% trọng lượng. Khi được bào chế dưới dạng thuốc mỡ, hoạt chất thường được kết hợp với nền dầu có thể trộn lẫn với parafin hoặc trộn lẫn với nước. Theo cách khác, hoạt chất có thể được bào chế thành dạng kem có, ví dụ nền kem dầu

trong nước. Chế phẩm dùng qua da này đã biết rộng rãi trong lĩnh vực liên quan và thường bao gồm các thành phần bổ sung để tăng cường sự thẩm thấu ổn định qua da của hoạt chất hoặc chế phẩm. Tất cả các chế phẩm dùng qua da và các thành phần đã biết này đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được dùng bằng dụng cụ qua da. Do đó, việc dùng qua da có thể bao gồm việc sử dụng cao dán ở dạng màng xốp hoặc màng đặc chứa hoạt chất hoặc dạng nền rắn.

Thành phần được mô tả trên đây để dùng cho chế phẩm dùng qua đường miệng, có thể tiêu được hoặc dùng tại chỗ chỉ là đại diện. Các nguyên liệu khác cũng như quy trình bào chế và dạng tương tự được nêu trong phần 8 của tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được dùng ở dạng giải phóng kéo dài hoặc từ hệ phân phối thuốc giải phóng kéo dài. Việc mô tả các nguyên liệu giải phóng kéo dài điển hình có thể được tìm thấy trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences.

Các ví dụ chế phẩm sau đây minh họa cho được phẩm điển hình mà có thể được điều chế theo sáng chế. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các được phẩm này.

Chế phẩm 1 - Viên nén

Hợp chất theo sáng chế có thể được phối trộn dưới dạng bột khô với chất gắn kết gelatin khô với tỷ lệ trọng lượng xấp xỉ là 1:2. Một lượng nhỏ magie stearat có thể được bổ sung vào làm chất làm trơn. Hỗn hợp này có thể được tạo thành viên nén có trọng lượng từ 240 đến 270mg (từ 80 đến 90mg hợp chất amit hoạt tính trong mỗi viên nén) trong viên nén.

Chế phẩm 2 - Viên nang

Hợp chất theo sáng chế có thể được phối trộn dưới dạng bột khô với chất pha loãng tinh bột với tỷ lệ trọng lượng xấp xỉ là 1:1. Hỗn hợp có thể được nạp vào trong viên nang 250mg (125mg hợp chất amit hoạt tính trong mỗi viên nang).

Chế phẩm 3 – Dạng lỏng

Hợp chất theo sáng chế (125mg), có thể được phối trộn với sucroza (1,75g) và gôm xanthan (4mg) và hỗn hợp tạo thành có thể được trộn, rồi cho đi qua sàng của Mỹ mắt lưới số 10, và sau đó được trộn với dung dịch xenluloza dạng vi tinh thể đã chuẩn bị từ trước và natri carboxymetyl xenluloza (11:89, 50mg) trong nước. Natri benzoat (10mg), chất tạo vị, và chất tạo màu có thể được pha loãng bằng nước và được bổ sung vào trong khi khuấy. Sau đó, một lượng nước thích hợp có thể được bổ sung vào trong khi khuấy. Sau đó, một lượng nước thích hợp nữa có thể được bổ sung vào để tạo ra tổng thể tích bằng 5ml.

Chế phẩm 4 - Viên nén

Hợp chất theo sáng chế có thể được phối trộn dưới dạng bột khô với chất gắn kết gelatin khô với tỷ lệ trọng lượng xấp xỉ là 1:2. Lượng nhỏ magie stearat có thể được bổ sung vào làm chất làm trơn. Hỗn hợp này có thể được tạo thành viên nén có trọng lượng từ 450 đến 900mg (từ 150 đến 300mg hợp chất amit hoạt tính) trong viên nén.

Chế phẩm 5 – Dạng tiêm

Hợp chất theo sáng chế có thể được hòa tan hoặc được tạo hỗn dịch trong môi trường dung dịch nước muối vô trùng được đệm, tiêm được để có nồng độ xấp xỉ bằng 5mg/ml.

Chế phẩm 6 – Dạng dùng tại chỗ

Rượu stearyllic (250g) và vazolin trắng (250g) có thể được làm tan chảy ở nhiệt độ khoảng 75°C và sau đó hỗn hợp gồm hợp chất theo sáng chế (50g) metylparaben (0,25g), propylparaben (0,15g), natri lauryl sulfat (10g), và propylen glycol (120g) được hòa tan trong nước (khoảng 370g) có thể được bổ sung vào và hỗn hợp thu được có thể được khuấy cho đến khi nó đông lại.

Các phương pháp điều trị

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất trị liệu để điều trị các tình trạng bệnh lý ở động vật có vú mà có nguyên nhân liên quan đến hoặc có thể do hoạt tính bất thường của JAK. Cụ thể, các tình trạng bệnh lý này liên quan tới hoạt tính bất thường của JAK1 và/hoặc JAK2. Do đó, hợp chất và dược phẩm theo sáng chế có thể sử dụng làm chất trị liệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị tình trạng bệnh lý viêm, bệnh

tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh thái ghép, bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, dị tật sụn bẩm sinh, và bệnh liên quan đến việc tăng tiết IL6 ở động vật có vú bao gồm người.

Các phương pháp khác của khía cạnh điều trị, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho động vật có vú mắc cảm hoặc bị đau đớn bởi tình trạng bệnh lý viêm. Các phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều dược phẩm hoặc hợp chất theo sáng chế ở đây để ngăn ngừa hoặc điều trị tình trạng bệnh lý đã nêu. Theo phương án cụ thể, tình trạng bệnh lý viêm được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh dị ứng đường thở (ví dụ, bệnh hen) và bệnh viêm ruột.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế được sử dụng để điều trị, ngăn ngừa hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh lý viêm. Theo phương án cụ thể, tình trạng bệnh lý viêm được chọn từ bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh dị ứng đường thở (ví dụ, bệnh hen) và bệnh viêm ruột.

Các phương pháp khác của khía cạnh điều trị, sáng chế mô tả các phương pháp điều trị cho động vật có vú mắc cảm hoặc bị đau đớn bởi bệnh tự miễn. Các phương pháp này bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều dược phẩm hoặc hợp chất theo sáng chế để ngăn ngừa hoặc điều trị các tình trạng bệnh lý nêu trên. Theo phương án cụ thể, bệnh tự miễn được chọn từ COPD, bệnh hen, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh đái tháo đường tuýp I và bệnh viêm ruột.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất được sử dụng để điều trị, ngăn ngừa hoặc phòng ngừa bệnh tự miễn. Theo phương án cụ thể, bệnh tự miễn được chọn từ COPD, bệnh hen, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh đái tháo đường tuýp I và bệnh viêm ruột.

Theo phương pháp khác của khía cạnh điều trị, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho động vật có vú mắc cảm hoặc bị đau đớn bởi bệnh tăng sinh, cụ thể là bệnh ung thư (ví dụ, các khối u rắn như sacôm cơ trơn tử cung hoặc bệnh ung thư tuyến tiền liệt), bệnh bạch cầu (ví dụ, AML hoặc ALL), đa u tuý và/hoặc bệnh vảy nến.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế được sử

dụng để điều trị, ngăn ngừa hoặc phòng ngừa bệnh tăng sinh, cụ thể là bệnh ung thư (ví dụ, các khối u rắn như sacôm cơ trơn tử cung hoặc bệnh ung thư tuyến tiền liệt), bệnh bạch cầu (ví dụ, AML hoặc ALL), đa u tuỷ và/hoặc bệnh vảy nến.

Theo phương pháp khác của khía cạnh điều trị, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho động vật có vú mắc cảm hoặc bị đau đớn bởi bệnh thải ghép. Theo phương án cụ thể, sáng chế mô tả phương pháp điều trị chứng thải ghép cơ quan.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế được sử dụng để điều trị, ngăn ngừa hoặc phòng ngừa bệnh thải ghép. Theo phương án cụ thể, sáng chế mô tả các phương pháp điều trị chứng thải ghép cơ quan.

Theo một phương pháp của khía cạnh điều trị, sáng chế mô tả phương pháp điều trị, ngăn ngừa hoặc phòng ngừa cho động vật có vú mắc cảm hoặc bị đau đớn bởi bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn, mà phương pháp này bao gồm bước dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hợp chất theo sáng chế, hoặc một hoặc nhiều được phẩm được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế được sử dụng để điều trị, ngăn ngừa hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến sự suy giảm khả năng tái tạo sụn.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị dị tật sụn bẩm sinh, mà phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều được phẩm hoặc hợp chất theo sáng chế được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế sử dụng để điều trị, ngăn ngừa hoặc phòng ngừa dị tật sụn bẩm sinh.

Theo phương pháp khác của khía cạnh điều trị, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho động vật có vú mắc cảm hoặc bị đau đớn bởi bệnh liên quan đến sự tăng tiết IL6, cụ thể là bệnh Castleman hoặc bệnh viêm cầu thận màng tăng sinh.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế được sử dụng để điều trị, ngăn ngừa hoặc điều trị dự phòng bệnh liên quan đến sự tăng tiết IL6, cụ thể là bệnh Castleman hoặc bệnh viêm cầu thận màng tăng sinh.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế được sử dụng làm được phẩm cụ thể là để điều trị hoặc ngăn ngừa các tình trạng bệnh lý và bệnh nêu

trên. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất theo sáng chế để sản xuất thuốc điều trị hoặc ngăn ngừa một trong số các tình trạng bệnh lý và bệnh nêu trên.

Một chế độ cụ thể của phương pháp theo sáng chế gồm việc cho đối tượng bị mắc bệnh liên quan đến viêm, dùng một lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế trong khoảng thời gian đủ để giảm mức độ viêm của đối tượng, và tốt hơn là kết thúc quá trình gây viêm này. Phương án cụ thể của phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng bệnh nhân bị mắc hoặc có thể mắc bệnh viêm đa khớp dạng thấp dùng lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế, trong khoảng thời gian đủ để giảm hoặc ngăn ngừa, lần lượt, bệnh viêm trong khớp của bệnh nhân, và tốt hơn là kết thúc quá trình gây viêm này.

Một chế độ cụ thể khác của phương pháp theo sáng chế gồm bước cho đối tượng bị mắc tình trạng bệnh lý được đặc trưng bởi sự thoái hóa khớp hoặc sụn (ví dụ, bệnh viêm đa khớp dạng thấp và/hoặc bệnh viêm xương khớp) dùng một lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế trong khoảng thời gian đủ để giảm và tốt hơn là kết thúc quá trình tự duy trì gây ra sự thoái hóa này. Phương án cụ thể của phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân bị mắc hoặc dễ mắc bệnh viêm xương khớp, dùng lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế, trong khoảng thời gian đủ để giảm hoặc ngăn ngừa, lần lượt, quá trình thoái hóa sụn trong khớp của bệnh nhân, và tốt hơn là kết thúc quá trình tự duy trì gây ra sự thoái hóa này. Hợp chất theo phương án cụ thể có thể thể hiện đặc tính đồng hóa và/hoặc chống dị hóa sụn.

Liều lượng tiêm nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg/giờ đến ít nhất 10mg/kg/giờ, trong thời gian từ khoảng 1 đến khoảng 120 giờ và cụ thể là từ 24 đến 96 giờ. Liều tiêm lớn nạp sẵn nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến khoảng 10mg/kg hoặc lớn hơn cũng có thể được dùng để đạt được nồng độ ở trạng thái sẵn sàng có đủ. Tổng liều lượng tối đa không vượt quá khoảng 2g/ngày cho bệnh nhân có cân nặng từ 40 đến 80kg.

Để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các tình trạng bệnh lý trong thời gian dài, như các tình trạng bệnh lý thoái hóa, chế độ điều trị thường kéo dài từ vài tháng đến vài năm nên liều lượng dùng qua đường miệng được ưu tiên để cho thuận tiện và phù hợp với sự dung nạp của bệnh nhân. Với liều lượng dùng qua đường miệng, từ một đến năm và cụ thể là từ hai đến bốn và thường ba liều dùng qua đường miệng mỗi ngày là

chế độ tiêu biểu. Bằng cách sử dụng các kiểu liều lượng này, thì mỗi liều cung cấp từ khoảng 0,01 đến khoảng 20mg/kg hợp chất theo sáng chế, với liều cụ thể cung cấp từ khoảng 0,1 đến khoảng 10mg/kg và cụ thể là khoảng 1 đến khoảng 5mg/kg.

Liều dùng qua da thường được chọn để tạo ra nồng độ trong máu thấp hơn hoặc tương đương với nồng độ đạt được khi sử dụng liều.

Khi được sử dụng để ngăn ngừa sự khởi phát của tình trạng bệnh lý viêm, hợp chất theo sáng chế sẽ được dùng cho bệnh nhân có nguy cơ phát triển tình trạng bệnh lý, thường khi được khuyên dùng và dưới sự giám sát của bác sĩ, ở nồng độ liều lượng được nêu trên. Bệnh nhân có nguy cơ phát triển tình trạng bệnh lý cụ thể nói chung bao gồm các bệnh nhân có tiền sử mắc bệnh trong gia đình, hoặc bệnh nhân được nhận diện bằng cách thử nghiệm hoặc sàng lọc di truyền là đặc biệt dễ có khả năng mắc bệnh.

Hợp chất theo sáng chế có thể được dùng làm hoạt chất duy nhất hoặc có thể được dùng kết hợp với chất trị liệu khác, bao gồm các hợp chất khác mà chứng minh có hoạt tính điều trị giống hoặc tương tự, và được xác định là an toàn và có hiệu quả khi được dùng kết hợp. Theo phương án cụ thể, dùng đồng thời hai (hoặc nhiều) chất cho phép giảm đáng kể liều lượng của mỗi chất khi sử dụng, nhờ đó giảm tác dụng phụ.

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế được dùng đồng thời cùng với chất trị liệu khác để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh liên quan đến viêm; các chất cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất điều hòa miễn dịch ví dụ azathioprin, corticosteroid (ví dụ, prednisolon hoặc dexametason), cyclophosphamid, cyclosporin A, tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, muromonab-CD3 (OKT3, ví dụ, Orthocolone®), ATG, aspirin, acetaminophen, ibuprofen, naproxen, và piroxicam.

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế được dùng đồng thời với chất trị liệu khác để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh khớp (ví dụ, bệnh viêm đa khớp dạng thấp); chất cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở thuốc giảm đau, thuốc chống viêm không steroid (NSAIDs), steroid, DMARDs tổng hợp (ví dụ, nhưng không giới hạn ở, metotrexat, leflunomide, sulfasalazin, auranofin, natri aurothiomalat, penixilamin, cloroquin, hydroxycloquin, azathioprin, và cyclosporin), và DMARDs sinh học (ví dụ, nhưng không giới hạn ở, Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Rituximab, và

Abatacept).

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế được dùng đồng thời với chất trị liệu khác để điều trị và/hoặc ngăn ngừa rối loạn tăng sinh; các chất cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở: metotrexat, leukovorin, adriamycin, prednisone, bleomycin, cyclophosphamid, 5-fluoraxil, paclitaxel, doxorubicin, vincristin, vinblastin, vinorelbin, doxorubicin, tamoxifen, toremifen, megestrol axetat, anastrozol, goserelin, kháng thể đơn dòng kháng HER2 (ví dụ, Herceptin™), capecitabin, raloxifen hydrochlorua, chất ức chế EGFR (ví dụ, Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), chất ức chế VEGF (ví dụ, Avastin™), chất ức chế proteasom (ví dụ, Velcade™), chất ức chế Glivec® và hsp90 (ví dụ, 17-AAG). Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với các liệu pháp điều trị khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, xạ trị hoặc phẫu thuật. Theo phương án cụ thể, rối loạn tăng sinh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư, bệnh tăng sinh tủy hoặc bệnh bạch cầu.

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế được dùng đồng thời với chất trị liệu khác để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh tự miễn, các chất cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở: glucocorticoid, chất kìm hãm tế bào (ví dụ, các chất tương tự purin), chất alkyl hóa, (ví dụ, hơi cay nitơ (cyclophosphamid), nitrosourea, hợp chất platin, và các hợp chất khác), chất chống chuyển hóa (ví dụ, metotrexat, azathioprin và mercaptopurin), chất kháng sinh gây độc tế bào (ví dụ, dactinomycin antracyclin, mitomycin C, bleomycin, và mithramycin), các kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng kháng CD20, kháng CD25 hoặc kháng CD3 (OTK3), Atgam® và Thymoglobuline®), cyclosporin, tacrolimus, rapamycin (sirolimus), interferon (ví dụ, IFN-β), protein liên kết TNF (ví dụ, infliximab (Remicade™), etanercept (Enbrel™), hoặc adalimumab (Humira™)), mycophenolat, Fingolimod và Myriocin.

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế được dùng đồng thời với chất trị liệu khác để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh thái ghép, các chất cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất ức chế calcineurin (ví dụ, cyclosporin hoặc tacrolimus (FK506)), chất ức chế mTOR (ví dụ, sirolimus, everolimus), chất chống tăng sinh (ví dụ, azathioprin, axit mycophenolic), corticosteroid (ví dụ, prednisolon, hydrocortison), các kháng thể (ví dụ, các kháng thể đơn dòng kháng thụ thể IL-2Rα, basiliximab, daclizumab), các kháng thể đa dòng kháng tế bào T (ví dụ, globulin ức chế tế bào

tuyến ức (ATG), globulin ức chế lymphô bào (ALG)).

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế được dùng đồng thời với chất trị liệu khác để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh hen và/hoặc bệnh viêm mũi và/hoặc COPD, các chất cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất chủ vận nhận beta₂-adrenalin (ví dụ, salbutamol, levalbuterol, terbutalin và bitolterol), epinephrin (thuốc xông hoặc viên nén), chất chống tiết cholin (ví dụ, ipratropium bromua), glucocorticoit (dùng qua miệng hoặc xông) chất chủ vận β_2 có tác dụng kéo dài (ví dụ, salmeterol, formoterol, bambuterol, và albuterol dùng qua đường miệng giải phóng kéo dài), tổ hợp của steroid xông và chất làm giãn phế quản tác động kéo dài (ví dụ, fluticason/salmeterol, budesonit/formoterol), chất đối kháng leukotrien và chất ức chế tổng hợp (ví dụ, montelukast, zafirlukast và zileuton), chất ức chế giải phóng chất trung gian (ví dụ, cromoglycat và ketotifen), chất điều hòa sinh học của đáp ứng IgE (ví dụ, omalizumab), chất kháng histamin (ví dụ, ceterizin, cinnarizin, fexofenadin) và chất gây co mạch (ví dụ, oxymethazolin, xylomethazolin, nafazolin và tramazolin).

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với các liệu pháp điều trị khẩn cấp cho bệnh hen và/hoặc COPD, các liệu pháp điều trị này bao gồm thở oxy hoặc heliox, xịt salbutamol hoặc terbutalin (tùy chọn kết hợp với chất kìm hãm tiết cholin (ví dụ, ipratropium), steroid tác động toàn thân (qua miệng hoặc tĩnh mạch, ví dụ, prednison, prednisolon, metylprednisolon, dexametason, hoặc hydrocortison), salbutamol dùng trong tĩnh mạch, chất chủ vận beta không đặc hiệu, tiêm hoặc hít (ví dụ, epinephrin, isoetharin, isoproterenol, metaproterenol), chất chống tiết cholin (tiêm tĩnh mạch hoặc xịt, ví dụ, glycopyrolat, atropin, ipratropium), metylxanthin (theophyllin, aminophyllin, bamiphyllin), thuốc tê dạng hít có tác dụng giãn phế quản (ví dụ, isofluran, halothan, enfluran), ketamin và magie sulfat dùng trong tĩnh mạch.

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế được dùng đồng thời với chất trị liệu khác để điều trị và/hoặc ngăn ngừa IBD, các chất cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở: các chất glucocorticoit tổng hợp có tác dụng thay đổi diễn tiến của bệnh (ví dụ, prednison, budesonit), chất điều biến miễn dịch (ví dụ, metotrexat, leflunomit, sulfasalazin, mesalazin, azathioprin, 6-mercaptopurin và ciclosporin) và chất sinh học có tác dụng thay đổi diễn tiến của bệnh, chất điều biến miễn dịch (infliximab, adalimumab, rituximab, và abatacept).

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế được dùng đồng thời với chất điều trị khác để điều trị và/hoặc ngăn ngừa SLE, các chất cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở: thuốc chống viêm khớp có tác dụng thay đổi diễn tiến của bệnh (DMARD) như thuốc chống bệnh sốt rét (ví dụ, plaquenil, hydroxycycloquin), chất ức chế miễn dịch (ví dụ, metotrexat và azathioprin), xyclophosphamit và axit mycophenolic; thuốc ức chế miễn dịch và thuốc giảm đau, như các thuốc chống viêm không steroid, opiat (ví dụ, dextropropoxyphen và co-codamol), opioit (ví dụ, hydrocodon, oxycodon, MS Contin, hoặc methadon) và cao dán trên da fentanyl duragesic.

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế được dùng đồng thời với chất trị liệu khác để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh vẩy nến, các chất cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất điều trị tại chỗ như dung dịch nước tắm, chất làm ẩm, kem bôi và thuốc mỡ điều trị chứa hắc ín, ditranol (antralin), corticosteroid như desoximetason (Topicort™), fluocinonit, các chất tương tự vitamin D₃ (ví dụ, calcipotriol), dầu Argan và retinoit (etretinat, axitretin, tazaroten), thuốc điều trị toàn thân như metotrexat, xyclosporin, retinoit, tioguanin, hydroxyure, sulfasalazin, mycophenolat mofetil, azathioprin, tacrolimus, este của axit fumaric hoặc các chất sinh học như Amevive™, Enbrel™, Humira™, Remicade™, Raptiva™ và ustekinumab (chất phong bế IL-12 và IL-23). Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với các liệu pháp điều trị khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, quang điều trị, hoặc quang hóa điều trị (ví dụ, psoralen và quang điều trị tia cực tím A (PUVA)).

Thuật ngữ ‘sử dụng đồng thời’ bao gồm việc đưa hai hoặc nhiều hơn hai chất trị liệu vào bệnh nhân như một phần của chế độ điều trị, là hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan. Trong khi hai hoặc hơn hai chất có thể được dùng đồng thời trong một chế phẩm là không nhất thiết. Các chất có thể được dùng trong các chế phẩm khác nhau và ở các thời điểm khác nhau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương pháp tổng hợp chung

Phương pháp tổng quát

Hợp chất theo sáng chế và ví dụ so sánh được bộc lộ trong WO2010010190 có thể được điều chế một cách dễ dàng từ nguyên liệu ban đầu sẵn có bằng cách sử dụng

các phương pháp và quy trình tổng quát dưới đây. Hiển nhiên là nếu các điều kiện xử lý thông thường hoặc ưu tiên (tức là, nhiệt độ phản ứng, thời gian, tỷ lệ mol của các chất phản ứng, dung môi, áp suất, v.v.) được cho trước, các điều kiện xử lý khác cũng có thể được sử dụng trừ khi có quy định khác. Điều kiện phản ứng tối ưu có thể khác nhau tùy theo các chất phản ứng hoặc dung môi cụ thể được sử dụng, nhưng các điều kiện này có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực bằng các phương pháp tối ưu thông thường.

Ngoài ra, rõ ràng với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực là các nhóm bảo vệ thông thường có thể cần thiết để ngăn chặn các nhóm chức nhất định không phải trải qua phản ứng không mong muốn. Việc lựa chọn nhóm bảo vệ thích hợp cho nhóm chức cụ thể cũng như các điều kiện thích hợp để bảo vệ và khử bảo vệ là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về nhiều nhóm bảo vệ, và việc kết hợp hoặc loại bỏ chúng được mô tả trong tài liệu của T. W. Greene và P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Second Edition, Wiley, New York, 1991, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các phương pháp được mô tả chi tiết sau đây là phương pháp điều chế hợp chất theo sáng chế như được xác định trên đây và ví dụ so sánh. Hợp chất theo sáng chế và ví dụ so sánh có thể được điều chế từ các nguyên liệu và chất phản ứng đã biết hoặc có bán trên thị trường bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực tổng hợp hữu cơ.

Tất cả các chất phản ứng đều là loại thương mại và được sử dụng nguyên dạng mà không cần tinh chế thêm, trừ khi có quy định khác. Dung môi khan có bán trên thị trường được sử dụng để tiến hành phản ứng trong môi trường khí trơ. Dung môi loại chất phản ứng được sử dụng trong tất cả các trường hợp khác, trừ khi có quy định khác. Sắc ký cột được tiến hành trên silicagel 60 (35-70 μ m). Sắc ký lớp mỏng được tiến hành bằng cách sử dụng các đĩa F-254 được phủ sẵn silicagel (độ dày 0,25mm). Phổ ^1H NMR được ghi lại bằng quang phổ kế Bruker DPX 400NMR (400 MHz). Dịch chuyển hóa học (δ) đối với phổ ^1H NMR được báo cáo đến giá trị một phần triệu (phần triệu) so với tetrametylsilan (δ 0,00) hoặc đỉnh dung môi còn lại thích hợp, tức là CHCl_3 (δ 7,27), là chất chuẩn nội. Các số bội được thể hiện ở dạng vạch đơn (s), vạch đôi (d), vạch ba (t), vạch bốn (q), vạch bội (m) và vạch rộng (br). Hằng số ghép là các hằng số (J) được thể hiện bằng đơn vị Hz. Phổ MS bằng phun điện tử thu được trên

quang phổ kế nền phẳng Micromass LC/MS. Cột được sử dụng cho tất cả các phân tích LCMS: Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1mm ID x 50mm L (số mã sản phẩm 186002350)). HPLC điều chế: Waters XBridge Prep C18 5 μ m ODB 19mm ID x 100mm L (số mã sản phẩm 186002978). Tất cả các phương pháp đều sử dụng gradien MeCN/H₂O. H₂O chứa TFA 0,1% hoặc NH₃ 0,1% .

Danh mục các chữ viết tắt được sử dụng trong phần thử nghiệm:

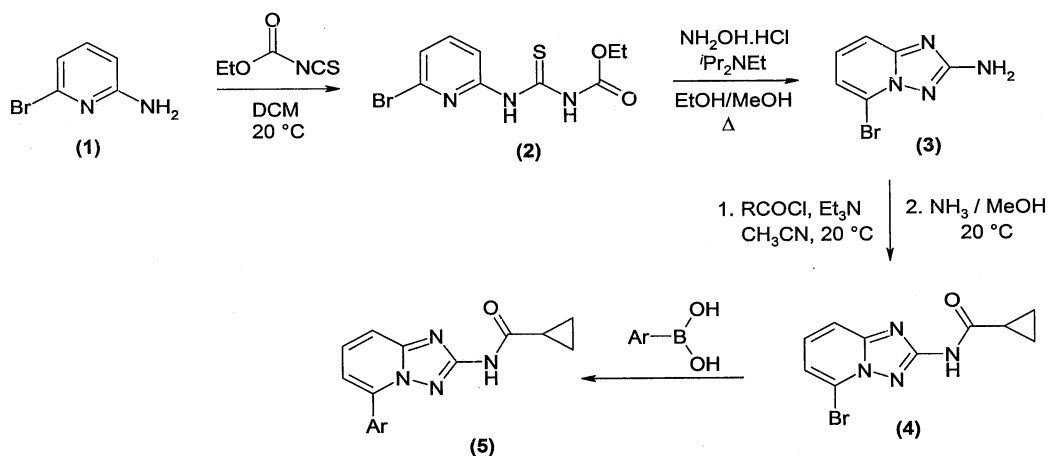
DCM:	diclometan
DiPEA:	<i>N,N</i> -diisopropyletylamin
MeCN	axetonitril
BOC	<i>tert</i> -butyloxy-cacbonyl
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamit
TFA	axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran
NMR	cộng hưởng từ hạt nhân
DMSO	dimetylsulfoxit
DPPA	diphenylphosphorylazit
LC-MS	sắc ký lỏng-khối phổ
Ppm	phần triệu
EtOAc	etyl axetat
APCI	ion hoá hóa chất dưới áp suất khí quyển
Rt	thời gian lưu
s	vạch đơn
br s	vạch đơn rộng
m	vạch bội
d	vạch đôi
PdCl ₂ dppf	[1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen] diclopaladi(II)
TEA	trietylamin

Tổng hợp hợp chất theo sáng chế và các ví dụ so sánh

Hợp chất theo sáng chế và các ví dụ so sánh có thể được tạo ra theo sơ đồ sau.

Phương pháp tổng hợp chung

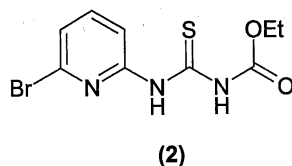
Sơ đồ 1



trong đó Ar là phenyl-L1-heteroxycloalkyl, trong đó L1 là liên kết, -CH₂- hoặc -CO- và nhóm heteroxycloalkyl là tùy chọn được thế.

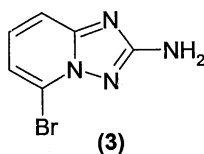
Quy trình điều chế chung

1.1.1 1-(6-bromo-pyridin-2-yl)-3-carboethoxy-thioure (2)



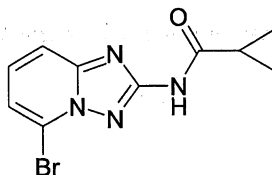
Bổ sung từng giọt etoxycarbonyl isothioxyanat (173,0ml, 1,467mol) vào dung dịch chứa 2-amino-6-bromopyridin (1) (253,8g, 1,467mol) trong DCM (2,5 L) được làm lạnh xuống nhiệt độ 5°C trong thời gian 15 phút. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm ấm lên tới nhiệt độ trong phòng (20°C) và được khuấy trong 16 giờ. Làm bay hơi trong chân không thu được chất rắn mà có thể được thu gom bằng cách lọc, rửa bằng xăng (3x600ml) và được để khô trong không khí để thu được sản phẩm (2). Thioure có thể được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế. ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 12,03 (1H, br s, NH), 8,81 (1H, d, *J* 7,8 Hz, H-3), 8,15 (1H, br s, NH), 7,60 (1H, t, *J* 8,0 Hz, H-4), 7,32 (1H, dd, *J* 7,7 và 0,6 Hz, H-5), 4,31 (2H, q, *J* 7,1 Hz, CH₂), 1,35 (3H, t, *J* 7,1 Hz, CH₃).

1.1.2 5-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-ylamin (3)



Bổ sung *N,N*-diisopropyletylamin (145,3ml, 0,879mol) vào hỗn dịch chứa hydroxylamin hydroclorua (101,8g, 1,465mol) trong EtOH/MeOH (1:1, 900ml) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng (20°C) trong thời gian 1 giờ. Sau đó bổ sung 1-(6-brom-pyridin-2-yl)-3-carboetoxy-thioure (**2**) (89,0g, 0,293mol) và hỗn hợp được gia nhiệt từ từ đến nhiệt độ hồi lưu (Lưu ý: thiết bị lọc khí được yêu cầu để ngăn H₂S thoát ra). Sau 3 giờ ở nhiệt độ hồi lưu, hỗn hợp được để nguội và được lọc để thu gom chất rắn kết tủa. Ngoài ra, sản phẩm được thu gom bằng cách làm bay hơi trong chân không phần dịch lọc, bổ sung H₂O (250ml) và lọc. Hỗn hợp chất rắn được rửa lần lượt bằng H₂O (250ml), EtOH/MeOH (1:1, 250ml) và Et₂O (250ml) sau đó được làm khô trong chân không để thu được dẫn xuất triazolopyridin (**3**) dưới dạng rắn. Hợp chất có thể được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế. ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,43-7,34 (2H, m, 2×H thơm), 7,24 (1H, dd, *J* 6,8 và 1,8 Hz, H thơm), 6,30 (2H, br, NH₂); *m/z* 213/215 (1:1, M+H⁺, 100%).

1.1.3 Quy trình chung để mono-axyl hóa để tạo ra hợp chất trung gian (**4**):



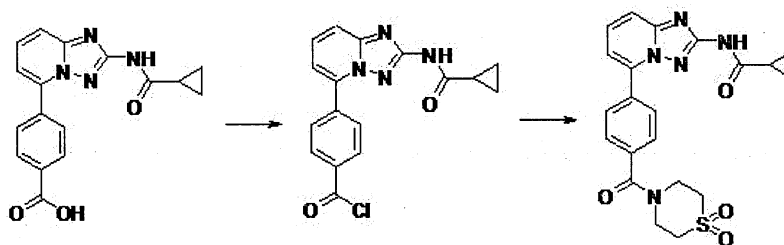
Bổ sung Et₃N (11,6ml, 83,3mmol) vào dung dịch chứa 2-amino-triazolopyridin (**3**) (7,10g, 33,3mmol) trong CH₃CN khan (150ml) ở nhiệt độ 5°C sau đó bổ sung xyclopropanacbonyl clorua (83,3mmol) vào. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm ấm lên tới nhiệt độ môi trường và được khuấy cho đến khi tất cả nguyên liệu ban đầu (**3**) được tiêu thụ hết. Nếu cần, bổ sung thêm Et₃N (4,64ml, 33,3mmol) và xyclopropanacbonyl clorua (33,3mmol) để đảm bảo phản ứng diễn ra hoàn toàn. Sau đó làm bay hơi dung môi trong chân không, cặn thu được được xử lý bằng dung dịch metanol amoniac 7N (50ml) và được khuấy ở nhiệt độ môi trường (trong thời gian từ 1 đến 16 giờ) để thủy phân sản phẩm bis-axyl hóa bất kỳ. Tiến hành phân lập sản phẩm bằng cách loại bỏ các chất dễ bay hơi trong chân không sau đó tán nhỏ với Et₂O (50ml). Chất rắn được thu gom bằng cách lọc, rửa bằng H₂O (2×50ml), axeton (50ml) và Et₂O (50ml), sau đó làm khô trong chân không để thu được hợp chất trung gian bromo (**4**) như yêu cầu.

Phương pháp A

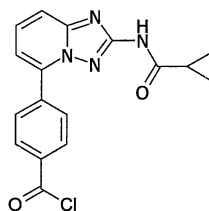
Điều chế hợp chất theo sáng chế bằng phản ứng liên hợp Suzuki (5):

Bổ sung axit boronic thích hợp (2 đương lượng) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian bromo (4) trong 1,4-dioxan/nước (5:1). Bổ sung K_2CO_3 (2 đương lượng) và $PdCl_2dppf$ (5%) vào dung dịch. Sau đó, hỗn hợp thu được gia nhiệt trong lò vi sóng ở nhiệt độ $140^\circ C$ trong 30 phút (phản ứng này cũng có thể được tiến hành bằng cách gia nhiệt truyền thống trong bể dầu ở nhiệt độ $90^\circ C$ trong thời gian 16 giờ dưới môi trường N_2). Bổ sung nước và dung dịch được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được làm khô bằng $MgSO_4$ khan và được làm bay hơi trong chân không. Hợp chất cuối cùng thu được sau khi tinh chế bằng sắc ký nhanh hoặc HPLC điều chế. HPLC: Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 19mm ID x 100mm L (số mã sản phẩm 186002978). Tất cả các phương pháp đều sử dụng gradien MeCN/ H_2O . H_2O chứa TFA 0,1% hoặc NH_3 0,1%.

Phương pháp B



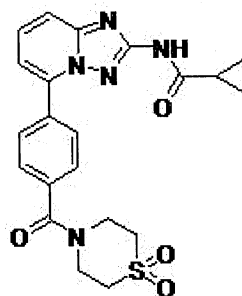
B1. 4-[2-(xyclopropanacarbonyl-amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-5-yl]-benzoyl clorua



Bổ sung 2 giọt DMF vào dung dịch axit 4-[2-(xyclopropanacarbonyl-amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-5-yl]-benzoic (1 đương lượng) thu được bằng phương pháp A sử dụng axit 4-carboxyphenyl boronic trong DCM trong môi trường khí N_2 . Sau đó, oxalyl clorua (2 đương lượng) được bổ sung từng giọt vào dung dịch thu được này (giải phóng khí). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Sau khi

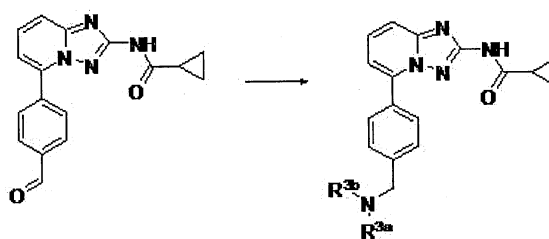
hoàn tất phản ứng bằng LCMS, dung môi được loại ra. Axit clorua thô được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

B2. Tạo thành amit (phương pháp chung)



Hòa tan amin thích hợp (1,1 đương lượng) và Et_3N (5 đương lượng) trong DCM trong môi trường khí N_2 và hỗn hợp được làm lạnh ở nhiệt độ 0°C . Axit clorua (B1, 1 đương lượng) được hòa tan trong DCM được bổ sung từng giọt vào dung dịch này. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 16 giờ. Sau thời gian này, phản ứng diễn ra hoàn toàn. Hợp chất được chiết bằng EtOAc và nước, rửa bằng nước muối và được làm khô bằng MgSO_4 khan. Các lớp hữu cơ được lọc và được làm bay hơi. Hợp chất cuối cùng được phân lập bằng HPLC điều chế. HPLC điều chế: Waters XBridge Prep C18 $5\mu\text{m}$ ODB 19mm ID x 100mm L (số mã sản phẩm 186002978). Tất cả các phương pháp đều sử dụng gradien MeCN/ H_2O . H_2O chứa TFA 0,1% hoặc NH_3 0,1%.

Phương pháp C



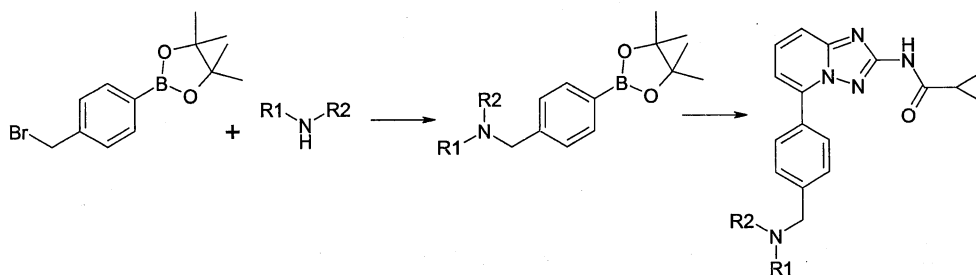
Trong đó R^{3a} hoặc R^{3b} cùng với nguyên tử nitơ mà chúng được gắn vào, có thể tạo ra heteroxycloalkyl.

Alkyl hóa khử (phương pháp chung)

Amin thích hợp (2 đương lượng), axit xyclopropanecarboxylic (ví dụ, axit

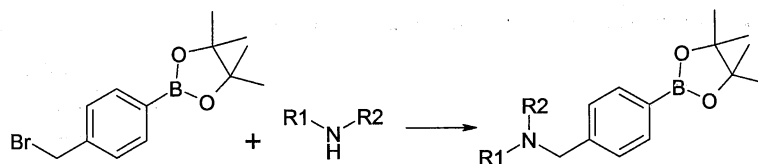
xyclopropanecarboxylic [5-(4-formyl-phenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl]-amit) được điều chế bằng phương pháp A (1 đương lượng) và $\text{Ti}(\text{OPr})_4$ được trộn và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Hỗn hợp được pha loãng trong etanol và bổ sung $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ (1 đương lượng). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Hỗn hợp được pha loãng trong nước và được lọc. Phần dịch lọc được rửa bằng etanol. Pha dung môi kết hợp được làm bay hơi trong chân không. Hợp chất cuối cùng được phân lập bằng HPLC điều chế.

Phương pháp D



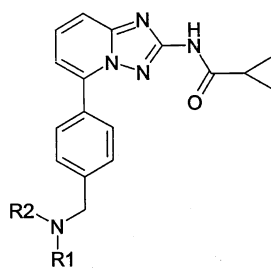
trong đó R^1 và R^2 cùng với nguyên tử nitơ mà chúng được gắn vào, có thể tạo ra heterocycloalkyl.

Phản ứng alkyl hóa



2-(4-bromomethyl-phenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan (1 đương lượng) và Et_3N (2 đương lượng) (hoặc AgCO_3) được hòa tan trong DCM/MeOH (4:1 theo thể tích) trong môi trường khí N_2 và amin (2 đương lượng) được bổ sung từng giọt vào. Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Sau thời gian này, phản ứng được diễn ra hoàn toàn. Dung môi được làm bay hơi. Hợp chất được chiết bằng EtOAc và nước, rửa bằng nước muối và được làm khô bằng MgSO_4 khan. Các lớp hữu cơ được lọc và được làm bay hơi. Hợp chất cuối cùng được phân lập bằng sắc ký nhanh.

Phản ứng liên hợp Suzuki

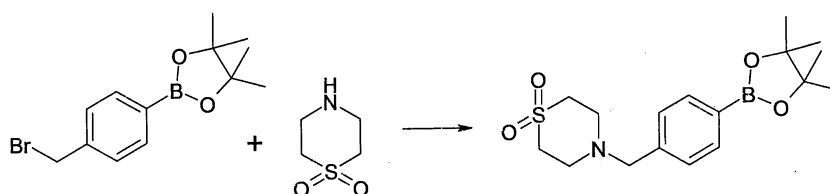


Bổ sung axit boronic thu được (2 đương lượng) vào dung dịch chứa (5-brom-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-amit của axit xyclopropanecarboxylic (**4**) trong 1,4-dioxan/nước (5:1). Bổ sung K_2CO_3 (2 đương lượng) và $PdCl_2dppf$ (5%) vào dung dịch này. Sau đó, hỗn hợp thu được được gia nhiệt trong lò vi sóng ở nhiệt độ $140^\circ C$ trong 30 phút (phản ứng này cũng có thể được tiến hành bằng cách gia nhiệt truyền thống trong bể dầu ở nhiệt độ $90^\circ C$ trong thời gian 16 giờ trong môi trường khí N_2). Nước được bổ sung vào và dung dịch được chiết bằng etyl axetat. Lốp hữu cơ được làm khô bằng $MgSO_4$ khan và được làm bay hơi trong chân không. Hợp chất cuối cùng thu được sau khi tinh chế bằng sắc ký nhanh hoặc HPLC điều chế. HPLC: Waters XBridge Prep C18 $5\mu m$ ODB 19mm ID x 100mm L (số mã sản phẩm 186002978). Tất cả các phương pháp đều sử dụng gradien MeCN/ H_2O . H_2O chứa TFA 0,1% hoặc NH_3 0,1%.

Tổng hợp hợp chất theo sáng chế và ví dụ so sánh

Hợp chất 1 (hợp chất theo sáng chế)

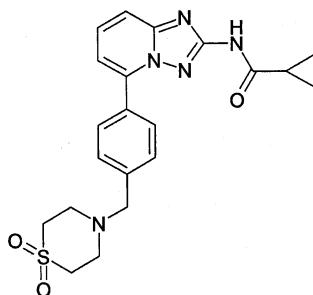
Bước 1:



2-(4-bromometyl-phenyl)-4,4,5,5-tetrametyl-[1,3,2]dioxaborolan (1 đương lượng) và DIPEA (2 đương lượng) được hòa tan trong DCM/MeOH (5:1 theo thể tích) trong môi trường khí N_2 và thiomorpholin 1,1-dioxit (2 đương lượng) được bổ sung vào từng phần một. Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 16 giờ. Sau thời gian này, phản ứng diễn ra hoàn toàn. Dung môi được làm bay hơi. Hợp chất được chiết bằng EtOAc và nước, rửa bằng nước muối và được làm khô

bằng MgSO_4 khan. Các lớp hữu cơ được lọc và được làm bay hơi. Hợp chất cuối cùng được phân lập mà không cần tinh chế thêm.

Bước 2: Phản ứng liên hợp Suzuki

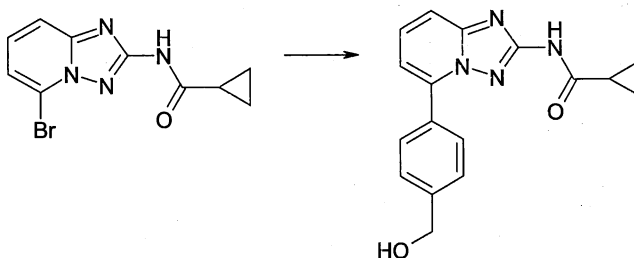


Bổ sung 4-[4-(4,4,5,5-tetrametyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzyl]-thiomorpholin-1,1-dioxit (1,1 đương lượng) vào dung dịch chứa (5-brom-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-amit của axit xyclopropanecarboxylic trong 1,4-dioxan/nước (4:1). Bổ sung K_2CO_3 (2 đương lượng) và PdCl_2dppf (0,03 đương lượng) vào dung dịch. Sau đó, hỗn hợp thu được được gia nhiệt trong bể dầu ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 16 giờ trong môi trường khí N_2 . Nước được bổ sung vào và dung dịch được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được làm khô bằng MgSO_4 khan và được làm bay hơi trong chân không. Hợp chất cuối cùng thu được sau khi tinh chế bằng sắc ký nhanh.

Theo cách khác, sau khi hoàn tất phản ứng, bổ sung chất tẩy tạp paladi như 1,2-bis(diphenylphosphino)etan, hỗn hợp phản ứng được để nguội và tiến hành lọc. Bánh lọc được tạo hỗn dịch đặc lần nữa trong dung môi thích hợp (ví dụ, axeton), chất rắn được tách bằng cách lọc, rửa bằng nhiều axeton, và được làm khô. Chất rắn thu được được tạo hỗn dịch lần nữa trong nước, HCl chứa nước được bổ sung vào, và sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng, dung dịch tạo thành được lọc trên xelit (Celpure P300). Sau đó, NaOH chứa nước được bổ sung vào phần dịch lọc, và hỗn dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ trong phòng, chất rắn được tách bằng cách lọc, rửa bằng nước và được làm khô bằng cách hút. Cuối cùng, bánh lọc được hòa tan lần nữa trong hỗn hợp gồm $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, được xử lý bằng chất tẩy tạp paladi (ví dụ, SMOPEX 234) ở nhiệt độ 50°C , hỗn dịch được lọc, dung môi hữu cơ được loại bỏ bằng cách làm bay hơi, và hỗn dịch đặc tạo thành được rửa bằng nước và metanol, được làm khô và được sàng, để thu được hợp chất được nêu ở đề mục này dưới dạng bazơ tự do.

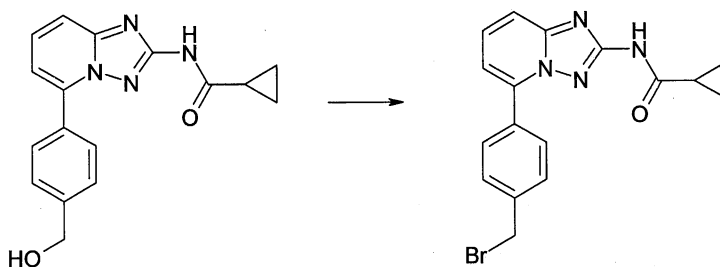
Quy trình khác để điều chế hợp chất 1 (hợp chất theo sáng chế)

Bước 1



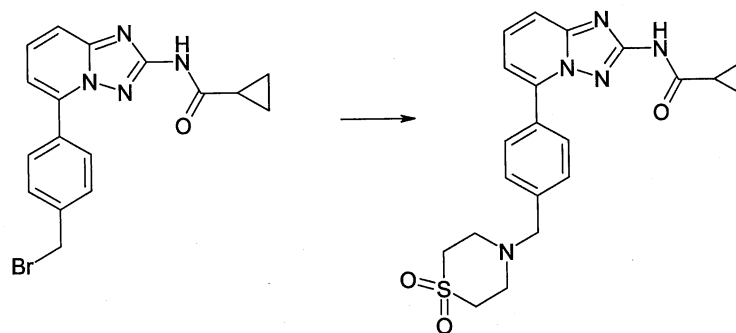
Bổ sung axit 4-(hydroxymetyl)phenylboronic (1,1 đương lượng) vào dung dịch chứa (5-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-amit của axit xyclopropanecarboxylic trong 1,4-dioxan/nước (4:1). Bổ sung K_2CO_3 (2 đương lượng) và $PdCl_2dppf$ (0,03 đương lượng) vào dung dịch. Sau đó, hỗn hợp thu được được gia nhiệt trong bể dầu ở nhiệt độ $90^\circ C$ trong thời gian 16 giờ trong môi trường khí N_2 . Nước được bổ sung vào và dung dịch được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được làm khô bằng $MgSO_4$ khan và được làm bay hơi trong chân không. Hỗn hợp thu được được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Bước 2:



Bổ sung từ từ phospho tribromua (1,0 đương lượng) vào dung dịch chứa [5-(4-hydroxymetyl-phenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl]-amit của axit xyclopropanecarboxylic (1,0 đương lượng) trong clorofom. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 20 giờ, được làm ngừng bằng đá và nước (20ml) và được chiết bằng diclometan. Lớp hữu cơ được làm khô bằng $MgSO_4$ khan, được lọc và được cô tới khô. Phần cặn màu trắng thu được được nghiền trong diclometan/dietyl ete 2:1 để tạo ra sản phẩm mong muốn dưới dạng chất rắn màu trắng.

Bước 3:



[5-(4-bromomethyl-phenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl]-amit của axit xyclopropanecarboxylic (1 đương lượng) và DIPEA (2 đương lượng) được hòa tan trong DCM/MeOH (5:1 theo thể tích) trong môi trường khí N₂ và thiomorpholin 1,1-dioxit (1,1 đương lượng) được bổ sung từng giọt vào. Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 16 giờ. Sau thời gian này, phản ứng diễn ra hoàn toàn. Dung môi được làm bay hơi. Hợp chất được hòa tan trong DCM, rửa bằng nước và được làm khô bằng MgSO₄ khan. Các lớp hữu cơ được lọc và được làm bay hơi. Hợp chất cuối cùng được phân lập bằng sắc ký cột bằng cách sử dụng EtOAc để tạo ra sản phẩm mong muốn.

Ví dụ so sánh

Hợp chất 2

Điều chế hợp chất này bằng cách sử dụng phương pháp chung A và 4-[4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2)dioxaborolan-2-yl)-benzyl]-morpholin.

Hợp chất 3

Điều chế hợp chất này bằng cách sử dụng phương pháp chung A và pinacol este của axit 3-(4-morpholinometyl)-phenylboronic hydroclorua.

Hợp chất 4

Điều chế hợp chất này bằng cách sử dụng phương pháp chung A và pinacol este của axit 2-(4-morpholino)pyridin-5-boronic.

Hợp chất 5

Điều chế hợp chất này bằng cách sử dụng phương pháp chung A và 4-[4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]morpholin.

Hợp chất 6

Điều chế hợp chất này bằng cách sử dụng phương pháp chung C và N-methyl-piperazin.

Hợp chất 7

Điều chế hợp chất này bằng cách sử dụng phương pháp chung C và piperidin.

Hợp chất 8

Điều chế hợp chất này bằng cách sử dụng phương pháp chung C và amit của axit piperidin-4-carboxylic.

Hợp chất 9

Điều chế hợp chất này bằng cách sử dụng phương pháp chung C và 1-piperazin-1-yl-etanon.

Hợp chất 10

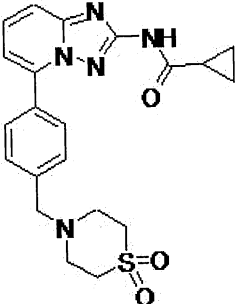
Điều chế hợp chất này bằng cách sử dụng phương pháp chung B và thiomorpholin 1,1-dioxit.

Hợp chất 11

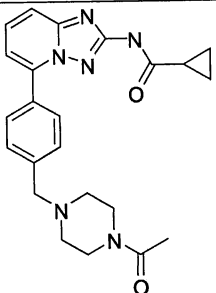
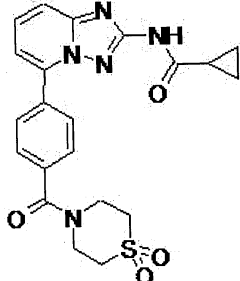
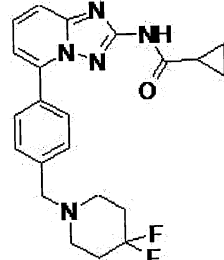
Điều chế hợp chất này bằng cách sử dụng phương pháp chung D và 4,4-diflopiperidin.

Hợp chất theo sáng chế và ví dụ so sánh được điều chế bằng các phương pháp tổng hợp được mô tả ở đây được nêu trong bảng I dưới đây. Các dữ liệu phổ NMR của hợp chất theo sáng chế và một số hợp chất của ví dụ so sánh được đưa ra trong bảng II.

Bảng I

Hợp chất số	Cấu trúc	Tên	MW	MS Mes'd
1		{5-[4-(1,1-dioxo-1-thiomorpholin-4-ylmethyl)-phenyl]-[1,2,4]triazolo [1,5-a]pyridin-2-yl}-amit của axit xyclopropanecarboxylic	425,51	426

2		N-(5-(4-(morpholinomethyl)phenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)xylopropan carboxamid	377,45	378,20
3		N-(5-(3-(morpholinomethyl)phenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)xylopropan carboxamid	377,45	378,20
4		N-(5-(6-morpholinopyridin-3-yl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)xylopropan carboxamid	364,41	365,10
5		N-(5-(4-morpholinophenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)xylopropan carboxamid	363,42	364,0
6		N-(5-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)xylopropan carboxamid	390,49	391,1
7		N-(5-(4-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)xylopropan carboxamid	375,48	376,1
8		1-(xylopropan carboxamido)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-5-ylbenzyl)piperidin-4-carboxamid	418,5	419,1

9		N-(5-(4-((4-oxo-4H-cyclopropylideneamino)phenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)xylopropanoic acid	418,5	419,1
10		{5-[4-(1,1-dioxo-1-thiomorpholin-4-yl)phenyl]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl}-amino cyclopropanecarboxylic acid	439,49	440,0
11		{5-[4-(4,4-difluoro-1-piperidin-1-ylmethyl)phenyl]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl}-amino cyclopropanecarboxylic acid	411,46	412,1

Bảng II: Dữ liệu NMR của các hợp chất điển hình theo sáng chế

Hợp chất số	(δ) Dữ liệu NMR
1	(^1H , DMSO- d_6) 11,00 (1H, b, NH) 7,99 (2H, d, 2xArH) 7,70 (2H, m, 2xArH) 7,53 (2H, d, 2xArH) 7,30 (1H, dd, ArH) 3,78 (2H, s, CH ₂) 3,14 (4H, b, 4xCH) 2,93 (4H, b, 4xCH) 2,03 (1H, b, CH) 0,82 (4H, m, 2xCH ₂)
2	(^1H , CDCl ₃) 10,20 (1H, b, NH), 8,06 (2H, d, ArH), 7,72 (2H, m, ArH), 7,63 (2H, d, ArH), 7,23 (1H, d, ArH), 4,27 (2H, s, CH ₂), 3,99 (4H, m, 2xCH ₂), 3,50 (2H, br, CH ₂), 2,95 (2H, br, CH ₂), 1,97 (1H, br, CH), 1,17 (2H, m, CH ₂), 0,95 (2H, m, CH ₂)
3	(^1H , CDCl ₃) 8,32 (1H, s, ArH), 7,96 (1H, m, ArH), 7,79 (1H, m, ArH), 7,66 (3H, m, ArH), 7,32 (1H, d, ArH), 4,31 (2H, s, CH ₂), 4,05 (4H, b, 2xCH ₂), 3,6 (2H, br, CH ₂), 3,06 (2H, br, CH ₂), 1,85 (1H, br, CH), 1,12 (2H, m, CH ₂), 0,98 (2H, m, CH ₂)
4	(^1H , CDCl ₃) 8,71 (1H, s, NH), 8,35 (1H, m, ArH), 8,27 (1H, br, ArH), 7,57 (2H, d, ArH), 7,07 (1H, m, ArH), 6,78 (1H, d, ArH), 3,86 (4H, m, 2xCH ₂), 3,66 (4H, m, 2xCH ₂), 1,6 (1H, br, CH), 1,22 (2H, m, CH ₂), 0,95 (2H, m, CH ₂)
5	(^1H , DMSO- d_6) 11,06 (1H, br, NH), 7,98 (2H, d, ArH), 7,67 (1H, m, ArH), 7,59 (1H, d, ArH), 7,25 (1H, m, ArH), 7,08 (2H, m, ArH), 3,67 (4H, m, 2xCH ₂), 3,25 (4H, m, 2xCH ₂), 2,02 (1H, br, CH), 0,82 (4H, m, 2xCH ₂)
10	(^1H , DMSO- d_6) 11,03 (1H, b, NH), 8,11 (2H, d, ArH), 7,73 (1H, d, ArH), 7,72 (1H, s, ArH), 7,68 (2H, d, ArH), 7,36 (1H, dd, ArH), 4,01 (2H, b, CH ₂), 3,81 (2H, b, CH ₂), 3,31 (4H, b dưới pic nước, 2xCH ₂), 2,03 (1H, b, CH), 0,81 (4H, m, CH ₂).
11	(^1H , DMSO- d_6) 10,99 (1H, b, NH), 7,98 (2H, d, 2xArH), 7,70 (2H, m, 2xArH), 7,50 (2H, d, 2xArH), 7,29 (1H, dd, ArH), 3,65 (2H, s, CH ₂), 2,54 (4H, b, 4xCH), 1,98 (5H, b, 5xCH), 0,81 (4H, m, 2xCH ₂)

Ví dụ sinh học

Ví dụ 1: Thử nghiệm *in-vitro*

1.1 Thử nghiệm ức chế JAK1

Miền xúc tác JAK1 của người tái tổ hợp (axit amin 850-1154; số lô 08-144) được mua từ Carna Biosciences. 10ng JAK1 được ủ với 12,5 μg cơ chất polyGT (số lô Sigma P0275) trong dung dịch đệm phản ứng kinaza (15mM Tris-HCl độ pH bằng 7,5, 1mM DTT, 0,01% Tween-20, 10mM MgCl₂, 2 μM ATP không phóng xạ, 0,25 μCi ^{33}P -gama-ATP (GE Healthcare, số lô AH9968) nồng độ cuối cùng) có hoặc không có 5 μL hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn thuốc (DMSO, nồng độ cuối cùng 1%), trong tổng thể tích bằng 25 μL , trong đĩa có 96 lỗ polypropylen (Greiner, đáy chữ V). Sau thời gian 45 phút ở nhiệt độ 30°C, ngừng phản ứng bằng cách bổ sung axit phosphoric

150mM với lượng 25 μ L/lỗ. Tất cả các phản ứng kinaza đã kết thúc được chuyển tới đĩa lọc 96 lỗ đã được rửa sẵn (axit phosphoric 75mM) (số lô Perkin Elmer 6005177) bằng cách sử dụng thiết bị thu gom tế bào (Perkin Elmer). Các đĩa được rửa 6 lần bằng dung dịch axit phosphoric 75mM với lượng 300 μ L mỗi lỗ và đáy của các đĩa này được bọc kín. Bổ sung Microscint-20 với lượng 40 μ L/lỗ, phần trên của các đĩa này được bọc kín và tiến hành đọc kết quả bằng cách sử dụng Topcount (Perkin Elmer). Hoạt tính kinaza được tính toán bằng cách trừ đi tổng số đếm được trong mỗi phút (cpm) thu được trong điều kiện có mặt chất ức chế đối chứng dương (10 μ M staurosporin) từ cpm thu được trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc. Khả năng ức chế hoạt tính của hợp chất thử nghiệm được xác định như sau:

Phần trăm ức chế = ((cpm được xác định cho mẫu có mặt hợp chất thử nghiệm – cpm được xác định cho mẫu chứa chất ức chế đối chứng dương) được chia cho (cpm được xác định trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc – cpm được xác định cho mẫu chứa chất ức chế đối chứng dương)) * 100.

Chuỗi pha loãng liều lượng được điều chế cho các hợp chất có thể tiến hành thử nghiệm tác dụng đáp ứng liều trong thử nghiệm JAK1 và tính toán giá trị IC₅₀ cho mỗi hợp chất. Mỗi hợp chất được thử nghiệm ở nồng độ 20 μ M sau đó là pha loãng theo chuỗi với tỷ lệ 1/3, 8 nồng độ (20 μ M - 6,67 μ M - 2,22 μ M - 740nM - 247nM - 82nM - 27nM - 9nM) trong nồng độ cuối cùng DMSO bằng 1%. Khi hoạt lực của chuỗi hợp chất pha loãng tăng, nhiều dung dịch pha loãng hơn được chuẩn bị và/hoặc nồng độ cao nhất được giảm xuống (ví dụ, 5 μ M, 1 μ M).

Các hợp chất sau đây được thử nghiệm hoạt tính kháng JAK1 của chúng và các giá trị IC₅₀, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm được mô tả ở đây, được nêu trong bảng IIIA dưới đây.

Bảng IIIA: Các giá trị JAK1 của các hợp chất

Hợp chất số	IC ₅₀ JAK1 (nM)
1	47,07, 55,66, 50,1, 48,29
2	50,91, 52,11
3	291
4	1032
5	1450
6	3448
7	504,1

8	435
9	334,3
10	18,16
11	7,69

1.2 Thử nghiệm xác định K_i JAK1

Để xác định giá trị K_i , lượng hợp chất khác nhau được trộn với enzym và phản ứng enzym được tiến hành là một hàm số của nồng độ ATP. Giá trị K_i được xác định bằng biểu đồ tương hỗ hai thông số gồm K_m và nồng độ hợp chất (biểu đồ Lineweaver-Burk). Sử dụng 1ng JAK1 (Invitrogen, PV4774) trong thử nghiệm. Cơ chất là 50nM Ulight-JAK-1 (Tyr1023) Peptit (Perkin Elmer, TRF0121). Phản ứng được tiến hành trong 25mM MOPS độ pH bằng 6,8, 0,01%, 2mM DTT, 5mM $MgCl_2$ Brij-35 với nồng độ khác nhau của ATP và hợp chất. Cơ chất phosphoryl hoá được xác định bằng cách sử dụng kháng thể PT66 kháng phosphotyrosin được đánh dấu Eu (Perkin Elmer, AD0068). Tiến hành đọc kết quả trên màn hình (Perkin Elmer) với bước sóng kích thích bằng 320nm và phát xạ sau đó ở bước sóng 615nm và 665nm.

Ví dụ, khi hợp chất 1 được kiểm tra trong thử nghiệm này, giá trị K_i đo được bằng 39nM.

1.3 Thử nghiệm ức chế JAK2

Miền xúc tác JAK2 của người tái tổ hợp (axit amin 808-1132; số lô PV4210) được mua từ Invitrogen. 0,025mU JAK2 được ủ với 2,5 μ g cơ chất polyGT (số lô Sigma P0275) trong dung dịch đệm phản ứng kinaza (5mM MOPS độ pH bằng 7,5, 9mM MgAc, 0,3mM EDTA, 0,06% Brij và 0,6mM DTT, 1 μ M ATP không phóng xạ, 0,25 μ Ci ^{33}P -gama-ATP (GE Healthcare, số lô AH9968) nồng độ cuối cùng) có hoặc không có 5 μ L hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn thuốc (DMSO, nồng độ cuối cùng 1%), trong tổng thể tích bằng 25 μ L, trong đĩa có 96 lỗ polypropylen (Greiner, đáy chữ V). Sau 90 phút ở nhiệt độ 30°C, ngừng phản ứng bằng cách bổ sung axit phosphoric 150mM với lượng 25 μ L/lỗ. Tất cả các phản ứng kinaza đã kết thúc được chuyển tới đĩa lọc 96 lỗ đã được rửa sẵn (axit phosphoric 75mM) (số lô Perkin Elmer 6005177) bằng cách sử dụng thiết bị thu gom tế bào (Perkin Elmer). Các đĩa được rửa 6 lần bằng dung dịch axit phosphoric 75mM với lượng 300 μ L mỗi lỗ và đáy của các đĩa này được bọc kín. Bổ sung Microscint-20 với lượng 40 μ L/lỗ, phần trên của các đĩa này được bọc kín và tiến hành đọc kết quả bằng cách sử dụng Topcount (Perkin Elmer). Hoạt

tính kinaza được tính toán bằng cách trừ đi tổng số đếm được trong mỗi phút (cpm) thu được trong điều kiện có mặt chất ức chế đối chứng dương (10 μ M staurosporin) từ cpm thu được trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc. Khả năng ức chế hoạt tính của hợp chất thử nghiệm được xác định như sau:

Phần trăm ức chế = ((cpm được xác định cho mẫu có mặt hợp chất thử nghiệm – cpm được xác định cho mẫu chất ức chế đối chứng dương) được chia cho (cpm được xác định trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc – cpm được xác định cho mẫu chất ức chế đối chứng dương)) * 100.

Chuỗi pha loãng liều được điều chế cho các hợp chất có thể tiến hành thử nghiệm tác dụng đáp ứng liều trong thử nghiệm JAK2 và tính toán giá trị IC₅₀ cho mỗi hợp chất. Mỗi hợp chất được thử nghiệm ở nồng độ bằng 20 μ M sau đó pha loãng theo chuỗi với tỷ lệ 1/3, 8 nồng độ (20 μ M - 6,67 μ M - 2,22 μ M - 740nM - 247nM - 82nM - 27nM - 9nM) trong nồng độ cuối cùng DMSO bằng 1%. Khi hoạt lực của chuỗi hợp chất pha loãng tăng, nhiều dung dịch pha loãng hơn được chuẩn bị và/hoặc nồng độ cao nhất được giảm xuống (ví dụ, 5 μ M, 1 μ M).

Các hợp chất sau đây được thử nghiệm hoạt tính kháng JAK2 của chúng và các giá trị IC₅₀, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm được mô tả ở đây, được nêu trong bảng IIIB dưới đây.

Bảng IIIB: Các giá trị IC₅₀ JAK2 của các hợp chất

Hợp chất số	IC ₅₀ JAK2 (nM)
1	31,37, 41,16, 55,49, 167,34
2	38,73, 152,3, 184,7
3	N/A
4	N/A
5	1760
6	5070
7	6449
8	7731, 1355
9	848,7
10	65,42
11	15,51

1.4 Thử nghiệm xác định K_d JAK2

JAK2 (Invitrogen, PV4210) được sử dụng ở nồng độ cuối cùng bằng 5nM. Thử nghiệm gắn kết được tiến hành trong 50mM Hepes độ pH bằng 7,5, 0,01% Brij-35,

10mM MgCl₂, 1mM EGTA bằng cách sử dụng chất phát hiện vết kinaza 236 25nM (Invitrogen, PV5592) và Eu-kháng-GST 2nM (Invitrogen, PV5594) với các nồng độ hợp chất khác nhau. Việc phát hiện của chất phát hiện vết được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ, khi hợp chất 1 được kiểm tra trong thử nghiệm này, đo được giá trị K_d bằng 205nM.

1.5 Thử nghiệm ức chế JAK3

Miền xúc tác JAK3 của người tái tổ hợp (axit amin 781-1124; số lô PV3855) được mua từ Invitrogen. 0,025mU JAK3 được ủ với 2,5μg cơ chất polyGT (số lô Sigma P0275) trong dung dịch đệm phản ứng kinaza (25mM Tris độ pH bằng 7,5, 0,5mM EGTA, 0,5mM Na₃VO₄, 5mM b-glyxerolphosphat, 0,01% Triton X-100, 1μM ATP không phóng xạ, 0,25μCi 33P-gama-ATP (GE Healthcare, số lô AH9968) nồng độ cuối cùng) có hoặc không có 5μL hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn thuốc (DMSO, nồng độ cuối cùng 1%), trong tổng thể tích bằng 25μL, trong đĩa có 96 lỗ polypropylen (Greiner, đáy chữ V). Sau 105 phút ở nhiệt độ 30°C, ngừng phản ứng bằng cách bổ sung axit phosphoric 150mM với lượng 25μL/lỗ. Tất cả các phản ứng kinaza đã kết thúc được chuyển tới đĩa lọc 96 lỗ được rửa sẵn (axit phosphoric 75mM) (số lô Perkin Elmer 6005177) bằng cách sử dụng thiết bị thu gom tế bào (Perkin Elmer). Các đĩa được rửa 6 lần bằng dung dịch axit phosphoric 75mM với lượng 300μL mỗi lỗ và đáy của các đĩa này được bọc kín. Bổ sung Microscint-20 với lượng 40μL/lỗ, phần trên của các đĩa này được bọc kín và tiến hành đọc kết quả bằng cách sử dụng Topcount (Perkin Elmer). Hoạt tính kinaza được tính toán bằng cách trừ đi tổng số đếm được trong mỗi phút (cpm) thu được trong điều kiện có mặt chất ức chế đối chứng dương (10μM staurosporin) từ cpm thu được trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc. Khả năng ức chế hoạt tính của hợp chất thử nghiệm được xác định như sau:

Phần trăm ức chế = ((cpm được xác định cho mẫu có mặt hợp chất thử nghiệm – cpm được xác định cho mẫu chất ức chế đối chứng dương) được chia cho (cpm được xác định trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc – cpm được xác định cho mẫu chất ức chế đối chứng dương)) * 100.

Chuỗi pha loãng liều được điều chế cho các hợp chất có thể tiến hành thử nghiệm tác dụng đáp ứng liều trong thử nghiệm JAK3 và tính toán giá trị IC₅₀ cho mỗi

hợp chất. Mỗi hợp chất được thử nghiệm ở nồng độ bằng 20 μ M sau đó pha loãng theo chuỗi với tỷ lệ 1/3, 8 nồng độ (20 μ M - 6,67 μ M - 2,22 μ M - 740nM - 247nM - 82nM - 27nM - 9nM) trong nồng độ cuối cùng DMSO bằng 1%. Khi hoạt lực của chuỗi hợp chất pha loãng tăng, nhiều dung dịch pha loãng hơn được chuẩn bị và/hoặc nồng độ cao nhất được giảm xuống (ví dụ, 5 μ M, 1 μ M).

Các hợp chất sau đây được thử nghiệm hoạt tính kháng JAK3 của chúng và các giá trị IC₅₀, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm được mô tả ở đây, được nêu trong bảng IIIC dưới đây.

Bảng IIIC: Các giá trị IC₅₀ JAK3 của các hợp chất

Hợp chất số	IC ₅₀ JAK3 (nM)
1	149,35, 187,3, 189,3, 194,7
2	2843
11	194,6

1.6 Thử nghiệm xác định giá trị Ki JAK3

Để xác định giá trị Ki, lượng hợp chất khác nhau được trộn với enzym và phản ứng enzym được tiến hành là một hàm số của nồng độ ATP. Giá trị Ki được xác định bằng biểu đồ tương hỗ hai thông số gồm Km và nồng độ hợp chất (biểu đồ Lineweaver-Burk). JAK3 (Carna biosciences, 09CBS-0625B) được sử dụng ở nồng độ cuối cùng bằng 10ng/ml. Cơ chất là muối Poly(Glu,Tyr)natri (4:1), MW 20 000 - 50 000 (Sigma, P0275). Phản ứng được tiến hành trong 25mM Tris độ pH bằng 7,5, 0,01% Triton X-100, 0,5mM EGTA, 2,5mM DTT, 0,5mM Na₃VO₄, 5mM b-glyxerolphosphat, 10mM MgCl₂ với nồng độ khác nhau của ATP và hợp chất và được ngừng phản ứng bằng cách bổ sung axit phosphoric 150mM. Việc xác định phosphat kết hợp vào cơ chất polyGT được thực hiện bằng cách nạp mẫu lên đĩa lọc (sử dụng thiết bị thu hoạch tế bào, Perkin Elmer) và sau đó được rửa. ³³P đã kết hợp trong polyGT được xác định trong máy đếm nhấp nháy Topcount sau khi bổ sung chất lỏng nhấp nháy vào các đĩa lọc (Perkin Elmer).

Ví dụ, khi hợp chất 1 được kiểm tra trong thử nghiệm này, giá trị Ki đo được bằng 353nM.

1.7 Thử nghiệm ức chế TYK2

Miền xúc tác TYK2 của người tái tổ hợp (axit amin 871-1187; số lô 08-147)

được mua từ Carna biosciences. 5ng TYK2 được ủ với 12,5µg cơ chất polyGT (số lô Sigma P0275) trong dung dịch đệm phản ứng kinaza (25mM Hepes độ pH bằng 7,5, 100mM NaCl, 0,2mM Na₃VO₄, 0,1% NP-40, 0,1µM ATP không phóng xạ, 0,125µCi ³³P-gama-ATP (GE Healthcare, số lô AH9968) nồng độ cuối cùng) có hoặc không có 5µL hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn thuốc (DMSO, nồng độ cuối cùng 1%), trong tổng thể tích bằng 25µL, trong đĩa có 96 lỗ polypropylen (Greiner, đáy chữ V). Sau 90 phút ở nhiệt độ 30°C, ngừng phản ứng bằng cách bổ sung axit phosphoric 150mM với lượng 25µL/lỗ. Tất cả phản ứng kinaza đã kết thúc được chuyển tới đĩa lọc 96 lỗ đã được rửa sẵn (axit phosphoric 75mM) (số lô Perkin Elmer 6005177) bằng cách sử dụng thiết bị thu gom tế bào (Perkin Elmer). Các đĩa được rửa 6 lần bằng dung dịch axit phosphoric 75mM với lượng 300µL mỗi lỗ và đáy của các đĩa này được bọc kín. Bổ sung Microscint-20 với lượng 40µL/lỗ, phần trên của các đĩa này được bọc kín và tiến hành đọc kết quả bằng cách sử dụng Topcount (Perkin Elmer). Hoạt tính kinaza được tính toán bằng cách trừ đi tổng số đếm được trong mỗi phút (cpm) thu được trong điều kiện có mặt chất ức chế đối chứng dương (10µM staurosporin) từ cpm thu được trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc. Khả năng ức chế hoạt tính của hợp chất thử nghiệm được xác định như sau:

Phần trăm ức chế = ((cpm được xác định cho mẫu có mặt hợp chất thử nghiệm – cpm được xác định cho mẫu chất ức chế đối chứng dương) được chia cho (cpm được xác định trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc – cpm được xác định cho mẫu chất ức chế đối chứng dương)) * 100.

Chuỗi pha loãng liều được điều chế cho các hợp chất có thể tiến hành thử nghiệm tác dụng đáp ứng liều trong thử nghiệm TYK2 và tính toán giá trị IC₅₀ cho mỗi hợp chất. Mỗi hợp chất được thử nghiệm ở nồng độ bằng 20µM sau đó pha loãng theo chuỗi với tỷ lệ 1/3, 8 nồng độ (20µM-6,67µM-2,22µM-740nM-247nM-82nM-27nM-9nM) trong nồng độ cuối cùng DMSO bằng 1%. Khi hoạt lực của chuỗi hợp chất pha loãng tăng, nhiều dung dịch pha loãng hơn được chuẩn bị và/hoặc nồng độ cao nhất được giảm xuống (ví dụ, 5µM, 1µM).

Các hợp chất sau đây được thử nghiệm hoạt tính kháng TYK2 của chúng; và các giá trị IC₅₀, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm được mô tả ở đây, được nêu trong bảng IIID dưới đây.

Bảng IIID: Các giá trị IC₅₀ TYK2 của các hợp chất

Hợp chất số	IC ₅₀ TYK2 (nM)
1	72,7, 73,75, 79,07, 86,77
2	2096
11	125,8

1.8 Thử nghiệm xác định Kd TYK2

TYK2 (Carna Biosciences, 09CBS-0983D) được sử dụng ở nồng độ cuối cùng bằng 5nM. Thử nghiệm gắn kết được tiến hành trong 50mM Hepes độ pH bằng 7,5, 0,01% Brij-35, 10mM MgCl₂, 1mM EGTA bằng cách sử dụng chất phát hiện vết kinaza 236 50nM (Invitrogen, PV5592) và Eu-kháng-GST 2nM (Invitrogen, PV5594) với các nồng độ hợp chất khác nhau. Việc phát hiện của chất phát hiện vết được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ, khi hợp chất 1 được kiểm tra trong thử nghiệm này, giá trị Kd đo được bằng 376nM.

Ví dụ 2. Thử nghiệm tế bào

Thử nghiệm truyền tín hiệu JAK-STAT:

Các tế bào HeLa được để trong môi trường Eagle được cải biến Dulbecco (DMEM) chứa huyết thanh phôi thai bê được bất hoạt bằng nhiệt 10%, 100 U/ml penixilin và 100µg/ml streptomycin. Các tế bào HeLa được sử dụng ở nồng độ hợp lưu bằng 70% để chuyển nhiễm. 20.000 tế bào trong 87µL môi trường nuôi cấy tế bào được chuyển nhiễm nhanh chóng bằng 40ng chất báo cáo pSTAT1(2)-luxiferaza (Panomics), 8ng chất báo cáo LacZ là chất báo cáo đối chứng bên trong và 52ng pBSK bằng cách sử dụng 0,32µL Jet-PEI (Polyplus) làm chất phản ứng chuyển nhiễm cho mỗi lỗ trong đĩa có 96 lỗ. Sau khi ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C, 10% CO₂, môi trường chuyển nhiễm được loại bỏ. Bổ sung 75µL DMEM + huyết thanh phôi thai bê được bất hoạt bằng nhiệt 1,5%. 15µL hợp chất ở nồng độ 6,7x được bổ sung vào trong 60 phút và sau đó bổ sung 10µL OSM người (Peprtech) ở nồng độ cuối cùng bằng 33ng/ml.

Tất cả các hợp chất được kiểm tra hai lần bắt đầu từ 20µM sau đó được pha loãng theo chuỗi với tỷ lệ 1/3, tổng là 8 nồng độ (20µM – 6,6µM – 2,2µM – 740nM – 250nM – 82nM – 27nM – 9nM) trong nồng độ cuối cùng DMSO bằng 0,2%.

Sau khi ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C, 10% CO₂, các tế bào được dung giải trong 100µL dung dịch đệm dung giải/lỗ (PBS, 0,9mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂, 5% Trehalozơ, 0,025% Tergitol NP9, 0,15% BSA).

40µL dịch dung giải tế bào được sử dụng để xác định hoạt tính β -galactosidaza bằng cách bổ sung 180µL dung dịch β -Gal (30µl ONPG 4mg/ml + 150µL dung dịch đệm β -Galactosidaza (0,06 M Na₂HPO₄, 0,04M NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂)) trong 20 phút. Phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung 50µL Na₂CO₃ 1M. Bước sóng hấp thụ được đọc ở 405nm.

Hoạt tính luxiferaza được xác định bằng cách sử dụng 40µL dịch dung giải tế bào cộng với 40µL Steadylite® như được mô tả bởi nhà sản xuất (Perkin Elmer), trên màn hình (Perkin Elmer).

10µM chất ức chế pan-JAK được sử dụng làm mẫu đối chứng dương (ức chế 100%). Mẫu đối chứng âm DMSO 0,5% (ức chế 0%) được sử dụng. Các mẫu đối chứng âm và dương được sử dụng để tính toán giá trị z' và 'phần trăm ức chế' (PIN).

Phần trăm ức chế = ((sự phát huỳnh quang được xác định trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc - sự phát huỳnh quang được xác định cho mẫu chứa hợp chất thử nghiệm) được chia cho (sự phát huỳnh quang được xác định trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc – sự phát huỳnh quang được xác định cho mẫu không có chất khơi mào)) * 100.

Các giá trị PIN được vẽ đồ thị đối với các hợp chất được thử nghiệm về sự đáp ứng liều và thu được các giá trị EC₅₀.

Bảng IV

Hợp chất số	EC ₅₀ (nM)
1	922,5, 625,6, 987,7, 1767
2	>10000, 3322, 2492
11	740,4

Ví dụ 2.2 Thử nghiệm truyền tín hiệu OSM/IL-1 β

OSM và IL-1 β cho thấy nồng độ MMP13 điều hòa tăng theo cách hiệp đồng trong dòng tế bào sacôm sụn ở người SW1353. Các tế bào được nuôi trong đĩa có 96 lỗ với 15.000 tế bào/lỗ với thể tích bằng 120µL DMEM (Invitrogen) chứa FBS 10% (theo thể tích) và 1% penixilin/streptomycin (InVitrogen) được ủ ở nhiệt độ 37°C 5%

CO₂. Các tế bào được ủ trước với 15µL hợp chất trong môi trường M199 với DMSO 2% trong thời gian 1 giờ trước khi được khơi mào bằng 15µL OSM và IL-1 để đạt 25ng/ml OSM và 1ng/ml IL-1β, và nồng độ MMP13 được xác định trong môi trường có điều kiện trong 48 giờ sau khi khơi mào. Hoạt tính MMP13 được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính bất giữ kháng thể. Nhằm mục đích này, đĩa 384 lỗ (NUNC, 460518, MaxiSorb đen) được phủ bằng 35µL dung dịch kháng thể kháng MMP13 của người 1,5µg/ml (R&D Systems, MAB511) trong 24 giờ ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa các lỗ 2 lần bằng PBS + 0,05% Tween, vị trí gắn kết còn lại được phong bế bằng 100µL sữa khô không béo 5% (Santa Cruz, sc-2325, Blotto) trong PBS trong 24 giờ ở nhiệt độ 4°C. Tiếp theo, các lỗ được rửa hai lần bằng PBS + 0,05% Tween và 35µL dung dịch pha loãng 1/10 dịch nuôi cấy nổi chứa MMP13 trong dung dịch đệm phong bế được pha loãng 100 lần được bổ sung vào và được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các lỗ tiếp theo được rửa hai lần bằng PBS + 0,05% Tween sau đó là quá trình hoạt hóa MMP13 bằng cách bổ sung 35µL dung dịch 4-aminophenylmercuric axetat 1,5mM (APMA) (Sigma, A9563) và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Các lỗ được rửa lần nữa bằng PBS + 0,05% Tween và bổ sung 35µL cơ chất MMP13 (Biomol, P-126, cơ chất OmniMMP flogenic). Sau khi ủ trong 24 giờ ở 37°C phát huỳnh quang của cơ chất đã chuyển hóa được xác định bằng máy đọc nhiều nhãn Perkin Elmer Wallac EnVision 2102 Multilabel Reader (bước sóng kích thích: 320nm, bước sóng phát xạ: 405nm).

Phần trăm ức chế = ((sự phát huỳnh quang được xác định trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc - sự phát huỳnh quang được xác định cho mẫu với sự có mặt của hợp chất thử nghiệm) được chia cho (sự phát huỳnh quang được xác định trong điều kiện có mặt chất dẫn thuốc - sự phát huỳnh quang được xác định cho mẫu mà không cần chất khơi mào)) * 100.

Ví dụ, khi hợp chất 1 được kiểm tra trong thử nghiệm này, giá trị EC₅₀ đo được bằng 2242,5 (±1098,5) nM.

Ví dụ 2.3 Thử nghiệm tăng sinh PBL

Các tế bào lymphô máu ngoại vi của người (PBL) được kích thích bằng IL-2 và quá trình tăng sinh được xác định bằng thử nghiệm hợp nhất BrdU. Đầu tiên, PBL được kích thích trong 72 giờ bằng PHA để cảm ứng thụ thể IL-2, sau đó chúng được

gắn chặt trong 24 giờ để ngừng quá trình tăng sinh tế bào sau đó là kích thích IL-2 trong 72 giờ nữa (bao gồm đánh dấu BrdU trong 24 giờ). Các tế bào được ủ trước với hợp chất thử nghiệm trong 1 giờ trước khi bổ sung IL-2. Các tế bào được nuôi cấy trong RPMI 1640 chứa FBS 10% (theo thể tích).

Ví dụ 2.4 Thử nghiệm máu toàn phần (WBA)

2.4.1 Quy trình kích thích IFN α

Để dự đoán hiệu lực của hợp chất thử nghiệm để ức chế con đường truyền tín hiệu phụ thuộc JAK1 hoặc JAK2 *in vivo*, mô hình *in vitro* tương đương về mặt sinh lý được phát triển sử dụng máu toàn phần của người. Trong thử nghiệm WBA, máu, được lấy từ tình nguyện viên là những người tự nguyện, được xử lý *ex vivo* với hợp chất (trong 1 giờ) và sau đó được kích thích trong 30 phút bằng interferon α (IFN α , con đường phụ thuộc JAK1) hoặc trong 2 giờ bằng yếu tố kích thích khuẩn lạc-đại thực bào tế bào hạt (GM-CSF, con đường phụ thuộc JAK2).

2.4.1.1 Thử nghiệm phospho – STAT1

Để kích thích IFN α , sự gia tăng phosphoryl hóa chất truyền tín hiệu và chất hoạt hóa quá trình phiên mã 1 (pSTAT1) bằng IFN α trong phần chiết tế bào bạch cầu được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm pSTAT1 ELISA. Quá trình phosphoryl hóa chất truyền tín hiệu và chất hoạt hóa quá trình phiên mã 1 (STAT1) sau khi khơi mào interferon alpha (IFN α) là sự kiện trung gian JAK1. Thử nghiệm phospho-STAT1, là thử nghiệm được sử dụng để xác định nồng độ phospho-STAT1 trong các phần chiết tế bào, được phát triển để đánh giá khả năng của hợp chất để ức chế con đường truyền tín hiệu phụ thuộc JAK1.

Trong máu toàn phần của người được lấy từ các tình nguyện viên là người tự nguyện, được xử lý *ex vivo* bằng hợp chất (1 giờ) và sau đó được kích thích trong 30 phút bằng IFN α . Việc tăng mức độ phosphoryl hóa của STAT1 bởi IFN α trong phần chiết tế bào bạch cầu được xác định bằng cách sử dụng phospho-STAT1 ELISA.

Dung dịch đệm dung giải ACK gồm 0,15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM EDTA. Giá trị pH của dung dịch đệm bằng 7,3.

Nồng độ dung dịch đệm dung giải tế bào 10x (một phần của bộ kit PathScan Phospho-STAT1 (Tyr701) Sandwich ELISA từ Cell Signaling) được pha loãng 10 lần

trong H₂O. Chất ức chế proteinaza được bổ sung vào dung dịch đệm trước khi sử dụng.

20µg IFN α được hòa tan trong 40µL H₂O để thu được 500µg/ml dung dịch gốc. Dung dịch gốc được bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Chuỗi pha loãng 3 lần của hợp chất được chuẩn bị trong DMSO (nồng độ cao nhất: 10mM). Sau đó, hợp chất được pha loãng tiếp trong môi trường (yếu tố pha loãng phụ thuộc vào nồng độ cuối cùng mong muốn của hợp chất).

2.4.1.1.1 Ủ máu với hợp chất và kích thích bằng IFN α

Máu người được thu gom trong ống heparini hóa. Máu được chia thành các phần có thể tích 392µL. Sau đó, 4µL hợp chất pha loãng được bổ sung vào mỗi phần và các mẫu máu được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch gốc IFN α được pha loãng 1000 lần trong môi trường RPMI để thu được 500ng/ml dung dịch xử lý. 4µL dung dịch xử lý 500ng/ml được bổ sung vào các mẫu máu (nồng độ cuối cùng IFN α : 5ng/ml). Các mẫu được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút.

2.4.1.1.2 Điều chế dịch chiết tế bào

Tại thời điểm kết thúc quá trình kích thích, 7,6ml dung dịch đệm ACK được bổ sung vào các mẫu máu để dung giải các tế bào hồng cầu. Các mẫu được trộn bằng cách đảo ngược ống năm lần và hỗn hợp phản ứng được ủ trên đá trong 5 phút. Việc dung giải RBC là hiển nhiên trong quá trình ủ. Các tế bào được tạo viên bằng cách ly tâm với vận tốc 3000 vòng/phút (300g), ở nhiệt độ 4°C trong 7 phút và dịch nổi được loại bỏ. 10ml PBS 1x được bổ sung vào mỗi ống và viên tế bào được tạo hỗn dịch lần nữa. Mẫu được ly tâm lần nữa trong thời gian 7 phút với vận tốc 3000 vòng/phút (300g), ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi được loại bỏ và viên này được tạo hỗn dịch lần nữa trong 500µL PBS 1x. Sau đó, hỗn dịch tế bào được chuyển tới ống vi ly tâm 1,5ml sạch. Các tế bào được tạo viên bằng cách ly tâm với vận tốc 7000 vòng/phút (700g) trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi được loại bỏ và viên này được hòa tan trong 150µL dung dịch đệm dung giải tế bào. Mẫu được ủ trên đá trong 15 phút. Sau đó, mẫu được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi được xử lý tiếp.

2.4.1.1.3 Xác định quá trình phosphoryl hóa STAT1 bằng ELISA

Kit Pathscan Phospho-STAT1 (Tyr701) Sandwich ELISA từ Cell Signaling (số

lô: #7234) được dùng để xác định nồng độ Phospho-STAT1.

Các phần chiết tế bào được làm tan trên đá. Các ống được ly tâm trong thời gian 5 phút ở vận tốc 160.000 vòng/phút (16.000g), ở nhiệt độ 4°C và sản phẩm dung giải trong được thu gom. Đồng thời, các khay vi lỗ của kit được làm cân bằng với nhiệt độ trong phòng và dung dịch đệm rửa được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch đệm rửa 20x trong H₂O. Mẫu được pha loãng 2 lần trong chất pha loãng mẫu và bổ sung 100µL vào các khay vi lỗ. Các khay vi lỗ được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C.

Ngày tiếp theo, các lỗ được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa. 100µL kháng thể phát hiện được bổ sung vào các lỗ. Các khay được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau đó, các lỗ được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa một lần nữa. 100µL kháng thể thứ cấp được gắn kết HRP được bổ sung vào mỗi lỗ và mẫu được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau 30 phút, các lỗ được rửa 3 lần nữa và bổ sung 100µL cơ chất TMB vào tất cả các lỗ. Khi mẫu chuyển sang màu xanh da trời, 100µL dung dịch STOP được bổ sung vào để ngừng phản ứng. Sự hấp thụ được xác định ở bước sóng 450nm.

2.4.1.2 Phân tích số liệu

Tác dụng ức chế cảm ứng phosphoSTAT1 bởi IFN α trong dịch chiết tế bào được lập đồ thị đối với hai thông số nồng độ hợp chất và giá trị IC₅₀ bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad. Số liệu được giữ lại nếu R² lớn hơn 0,8 và đỉnh dốc nhỏ hơn 3.

2.4.1.2 IL-8 ELISA

Để kích thích GM-CSF, sự tăng nồng độ interleukin-8 (IL-8) trong huyết tương được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm IL-8 ELISA. Sự biểu hiện của interleukin 8 (IL-8) được cảm ứng bởi yếu tố kích thích khuẩn lạc-đại thực bào tế bào hạt (GM-CSF) là sự kiện trung gian JAK2. IL-8 ELISA, có thể được sử dụng để xác định nồng độ IL-8 trong mẫu huyết tương, được phát triển để đánh giá khả năng của hợp chất ức chế con đường truyền tín hiệu phụ thuộc JAK2.

Máu người toàn phần được lấy từ tình nguyện viên là người tự nguyện, được xử lý *ex vivo* bằng hợp chất (1 giờ) và sau đó được kích thích trong 2 giờ bằng GM-CSF. Việc tăng nồng độ IL-8 trong huyết tương được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm IL-8 ELISA.

10µg GM-CSF được hòa tan trong 100µL H₂O để thu được 100µg/ml dung

dịch gốc. Dung dịch gốc được bảo quản ở nhiệt độ -20°C .

Chuỗi pha loãng 3 lần của hợp chất thử nghiệm được chuẩn bị trong DMSO (nồng độ cao nhất: 10mM). Sau đó, hợp chất còn được pha loãng tiếp trong môi trường (yếu tố pha loãng phụ thuộc vào nồng độ hợp chất mong muốn cuối cùng).

2.4.1.2.1 Ủ máu với hợp chất và kích thích bằng GM-CSF

Máu người được thu gom trong ống heparini hóa. Máu được chia thành các phần với thể tích 245 μL . Sau đó, 2,5 μL dung dịch pha loãng hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào mỗi phần và các mẫu máu được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C . Dung dịch gốc GM-CSF được pha loãng 100 lần trong môi trường RPMI để thu được 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dung dịch xử lý. 2,5 μL dung dịch xử lý 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ được bổ sung vào các mẫu máu (nồng độ cuối cùng GM-CSF: 10ng/ml). Mẫu được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ.

2.4.1.2.2 Chuẩn bị mẫu huyết tương

Mẫu được ly tâm trong 15 phút ở vận tốc 10.000 vòng/phút (1.000g), ở nhiệt độ 4°C . 100 μL huyết tương được thu gom và bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng tiếp.

2.4.1.2.3 Xác định nồng độ IL-8 bằng ELISA

Kit Human IL-8 Chemiluminescent Immunoassay từ R&D Systems cung cấp (số lô: Q8000B) được sử dụng để xác định nồng độ IL-8.

Dung dịch đệm rửa được điều chế bằng cách pha loãng dung dịch đệm rửa 10x trong H_2O . Chất phản ứng glo được điều chế bằng cách bổ sung 1 phần chất phản ứng glo 1 vào 2 phần chất phản ứng glo B trong thời gian 15 phút đến 4 giờ trước khi sử dụng.

100 μL chất pha loãng thử nghiệm RD1-86 được bổ sung vào mỗi lỗ. Sau đó, 50 μL mẫu (huyết tương) được bổ sung vào. Đĩa ELISA được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, 500 vòng/phút. Tất cả các lỗ được rửa 4 lần bằng dung dịch đệm rửa và 200 μL thể tiếp hợp IL-8 được bổ sung vào mỗi lỗ. Sau khi ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng, các lỗ được rửa 4 lần bằng dung dịch đệm rửa và 100 μL chất phản ứng glo được bổ sung vào mỗi lỗ. Đĩa ELISA được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng (được bảo vệ khỏi ánh sáng). Sự phát huỳnh quang được xác định (thời gian đọc 0,5 giây/lỗ).

2.4.1.3 Kết quả

Ví dụ, khi sử dụng quy trình này, pIC_{50} của hợp chất 1 ức chế sự tăng nồng độ của pSTAT1 do $INF\alpha$ gây ra bằng $6,23 \pm 0,15$ (SEM). Điều này chứng tỏ rằng hợp chất 1 có khả năng ức chế con đường JAK1 trong điều kiện sinh lý.

2.4.2 Quy trình kích thích IL-6

Ngoài ra, phân tích tế bào theo dòng được tiến hành để chứng minh khả năng chọn lọc *ex vivo* của hợp chất đối với JAK1 cao hơn JAK2 bằng cách sử dụng máu toàn phần của người. Do đó, máu được lấy từ tình nguyện viên là những người tự nguyện cho máu. Sau đó, máu được làm cân bằng trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ $37^{\circ}C$ dưới điều kiện rung nhẹ, sau đó được cho vào ống Eppendorf. Hợp chất được bổ sung vào với nồng độ khác nhau và được ủ ở nhiệt độ $37^{\circ}C$ trong 30 phút dưới điều kiện rung nhẹ và sau đó được kích thích trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ $37^{\circ}C$ dưới điều kiện rung nhẹ với interleukin 6 (IL-6) để kích thích con đường phụ thuộc JAK1 hoặc GM-CSF để kích thích con đường phụ thuộc JAK2. Sau đó, đánh giá phospho-STAT1 và phospho-STAT5 bằng cách sử dụng phân tích FACS.

2.4.2.1 Thử nghiệm phospho-STAT1

Để tăng sự phosphoryl hóa của chất truyền tín hiệu và chất hoạt hóa quá trình phiên mã 1 (pSTAT1) được kích thích bởi IL-6 trong tế bào bạch cầu, máu toàn phần của người được lấy từ tình nguyện viên là những người tự nguyện cho máu, được xử lý *ex vivo* bằng hợp chất trong 30 phút và sau đó được kích thích trong 20 phút bằng IL-6. Việc tăng sự phosphoryl hóa của STAT1 bởi IL-6 trong các tế bào lymphô được xác định bằng cách sử dụng kháng thể kháng phospho-STAT1 bằng FACS.

Dung dịch đậm 5X Lyse/Fix (BD PhosFlow, số lô 558049) được pha loãng 5 lần bằng nước cất và được làm ấm sẵn ở nhiệt độ $37^{\circ}C$. Dung dịch đậm Lyse/Fix đã pha loãng còn lại được bỏ đi.

Hòa tan $10\mu g$ rhIL-6 (R&D Systems, số lô 206-IL) trong 1ml PBS 0,1% BSA để thu được $10\mu g/ml$ dung dịch gốc. Dung dịch gốc được chia thành các phần và bảo quản ở nhiệt độ $-80^{\circ}C$.

Chuỗi pha loãng 3 lần của hợp chất được chuẩn bị trong DMSO (10mM dung dịch gốc). Mẫu được xử lý bằng chất đối chứng nhận DMSO thay cho hợp chất. Tất cả

các mẫu được ủ với nồng độ DMSO cuối cùng bằng 1%.

2.4.2.1.1 Ủ máu bằng hợp chất và kích thích bằng IL-6

Máu người được thu gom trong ống heparini hóa. Máu được chia thành các phần với thể tích 148,5µl. Sau đó, 1,5µl dung dịch pha loãng hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào mỗi phần mẫu máu và các mẫu máu được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C dưới điều kiện rung nhẹ. Dung dịch gốc IL-6 (1,5µl) được bổ sung vào các mẫu máu (nồng độ cuối cùng 10ng/ml) và mẫu được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 20 phút dưới điều kiện rung nhẹ.

2.4.2.1.2 Chuẩn bị tế bào bạch cầu và đánh dấu CD4

Tại thời điểm kết thúc quá trình kích thích, 3ml dung dịch đệm Lyse/Fix 1X được làm ấm sẵn ngay lập tức được bổ sung vào các mẫu máu, được tạo xoáy nhanh và được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ 37°C trong bể nước để dung giải các tế bào hồng cầu và cố định bạch cầu, sau đó được làm đông lạnh ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng tiếp.

Đối với các bước sau đó, các ống được làm tan băng ở nhiệt độ 37°C trong thời gian xấp xỉ 20 phút và được ly tâm trong 5 phút với lực ly tâm 400xg ở nhiệt độ 4°C. Viên tế bào được rửa bằng 3ml PBS 1X lạnh, và sau khi ly tâm viên tế bào được tạo hỗn dịch lần nữa trong 100µl PBS chứa BSA 3%. Kháng thể kháng CD4 thể tiếp hợp với FITC hoặc kháng thể cùng loại tiếp hợp với FITC đối chứng được bổ sung vào và được ủ trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ trong phòng, ở chỗ tối.

2.4.2.1.3 Độ thấm của tế bào và đánh dấu bằng kháng thể kháng phospho-STAT1

Sau khi rửa các tế bào bằng PBS 1X, viên tế bào được tạo hỗn dịch lần nữa trong 100µl PBS 1X được làm lạnh trong nước đá và 900µl metanol 100% được làm lạnh trong nước đá được bổ sung vào. Sau đó, các tế bào được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút để làm thấm.

Các tế bào được làm thấm sau đó được rửa bằng PBS 1X chứa BSA 3% và cuối cùng được tạo hỗn dịch lần nữa trong 80µl PBX 1X chứa BSA 3%.

20µL kháng thể đối chứng cùng loại kháng STAT1 của chuột nhắt PE (pY701) hoặc IgG2ak của chuột nhắt PE (BD Biosciences, số lô lần lượt là 612564 và 559319) được bổ sung vào và được trộn, sau đó được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C, ở chỗ tối.

Sau đó, các tế bào được rửa một lần bằng PBS 1X và được phân tích bằng máy đếm tế bào dòng FACSCanto II (BD Biosciences).

2.4.2.1.4 Phân tích phát huỳnh quang bằng máy FACSCanto II

Tổng cộng 50.000 lần được đếm và các tế bào dương tính với phospho-STAT1 được xác định sau khi bám trên các tế bào CD4+, trong cửa lymphô bào. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FACSDiva và phần trăm tác dụng ức chế kích thích IL-6 được tính theo phần trăm các tế bào dương tính đối với phospho-STAT1 trên các tế bào CD4+.

2.4.2.2 Thử nghiệm phospho-STAT5

Để tăng sự phosphoryl hóa của chất truyền tín hiệu và chất hoạt hóa quá trình phiên mã 5 (pSTAT5) được kích thích bởi GM-CSF trong tế bào bạch cầu, máu toàn phần của người được lấy từ tình nguyện viên là những người tự nguyện cho máu, được xử lý *ex vivo* bằng hợp chất trong 30 phút và sau đó được kích thích trong thời gian 20 phút bằng GM-CSF. Việc tăng sự phosphoryl hóa của STAT5 bởi GM-CSF trong các bạch cầu đơn nhân được xác định bằng cách sử dụng kháng thể kháng phospho-STAT5 bằng FACS.

Dung dịch đệm Lyse/Fix 5X (BD PhosFlow, số lô 558049) được pha loãng 5 lần bằng nước cất và được làm ấm sẵn ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch đệm Lyse/Fix đã pha loãng còn lại được bỏ đi.

Hòa tan 10µg rhGM-CSF (AbCys S.A., số lô P300-03) trong 100µl PBS 0,1% BSA để thu được 100µg/ml dung dịch gốc. Dung dịch gốc được bảo quản từng phần ở nhiệt độ -80°C.

Chuỗi pha loãng 3 lần của hợp chất được chuẩn bị trong DMSO (10mM dung dịch gốc). Mẫu được xử lý bằng đối chứng nhận DMSO mà không có hợp chất thử nghiệm. Tất cả các mẫu được ủ với nồng độ DMSO cuối cùng bằng 1%.

2.4.2.2.1 Ủ máu với hợp chất và kích thích bằng GM-CSF

Máu người được thu gom trong ống heparini hóa. Máu được chia thành các phần với thể tích 148,5µl. Sau đó, 1,5µl hợp chất pha loãng được bổ sung vào mỗi phần và các mẫu máu được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C dưới điều kiện rung nhẹ. Dung dịch gốc GM-CSF (1,5µl) được bổ sung vào các mẫu máu (nồng độ cuối cùng

20pg/ml) và mẫu được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 20 phút dưới điều kiện rung nhẹ.

2.4.2.2.2 Chuẩn bị tế bào bạch cầu và đánh dấu CD14

Tại thời điểm kết thúc quá trình kích thích, 3ml dung dịch đệm Lyse/Fix 1X được làm ấm sẵn ngay lập tức được bổ sung vào các mẫu máu, được tạo xoáy nhanh và được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ 37°C trong bể nước để dung giải các tế bào hồng cầu và cố định bạch cầu, sau đó làm đông lạnh ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng tiếp.

Đối với các bước sau đó, ống được làm tan băng ở nhiệt độ 37°C trong thời gian khoảng 20 phút và được ly tâm trong thời gian 5 phút với lực ly tâm 400xg ở nhiệt độ 4°C. Viên tế bào được rửa bằng 3ml PBS 1X lạnh, và sau khi ly tâm viên tế bào được tạo hỗn dịch lần nữa trong 100µl PBS chứa BSA 3%. Kháng thể kháng CD14 của chuột nhắt FITC (BD Biosciences, số lô 345784) hoặc kháng thể cùng loại IgG2bk của chuột nhắt FITC đối chứng (BD Biosciences, số lô 555057) được bổ sung vào và được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng, ở chỗ tối.

2.4.2.2.3 Thẩm tế bào và đánh dấu bằng kháng thể kháng phospho-STAT5

Sau khi rửa các tế bào bằng PBS 1X, viên tế bào được tạo hỗn dịch lần nữa trong 100µl PBS 1X được làm lạnh bằng nước đá và bổ sung 900µl metanol 100% được làm lạnh bằng nước đá. Sau đó, các tế bào được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút để làm thẩm.

Sau đó, các tế bào đã thẩm được rửa bằng PBS 1X chứa BSA 3% và cuối cùng tạo hỗn dịch lần nữa trong 80µl PBX 1X chứa BSA 3%.

20µL kháng thể đối chứng cùng loại kháng STAT5 của chuột nhắt PE (pY694) hoặc IgG1κ của chuột nhắt PE (BD Biosciences, số lô lần lượt là 612567 và 554680) được bổ sung vào, được trộn, sau đó, được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C, ở chỗ tối.

Sau đó, các tế bào được rửa một lần bằng PBS 1X và được phân tích bằng máy đếm tế bào dòng FACSCanto II (BD Biosciences).

2.4.2.2.4 Phân tích sự phát huỳnh quang trên FACSCanto II

Tổng cộng 50.000 lần được đếm và các tế bào dương tính với phospho-STAT5 được xác định sau khi bấm trên các tế bào CD14+. Số liệu được phân tích bằng cách

sử dụng phần mềm FACSDiva và tương ứng với phần trăm ức chế sự kích thích của GM-CSF được tính trên phần trăm các tế bào dương tính đối với phospho-STAT5 trên các tế bào CD14+.

2.4.2.2 Kết quả

Khi sử dụng quy trình này, phần trăm ức chế (PIN) thu được từ giá trị trung bình của 3 tình nguyện viên khỏe mạnh được xác định cho mỗi hợp chất thử nghiệm. Ví dụ, hợp chất 1 được thử nghiệm và có $pIC_{50} = 6,08$ trong việc ức chế quá trình phosphoryl hóa STAT1.

Ví dụ 3. Mô hình *in vivo*

Ví dụ 3.1 Mô hình CIA

3.1.1 Nguyên liệu

Tá dược Freund hoàn toàn (CFA) và tá dược Freund không hoàn toàn (IFA) được mua từ Difco. Collagen loại II của bò (CII), lipopolysaccharit (LPS), và Enbrel được mua từ Chondrex (Isle d'Abeau, France); Sigma (P4252, L'Isle d'Abeau, France), Whyett (xy lanh tiêm 25mg, France), Acros Organics (Palo Alto, CA) tương ứng. Tất cả các chất phản ứng khác được sử dụng là thuộc loại chất phản ứng và tất cả dung môi đều thuộc loại dùng để phân tích.

3.1.2 Động vật

Chuột cống Agouti đen (đực, 7-8 tuần tuổi) được mua từ Harlan Laboratories (Maison-Alfort, France). Các con chuột cống được giữ trong chu kỳ sáng/tối 12 giờ (07:00 – 19:00). Nhiệt độ được duy trì ở 22°C, và thức ăn và nước được cung cấp tùy ý.

3.1.3 Bệnh viêm khớp gây ra bởi collagen (CIA)

Một ngày trước khi tiến hành thử nghiệm, dung dịch CII (2mg/ml) được chuẩn bị với axit axetic 0,05 M và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Ngay trước khi chủng ngừa, các thể tích tá dược bằng nhau (IFA) và CII được trộn bằng máy trộn đồng nhất trong chai thủy tinh được làm mát sẵn trong bể nước đá. Có thể cần một lượng dư tá dược và làm đồng nhất kéo dài nếu nhũ tương chưa được tạo thành. 0,2ml nhũ tương được tiêm vào da ở chóp đuôi của mỗi con chuột vào ngày 1, liều tăng cường thứ hai

được tiêm vào da (dung dịch CII có nồng độ 2mg/ml trong CFA 0,1ml nước muối) được tiến hành vào ngày 9. Phương pháp chủng ngừa này được cải biến từ các phương pháp đã được công bố (Sims *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 2005).

3.1.4 Thiết kế thử nghiệm

Tác dụng trị liệu của hợp chất được thử nghiệm bằng mô hình CIA chuột cống. Các con chuột cống được chia ngẫu nhiên thành các nhóm bằng nhau và mỗi nhóm gồm 10 con. Tất cả các con chuột cống đều được chủng ngừa vào ngày 1 và được tăng liều vào ngày 9. Liều lượng trị liệu kéo dài từ ngày 16 đến ngày 30. Nhóm đối chứng âm được điều trị bằng chất dẫn thuốc (MC 0,5%) và nhóm đối chứng dương được điều trị bằng Enbrel (10mg/kg, 3 lần một tuần, dưới da). Hợp chất được quan tâm thường được kiểm tra với 3 liều, ví dụ 3, 10, 30mg/kg, qua đường miệng.

3.1.5 Đánh giá lâm sàng bệnh viêm khớp

Bệnh viêm khớp được tính điểm theo phương pháp của Khachigian 2006, Lin *et al.* 2007 và Nishida *et al.* 2004). Việc sưng lên ở một trong bốn chân được phân loại theo mức độ viêm khớp như sau: 0-không có triệu chứng; 1-nhẹ, nhưng có vết tấy đỏ xác định và sưng một loại khớp như mắt cá chân hoặc cổ chân, hoặc xuất hiện vết tấy đỏ và sưng chỉ giới hạn ở ngón chân riêng rẽ, không liên quan đến số lượng ngón chân bị ảnh hưởng; 2-vết tấy đỏ trung bình và vị trí sưng xuất hiện ở hai hoặc hơn hai loại khớp; 3-vết tấy đỏ mạnh và sưng toàn bộ chân bao gồm ngón chân; 4-chỉ bị viêm tối đa liên quan đến nhiều khớp (điểm số viêm khớp lâm sàng tích tụ tối đa là mức 16 ở mỗi con vật) (Nishida *et al.*, 2004).

Để cho phép phân tích chi tiết nhiều thử nghiệm, các giá trị điểm số lâm sàng được chuẩn hóa như sau:

AUC của điểm số lâm sàng (điểm số AUC): Phần diện tích dưới đường cong (AUC) từ ngày 1 đến ngày 14 được tính toán đối với mỗi con chuột cống cụ thể. AUC của mỗi con vật được chia cho giá trị AUC trung bình thu được từ nhóm dùng chất dẫn thuốc trong thử nghiệm mà số liệu về con vật này được thu và nhân với 100 (tức là AUC được biểu hiện dưới dạng phần trăm AUC của chất dẫn thuốc trung bình trong mỗi thử nghiệm).

Điểm số lâm sàng tăng từ ngày 1 đến ngày 14 (điểm số điểm cuối): Hiệu số về

điểm số lâm sàng đối với mỗi con vật được chia cho hiệu số về điểm số lâm sàng trung bình thu được đối với chất dẫn thuốc trong thử nghiệm mà số liệu về con vật này được thu và nhân với 100 (tức là hiệu số được biểu diễn dưới dạng phần trăm của hiệu số về điểm số lâm sàng trung bình đối với chất dẫn thuốc trong mỗi thử nghiệm).

3.1.6 Thay đổi cân nặng (%) sau khi khởi phát bệnh viêm khớp

Về mặt lâm sàng, việc sụt cân là có liên quan đến bệnh viêm khớp (Shelton *et al.*, 2005; Argiles *et al.*, 1998; Rall, 2004; Walsmith *et al.*, 2004). Do đó, sự thay đổi cân nặng sau khi khởi phát bệnh viêm khớp có thể được sử dụng làm điểm cuối không đặc thù để đánh giá mức độ hiệu quả trị liệu ở mô hình chuột cống. Sự thay đổi cân nặng (%) sau khi khởi phát bệnh viêm khớp được tính toán như sau:

$$\text{Chuột nhắt: } \frac{\text{Cân nặng (tuần 6)} - \text{Cân nặng (tuần 5)}}{\text{Cân nặng (tuần 5)}} \times 100\%$$

$$\text{Chuột cống: } \frac{\text{Cân nặng (tuần 4)} - \text{Cân nặng (tuần 3)}}{\text{Cân nặng (tuần 3)}} \times 100\%$$

3.1.7 Phóng xạ học

Ảnh chụp bằng tia X được chụp ở chân sau của mỗi con vật riêng rẽ. Số nhận diện điểm mù ngẫu nhiên được gán cho mỗi ảnh, và mức độ nghiêm trọng của quá trình ăn mòn xương được phân loại dựa trên hai điểm số độc lập với hệ điểm số Larsen phóng xạ như sau: 0-bình thường không ảnh hưởng đến hình thái xương bên ngoài và khoảng trống giữa các khớp bình thường; 1-bất thường nhẹ với một hoặc hai xương bàn chân bên ngoài thể hiện sự ăn mòn xương nhẹ; 2-sự bất thường sớm rõ ràng với ba đến năm xương bàn chân bên ngoài thể hiện sự ăn mòn xương; 3-thoái hóa xương bất thường ở mức trung bình với tất cả xương bàn chân bên ngoài cũng như một hoặc hai xương bàn chân bên trong thể hiện sự ăn mòn xương rõ ràng; 4-thoái hóa xương bất thường ở mức nghiêm trọng với toàn bộ xương bàn chân thể hiện sự ăn mòn xương rõ ràng và ít nhất một trong số các khớp khối xương bàn chân bên trong bị ăn mòn hoàn toàn khiến cho hình hài của khớp xương chỉ được bảo toàn một phần; 5-tổn thương bất thường không còn hình hài của xương. Hệ điểm số này là cải biến từ hệ điểm số của Salvemini *et al.*, 2001; Bush *et al.*, 2002; Sims *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 2005.

3.1.8 Mô học

Sau khi phân tích phóng xạ học, chân sau của chuột nhắt được cố định trong

formalin đệm phosphat 10% (độ pH bằng 7,4), được tách canxi bằng chất tách canxi xương nhanh để nghiên cứu mô nguyên chất (Laboratories Eurobio) và được gắn ngập trong parafin. Để đảm bảo đánh giá khớp viêm một cách chuyên sâu, ít nhất bốn phần cắt nối tiếp (độ dày 5 μ m) được cắt và một loạt các phần cắt này dài 100 μ m. Các phần cắt này được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H&E). Các xét nghiệm mô học đối với sự viêm hoạt dịch và xương và tổn thương sụn được tiến hành mù đôi. Trong mỗi chân, bốn thông số được đánh giá bằng cách sử dụng thang bốn điểm. Các thông số này là độ thâm nhiễm tế bào, độ nghiêm trọng qua dịch rỉ viêm khớp, độ ăn mòn sụn và độ ăn mòn xương. Việc tính điểm được tiến hành như sau: 1-bình thường, 2-nhẹ, 3-trung bình, 4-đáng chú ý. Bốn điểm số này được cộng với nhau và được thể hiện như điểm số bổ sung, tức là 'điểm số tổng RA'.

3.1.9 Phân tích chụp vi cắt lớp bằng máy tính (μ CT) xương gót (xương gót chân):

Quá trình thoái hóa xương được quan sát trong RA đặc biệt xảy ra ở xương sọ và có thể được thể hiện bằng phân tích μ CT (Sims NA *et al.*, Arthritis Rheum. 50 (2004) 2338-2346: Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis; Oste L *et al.*, ECTC Montreal 2007: A high throughput method of measuring bone architectural disturbance in a murin CIA model by micro-CT morphometry). Sau khi quét và xây dựng lại bằng hình ảnh 3D của xương gót, quá trình thoái hóa xương được xác định trên số lượng chỗ rời rạc có mặt trên mỗi tấm kính, được phân lập trong *silico* vuông góc với trục dọc của xương. Càng nhiều xương bị thoái hóa, thì càng có nhiều chỗ rời rạc được xác định. Phân tích 1000 lát, được phân bố đồng đều dọc theo xương gót (với khoảng cách bằng khoảng 10,8 μ m).

3.1.10 Trạng thái ổn định PK

Tại ngày thứ 7 hoặc 11, các mẫu máu được thu gom ở xoang hốc mắt với lithi heparin là chất chống đông tại các thời điểm sau: trước khi dùng liều, 1, 3 và 6 giờ. Mẫu máu toàn phần được ly tâm và mẫu huyết tương thu được được bảo quản ở nhiệt độ -20°C để phân tích. Nồng độ huyết tương của mỗi hợp chất thử nghiệm được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS trong đó khối phổ kế được vận hành ở chế độ phun điện tử dương. Các thông số được động học được tính toán bằng cách sử dụng Winnonlin® (Pharsight®, United State) và giả thiết rằng nồng độ huyết tương trước

khi dùng liều bằng nồng độ huyết tương tại thời điểm 24 giờ.

Bảng V dưới đây tổng hợp kết quả thu được từ một số thông số PK, đối với hợp chất theo sáng chế và ví dụ so sánh, minh họa các tính chất PK được cải thiện (ví dụ, $C_{tối\ da}$, $T_{1/2}$) của hợp chất theo sáng chế.

Bảng V

		Hợp chất 1 Dùng qua đường miệng (mg/kg/ngày)						Hợp chất 2 Dùng qua đường miệng (mg/kg/ngày)	
		0,1	0,3	1	3	10	30	10	30
$C_{tối\ da}$	(ng/ml)	5,18	19,3	102	363	1,167	3,805	867	2630
$T_{tối\ da}$	(giờ)	3	1	1	1	1	1	1	1
AUC(0-24 giờ)	(ng.giờ/ml)	30	163	931	1,932	7,172	27,767	2019	7809
$T_{1/2}$	(giờ)	NC	NC	3,6	5,6	4,5	3,9	1,17	3,36

3.1.11 Kết quả

Bảng VI dưới đây tổng hợp kết quả thu được từ hợp chất 1 và 2 trong mô hình CIA chuột cống, “*” thể hiện sự cải thiện có ý nghĩa về mặt thống kê về điểm số, p bằng 0,05 so với đối chứng không được xử lý.

Bảng VI

Hợp chất	Liều lượng (mg/kg/ngày)	Đánh giá lâm sàng [§]		Sung chân	Điểm số Larsen
		Điểm số điểm cuối	Điểm số AUC		
Hợp chất 1	0,1	*	*		
	0,3	*	*	*	
	1	*	*	*	
	3	*	*	*	*
Hợp chất 2	10	*			
	30	*		*	*

§ - “Điểm số lâm sàng” được dùng để chỉ điểm số AUC được chuẩn hóa/điểm số điểm cuối được chuẩn hóa thu được từ hợp chất 1, và điểm số AUC/điểm số điểm cuối của hợp chất 2.

Hợp chất 1 thể hiện sự cải thiện có ý nghĩa về mặt thống kê về điểm số lâm sàng được chuẩn hóa (được tính toán theo AUC hoặc sự khác nhau từ ngày 1 đến ngày 14) với liều lượng bằng 0,1mg/kg. Ngoài ra, sự tăng có ý nghĩa về mặt thống kê ở kết quả về mức độ sung chân và về điểm số Larsen được quan sát ở các liều lượng lần lượt

bằng 0,3mg/kg và 3mg/kg. Ngược lại, hợp chất 2 thể hiện sự cải thiện có ý nghĩa về mặt thống kê chỉ ở giá trị điểm số lâm sàng được chuẩn hóa (vào ngày 14) với liều lượng bằng 10mg/kg. Ngoài ra, sự tăng có ý nghĩa về mặt thống kê ở kết quả về mức độ sưng chân và về điểm số Larsen được quan sát ở liều lượng bằng 30mg/kg. Do vậy, hợp chất 1 thể hiện sự cải thiện hiệu lực gấp 100 lần so với hợp chất 2 khi các liều lượng dùng qua đường miệng được so sánh. Cụ thể, với liều lượng bằng 3mg/kg đối với hợp chất 1, sự cải thiện có ý nghĩa về mặt thống kê được quan sát thấy trong tất cả các giá trị đo được, tuy nhiên, liều của hợp chất 2 cao hơn đã tạo ra sự cải thiện có ý nghĩa về mặt thống kê chỉ ở điểm số lâm sàng. Sự cải thiện hoạt lực *in vivo* không được cho là do sự tiếp xúc với hợp chất tăng vì có thể thấy rằng AUC (từ 0 đến 24 giờ) thấp hơn so với hợp chất 1 ở liều lượng bằng 0,1, 0,3 và 1mg/kg/ngày so với hợp chất 2 ở liều lượng 10mg/kg/ngày.

Ví dụ 3.2 Mô hình sốc nhiễm khuẩn

Tiêm lipopolysaccharit (LPS) để kích thích sự giải phóng nhanh yếu tố gây hoại tử khối u hòa tan (TNF-alpha) vào thành mạch ngoại vi. Mô hình này được sử dụng để phân tích chất phong bế sau này của sự giải phóng TNF *in vivo*.

Sáu con chuột nhắt cái BALB/cJ (20 g) ở mỗi nhóm được xử lý bằng một liều dự định, qua đường miệng. 30 phút sau, LPS (15µg/kg; kiểu huyết thanh *E. Coli* 0111:B4) được tiêm trong màng bụng. 90 phút sau, chuột nhắt bị giết và máu được thu gom. Nồng độ TNF alpha tuần hoàn được xác định bằng cách sử dụng bộ kit ELISA có bán trên thị trường. Dexamethason (5µg/kg) được sử dụng là hợp chất kháng viêm đối chứng. Hợp chất đã chọn được kiểm tra với một hoặc nhiều liều, ví dụ, 3 và/hoặc 10 và/hoặc 30mg/kg, dùng qua đường miệng

Hợp chất 1, 2 và 10 có tác dụng ở liều bằng 30mg/kg, dùng qua đường miệng.

Ví dụ 3.3 Mô hình MAB

Mô hình MAB cho phép đánh giá nhanh quá trình điều biến đáp ứng viêm RA bằng cách trị liệu (Kachigian LM. Nature Protocols (2006) 2512-2516: Collagen antibody-induced arthritis). Chuột nhắt DBA/J được tiêm trong tĩnh mạch hỗn hợp collagen II kháng trực tiếp mAb. Một ngày sau, bắt đầu điều trị bằng hợp chất (chất dẫn thuốc: 10% (theo thể tích) HPβCD). Ba ngày sau, chuột nhắt được tiêm LPS trong

màng bụng (50µg/chuột nhất), gây khởi phát nhanh chứng viêm. Tiếp tục điều trị bằng hợp chất trong 10 ngày sau khi tiêm mAb. Chứng viêm được biểu lộ bằng cách xác định vết sưng chân và tính điểm số lâm sàng của mỗi chân. Điểm số bệnh viêm khớp lâm sàng tích tụ của bốn chi đã thể hiện mức độ nghiêm trọng của bệnh viêm. Hệ điểm số được áp dụng cho mỗi chi bằng cách sử dụng thang từ 0 đến 4, với mức 4 là viêm nghiêm trọng nhất.

0 Không có triệu chứng

1 Nhẹ, nhưng có vết tấy đỏ xác định và sưng một loại khớp như mắt cá chân hoặc cổ chân, hoặc xuất hiện vết tấy đỏ và sưng chỉ giới hạn ở ngón chân riêng rẽ, không liên quan đến số lượng ngón chân bị ảnh hưởng

2 Vết tấy đỏ trung bình và sưng hai hoặc hơn hai loại khớp

3 Vết tấy đỏ mạnh và sưng toàn bộ chân bao gồm ngón chân

4 Chi bị viêm tối đa liên quan đến nhiều khớp

Ví dụ 3.4 Mô hình ung thư

Mô hình *in vivo* để công nhận hiệu lực của các phân tử nhỏ hướng đến các bệnh tăng sinh tủy xương do JAK2 gây ra được mô tả bởi Wernig *et al.* Cancer Cell 13, 311, 2008 và Geron *et al.* Cancer Cell 13, 321, 2008.

Ví dụ 3.5 Mô hình chuột nhất IBD

Mô hình *in vitro* và *in vivo* để công nhận hiệu lực của các phân tử nhỏ hướng đến IBD được mô tả bởi Wirtz *et al.* 2007.

Ví dụ 3.6 Mô hình bệnh hen ở chuột nhất

Mô hình *in vitro* và *in vivo* để công nhận hiệu lực của phân tử nhỏ hướng đến bệnh hen được mô tả bởi Nials *et al.*, 2008; Ip *et al.* 2006; Pernis *et al.*, 2002; Kudlacz *et al.*, 2008.

Ví dụ 4: Thử nghiệm dược động học, DMPK và độc tính

Ví dụ 4.1 Khả năng hòa tan nhiệt động học

Dung dịch chứa hợp chất thử nghiệm có nồng độ 1mg/ml được điều chế trong dung dịch đệm phosphat 0,2M độ pH bằng 7,4 hoặc dung dịch đệm xitrat 0,1M độ pH

bằng 3,0 ở nhiệt độ trong phòng trong lọ thủy tinh.

Mẫu được quay trong thiết bị quay STR 4 (Stuart Scientific, Bibby) với tốc độ 3,0 ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ.

Sau 24 giờ, 800 μ L mẫu được chuyển vào ống eppendorf và được ly tâm 5 phút với vận tốc bằng 14000 vòng/phút. Sau đó, 200 μ L dịch nổi của mẫu được chuyển đến đĩa MultiscreenR Solubility Plate (Millipore, MSSLBPC50) và dịch nổi được lọc (10-12" Hg) với sự hỗ trợ của ống phân phối chân không vào đĩa có 96 lỗ Greiner polypropylen đáy chữ V sạch (số lô 651201). 5 μ L dịch lọc được pha loãng thành 95 μ L (F20) với cùng dung dịch đệm được sử dụng để ủ trong đĩa này có đường cong chuẩn (Greiner, số lô 651201).

Đường cong chuẩn đối với hợp chất vừa mới được điều chế trong DMSO bắt đầu từ 10mM dung dịch gốc DMSO được pha loãng bằng yếu tố 2 trong DMSO (5000 μ M) và sau đó được pha loãng tiếp trong DMSO đến 19,5 μ M. 3 μ L chuỗi pha loãng bắt đầu từ 5000 μ M sau đó được chuyển tới 97 μ L hỗn hợp axetonitril-dung dịch đệm (50/50). Nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 2,5 đến 150 μ M.

Đĩa này được bọc kín bằng tấm niêm phong (MA96RD-04S, www.kinesis.co.uk) và mẫu được xác định ở nhiệt độ trong phòng bằng LCMS (ZQ 1525 do Waters cung cấp) dưới các điều kiện được tối ưu hóa bằng cách sử dụng Quanoptimize để xác định trọng lượng phân tử thích hợp.

Mẫu được phân tích bằng LCMS với lưu lượng bằng 1ml/phút. Dung môi A là amoniac 15mM và dung môi B là axetonitril. Mẫu được chạy dưới điều kiện phun ion dương trên cột XBridge C18 3,5 μ M (2,1 x 30mm), do Waters cung cấp. Gradient dung môi có tổng thời gian tiến hành là 2 phút và chứa chất B với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 95%.

Diện tích đỉnh được phân tích với sự hỗ trợ của gói phần mềm Masslynx và diện tích đỉnh của mẫu được lập đồ thị dưới dạng đường cong chuẩn để thu được khả năng hòa tan của hợp chất.

Các giá trị về khả năng hòa tan được báo cáo theo đơn vị μ M hoặc μ g/ml.

Ví dụ 4.2 Khả năng hòa tan trong nước

Bắt đầu từ dung dịch gốc DMSO 10mM, dung dịch pha loãng theo chuỗi của

hợp chất được chuẩn bị trong DMSO. Chuỗi pha loãng được chuyển sang đĩa có 96 lỗ NUNC Maxisorb đáy chữ F (số lô 442404) và bổ sung dung dịch đệm phosphat 0,2M, độ pH bằng 7,4 hoặc dung dịch đệm xitrat 0,1M, độ pH bằng 3,0 ở nhiệt độ trong phòng.

Nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 200 μ M đến 2,5 μ M trong 5 bước pha loãng bằng nhau. Nồng độ DMSO cuối cùng không vượt quá 2%. Bổ sung pyren 200 μ M vào các điểm ở góc của mỗi đĩa có 96 lỗ và sử dụng làm vị trí đối chứng để căn chỉnh trục Z trên kính hiển vi.

Các đĩa thử nghiệm được bọc kín và được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C đồng thời được lắc với vận tốc 230 vòng/phút. Sau đó, các đĩa này được quét dưới kính hiển vi ánh sáng trắng, thu được các ảnh riêng rẽ của chất kết tủa ở mỗi nồng độ. Chất kết tủa được phân tích và được chuyển thành số và được vẽ trên đồ thị. Nồng độ thứ nhất tại đó hợp chất được hòa tan hoàn toàn là nồng độ được báo cáo dưới đây, tuy nhiên nồng độ thực tế lại nằm giữa nồng độ này và nồng độ ở bước pha loãng cao hơn.

Giá trị hòa tan được tính theo μ g/ml

Bảng VII

Hợp chất số	Độ pH bằng 3,0 (μ g/ml)	Độ pH bằng 7,4 (μ g/ml)
1	>85	>85
2	>38	>38
10	>87,9	>87,9

Ví dụ 4.3 Gắn kết protein huyết tương (Thẩm tách cân bằng)

Dung dịch gốc 10mM của hợp chất trong DMSO được pha loãng bằng yếu tố 5 trong DMSO. Dung dịch này được pha loãng tiếp trong huyết tương vừa được làm tan của người, chuột cống, chuột nhắt hoặc chó (BioReclamation INC) với nồng độ cuối cùng bằng 10 μ M và nồng độ DMSO cuối cùng bằng 0,5% (5,5 μ L trong 1094,5 μ L huyết tương trong đĩa 96 lỗ PP-Masterblock (Greiner, số lô 780285)).

Đĩa Pierce Red Device với vật chèn (ThermoScientific, số lô 89809) được chuẩn bị và được nạp đầy 750 μ L PBS trong buồng dung dịch đệm và 500 μ L huyết tương trong buồng chứa huyết tương. Đĩa này được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C trong khi được lắc với vận tốc 230 vòng/phút. Sau khi ủ, 120 μ L của hai buồng được

chuyển vào 360 μ L axetonitril ở trong đĩa có 96 lỗ đáy tròn, PP lỗ sâu (Nunc, số lô 278743) và bọc kín bằng nắp lõi nhôm. Mẫu được trộn và được đặt trên đá trong 30 phút. Sau đó, các đĩa này được ly tâm 30 phút ở vận tốc 1200 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C và dịch nổi được chuyển tới đĩa PP 96 lỗ đáy chữ V (Greiner, 651201) để phân tích bằng LCMS.

Các đĩa được bọc kín bằng tấm niêm phong (MA96RD-04S) được mô tả trên www.kinesis.co.uk và mẫu được xác định ở nhiệt độ trong phòng bằng LCMS (ZQ 1525 do Waters cung cấp) dưới các điều kiện được tối ưu hóa bằng cách sử dụng thiết bị Quanoptimize để xác định khối lượng phân tử thích hợp.

Mẫu được phân tích bằng LCMS với lưu lượng bằng 1ml/phút. Dung môi A là amoniac 15mM và dung môi B là axetonitril. Mẫu được chạy dưới điều kiện phun ion dương trên cột XBridge C18 3,5 μ M (2,1 x 30mm), do Waters cung cấp. Gradient dung môi có tổng thời gian tiến hành là 2 phút và chứa chất B với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 95%.

Diện tích đỉnh của hợp chất trong buồng chứa dung dịch đệm và buồng chứa huyết tương được coi là 100% hợp chất. Phần trăm gắn kết với huyết tương thu được từ những kết quả này và được báo cáo là phần trăm gắn kết với huyết tương.

Khả năng hòa tan của hợp chất trong nồng độ thử nghiệm cuối cùng trong PBS được kiểm tra bằng kính hiển vi để nhận biết được có xuất hiện kết tủa hay không.

Bảng VIII

Hợp chất số	Người (%)	Chuột cống (%)
1	76,4	65,7
2	70,5	64,5
10	n/a	51
11	91,25	76,5

Ví dụ 4.4 Độ ổn định vi thể

Dung dịch gốc 10mM của hợp chất trong DMSO được pha loãng 1000 lần trong dung dịch đệm phosphat 182mM độ pH bằng 7,4 trong đĩa có 96 lỗ đáy sâu (Greiner, số lô 780285) và được ủ trước ở nhiệt độ 37°C.

40 μ L nước đã khử ion được bổ sung vào lỗ của ống bảo quản được đánh dấu mã vạch polypropylen Matrix 2D (Thermo Scientific) và được ủ sẵn ở nhiệt độ 37°C.

Dung dịch gốc glucoza-6-phosphat-dehydroaza (G6PDH) được chuẩn bị trong 182mM dung dịch đệm phosphat có độ pH 7,4 và được đặt trên nước đá trước khi sử dụng. Yếu tố cùng tác động chứa $MgCl_2$, glucoza-6-phosphat và $NADP^+$ được điều chế trong nước đã khử ion và được đặt trên nước đá trước khi sử dụng.

Dung dịch xử lý cuối cùng chứa vi thể tế bào gan (Xenotech) của loài được quan tâm (người, chuột nhắt, chuột cống, chó), G6PDH được mô tả trước đó và yếu tố cùng tác động được điều chế và hỗn hợp này được ủ trong thời gian không lâu hơn 20 phút ở nhiệt độ trong phòng.

Bổ sung 30 μ L hợp chất pha loãng được gia nhiệt từ trước vào 40 μ L nước gia nhiệt từ trước trong ống Matrix và bổ sung 30 μ L hỗn hợp vi thể. Nồng độ phản ứng cuối cùng chứa 3 μ M hợp chất, 1mg vi thể, 0,4U/ml G6PDH, 3,3mM $MgCl_2$, 3,3mM glucoza-6-phosphat và 1,3mM $NADP^+$.

Để xác định phần trăm còn lại của hợp chất tại thời điểm 0, bổ sung MeOH hoặc ACN (với tỷ lệ 1:1) vào lỗ trước khi bổ sung hỗn hợp vi thể. Đĩa này được bọc kín bằng Matrix Sepra sealsTM (Matrix, số lô 4464) và lắc vài giây để đảm bảo tất cả các thành phần được trộn lẫn hoàn toàn.

Mẫu chưa ngừng phản ứng sẽ được ủ ở nhiệt độ 37°C, ly tâm 300 vòng/phút và sau 1 giờ ủ, phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung MeOH hoặc ACN (1:1).

Sau khi ngừng phản ứng, mẫu được trộn và được đặt trên nước đá trong 30 phút để kết tủa protein. Sau đó, các đĩa này được ly tâm 30 phút ở lực ly tâm 1200 rcf ở nhiệt độ 4°C và dịch nổi được chuyển đến đĩa có 96 lỗ PP đáy chữ V (Greiner, 651201) để phân tích bằng LCMS.

Các đĩa này được bọc kín bằng tấm niêm phong (MA96RD-04S) được mô tả trên www.kinesis.co.uk và mẫu được xác định ở nhiệt độ trong phòng bằng LCMS (ZQ 1525 do Waters cung cấp) dưới các điều kiện được tối ưu hóa bằng cách sử dụng thiết bị Quanoptimize để xác định khối lượng thích hợp của phân tử gốc.

Mẫu được phân tích bằng LCMS với lưu lượng 1ml/phút. Dung môi A là amoniac 15mM và dung môi B là metanol hoặc axetonitril, phụ thuộc vào dung dịch ngừng phản ứng được sử dụng. Mẫu được chạy dưới điều kiện phun ion dương trên cột XBridge C18 3,5 μ M (2,1 x 30mm), do Waters cung cấp. Gradient dung môi có tổng

thời gian tiến hành là 2 phút và chứa chất B với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 95%.

Diện tích đỉnh từ hợp chất gốc tại thời điểm 0 được coi là còn lại 100%. Phần trăm còn lại sau 1 giờ ủ được tính toán từ thời điểm 0 và được tính là phần trăm còn lại. Khả năng hòa tan của hợp chất trong nồng độ thử nghiệm cuối cùng trong dung dịch đệm được kiểm tra bằng kính hiển vi và kết quả được báo cáo.

Số liệu độ ổn định vi thể được biểu diễn dưới dạng phần trăm tổng lượng hợp chất còn lại sau 60 phút.

Bảng IX

Hợp chất số	Người (%)	Chuột cống (%)
1	87,2	65,6
2	73	38
10	102	89
11	51	26

Ví dụ 4.5 Độ thâm Caco2

Tiến hành thử nghiệm Caco-2 hai hướng như được nêu dưới đây. Các tế bào Caco-2 mua được từ European Collection of Cell Cultures (ECACC, số lô 86010202) và được sử dụng sau khi nuôi cấy tế bào 21 ngày trong các đĩa Transwell 24 lỗ (Fisher TKT-545-020B).

2×10^5 tế bào/lỗ được nuôi trong môi trường nuôi cấy chứa DMEM + GlutaMAXI + 1% NEAA + 10% FBS (FetalClone II) + 1% Pen/Strep. Cứ 2 đến 3 ngày môi trường lại được thay đổi.

Hợp chất thử nghiệm và đối chứng (propranolol và rhodamin123 hoặc vinblastin tất cả được mua từ Sigma) được chuẩn bị trong dung dịch muối được làm cân bằng của Hank chứa 25mM HEPES (độ pH bằng 7,4) và được bổ sung trên các khoang bề mặt (125 μ L) hoặc các khoang dưới nền (600 μ L) của đĩa Transwell lắp ghép ở nồng độ bằng 10 μ M với nồng độ DMSO cuối cùng bằng 0,25%.

Bổ sung 50 μ M Lucifer Yellow (Sigma) vào dung dịch đệm cho ở tất cả các lỗ để đánh giá tính nguyên vẹn của các lớp tế bào bằng cách giám sát sự thâm hút của Lucifer Yellow. Do Lucifer Yellow (LY) không thể thấm tự do qua lớp cản ưa chất béo, mức độ di chuyển LY cao cho thấy tính nguyên vẹn của lớp tế bào kém.

Sau khi ủ 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong khi lắc bằng máy lắc theo quỹ đạo ở tốc độ 150 vòng/phút, các phần có thể tích 70µL được lấy từ cả trên các khoang bề mặt (A) và khoang nền (B) và được bổ sung 100µL dung dịch 50:50 axetonitril: nước chứa chất chuẩn nội phân tích (0,5µM carbamazepin) trong đĩa có 96 lỗ.

Lucifer Yellow được xác định bằng Spectramax Gemini XS (Ex 426nm và Em 538nm) trong đĩa có 96 lỗ sạch chứa 150µL chất lỏng thu được từ phần dưới nền và phần bề mặt.

Nồng độ hợp chất trong các mẫu được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao /khối phổ (LC-MS/MS).

Các giá trị độ thấm biểu kiến ($P_{\text{biểu kiến}}$) được tính toán bằng công thức sau:

$$P_{\text{biểu kiến}} = \frac{[\text{hợp chất}]_{\text{chất nhận cuối cùng}} \times V_{\text{chất nhận}}}{([\text{hợp chất}]_{\text{chất cho ban đầu}} \times V_{\text{chất cho}}) / T_{\text{ủ}} \times V_{\text{chất cho}} / \text{diện tích bề mặt} \times 60 \times 10^{-6} \text{ cm/giây}}$$

V = thể tích khoang

$T_{\text{ủ}}$ = thời gian ủ

Diện tích bề mặt = 0,33cm²

Tỷ lệ thoát ra, là chỉ sự thoát ra chủ động từ bề mặt tế bào trên mặt, được tính toán bằng cách sử dụng tỷ lệ $P_{\text{biểu kiến B>A}} / P_{\text{biểu kiến A>B}}$.

Các tiêu chuẩn chấp nhận được về mặt thử nghiệm dưới đây được sử dụng:

Propranolol: giá trị $P_{\text{biểu kiến (A>B)}} \geq 20 (\times 10^{-6} \text{ cm/giây})$

Rhodamin 123 hoặc Vinblastin: giá trị $P_{\text{biểu kiến (A>B)}} < 5 (\times 10^{-6} \text{ cm/giây})$ với tỷ lệ thoát ra ≥ 5 .

Độ thấm Lucifer Yellow: $\leq 100 \text{ nm/giây}$

Bảng X

Hợp chất số	$P_{\text{biểu kiến A>B}}$ ($\times 10^{-6} \text{ cm/giây}$)	Tỷ lệ thoát ra
1	3,33	15,7
2	25	0,95
10	0,05	97,6
11	36,5	0,9

Ví dụ 4.6 Thử nghiệm được động học ở loài gặm nhấm

4.6.1 Động vật

Chuột cống Sprague-Dawley (đực, từ 5 đến 6 tuần tuổi) mua được từ Janvier (France). Các con chuột cống được cho thích nghi trong thời gian ít nhất 7 ngày trước khi điều trị và được giữ trong chu kỳ sáng/tối 12 giờ (07:00 – 19:00). Nhiệt độ được duy trì ở xấp xỉ 22°C, và thức ăn và nước được cung cấp tùy ý. Hai ngày trước khi dùng hợp chất 1 và 2, chuột cống được phẫu thuật để đặt ống thông trong tĩnh mạch cổ trong điều kiện gây mê bằng isofluran. Sau khi phẫu thuật, chuột cống được nhốt riêng rẽ. Các con chuột cống bị bỏ đói ít nhất 16 giờ trước khi cho dùng liều qua đường miệng và 6 giờ sau đó. Nước được cung cấp tùy ý.

4.6.2 Thử nghiệm dược động học

Hợp chất được bào chế trong PEG200/nước muối sinh lý (60/40) để dùng qua tĩnh mạch và trong 0,5% metylxenuloza (hợp chất 1 và 2) và hydroxylpropyl- β -cyclodextrin 10% độ pH bằng 3 (hợp chất 11) để dùng qua đường miệng. Hợp chất thử nghiệm được dùng qua đường miệng bằng một ống xông thực quản với lượng 5mg/kg với thể tích liều lượng bằng 5 ml/kg và được dùng liều trong tĩnh mạch dưới dạng tiêm nhanh một liều thuốc qua tĩnh mạch đuôi với lượng 1mg/kg dưới thể tích liều lượng bằng 5ml/kg. Mỗi nhóm gồm 3 con chuột cống. Đối với hợp chất 1 và 2, các mẫu máu được thu qua tĩnh mạch cổ với lithi heparin là chất chống đông tại các thời điểm sau: 0,05, 0,25, 0,5, 1, 3, 5 và 8 giờ (trong tĩnh mạch), và 0,25, 0,5, 1, 3, 5, 8 và 24 giờ (qua đường miệng). Đối với hợp chất 11, các mẫu máu được thu ở xoang hốc mắt với lithi heparin là chất chống đông tại các thời điểm sau: 0,25, 1, 3 và 6 giờ (qua đường miệng). Mẫu máu toàn phần được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút và mẫu huyết tương thu được được bảo quản ở nhiệt độ -20°C để phân tích.

4.6.3 Định lượng nồng độ hợp chất trong huyết tương

Nồng độ huyết tương của mỗi hợp chất thử nghiệm được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS trong đó khối phổ kế được vận hành ở chế độ phun điện tử dương.

4.6.4 Xác định các thông số dược động học

Các thông số dược động học được tính toán bằng cách sử dụng Winnonlin® (Pharsight®, United States).

Bảng XI

	Hợp chất 1		Hợp chất 2		Hợp chất 11
	Dùng trong tĩnh mạch 1mg/kg (n=3)	Dùng qua đường miệng 5mg/kg (n=3)	Dùng trong tĩnh mạch 1mg/kg (n=3)	Dùng qua đường miệng 5mg/kg (n=3)	Dùng qua đường miệng 5mg/kg (n=3)
C ₀ hoặc C _{tối đa} (ng/ml)	1407 (28)	310 (33)	863 (4)	1320 (42)	547 (8)
T _{tối đa} (giờ)		2,2 [0,5-5]		0,33 [0,25-0,5]	0,25 [0,25-0,25]
AUC(0-z) (ng.giờ/ml)	722 (2)	1429 (24)	470 (5)	1437 (33)	690 (23)
AUC (0-24 giờ) (ng.giờ/ml)	739 (2)	1681 (8)	474 (5)	1465 (30)	
Cl	1,35 (2)		2,12 (5)		
V _{ss}	1,76 (3)		1,46 (4)		
T _{1/2}	1,6 (3)		0,74 (8)	0,92 (57)	0,92 (7)
F (%)	45		62		

Ví dụ 4.7 Thử nghiệm độc tính trong 7 ngày ở chuột cống

Thử nghiệm độc tính trong 7 ngày dùng qua đường miệng bằng hợp chất thử nghiệm được tiến hành ở các con chuột cống đực Sprague-Dawley để đánh giá khả năng gây độc và động học của chất độc của chúng, với liều lượng hàng ngày bằng 100, 300 và 500mg/kg/ngày, bằng ống xông, với liều lượng-thể tích không đổi bằng 5ml/kg/ngày.

Hợp chất thử nghiệm được bào chế trong HPβCD 30% (theo thể tích) trong nước tinh khiết. Mỗi nhóm bao gồm 5 con chuột đực cũng như 3 con chuột đối chứng để đánh giá động học của chất độc. Nhóm thứ tư chỉ tiếp nhận HPβCD 30% (theo thể tích) trong nước, với cùng tần suất, thể tích liều lượng và bởi cùng đường dùng, và được thử nghiệm như nhóm đối chứng dùng chất dẫn thuốc.

Mục đích của thử nghiệm này là xác định liều thấp nhất không gây tác dụng bất lợi (không thể quan sát nồng độ gây tác dụng bất lợi - NOAEL).

Ví dụ 4.8 Độ ổn định tế bào gan

Mô hình để đánh giá độ thanh thải chuyển hóa trong tế bào gan được mô tả bởi McGinnity *et al.* Drug Metabolism and Disposition **2008**, 32, 11, 1247.

Ví dụ 4.9 Khả năng kéo dài QT

Khả năng kéo dài QT được đánh giá bởi thử nghiệm kẹp giữ tế bào hERG.

Kẹp giữ toàn bộ tế bào thông thường

Việc ghi nhận bằng kẹp giữ toàn bộ tế bào được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị khuếch đại EPC10 được kiểm soát bằng phần mềm Pulse v8.77 (HEKA). Điện trở thường nhỏ hơn 10 M Ω và được bù lớn hơn 60%, việc ghi nhận không bị trừ hao hụt. Các điện cực được sản xuất từ thủy tinh làm pipet GC150TF (Harvard).

Dung dịch rửa bên ngoài chứa: 135mM NaCl, 5mM KCl, 1,8mM CaCl₂, 5mM Glucoza, 10mM HEPES, độ pH bằng 7,4.

Dung dịch pipet giữ bên trong chứa: 100mM Kgluconat, 20mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 5mM Na₂ATP, 2mM Glutathion, 11mM EGTA, 10mM HEPES, độ pH bằng 7,2.

Thuốc được rắc lên bằng cách sử dụng hệ rắc nhanh Biologic MEV-9/EVH-9.

Tất cả việc ghi nhận được tiến hành trên các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định kênh hERG. Các tế bào được nuôi cấy trên đĩa đáy bằng kính hình tròn 12mm (German glass, Bellco) được giữ trong buồng đọc bằng cách sử dụng hai thanh platin (Goodfellow). Dòng hERG được tạo ra bằng cách sử dụng xung kích hoạt lên đến +40 mV trong 1000 ms sau đó là xung dòng đuôi -50 mV trong 2000 ms, điện áp duy trì bằng -80 mV. Các xung được tác dụng trong thời gian mỗi 20 giây và tất cả các thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng.

Kết quả

Ví dụ, khi tiến hành thử nghiệm này, giá trị IC₅₀ đo được của hợp chất 1 lớn hơn 150 μ M.

Kết luận chung

Số liệu được cung cấp trong đơn sáng chế này chứng tỏ rằng hợp chất 1 (hợp chất theo sáng chế) thể hiện hoạt lực *in vivo* được cải thiện đáng kể so với hợp chất tương tự về cấu trúc. Sự cải tiến này là rất bất ngờ và không thể dự đoán được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, đặc biệt là do nhiều hợp chất tương tự về cấu trúc thể hiện hoạt lực kháng JAK1 và JAK2 *in vitro* rất tương tự nhau.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết được rằng về bản chất phần

mô tả trên đây chỉ để làm ví dụ và chỉ có ý nghĩa giải thích, và được dự định để minh họa sáng chế và các phương án được ưu tiên của nó. Thông qua các thử nghiệm thông thường, người thực hiện sẽ nhận biết được các cải biến và các biến đổi hiển nhiên có thể được thực hiện nhưng không nằm ngoài phạm vi bảo hộ của sáng chế. Do đó, sáng chế được dự định là không chỉ giới hạn ở phần mô tả trên đây, mà chỉ bị giới hạn bởi phạm vi yêu cầu bảo hộ dưới đây và các phạm vi tương đương của chúng.

Tài liệu tham khảo

Choy EH, Panayi GS. (2001). *N Engl J Med.* 344: 907-16.

Chubinskaya S and Kuettner KE (2003). Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35(9)1323-1340.

Clegg DO et al. (2006) *N Engl J Med.* 2006 354:795-808. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis.

Firestein GS. (2003). *Nature.* 423:356-61.

Lee DM, Weinblatt ME (2001). *Lancet.* 358: 903-11.

Legendre F, Dudhia J, Pujol J-P, Bogdanowicz P. (2003) JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 278(5)2903-2912.

Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. (2001) Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires janus kinase/STAT signaling pathway. (2001) *J Immunol* 166:3491-3498.

O'Dell JR. (2004) Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 350(25):2591-602.

Osaki M, Tan L, Choy BK, Yoshida Y, Cheah KSE, Auron PE, Goldring MB. (2003) The TATA-containing core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon-gamma-mediated inhibition in human chondrocytes: requirement for STAT1alpha, JAK1 and JAK2. *Biochem J* 369:103-115.

Otero M, Lago R, Lago F, Gomez Reino JJ, Gualillo O. (2005) Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis Research & Therapy* 7:R581-

R591.

Sims NA *et al.*, (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis, *Arthritis Rheum.* 50 2338-2346:

Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KCF, Yin L, Pennica D, Johnson EM, Schreiber RD. (1998) Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the jaks in cytokine-induced biologic responses *Cell* 93: 373-383.

Smolen JS, Steiner G. (2003). *Nat Rev Drug Discov.* 2: 473-88.

Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. (2005). *Nat Rev Drug Discov.* 4:331-44. Osteoarthritis - an untreatable disease?

Tam, L., McGlynn, L.M., Traynor, P., Mukherjee, R., Bartlett, J.M.S., Edwards, J. (2007) *British Journal of Cancer*, 97, 378-383

Constantinescu *et al.*, 2007, *Trends in Biochemical Sciences* 33(3): 122-131

Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto and Tadamitsu Kishimoto, *Arthritis Res* 2002, 4 (suppl 3):S233-S242

O'Shea J. *et al.* *Nature Review Drug Discovery* 3 (2004) 555-564: A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway

Vainchenker W. *et al.* *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (2008) 385-393: JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immune deficiencies

Levy D. and Loomis C. *New England Journal of Medicine* 357 (2007) 1655-1658: STAT3 signaling and the Hyper-IgE-syndrome

Wernig *et al.* (2008) Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera, *Cancer Cell* 13(4), 311-320

Geron *et al.* (2008) Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors *Cancer Cell* 13 (4), 321-30

Wirtz *et al.* (2007) Mouse Models of Inflammatory Bowel Disease, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 1073-1083:

Nials *et al.* (2008) Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Allergen Challenge, *Disease Models & Mechanisms*, 213-220.

Ip *et al.* (2006) Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte

chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways, *Clin. Exp. Immun.* 162-172.

Pernis *et al.* (2002) JAK-STAT signaling in asthma *J. Clin. Invest.* 1279.

Kudlacz *et al.* (2008) The JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent anti-inflammatory agent in a murine model of pulmonary eosinophilia, *Eur J Pharmacol* 154-161.

Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, Tasian SK, Loh ML, Su X, Liu W, Devidas M, Atlas SR, Chen I-M, Clifford RJ, Gerhard DS, Carroll WL, Reaman GH, Smith M, Downing JR, Hunger SP, Willman CL; (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia, *PNAS* May 22. [Epub ahead of print]

Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. (1998) Catabolic proinflammatory cytokines. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1:245-51.

Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. (2002) Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum.* 46: 802-5.

Jou IM, Shiau AL, Chen SY, Wang CR, Shieh DB, Tsai CS, Wu CL. (2005) Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 52:339-44.

Nishida K, Komiyama T, Miyazawa S, Shen ZN, Furumatsu T, Doi H, Yoshida A, Yamana J, Yamamura M, Ninomiya Y, Inoue H, Asahara H. (2004) Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum.* 10: 3365-76.

Rall LC, Roubenoff R. (2004) Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology*; 10:1219-23.

Salvemini D, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. (2001) Amelioration of joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Arthritis Rheum.* 44:2909-21.

Shelton DL, Zeller J, Ho WH, Pons J, Rosenthal A. (2005) Nerve growth factor

mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. *Pain*. 116:8-16.

Sims NA, Green JR, Glatt M, Schlicht S, Martin TJ, Gillespie MT, Romas E. (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 50: 2338-46.

Walsmith J, Abad L, Kehayias J, Roubenoff R. (2004) Tumor necrosis factor- α production is associated with less body cell mass in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*; 31:23-9.

Khachigian, L. M. Collagen antibody-induced arthritis. (2006) *Nature Protocols* 1, 2512-6.

Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepescheux L, Bastianelli E, Baron R, Rawadi G, Clément-Lacroix P. (2007) Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *Br J Pharmacol*. Apr;150 (7):829-31.

McGinnity *et al.* *Drug Metabolism and Disposition* **2008**, 32, 11, 1247.

Tất cả các tài liệu công bố, bao gồm nhưng không giới hạn ở các đơn sáng chế và đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế, được nêu trong bản mô tả này dưới hình thức viện dẫn như mỗi tài liệu công bố cụ thể và riêng biệt đều được đưa vào đây dưới hình thức viện dẫn.

Từ phần mô tả trên đây, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể thực hiện các cải biến và biến đổi khác nhau về chế phẩm và phương pháp theo sáng chế. Tất cả các cải biến này đều nằm trong phạm vi yêu cầu bảo hộ được dự định bao gồm ở đây.

Cần hiểu rằng các yếu tố như khả năng thẩm thấu tế bào khác nhau của các hợp chất khác nhau có thể góp phần vào sự khác nhau giữa hoạt tính của các hợp chất trong thử nghiệm sinh hóa *in vitro* và thử nghiệm tế bào.

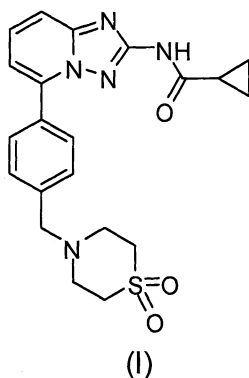
Ít nhất một số tên hóa học của các hợp chất theo sáng chế đã nêu và nêu trong đơn sáng chế này, có thể là được tạo ra một cách tự động bằng cách sử dụng chương trình phần mềm đặt tên hóa học có bán trên thị trường, và không được xác minh độc lập. Các chương trình điển hình thực hiện chức năng này bao gồm công cụ đặt tên Lexichem do Open Eye Software, Inc. cung cấp và công cụ phần mềm Autonom được bán bởi MDL, Inc. Ví dụ, nếu tên hóa học được chỉ ra và cấu trúc hóa học được mô tả

có sự khác biệt, thì cấu trúc được mô tả này sẽ chi phối.

Cấu trúc hóa học được thể hiện ở đây là được thể hiện bằng cách sử dụng phần mềm ChemDraw® hoặc ISIS® /DRAW. Một hóa trị mở bất kỳ xuất hiện trên nguyên tử cacbon, oxy hoặc nitơ trong cấu trúc ở đây chỉ sự có mặt của nguyên tử hydro. Nếu tâm không đối xứng có mặt trong cấu trúc nhưng không chỉ ra cấu trúc hóa học lập thể cụ thể đối với tâm không đối xứng này, thì cả hai chất đồng phân đối ảnh liên quan đến cấu trúc không đối xứng cũng được bao gồm trong cấu trúc này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức I:



hoặc muối dược dụng của nó.

2. Dược phẩm chứa chất mang dược dụng và lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hợp chất theo điểm 1.
3. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó dược phẩm này chứa chất trị liệu khác được chọn từ chất điều trị bệnh viêm khớp.
4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó chất trị liệu khác là chất được chọn từ nhóm bao gồm thuốc giảm đau, NSAIDS (thuốc chống viêm không steroid), và DMARDS (thuốc chống thấp khớp làm thay đổi diễn tiến bệnh).