



(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)



1-0026900

(51)^{2020.01} C07C 255/59; C07C 255/60; C07C
275/40; C07D 471/04; C07D 213/81;
C07D 215/233; C07C 311/29

(13) B

(21) 1-2014-00674

(22) 03/08/2012

(86) PCT/US2012/049446 03/08/2012

(87) WO 2013/020014 A1 07/02/2013

(30) 61/514,555 03/08/2011 US

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/06/2014 315A

(73) 1. NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (TW)

No.1, Sec.4, Roosevelt Road, Taipei, 10617 Taiwan

2. NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY (TW)

No.155, Sec.2, Linong Street, Taipei, 112 Taiwan

3. DCB-USA LLC (US)

1007 North Orange, 9th Floor, New Castle County, Wilmington, DE 19801, United States of America

(72) SHIAU, Chung-Wai (TW); CHEN, Kuen-Feng (TW).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG SRC HOMOLOG-2 CHỨA PROTEIN
TYROSIN PHOSPHATAZA-1 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I, II hoặc III, mà có hoạt tính đối kháng Src homology-2 chứa protein tyrosin phosphataza-1 (SHP-1). Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất mới có hoạt tính đối kháng Src homology-2 chứa protein tyrosin phosphatase-1 (SHP-1) và các phương pháp điều trị sử dụng chất chủ vận này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

SHP-1, protein-tyrosin phosphatase với hai Src homology-2 (SH2), chất điều biến các phân tử phát tín hiệu nội bào khác nhau, như chất biến đổi tín hiệu và chất kích hoạt phiên mã 3 (STAT3), KIT, CD22, CD5, CD72, SHPS-1, TIMP (các metaloproteinase), CDK2, p27, SRC, ZAP70, IL-10, NF- κ B, Lck, 3BP2, Lyn và cyclin D1.

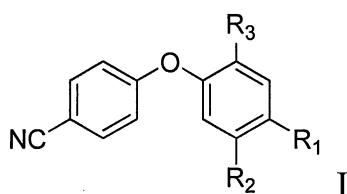
STAT3 là yếu tố phiên mã điều chỉnh sự phát triển và sống sót của tế bào bằng cách điều biến biểu hiện các gen mục tiêu. STAT3 tác dụng làm gen gây bệnh ung thư mà có hoạt tính cấu thành trong các bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đầu và bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, và bệnh ung thư vú cũng như u tủy và bệnh ung thư bạch cầu. Chất điều chỉnh chính hoạt tính STAT3 là SHP-1. Từ khía cạnh cơ học, SHP-1 thể hiện hoạt tính protein phosphatase mà giảm mức phospho-STAT3 (P-STAT) và sau đó ngăn chặn sự nhị trùng hóa của P-STAT3. Do đó, sự biểu hiện của các gen mục tiêu, như cyclin D1 và survivin bị ức chế bởi STAT3 được giảm đi đáng kể. Ngoài ra, các nghiên cứu về SHP-1 protein và SHP-1 mRNA thể hiện rằng mức biểu hiện của SHP-1 là thấp trong hầu hết các tế bào ung thư; và sự gia tăng gen trong SHP-1 trong các tế bào ung thư dẫn đến việc ngăn chặn sự phát triển của tế bào, gợi ý rằng gen SHP-1 tác động làm chất ngăn chặn khối u. Xét về việc phát hiện dược chất, sự phát triển của phân tử lượng thấp mà có thể giảm P-STAT3 và gia tăng mức SHP-1 là theo hướng hứa hẹn để điều trị bệnh

ung thư. SHP-1 cũng đóng vai trò quan trọng trong việc tái tạo xương, quy trình tạo xương các nguyên bào và tái hấp thụ xương các tế bào tủy xương. Chức năng của SHP-1 bị tổn thất trong tế bào tủy xương và thực tế dẫn đến chứng loãng xương. Do đó, sự gia tăng hoạt tính SHP-1 có thể là hướng cho bệnh nhân bị chứng loãng xương. Ngoài ra, sự gia tăng SHP-1 là có lợi đối với đại thực bào của các bệnh nhân bị đa xơ cứng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa vào phát hiện không được kỳ vọng là các hợp chất mới đóng vai trò là chất chủ vận SHP-1 và có khả năng giảm P-STAT3, và hữu ích để điều trị các bệnh nhất định, như bệnh ung thư. Đặc biệt, các hợp chất theo sáng chế không cản trở hoạt tính của các kinaza, như Raf-1 và VEGFR2.

Cụ thể, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I



trong đó:

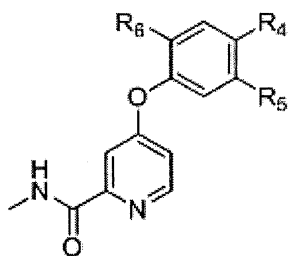
R_1 , R_2 , và R_3 độc lập là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế, $-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a-$, $-(C)_pNHC(X)R_b-$, $-(C)_qNHS(O)_2R_c$, $-(C)_r(X)NHR_d-$, hoặc $-(C)_sNH(C)_tR_e$;

R_a , R_b , R_c , R_d và R_e độc lập là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế;

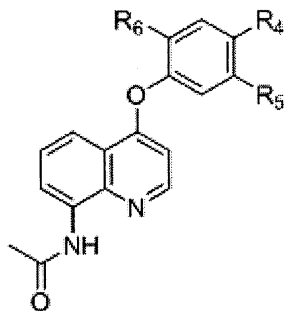
$X=O$ hoặc S ; và

$m, n, p, q, r, s, t=0, 1$, hoặc 2.

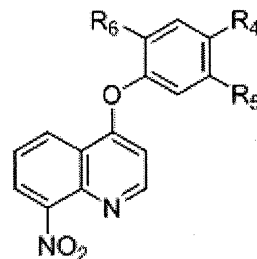
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức II, bao gồm hợp chất có công thức II(a), hợp chất có công thức II(b), hoặc hợp chất có công thức II(c),



II(a)



II(b)



II(c)

trong đó:

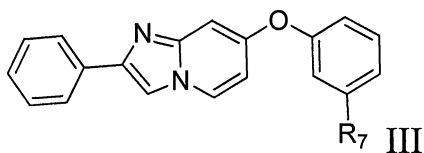
R_4, R_5 và R_6 độc lập là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế, $-(C)_mNHC(X)NH(C)_n R_a-$, $-(C)_pNHC(X)R_b-$, $-(C)_qNHS(O)_2R_c$, $-(C)_r(X)NHR_d-$, hoặc $-(C)_sNH(C)_tR_e$;

R_a, R_b, R_c, R_d và R_e độc lập là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế;

$X=O$ hoặc S ; và

$m, n, p, q, r, s, t=0, 1$, hoặc 2.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức III



trong đó:

R_7 là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế, $-(C)_mNHC(X)NH(C)_n R_a-$, $-(C)_pNHC(X)R_b-$, $-(C)_qNHS(O)_2R_c$, $-(C)_r(X)NHR_d-$, hoặc $-(C)_sNH(C)_tR_e$;

R_a , R_b , R_c , R_d và R_e độc lập là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế;

$X=O$ hoặc S ; và

$m, n, p, q, r, s, t=0, 1$, hoặc 2 .

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm bao gồm một hoặc nhiều hợp chất mô tả ở trên. Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để gia tăng các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 trong tế bào, hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh khác biệt bởi các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của Src homology-2 chứa protein tyrosin phosphatase-1 giảm, mà bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh ung thư, cụ thể là bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư bạch cầu, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư đầu và cổ, xơ cứng và chứng loãng xương. Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế này là việc sử dụng hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất mô tả ở trên để gia tăng các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 trong tế bào, hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh khác biệt bởi các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 giảm được mô tả ở đây và để sản xuất thuốc điều trị các bệnh này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp gia tăng các mức biểu hiện SHP-1 hoặc hoạt tính sinh học trong tế bào, bao gồm bước cho tế bào xử lý bằng một

lượng hữu hiệu hợp chất hoặc dược phẩm được mô tả ở đây.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh khác biệt bởi các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 giảm ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất hoặc dược phẩm được mô tả ở đây.

Các phương án khác nhau của sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây. Các dấu hiệu khác của sáng chế sẽ được minh họa một cách rõ ràng từ phần mô tả chi tiết dưới đây và các hình vẽ về các phương án khác nhau và yêu cầu bảo hộ.

Tin rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc vào có thể sử dụng sáng chế theo phạm vi rộng nhất của nó dựa vào phần mô tả ở đây mà không cần minh họa thêm. Do đó, các phần mô tả sau đây cần được hiểu là chỉ nhằm mục đích minh họa thay vì giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Nhằm mục đích minh họa sáng chế, các phương án ưu tiên được thể hiện trên các hình vẽ là được ưu tiên. Tuy nhiên, cần hiểu rằng sáng chế không được giới hạn ở các phương án ưu tiên đã thể hiện.

Trên các hình vẽ:

Fig.1 thể hiện cấu trúc hóa học của sorafenib và hợp chất SC-1.

Fig.2 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất có công thức I, II và III theo sáng chế.

Fig.3 thể hiện hoạt tính Raf-1 trong các tế bào tương ứng được xử lý bằng sorafenib và hợp chất có công thức 1. Các tế bào Huh-7 được điều trị bằng sorafenib hoặc hợp chất có công thức 1 ở 10 μ M trong thời gian 24 giờ và các dịch thủy phân tế bào được phân tích đối với hoạt tính raf-1. Các cột, ý nghĩa; các thanh ghi, SD (n = 3). *P < 0,05.

Fig.4 thể hiện các kết quả của phép phân tích ELISA đối với các hiệu quả ức chế của các hợp chất có công thức 1-25 versus sorafenib, mỗi hợp chất ở

nồng độ $10\mu\text{M}$, P-STAT kích thích bằng IL-6 trong các tế bào PLC5 sau 24 giờ điều trị. Các cột, ý nghĩa, các thanh ghi, SD ($N = 3$).

Fig.5 thể hiện các kết quả của phép phân tích vết bản phương tây đối với các tác dụng của các hợp chất có công thức 1 và 12, mỗi hợp chất ở nồng độ $5\mu\text{M}$ và $10\mu\text{M}$ lên sự phosphoryl hóa P-STAT3, STAT3, cyclin D và survivin trong các tế bào PLC5 trong môi trường chứa FBS sau 24 giờ điều trị.

Fig.6 thể hiện (A) các kết quả của phép phân tích ELISA đối với tỷ lệ chết tế bào gây ra bởi hợp chất có công thức 1 và 12, ở nồng độ 5, và $10\mu\text{M}$, sau 24 giờ điều trị ở các tế bào PLC5; và (B) thể hiện các kết quả của phép phân tích đếm tế bào dòng của sự chết tế bào gây ra bởi hợp chất có công thức 1 và 12, ở nồng độ 5, và $10\mu\text{M}$, sau 24 giờ điều trị ở các tế bào PLC5.

Fig.7 thể hiện (A) các tác dụng của sorafenib và SC-1 lên phospho-VEGFR2 trong các tế bào HUVEC, trong đó các tế bào được xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 ở nồng độ $10\mu\text{M}$ trong thời gian 24 giờ; (B) các tác dụng của sorafenib và SC-1 lên hoạt tính raf-1, trong đó các tế bào được xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 ở nồng độ $10\mu\text{M}$ trong thời gian 24 giờ. Các điểm, ý nghĩa; các thanh ghi, SD ($n = 6$).

Fig.8 thể hiện (A) các tác dụng tăng của liều dùng của sorafenib và SC-1 lên khả năng thay đổi của tế bào trong bốn dòng tế bào HCC, trong đó các tế bào được xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 ở các liều quy định trong thời gian 72 giờ và sự thay đổi của tế bào được đánh giá bằng thử nghiệm MTT; và các tác dụng tăng của liều dùng của sorafenib và SC-1 lên cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong bốn dòng tế bào HCC, trong đó các tế bào được xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 ở các liều quy định trong thời gian 24 giờ, và các dịch thủy phân tế bào được phân tích bằng flowcytometry (B), hoặc tỷ lệ chết của tế bào ELISA (C). Các điểm, ý nghĩa; các thanh ghi, SD ($n = 6$).

Fig.9 thể hiện (A) các tác dụng của sorafenib hoặc SC-1 lên các protein liên quan đến STAT3, trong đó các tế bào được xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 ở nồng độ $10\mu\text{M}$ trong thời gian 24 giờ; (B) các tác dụng tăng của liều dùng của

sorafenib hoặc SC-1 lên phospho-STAT3 ở các tế bào PLC5, trong đó các tế bào được xử lý bằng các dược chất ở các nồng độ quy định trong thời gian 24 giờ; (C) các tác dụng của sorafenib và SC-1 lên hoạt tính STAT3 (*trái*, Phospho-STAT3 ELISA; *Bên phải*, Thử nghiệm chỉ thị luciferaza của STAT3), trong đó các tế bào được xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 ở nồng độ 10 μ M trong thời gian 24 giờ và phospho-STAT3 ELISA hoặc hoạt tính luciferase được đo; (D) các hiệu quả bảo vệ của STAT3 lên cơ chế gây chết tế bào theo chương trình gây ra bởi sorafenib ở các tế bào PLC5, trong đó các tế bào (kiểu hoang đại hoặc biểu hiện ectopic của STAT3) được điều trị bằng sorafenib hoặc SC-1 ở nồng độ 10 μ M trong thời gian 24 giờ, và các tế bào chết theo chương trình được phân tích bằng dòng tế bào kế. Các cột, ý nghĩa; các thanh ghi, SD ($n = 3$). * $P < 0,05$.

Fig.10 thể hiện sự ức chế SHP-1 ảnh hưởng ngược của sorafenib và SC-1 đến phospho-STAT3 và cơ chế gây chết tế bào theo chương trình. A, *trái*, vanadat, các chất ức chế phosphatase không đặc biệt. *Bên phải*, chất ức chế AHP-1. Các cột, ý nghĩa; các thanh ghi, SD ($n = 3$). * $P < 0,05$. B, *bên trái*, khử âm SHP-1 bằng siRNA giảm các tác dụng của sorafenib hoặc SC-1 lên p-STAT3 trong các tế bào HCC. Các tế bào PLC5 được chuyển nạp với siRNA hoặc SHP-1 siRNA kiểm soát trong thời gian 24 giờ. sau đó xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 trong 24 giờ nữa. *Giữa*, hoạt tính của SHP-1 ở các tế bào PLC5. Các cột, ý nghĩa; các thanh ghi, SD ($n = 3$). * $P < 0,05$. *Bên phải*, các tác dụng của sorafenib hoặc SC-1 lên tác tương tác protein giữa SHP-1 và STAT3. Các tế bào PLC5 được xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 ở nồng độ 10 μ M trong thời gian 24 giờ. C, sự hạ gục của SHP-2 không ảnh hưởng đến các tác dụng của sorafenib hoặc SC-1 trên p-STAT3 và cơ chế gây chết tế bào theo chương trình. D, sự hạ gục của PTP-1B không ảnh hưởng đến các tác dụng của sorafenib lên p-STAT3 và cơ chế gây chết tế bào theo chương trình. các tế bào PLC5 được chuyển nạp với siRNA hoặc SHP-2 kiểm soát, siRNA hoặc PTP-1B siRNA trong thời gian 24 giờ sau đó xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 ở nồng độ 10 μ M trong thời gian 24 giờ.

Fig.11 thể hiện là SC-1 điều chỉnh xuống p-STAT3 và gây ra cơ chế gây

chết tế bào theo chương trình trong các tế bào HUVEC. A, các tác dụng của sorafenib hoặc SC-1 lên p-STAT3 (*bên trái*) và cơ chế gây chết tế bào theo chương trình (*bên phải*) trong các tế bào HUVEC. Các tế bào được điều trị bằng sorafenib hoặc SC-1 ở nồng độ 10 μ M trong thời gian 24 giờ. Các tế bào chết theo chương trình được thử nghiệm bởi dòng tế bào kế (sub-G1). B, các tác dụng của SC-1 lên sự nhạy TRAIL trong HCC. Các tế bào PLC5 được xử lý bằng SC-1 (10 μ M) và/hoặc TRAIL (100ng/ml) trong thời gian 24 giờ. C, sự triệt âm Raf-1 không ảnh hưởng đến các tác dụng của các dược chất lên p-STAT3. Các tế bào PLC5 được chuyển nạp với siRNA hoặc Raf-1 siRNA kiểm soát trong thời gian 24 giờ sau đó xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 ở nồng độ 10 μ M trong thời gian 24 giờ. D, tác dụng của sorafenib và SC-1 lên hoạt tính JAK2. Các tế bào PLC5 được điều trị bằng sorafenib hoặc SC-1 ở nồng độ 10 μ M trong thời gian 24 giờ. Các điểm, ý nghĩa; các thanh ghi, SD ($n = 6$). E, các tác dụng của sorafenib và SC-1 lên SOCS-1 và SOCS-3. các tế bào Sk-Hep1 được xử lý trước bằng IL-6 trong thời gian 24 giờ. Sau đó, các tế bào được xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 ở các liều quy định trong thời gian 24 giờ nữa có mặt IL-6. F, các tác dụng của STAT-C lên cơ chế gây chết tế bào theo chương trình gây ra bởi SC-1 ở các tế bào PLC5. Các tế bào (kiểu hoang dại hoặc biểu hiện ectopic của STAT3-C) được điều trị bằng sorafenib hoặc SC-1 ở 10 μ M trong thời gian 24 giờ. G, các tác dụng của sorafenib và SC-1 lên SHP-1. Các cột, ý nghĩa; các thanh ghi, SD ($n = 3$). * $P < 0,05$.

Fig.12 thể hiện *in vivo* tác dụng của sorafenib và SC-1 lên các con chuột trụi lông Huh-7 xenograft A, sorafenib thể hiện tác dụng chống u khác lên các khối u Huh-7. Bên trái, các điểm, ý nghĩa ($n = 6$); các thanh ghi, SE. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. Bên phải, phía trên, phân tích vết phương đông của p-STAT3 và STAT3 trong các khối u Huh-7. Bên phải, phía dưới, hoạt tính của SHP-1 trong các khối u Huh-7. B, SC-1 thể hiện tác dụng chống u đáng kể lên các khối u Huh-7. Bên trái, các điểm, ý nghĩa ($n = 6$); các thanh ghi, SE. Bên phải, phía trên, phân tích vết phương đông của p-STAT3 và STAT3 ở các khối u Huh-7. Bên phải, phía dưới, hoạt tính của SHP-1 ở các khối u Huh-7.

Fig.13 thể hiện các tác dụng chống lại sự nảy nở của SC-1 và SC-43 trong các dòng tế bào ung thư khác nhau, bao gồm các dòng ung thư vú (A) MDAMB231, (B) MDAMB468 và (C) MCF-7, và các dòng tế bào ung thư bạch cầu (D) HL-60, (E) KG-1, và (F) mL-1.

Fig.14 thể hiện rằng các dẫn xuất Sorafenib gây ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình đáng kể trong theo cách tùy thuộc vào liều lượng, trong đó (A), (B), (C), (D) và (E) gọi là SC-43 lần lượt đối với các tế bào PLC5, HepG2, Hep3B, HA59T và SK-Hep1; và (F), (G), (H), (I) và (J) lần lượt gọi là SC-40 đối với các tế bào PLC5, HepG2, Hep3B, HA59T và SK-Hep1. Các điểm, ý nghĩa; các thanh ghi, SD (n = 6).

Fig.15 thể hiện rằng SC-43 này điều chỉnh xuống đường phát tín hiệu liên quan đến phospho-STAT3 trong các tế bào HCC, bao gồm các tế bào PLC5, HepG2, Hep3B, HA59T và SK-Hep1.

Fig.16 thể hiện rằng SC-40 điều chỉnh xuống đường phát tín hiệu liên quan đến phospho-STAT3 trong các tế bào HCC, bao gồm các tế bào PLC5, HepG2, Hep3B, HA59T và SK-Hep1.

Fig.17 thể hiện rằng SC-43 thể hiện sự ức chế của đường phát tín hiệu liên quan đến p-STAT3 tốt hơn sorafenib trong các tế bào HCC, (A) PLC5 và (B) Hep 3B.

Fig.18 thể hiện rằng cả SC-43 và SC-40 gây ra sự ức chế mạnh hoạt tính p-STAT3 (A) và (B) p-STAT3 ELISA lần lượt đối với SC-43 và SC-40, và (C) và (D) thử nghiệm gen chỉ thị STAT3 lần lượt đối với SC-43 và SC-40.

Fig.19 thể hiện rằng các dẫn xuất SC gia tăng hoạt tính phosphatase của SHP-1 *in vitro*, (A) SC-43, (B) SC-40, và (C) SC-49.

Fig.20 thể hiện rằng các dẫn xuất SC gia tăng hoạt tính phosphatase của SHP-1 *in vitro*, (A) SC-43 và (B) SC-40.

Fig.21 thể hiện rằng (A) tác dụng chống u của SC-40 lên các khối u PCL5; (B) Phân tích vết phương đông của p-STAT3 và STAT3 ở các khối u PCL5; (C)

trọng lượng cơ thể của các con vật; và (D) trọng lượng khối u và (E) hoạt tính của SHP-1 ở các khối u PCL5. Các điểm, ý nghĩa ($n = 6$); các thanh ghi, SE

Fig.22 thể hiện rằng SC-43 thể hiện tác dụng chống u *in vitro* và *in vivo*, (A) độc tố tế bào của SC-43 trong các tế bào HCC, (B) tác dụng chống u của SC-43 trong chuột mang HCC, (C) hoạt tính của SHP-1 gây ra bởi SC-43, và (D) Phân tích vết phương đông của p-STAT3 và STAT3 trong các tế bào HCC được xử lý bằng SC-43 (10 μ M và 20 μ M).

Fig.23 thể hiện (A) ảnh thu được bằng hệ thống lấy ảnh *in vivo* không can thiệp của chuột xử lý, (B) thể hiện trọng lượng cơ thể của chuột, và (C) thể hiện đường cong tỷ lệ sống sót giữa chuột kiểm chứng và được xử lý.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có cùng ý nghĩa như được hiểu chung bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc vào. Tất cả các công bố nêu ở bản mô tả này dựa vào bộc lộ và mô tả các phương pháp và/hoặc nguyên liệu kết hợp với các công bố được trích.

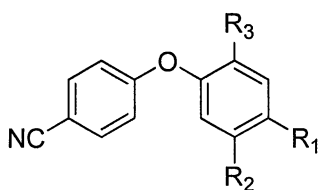
Như được sử dụng ở đây, các dạng số ít “một” chỉ các nhiều số trừ ngữ cảnh được chỉ ra rõ ràng theo cách khác. Do vậy, ví dụ, tham chiếu đến “một mẫu” gồm nhiều mẫu này và các tương đương của nó đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Sorafenib (BAY43-9006, Nexavar) được sử dụng về phương diện lâm sàng đối với bệnh ung thư thận và ung thư biểu mô tế bào gan (HCC). Đã biết là chất ức chế đa kinaza mà ngăn chặn hoạt tính của Raf-1 và các tyrosin kinaza khác như VEGFR2, VEGFR3, Flt-3, PDGFR, và FGFR-1.

Theo sáng chế này, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu mối tương quan giữa cấu trúc của sorafenib và hoạt tính sinh học của nó và cải biến cấu trúc của sorafenib. Do đó, các tác giả sáng chế đã phát triển một số D-xyloza permeaza. Sorafenib không có khả năng chặn hoạt tính kinaza, và phát hiện ra một cách

không mong chờ là các hợp chất này thể hiện các tác dụng điều trị tốt ở một số bệnh nhất định, như bệnh ung thư, ít nhất so với các tác dụng của sorafenib. Theo sáng chế, các hợp chất mới của sáng chế tác dụng làm các chất chủ vận SHP-1 và hữu ích để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh khác biệt bởi các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 giảm, như bệnh ung thư, cụ thể là bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư bạch cầu, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư đầu và cổ, xơ cứng và chứng loãng xương). Các hợp chất theo sáng chế cũng đưa ra lựa chọn điều trị mới đối với các bệnh nhân chịu các chất ức chế kinaza. Các khối u này tạo ra đột biến kinaza sau khi điều trị và có ở dạng hoạt tính phosphoryl hóa, thậm chí có mặt chất ức chế kinaza. Do đó, sự điều chỉnh lên của chất ức chế khối u, đặc biệt là SHP-1, để ức chế sự đột biến hoạt hóa của các kinaza theo hướng kỳ vọng đối với các bệnh nhân chi hóa chất. Nói cách khác, các hợp chất theo sáng chế, tác dụng qua cơ chế đích mới (độc lập với kinaza), cho các lựa chọn điều trị khác mà có thể hữu ích trong việc điều trị bệnh ung thư chịu phương pháp điều trị y học thông thường.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I



I

trong đó:

R_1 , R_2 , và R_3 độc lập là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế, $-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a-$, $-(C)_pNHC(X)R_b-$, $-(C)_qNHS(O)_2R_c$, $-(C)_r(X)NHR_d-$, hoặc $-(C)_sNH(C)_tR_e$;

R_a , R_b , R_c , R_d và R_e độc lập là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế,

alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế;

$X=O$ hoặc S ; và

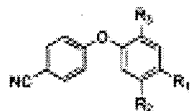
$m, n, p, q, r, s, t=0, 1$, hoặc 2 .

Theo một phương án, hợp chất có công thức I bao gồm các hợp chất trong đó R_1, R_2 , và R_3 độc lập là hydro, alkyl thấp tùy ý được thế, $-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a$ -, $-(C)_pNHC(X)R_b$ -, $-(C)_qNHS(O)_2R_c$, hoặc $-(C)_sNH(C)_tR_e$.

Theo một phương án khác, hợp chất có công thức I bao gồm các hợp chất trong đó R_a, R_b, R_c, R_d và R_e độc lập là phenyl hoặc naphtyl, tùy ý được thế bằng 1 đến 3 nhóm được chọn từ nhóm bao gồm halo, alkyl thấp tùy ý được thế (như alkyl thấp được thế bằng nhóm halo, cụ thể là triflometyl), alkoxyl tùy ý được thế (cụ thể là alkoxyl thấp thế bằng nhóm halo, cụ thể là triflometyl) và aryloxy tùy ý được thế (cụ thể là phenoxy thế bằng nhóm xyano).

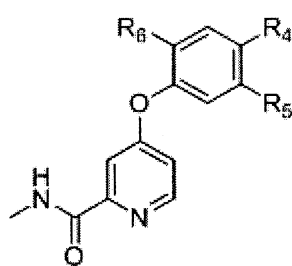
Trong các ví dụ nhất định, hợp chất có công thức I là một trong số các hợp chất SC-1, SC-48, SC-49, SC-54, SC-55, SC-56, SC-58, SC-43, SC-44, SC-45, SC-50, SC-51, SC-52, SC-59, SC-60 và SC-40 được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1

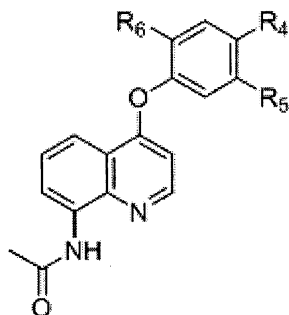


Hợp chất	R ₁	R ₂	R ₃
SC-1		H	H
SC-48		H	H
SC-49		H	H
SC-54		H	H
SC-55		H	H
SC-58		H	H
SC-59		H	H
SC-43	H		H
SC-44	H		H
SC-45	H		H
SC-50	H		H
SC-51	H		H
SC-52	H		H
SC-58	H		Me
SC-60	H		Me

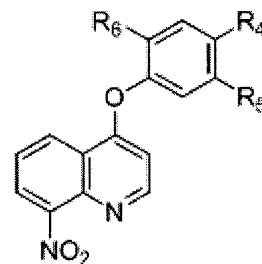
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức II, bao gồm hợp chất có công thức II(a), hợp chất có công thức II(b) hoặc hợp chất có công thức II(c),



II(a)



II(b)



II(c)

trong đó:

R_4 , R_5 và R_6 độc lập là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế, $-(C)_mNHC(X)NH(C)_n R_a-$, $-(C)_pNHC(X)R_b-$, $-(C)_qNHS(O)_2R_c$, $-(C)_r(X)NHR_d-$, hoặc $-(C)_sNH(C)_tR_e$;

R_a , R_b , R_c , R_d và R_e độc lập là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế;

$X=O$ hoặc S ; và

$m, n, p, q, r, s, t=0, 1$, hoặc 2 .

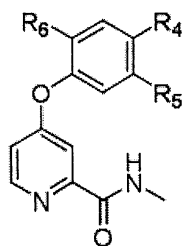
Theo một phương án, hợp chất có công thức II bao gồm các hợp chất trong đó R_4 , R_5 và R_6 độc lập là hydro, alkyl thấp tùy ý được thế, $-(C)_mNHC(X)NH(C)_n R_a-$, $-(C)_pNHC(X)R_b-$, $-(C)_qNHS(O)_2R_c$, hoặc $-(C)_sNH(C)_tR_e$.

Theo một phương án khác, hợp chất có công thức II bao gồm các hợp chất

trong đó R_a , R_b , R_c , R_d và R_e độc lập là phenyl hoặc naphthyl, tùy ý được thế bằng 1 đến 3 nhóm được chọn từ nhóm bao gồm halo, alkyl thấp tùy ý được thế (như alkyl thấp được thế bằng nhóm halo, cụ thể là triflometyl), alkoxyl tùy ý được thế (cụ thể là alkoxyl thấp thế bằng nhóm halo, cụ thể là triflometyl) và aryloxy tùy ý được thế (cụ thể là phenoxy thế bằng nhóm xyano).

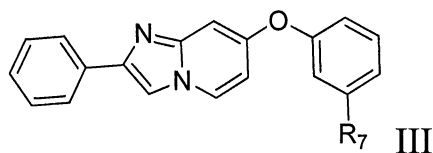
Trong các ví dụ nhất định, hợp chất có công thức II là một trong số các hợp chất SC-31, SC-32, SC-33, SC-34 và SC-35, được liệt kê trong bảng 2.

Bảng 2



Hợp chất	R_4	R_5	R_6
SC-31	H		H
SC-32	H		H
SC-33	H		H
SC-34	H		H
SC-35	H		H

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức III



trong đó:

R₇ là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế, $-(C)_mNHC(X)NH(C)_n$ R_a-, $-(C)_pNHC(X)R_b$ -, $-(C)_qNHS(O)_2R_c$, $-(C)_r(X)NHR_d$ -, hoặc $-(C)_sNH(C)_tR_e$;

R_a, R_b, R_c, R_d và R_e độc lập là hydro, halo, hydroxyl, alkoxy tùy ý được thế, thioalkoxy tùy ý được thế, alkyl tùy ý được thế, alkenyl thấp tùy ý được thế, alkynyl thấp tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, aralkyl tùy ý được thế, heteroaryl tùy ý được thế, heteroaralkyl tùy ý được thế;

X=O hoặc S; và

m, n, p, q, r, s, t=0, 1, hoặc 2.

Theo một phương án, hợp chất có công thức III bao gồm các hợp chất trong đó trong đó R₇ độc lập là hydro, alkyl thấp tùy ý được thế, $-(C)_mNHC(X)NH(C)_n$ R_a-, $-(C)_pNHC(X)R_b$ -, $-(C)_qNHS(O)_2R_c$, hoặc $-(C)_sNH(C)_tR_e$.

Theo một phương án khác, hợp chất có công thức III bao gồm các hợp chất trong đó R_a, R_b, R_c, R_d và R_e độc lập là phenyl hoặc naphtyl, tùy ý được thế bằng 1 đến 3 nhóm được chọn từ nhóm bao gồm halo, alkyl thấp tùy ý được thế (như alkyl thấp được thế bằng nhóm halo, cụ thể là triflometyl), alkoxy tùy ý được thế (cụ thể là alkoxy thấp thế bằng nhóm halo, cụ thể là triflometyl) và aryloxy tùy ý được thế (cụ thể là phenoxy thế bằng nhóm xyano).

Trong các ví dụ nhất định, hợp chất có công thức III là một trong số các

hợp chất SC-36, SC-37 và SC-38, được liệt kê trong bảng 3.

Bảng 3

Hợp chất	R ₇
SC-36	
SC-37	
SC-38	

Thuật ngữ “halo” hoặc “halogen” riêng lẻ hoặc kết hợp với tất cả halogen, như flo (F), clo (Cl), brom (Br) hoặc iot (I).

Thuật ngữ “hydroxyl” là nhóm -OH.

Các thuật ngữ “thio” và “mercapto” được sử dụng thay nhau và gọi là nhóm “-SH.”

Thuật ngữ “alkyl” riêng lẻ hoặc kết hợp là gốc có nguồn gốc là alkan, trừ khi có quy định khác, chứa 1-20 nguyên tử cacbon (C₁-C₂₀), tốt hơn là 1-15 nguyên tử cacbon (C₁-C₁₅), tốt hơn nữa là 1-10 nguyên tử cacbon (C₁-C₁₀). Nhóm này là alkyl mạch thẳng, alkyl mạch nhánh hoặc xycloalkyl, tốt hơn là, các nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ 1 đến 15, tốt hơn nữa là 1 đến 8, thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 6, còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 4 và tốt nhất là 1-2, nguyên tử cacbon, như metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, t-butyl và tương tự. Thuật ngữ “alkyl thấp” được sử dụng ở đây mô tả các nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh như được mô tả ở trên. Tốt hơn là, các nhóm xycloalkyl là các hệ vòng một vòng, hai vòng hoặc ba vòng có từ 3 đến 8, tốt

hơn nữa là 3 đến 6 chi tiết vòng trên vòng, như xyclopropyl, xyclopentyl, xyclohexyl, adamantyl và tương tự. Alkyl cũng bao gồm nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh mà chứa hoặc bị gián đoạn bởi phần xycloalkyl. Nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được gắn tại điểm có thể bất kỳ để tạo ra hợp chất ổn định. Các ví dụ về nhóm này bao gồm, nhưng không giới hạn ở 4-(isopropyl)-xyclohexyl hoặc 2-metyl-xyclopropyl-pentyl. A được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm hoặc phần tử thay thế của halo, hydroxyl, alkoxy, alkylthio, alkylsulfinyl, alkylsulfonyl, aryloxy, heteroaryloxy, các nhóm alkyl, aryl hoặc heteroaryl được thế một lần hoặc hai lần bằng amin, amidino, các nhóm alkyl, aryl, heteroaryl hoặc heterocyclyl được thế một lần hoặc hai lần bằng ure, các nhóm alkyl được thế một lần ở vị trí N hoặc hai lần ở vị trí N,N tùy ý bằng aminosulfinyl, aryl hoặc heteroaryl, alkylsulfonylamino, arylsulfonylamino, heteroarylsulfonylamino, alkylcarbonylamino, arylcarbonylamino, heteroarylcarbonylamino, hoặc các nhóm tương tự.

Thuật ngữ “alkenyl” riêng lẻ hoặc kết hợp có nghĩa là hydrocarbon mạch thẳng, mạch nhánh hoặc vòng chứa từ 2 đến 20, tốt hơn là 2 đến 17, tốt hơn nữa là 2 đến 10, thậm chí tốt hơn nữa là 2-8, tốt nhất là 2-4, nguyên tử cacbon và ít nhất là một, tốt hơn là 1 đến 3, tốt hơn nữa là 1 đến 2, tốt nhất là một, liên kết đôi cacbon-cacbon. Trong trường hợp nhóm xycloalkenyl, kết hợp của hơn một liên kết đôi cacbon-cacbon là không thể trao tính thơm cho vòng. Các liên kết đôi cacbon-cacbon hoặc có thể chứa trong phần xycloalkyl, với sự ngoại trừ là xyclopropyl, hoặc bên trong phần mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Các ví dụ về các nhóm alkenyl bao gồm etenyl, propenyl, isoprenyl, butenyl, xyclohexenyl, xyclohexenylalkyl và tương tự. Alkenyl thế là alkenyl mạch thẳng, alkenyl mạch nhánh hoặc các nhóm xycloalkenyl định nghĩa trên đây, độc lập được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm hoặc phần tử thay thế của halo, hydroxyl, aryloxy, alkylthio, alkylsulfinyl, alkylsulfonyl, độc lập thế bằng từ các nhóm alkyl, aryl hoặc heteroaryl, amidino, ure tùy ý được thế bằng các nhóm alkyl, aryl, heteroaryl hoặc heterocyclyl, các nhóm alkyl được thế một lần ở vị trí N hoặc hai lần ở vị trí N,N tùy ý bằng aminosulfonyl, aryl hoặc heteroaryl, alkylsulfonylamino,

alkylcarbonylamino, arylcarbonylamino, aryloxy-carbonyl, heteroaryloxy-carbonyl, hoặc tương tự được gắn ở điểm có thể bất kỳ để tạo ra hợp chất ổn định.

Thuật ngữ “alkynyl” riêng lẻ hoặc kết hợp có nghĩa là hydrocarbon mạch thẳng, mạch nhánh hoặc vòng chứa 2 đến 20, tốt hơn là 2 đến 17, tốt hơn nữa là 2 đến 10, thậm chí tốt hơn nữa là 2 đến 8, tốt nhất là 2 đến 4, nguyên tử cacbon và ít nhất là một, tốt hơn là 1 đến 3, tốt hơn nữa là 1 đến 2, tốt nhất là một liên kết ba cacbon-cacbon. Các ví dụ về các nhóm alkynyl bao gồm etynyl, propynyl, isopropynyl, butynyl, và tương tự. Alkynyl thế là alkynyl mạch thẳng, các nhóm alkynyl mạch nhánh định nghĩa trên đây, độc lập thế bằng từ 1 đến 3 nhóm hoặc phần tử thay thế của halo, hydroxyl, aryloxy, alkylthio, alkylsulfinyl, alkylsulfonyl, độc lập thế bằng từ các nhóm alkyl, aryl hoặc heteroaryl, amidino, alkyl tùy ý được thế bằng ure, các nhóm aryl, heteroaryl hoặc heterocyclyl, các nhóm alkyl được thế một lần ở vị trí N hoặc hai lần ở vị trí N,N tùy ý bằng aminosulfonyl, aryl hoặc heteroaryl, alkylsulfonylamino, alkylcarbonylamino, arylcarbonylamino, aryloxy-carbonyl, heteroaryloxy-carbonyl, hoặc tương tự được gắn ở điểm có thể bất kỳ để tạo ra hợp chất ổn định.

Thuật ngữ “alkyl alkenyl” là nhóm $-R-CR'=CR''R'''$, trong đó R là alkyl thấp, hoặc alkyl thấp thế, R', R'', R''' độc lập là hydro, halogen, alkyl thấp, alkyl thấp thế, axyl, aryl, aryl thế, hetaryl, hoặc hetaryl thế được định nghĩa dưới đây.

Thuật ngữ “alkyl alkynyl” là nhóm $-R-CCR'$, trong đó R là alkyl thấp, hoặc alkyl thấp thế, R' là hydro, halogen, alkyl thấp, alkyl thấp thế, axyl, aryl, aryl thế, hetaryl, hoặc hetaryl thế được định nghĩa dưới đây.

Thuật ngữ “alkoxy” chỉ nhóm $-OR$, trong đó R là alkyl thấp, alkyl thấp thế, axyl, aryl, aryl thế, aralkyl, aralkyl thế, heteroalkyl, heteroarylalkyl, xycloalkyl, xycloalkyl thế, xycloheteroalkyl, hoặc xycloheteroalkyl thế như được định nghĩa.

Thuật ngữ “alkylthio” hoặc “thioalkoxy” chỉ nhóm $-SR$, $S(O)_{n=1-2}-R$, trong đó R là alkyl thấp, alkyl thấp thế, axyl, aryl, aryl thế, aralkyl, hoặc aralkyl

thể như được định nghĩa ở đây.

Thuật ngữ "axyl" chỉ các nhóm $-C(O)R$, trong đó R là hydro, alkyl thấp, alkyl thấp thế, aryl, aryl thế, và tương tự như được định nghĩa ở đây.

Thuật ngữ "aryloxy" chỉ các nhóm $-OAr$, trong đó Ar là aryl, aryl thế, heteroaryl, hoặc nhóm heteroaryl thế như được định nghĩa ở đây.

Thuật ngữ "amido" chỉ nhóm $-C(O)NRR'$, trong đó R và R' có thể độc lập là hydro, alkyl thấp, alkyl thấp thế, aryl, aryl thế, và tương tự như được định nghĩa ở đây.

Thuật ngữ "carboxyl" chỉ nhóm $-C(O)OR$, trong đó R là hydro, alkyl thấp, alkyl thấp thế, aryl, aryl thế, và tương tự như được định nghĩa ở đây.

Thuật ngữ "aryl" riêng lẻ hoặc kết hợp có nghĩa là phenyl hoặc naphthyl cacboxylic tùy ý ngưng tụ tùy ý bằng xycloalkyl tốt hơn là từ 5 đến 7, tốt hơn nữa là 5 đến 6 chi tiết vòng và /hoặc tùy ý được thế bằng 1 đến 3 nhóm hoặc phần tử thay thế của halo, hydroxyl, aryloxy, alkylthio, alkylsulfinyl, alkylsulfonyl, độc lập thế bằng các nhóm alkyl, aryl hoặc heteroaryl, amidino, alkyl tùy ý được thế bằng ure, các nhóm aryl, heteroaryl hoặc heterocyclyl, các nhóm alkyl được thế một lần ở vị trí N hoặc hai lần ở vị trí N,N tùy ý bằng aminosulfonyl, aryl hoặc heteroaryl, alkylsulfonylamino, alkylcarbonylamino, arylcarbonylamino, aryloxycarbonyl, heteroaryloxycarbonyl, hoặc tương tự.

Thuật ngữ "dị vòng" là nhóm cacboxylic no, không no, hoặc thơm có một vòng (cụ thể là morpholino, pyridyl hoặc furyl) hoặc các vòng đa ngưng tụ (cụ thể là naphthpyridyl, quinoxaryl, quinolinyl, indolizinyll hoặc benzo[b]thienyl) và có ít nhất là một nguyên tử khác loại, như N, O hoặc S, trong vòng, mà tùy ý có thể không được thế hoặc thế bằng cụ thể là halogen, alkyl thấp, alkoxy thấp, alkylthio, axetylen, amino, amido, carboxyl, hydroxyl, aryl, aryloxy, dị vòng, hetaryl, hetaryl thế, nitro, xyano, thiol, sulfamino và tương tự.

Thuật ngữ "heteroaryl" riêng lẻ hoặc kết hợp có nghĩa là cấu trúc vòng thơm noncyclic chứa 5 hoặc 6 nguyên tử vòng, hoặc nhóm thơm bicyclic có 8

đến 10 nguyên tử, chứa một hoặc nhiều, tốt hơn là 1 đến 4, tốt hơn nữa là 1 đến 3, thậm chí tốt hơn nữa là 1 đến 2 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nhóm O, S, và N, và tùy ý được thế bằng 1 đến 3 nhóm hoặc phần tử thay thế của halo, hydroxyl, alkoxy, alkythio, alkylsulfinyl, alkylsulfonyl, alyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, các nhóm alkyl, aryl hoặc heteroaryl được thế một lần hoặc hai lần bằng amin, amidino, các nhóm alkyl, aryl, heteroaryl hoặc heteroxyclyl được thế một lần hoặc hai lần bằng ure, các nhóm alkyl được thế một lần ở vị trí N hoặc hai lần ở vị trí N,N tùy ý bằng aminosulfinyl, aryl hoặc heteroaryl, alkylsulfonylamino, arylsulfonylamino, heteroarylsulfonylamino, alkylcarbonylamino, arylcarbonylamino, heteroarylcarbonylamino, hoặc tương tự. Heteroaryl cũng dự định bao gồm S hoặc N oxy hóa, như sulfinyl, sulfonyl và N-oxit của nitơ vòng bậc ba. Nguyên tử cacbon hoặc nitơ tại điểm gắn của cấu trúc vòng heteroaryl sao cho vòng thơm phù hợp được giữ. Các ví dụ về các nhóm heteroaryl là pyridinyl, pyridazinyl, pyrazinyl, quinazolinyl, purinyl, indonyl, quinolinyl, pyrimidinyl, pyrrolyl, oxazolyl, thiazolyl, thienyl, isoxazolyl, oxathiadiazolyl, isothiazolyl, tetrazolyl, imidazolyl, triazinyl, furanyl, benzofuryl, indolyl và tương tự. Heteroaryl thế chứa phần tử thay thế gắn cacbon hoặc nitơ có sẵn để tạo ra hợp chất ổn định.

Thuật ngữ “heteroxyclyl” riêng lẻ hoặc kết hợp có nghĩa là nhóm xycloalkyl không thơm có từ 5 đến 10 nguyên tử trong đó từ 1 đến 3 nguyên tử cacbon trong vòng được thay bằng các nguyên tử khác loại là O, S, N, và tùy ý được ngưng tụ ở benzo hoặc heteroaryl ngưng tụ của 5 đến 6 chi tiết vòng và / hoặc tùy ý được thế như trong trường hợp xycloalkyl. Heteroxyclyl cũng dự định bao gồm S hoặc nitơ oxy hóa, như sulfinyl, sulfonyl và N-oxit của nitơ vòng bậc ba. Điểm gắn là ở nguyên tử cacbon hoặc nitơ. Ví dụ về nhóm heteroxyclyl là tetrahydrofuranyl, dihydropyridinyl, piperidinyl, pyrrolidinyl, piperazinyl, dihydrobenzofuryl, dihydroindolyl, và tương tự. Heteroxyclyl thế chứa phần tử thế nitơ được gắn ở cacbon hoặc nitơ có sẵn để tạo ra hợp chất ổn định.

Thuật ngữ “heteroaryl thế” là dị vòng tùy ý được thế một lần hoặc nhiều

lần bằng từ một hoặc nhiều nhóm chức cụ thể là halogen, alkyl thấp, alkoxy thấp, alkylthio axetylen, amino, amido, carboxyl, hydroxyl, aryl, aryloxy, dị vòng, dị vòng thế, hetaryl, hetaryl thế, nitro, xyano, thiol, sulfamido và tương tự.

Thuật ngữ “aralkyl” là nhóm -R-Ar trong đó Ar là nhóm aryl và R là nhóm alkyl thấp hoặc alkyl thấp thế. Các nhóm aryl tùy ý có thể không thế hoặc thế bằng, cụ thể là halogen, alkyl thấp, alkoxy thấp, alkylthio axetylen, amino, amido, carboxyl, hydroxyl, aryl, aryloxy, dị vòng, dị vòng thế, hetaryl, hetaryl thế, nitro, xyano, thiol, sulfamido và tương tự.

Thuật ngữ “heteroalkyl” là nhóm -R-Het trong đó Het là nhóm dị vòng và R là nhóm alkyl thấp. Các nhóm heteroalkyl tùy ý có thể không được thế hoặc thế bằng halogen, alkyl thấp, alkoxy thấp, alkylthio axetylen, amino, amido, carboxyl, hydroxyl, aryl, aryloxy, dị vòng, dị vòng thế, hetaryl, hetaryl thế, nitro, xyano, thiol, sulfamido và tương tự.

Thuật ngữ “heteroarylalkyl” là nhóm -R-Het AR trong đó HetAr là nhóm heteroaryl và R là nhóm alkyl thấp. Các nhóm heteroarylalkyl tùy ý có thể không được thế hoặc thế bằng halogen, alkyl thấp, alkoxy thấp, alkylthio axetylen, amino, amido, carboxyl, hydroxyl, aryl, aryloxy, dị vòng, dị vòng thế, hetaryl, hetaryl thế, nitro, xyano, thiol, sulfamido và tương tự.

Thuật ngữ “xycloalkyl” là nhóm alkyl xyclic hoặc polyxyclic hóa trị hai chứa 3 đến 15 nguyên tử cacbon.

Thuật ngữ “xycloalkyl thế” là nhóm xycloalkyl bao gồm một hoặc nhiều phần tử thế với cụ thể là halogen, alkyl thấp, alkoxy thấp, alkylthio axetylen, amino, amido, carboxyl, hydroxyl, aryl, aryloxy, dị vòng, dị vòng thế, hetaryl, hetaryl thế, nitro, xyano, thiol, sulfamido và tương tự.

Thuật ngữ “xycloheteroalkyl” là nhóm xycloalkyl trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon vòng được thay bằng nguyên tử khác loại (cụ thể là N, O, S, hoặc P).

Thuật ngữ “xycloheteroalkyl thế” là nhóm xycloheteroalkyl như được

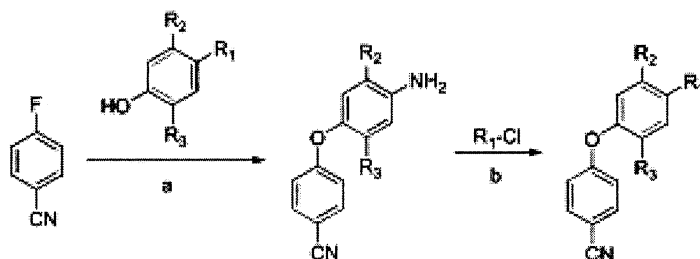
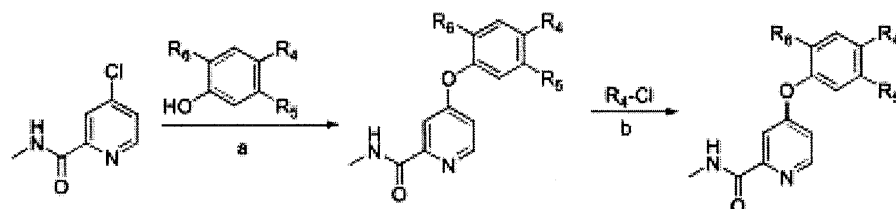
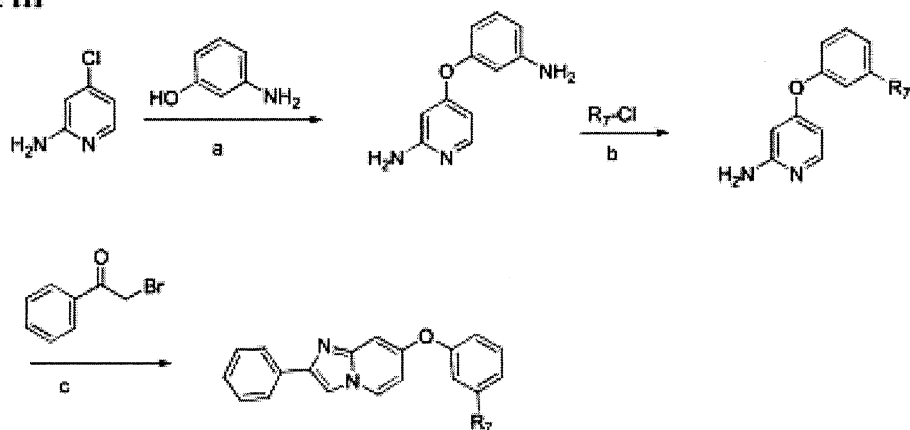
định nghĩa ở đây chứa một hoặc nhiều phần tử thay thế, như halogen, alkyl thấp, alkoxy thấp, alkylthio axetylen, amino, amido, carboxyl, hydroxyl, aryl, aryloxy, dị vòng, dị vòng thế, hetaryl, hetaryl thế, nitro, xyano, thiol, sulfamido và tương tự.

Thuật ngữ “alkyl xycloalkyl” chỉ nhóm -R'-xycloalkyl trong đó xycloalkyl là nhóm xycloalkyl và R là nhóm alkyl thấp hoặc alkyl thấp thế. các nhóm xycloalkyl tùy ý có thể không được thế hoặc thế cụ thể bằng halogen, alkyl thấp, alkoxy thấp, alkylthio axetylen, amino, amido, carboxyl, hydroxyl, aryl, aryloxy, dị vòng, dị vòng thế, hetaryl, hetaryl thế, nitro, xyano, thiol, sulfamido và tương tự.

Thuật ngữ “alkyl xycloheteroalkyl” chỉ nhóm -R'-xycloheteroalkyl trong đó R là nhóm alkyl thấp hoặc alkyl thấp thế. Các nhóm xycloheteroalkyl tùy ý có thể không được thế hoặc thế cụ thể bằng halogen, alkyl thấp, alkoxy thấp, alkylthio axetylen, amino, amido, carboxyl, hydroxyl, aryl, aryloxy, dị vòng, dị vòng thế, hetaryl, hetaryl thế, nitro, xyano, thiol, sulfamido và tương tự.

Các hợp chất của sáng chế có thể được điều chế bằng quy trình hóa học đã biết như được mô tả trước trong hóa hữu cơ được viết bởi Francis Carey and Richard Sundberg and review journal “Account of Chemical research.”

Cụ thể, quy trình được thể hiện ở công thức chung dưới đây là quy trình tổng hợp các hợp chất nhất định của sáng chế.

Công thức I**Công thức II****Công thức III**

Quy trình tổng hợp chung hợp chất có công thức I, II, III: a, K₂CO₃, DMF; b, pyridin, THF; c, Et₃N, dioxan

Các hợp chất của sáng chế này được tổng hợp có thể được tinh chế tiếp bằng sắc khí hoặc kết tinh hoặc phương pháp thích hợp bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm bao gồm một hoặc nhiều hợp chất mô tả ở trên và chất mang dược dụng. Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để gia tăng các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 trong tế bào, hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh khác biệt bởi các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 giảm. Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế

này là sử dụng bất kỳ hợp chất mô tả ở trên để gia tăng các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 trong tế bào, hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh khác biệt bởi các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 giảm được mô tả ở đây và để sản xuất thuốc điều trị các bệnh này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp gia tăng các mức biểu hiện SHP-1 hoặc hoạt tính sinh học trong tế bào, bao gồm bước cho tế bào xử lý bằng một lượng hữu hiệu hợp chất hoặc dược phẩm được mô tả ở đây. Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh khác biệt bởi các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 giảm ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất hoặc dược phẩm được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “xử lý” hoặc “điều trị” bao gồm việc điều trị rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể, hoặc làm giảm bớt các triệu chứng liên quan đến rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể và/hoặc phòng ngừa hoặc giảm bớt các triệu chứng này.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các tình trạng bệnh khác biệt bởi các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 giảm. Hợp chất theo sáng chế có thể được cho bệnh nhân là người sử dụng bởi chính nó hoặc phối chế thành dược phẩm trong đó nó được trộn với chất mang hoặc tá dược phù hợp ở các liên lượng điều trị hoặc cải thiện các điều kiện khác nhau khác biệt bởi các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 giảm. Các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học tăng hoặc giảm của yếu tố, cụ thể là SHP-1) có thể dễ dàng được phát hiện bởi sản phẩm gen của yếu tố như protein hoặc RNA, ở mẫu từ đối tượng, cụ thể là từ máu hoặc mô sinh thiết) và phân tích nó in vitro đối với các mức ARN, cấu trúc và/hoặc hoạt tính của protein thể hiện và tương tự, sử dụng các phương pháp phát hiện đã biết trong lĩnh vực như thử nghiệm ngoại hấp miễn dịch enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay -ELISA), tạo vết phương tây và tạo nét phương bắc. Các ví dụ cụ thể về các bệnh hoặc các tình trạng bệnh khác biệt bởi các mức biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của SHP-1 giảm theo sáng chế bao gồm nhưng

không giới hạn ở bệnh ung thư, cụ thể là bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư bạch cầu, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thận, và chứng loãng xương.

“Đối tượng” cụ thể là động vật có vú, như người, nhưng cũng có thể là động vật nuôi (cụ thể là chó, mèo và tương tự), các động vật ở trang trại (cụ thể là bò, vừu, lợn, ngựa và tương tự) hoặc các động vật thí nghiệm (cụ thể là chuột nhắt, chuột, lợn guine, và tương tự) cần điều trị được mô tả ở đây.

“Lượng hữu hiệu” như được sử dụng ở đây là lượng hoạt chất cần thiết để cho tác dụng điều trị trên đối tượng điều trị, hoặc riêng lẻ hoặc kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất khác. Các lượng hữu hiệu thay đổi, như nhận thấy bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, tùy thuộc vào đường dùng, tá dược sử dụng, và cùng sử dụng hoạt chất khác.

Các đường dùng phù hợp, ví dụ, bao gồm miệng, trực tràng, qua má hoặc hoặc ruột; chuyển qua đường tiêm, bao gồm thuốc tiêm bắp, tiêm ven, trong tủy sống, cũng như nội tủy mạc, nội tâm thất trực tiếp, trong tĩnh mạch, trong bụng, trong mũi, hoặc trong mắt, và tùy ý ở công thức depot hoặc giải phóng kéo dài.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sản xuất theo cách đã biết trong lĩnh vực cụ thể là bằng các quy trình trộn, hòa tan, tạo nhũ, bao nang, sấy, hoặc làm khô lạnh thông thường. Các dược phẩm để sử dụng theo sáng chế do vậy có thể được phối chế theo cách thông thường sử dụng một hoặc nhiều chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý bao gồm các tá dược và/hoặc các chất phụ trợ mà tạo thuận lợi cho việc xử lý các hoạt chất thành các chế phẩm, các chế phẩm này có thể được sử dụng trong ngành dược. Như được sử dụng ở đây, “chấp nhận được” có nghĩa là chất mang bên phải tương thích với hoạt chất của dược phẩm (và tốt hơn là, có thể làm ổn định hoạt chất) và không có hại đến đối tượng cần điều trị. Công thức thích hợp phụ thuộc vào đường dùng đã chọn.

Cụ thể, để tiêm, các hợp chất theo sáng chế có thể được phối chế ví dụ trong các đệm tương thích về mặt sinh lý, như dung dịch Hank, Dung dịch Ringer, hoặc đệm nước muối sinh lý. Nhằm mục đích dùng qua đường miệng,

các hợp chất theo sáng chế có thể được phối chế bằng cách kết hợp các hợp chất hoạt tính với các chất mang được dụng đã biết trong lĩnh vực, như lactoza, sucroza, manitol, sorbitol, tinh bột ngô, tinh bột mỳ, tinh bột gạo, tinh bột khoai tây, gelatin, gôm tragacanth, metyl xenluloza, hydroxypropylmetyl-xenluloza, natri carboxymetyl-xenluloza, và/hoặc polyvinylpyrrolidon (PVP), cho phép các hợp chất của sáng chế được phối chế dưới dạng các viên nén, bi, viên, viên nang, dịch lỏng, gen, xirô, bột nhão, huyền phù và tương tự. Để sử dụng bằng cách xông, các hợp chất của sáng chế có thể được phối chế ở dạng phun sol khí thể hiện từ các gói điều áp hoặc ống phun, có sử dụng một chất đẩy phù hợp cụ thể là diclodyflometan, tricloflometan, diclotetrafloetan, cacbon dioxit hoặc khí phù hợp khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nếu không có chi tiết hơn, chúng tôi tin rằng phần mô tả trên đã mô tả đầy đủ sáng chế. Các ví dụ cụ thể sau đây do đó được cấu tạo chỉ nhằm mục đích minh họa, và không giới hạn phần còn lại của phần mô tả theo cách bất kỳ. Tất cả các công bố, bao gồm các sáng chế được chỉ ra ở đây được đưa vào phần mô tả này bằng cách viện dẫn.

Ví dụ 1: Tổng hợp hóa học

1.1 Các nguyên liệu

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$) được ghi trên dụng cụ Bruker DPX300 (400 MHz). Các dịch chuyển hóa học được thông báo là các giá trị δ (ppm) ở khu vực từ cloroform deuteri hóa bên trong của dung dịch hữu cơ chỉ báo. Các bội số ở đỉnh được biểu thị như sau: s, vạch đơn; d, vạch đôi; t, vạch ba; q, vạch bốn; dd, vạch đôi của các vạch đôi; ddd, vạch đôi của các vạch đôi của các vạch đôi; dt, của các vạch ba; brs, vạch đơn rộng; m, đa vạch. Hằng số ghép nối (các giá trị J) được cho là héc (Hz). Tiến triển phản ứng được xác định là phân tích sắc ký lớp mỏng (TLC) trên tấm silica gel 60 F254 (Merck). Sự tinh chế sắc ký được tiến hành trên các cột silica gel 60 (0,063–0,200mm hoặc 0,040–0,063mm, Merck), silica gel cơ bản. Các chất phản ứng và dung môi

thương mại được sử dụng mà không tinh chế thêm. Các chữ viết tắt được sử dụng là như sau: CDCl_3 , cloroform deuteri hóa; $\text{DMSO}-d_6$, dimetyl sulfoxit- d_6 ; EtOAc, etyl axetat; DMF, *N,N*-dimetylformamit; MeOH, metanol; THF, tetrahydrofuran; EtOH, etanol; DMSO, dimetyl sulfoxit; NMP, *N*-metylpyrrolidon. Phổ khối rửa giải cao được ghi trên phổ kế khối FINNIGAN MAT 95S.

1.2 Các phương pháp

Thiết kế cấu trúc của các hợp chất theo sáng chế được mô tả dưới đây. Trước tiên, nhằm mối tương quan giữa sự ngăn chặn Raf kinaza và điều chỉnh xuống của P-STAT3 bởi sorafenib, các tác giả sử dụng một hóa chất để giảm tương tác liên kết hydro giữa nhóm amit của sorafenib với Raf bằng cách thay nhóm amido bằng nhóm phenylxyano (hợp chất có công thức 1, Fig.1). Các tác giả cũng cải biến SC-1 trên cơ sở các nhóm chức mà chứa các kích cỡ khác nhau, chất cho hydro, chất chấp nhận hydro, khả năng kỵ nước và ưa nước để tạo ra một loạt các hợp chất SC-48, SC-49, SC-54, SC-55, SC-56, SC-58, SC-43, SC-44, SC-45, SC-50, SC-51, SC-52, SC-59, SC-60 và SC-40. Ngoài ra, các tác giả thay nhóm chức ure trong khung sườn sorafenib với các hợp chất amit và sulfonamit khác nhau 2-11. Ngoài ra, các tác giả thay vòng pyridin với quinolin và sử dụng nó dưới dạng nền để tiến hành cải biến kết cấu, tạo ra một loạt các hợp chất có công thức 12-19 và 20-25. Các dẫn xuất SC-1 này được tổng hợp theo quy trình chung được mô tả ở trên trong công thức II Fig.2. Hơn nữa, các tác giả kéo dài độ dài của hợp chất bằng cách bổ sung một vòng phenyl để làm lộ mối tương quan hoạt tính kết cấu với nhóm chức khác 36-38.

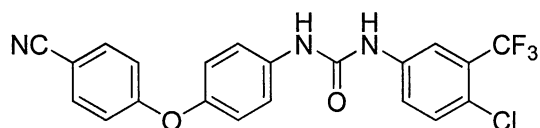
1.2.1 Các quy trình tổng hợp hợp chất có công thức 1 (công thức I)

Bổ sung 4-clo-3- (triflometyl)anilin (0,21g, 1,1mmol) và 2 đương lượng của trietyl amin vào 50mL dung dịch THF của triphosgen (0,30 g, 1,0mmol). Hỗn hợp được gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút. Sau khi nhiệt độ quay trở lại nhiệt độ trong phòng, 4-(4-aminophenoxy)benzonitril trong 10mL dung dịch THF được bổ sung vào hỗn hợp và gia nhiệt đến 50°C trong 30

phút nữa. Hỗn hợp được cho bay hơi, pha loãng bằng nước và pha loãng bằng EtOAc. Dịch chiết được rửa bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat khan, và cô dưới áp suất giảm thu được hợp chất có công thức 1. (0,34 g, 80%)

1.2.1.1.

1-(4-Clo-3-(triflometyl)phenyl)-3-(4-(4-xyanophenoxy)phenyl)ure (1)

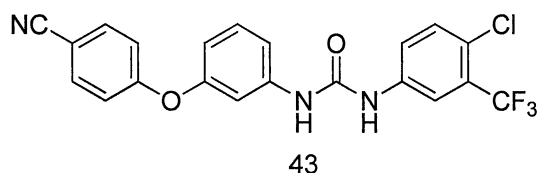


SC-1

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9,17 (s, 1H), 8,94 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,81 (d, 2H, $J = 6,8$), 7,63-7,59 (m, 2H), 7,54 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz), 7,10 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz), 7,05 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4): δ 163,7, 163,6, 154,8, 151,4, 151,2, 140,1, 137,7, 137,4, 135,3, 132,9, 129,7, 129,4, 129,1, 128,8, 128,3, 125,6, 125,5, 125,4, 124,2, 122,9, 122,4, 122,3, 122,1, 120,2, 119,7, 118,8, 118,7, 118,6, 118,6, 106,5, 106,4; HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$): 431,0648. Trên thực tế: 431,0656.

1.2.1.2.

1-(3-(4-xyanophenoxy)phenyl)-3-(4-clo-3-(triflometyl)phenyl)ure (43)

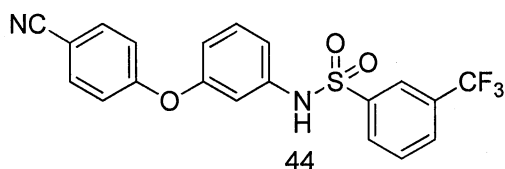


43

^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 9,17 (s, 1H), 9,03 (s, 1H), 8,04 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,83 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,64- 7,55 (m, 2H), 7,41- 7,32 (m, 2H), 7,23 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,11 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 6,75 (dd, $J = 8,0$ Hz, 2,4 Hz, 1H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{21}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}_3\text{Cl}$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$: 430,0570. Trên thực tế: 430,0576.

1.2.1.3.

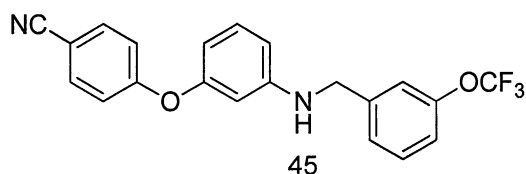
4-(3-(3-(triflometyl)benzensulfonylamino)phenoxy)benzonitril (44)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,00 (s, 1H), 7,96 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,81 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,65- 7,54 (m, 3H), 7,26 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,08 (s, 1H), 7,05- 6,97 (m, 1H), 6,94- 6,86 (m, 3H), 6,84 (t, $J = 2,0$ Hz, 1H), 6,81 (dd, $J = 8,4$ Hz, $2,0$ Hz, 1H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{F}_3\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 417,0521. Trên thực tế: 417,0518.

1.2.1.4.

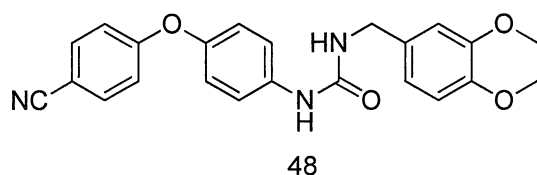
4-(3-(3-(trifluoromethoxy)benzylamino)phenoxy)benzonitril (45)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,61 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,43 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,33 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,29- 7,16 (m, 3H), 7,04 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,55 (dd, $J = 8,0$ Hz, $2,4$ Hz, 1H), 6,46 (dd, $J = 8,0$ Hz, $2,0$ Hz, 1H), 6,34 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H), 4,41 (s, 2H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{F}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 385,1164. Trên thực tế: 385,1157.

1.2.1.5.

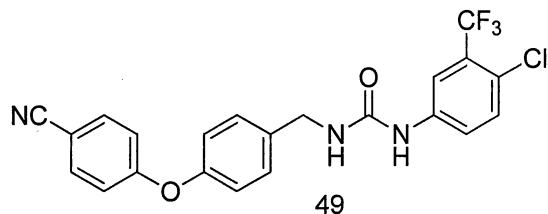
1-(4-(4-cyanophenoxy)phenyl)-3-(3,4-dimethoxybenzyl)ure (48)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,56 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H), 7,34 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,98- 6,94 (m, 4H), 6,88-6,75 (m, 4H), 6,56 (brs, 1H), 4,36 (s, 2H), 3,84 (s, 6H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 402,1454. Trên thực tế: 402,1462.

1.2.1.6.

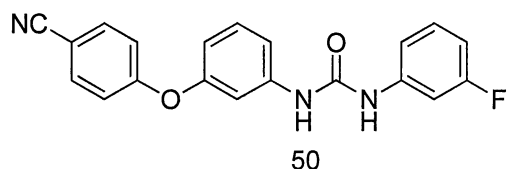
1-(4-clo-3-(triflometyl)phenyl)-3-(4-(4-xyanophenoxy)benzyl)ure (49)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,76 Hz(s, 1H), 7,51- 7,39 (m, 3H), 7,29 (dd, $J = 8,8$ Hz, 2,4 Hz, 1H), 7,13 (d, $J = 8,4$ Hz, 3H), 6,83 (dd, $J = 8,8$ Hz, 4,8 Hz, 4H), 5,93 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 4,24 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}_3\text{Cl}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 444,0727. Trên thực tế: 444,0732.

1.2.1.7.

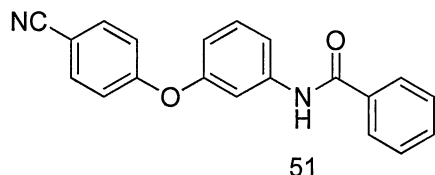
1-(3-(4-xyanophenoxy)phenyl)-3-(3-flophenyl)ure (50)



^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7,66 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 7,60 (s, 1H), 7,41 - 7,34 (m, 2H), 7,22 (q, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,18 (dd, $J = 8,0$ Hz, 2,0 Hz, 1H), 7,10-7,02 (m, 3H), 6,71 (dd, $J = 8,8$ Hz, 2,4 Hz, 2H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 346,0992. Trên thực tế: 346,0999.

1.2.1.8.

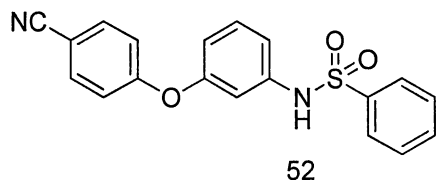
N-(3-(4-xyanophenoxy)phenyl)benzamid (51)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,82 (s, 1H), 7,75 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,53 (s, 1H), 7,46- 7,35 (m, 4H), 7,28 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,22 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,90 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,72 (dd, $J = 8,0$ Hz, 2,0 Hz, 1H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 313,0977. Trên thực tế: 313,0971.

1.2.1.9.

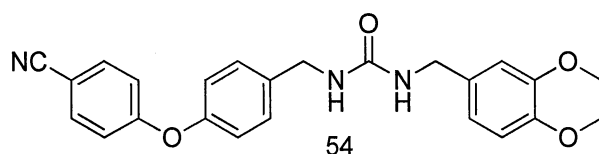
N-(3-(4-cyanophenoxy)phenyl)benzenesulfonamit (52)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,79 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,53 (t, $J = 4,4$ Hz, 3H), 7,42 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,20 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,93 (dd, $J = 8,0$ Hz, 2,0 Hz, 1H), 6,86- 6,83 (m, 3H), 6,73 (dd, $J = 8,0$ Hz, 2,0 Hz, 1H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 349,0647. Trên thực tế: 2349,0643.

1.2.1.10.

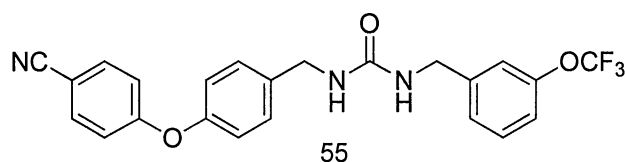
1-(4-(4-cyanophenoxy)benzyl)-3-(3,4-dimethoxybenzyl)ure (54)



^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 7,81 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 7,33 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,06 (dd, $J = 15,6$ Hz, 9,2 Hz, 4H), 6,86 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 6,76 (dd, $J = 8,0$ Hz, 2,0 Hz, 1H), 6,45 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 6,38 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 4,23 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H), 4,14 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H), 3,69 (s, 6H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 418,1767. Trên thực tế: 418,1773.

1.2.1.11.

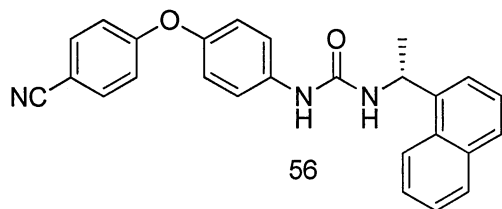
1-(4-(4-cyanophenoxy)benzyl)-3-(3-(trifluoromethoxy)benzyl)ure (55)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,49 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 7,17 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,10 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,00 – 6,92 (m, 3H), 6,88 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 6,84 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,17- 6,05 (m, 2H), 4,10 (m, 4H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 442,1379. Trên thực tế: 442,1381.

1.2.1.12.

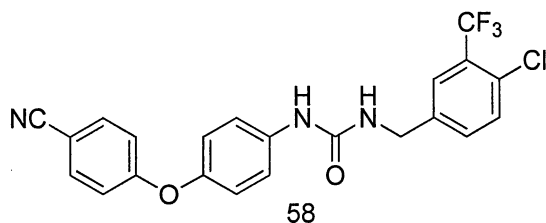
(R)-1-(4-(4-cyano-phenoxy)phenyl)-3-(1-(naphthalen-1-yl)ethyl)ure (56)



^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 8,17 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,87 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,78 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,65 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,58 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,53 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,50- 7,45 (m, 2H), 7,41 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,99 (t, $J = 9,2$ Hz, 4H), 5,74 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 1,63 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 406,1556. Trên thực tế: 406,1563.

1.2.1.13.

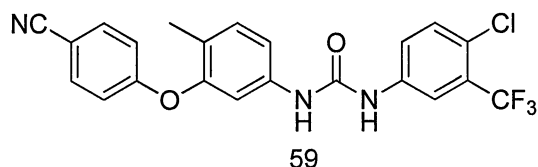
1-(4-clo-3-(triflometyl)benzyl)-3-(4-(4-cyano-phenoxy)phenyl)ure (58)



^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7,74 (brs, 1H), 7,66 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 7,56 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H), 7,44 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 7,05- 6,98 (m, 4H), 4,43 (s, 2H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}_3\text{Cl}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 444,0727. Trên thực tế: 444,0736.

1.2.1.14.

1-(4-clo-3-(triflometyl)phenyl)-3-(3-(4-cyano-phenoxy)-4-metyl-phenyl)ure (59)

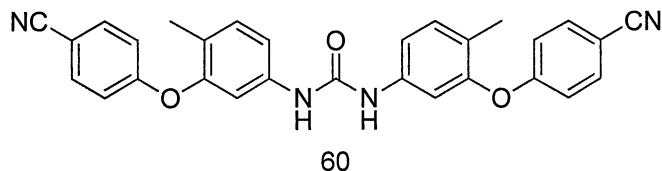


^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7,87 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 7,60 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 7,54 (dd, $J = 8,4$ Hz, 2,4 Hz, 1H), 7,39 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,25 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,18 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,12 (dd, $J = 8,0$ Hz, 2,4 Hz, 1H), 6,93 (d,

$J = 9,6$ Hz, 2H), 2,02 (s, 3H); HRMS theo lý thuyết đối với $C_{22}H_{14}N_3O_2F_3Cl$ $[M-H]^-$: 444,0727. Trên thực tế: 444,0725.

1.2.1.15.

1,3-bis(3-(4-xyanophenoxy)-4-metylphenyl)ure (60)



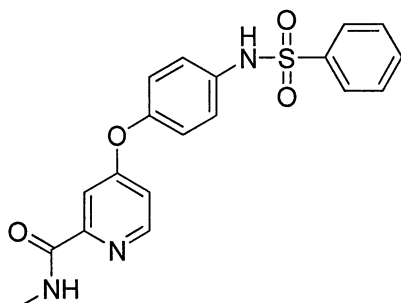
1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 8,77 (s, 2H), 7,80 (d, $J = 8,0$ Hz, 4H), 7,29 (s, 2H), 7,24 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,13 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,98 (d, $J = 8,4$ Hz, 4H), 2,02 (s, 6H); HRMS theo lý thuyết đối với $C_{29}H_{21}N_4O_3$ $[M-H]^-$: 473,1614. Trên thực tế: 473,1619.

1.2.2 Các quy trình chung cho hợp chất 2-25

Trong một bình tròn hai cổ dung tích 25mL, các dẫn xuất anilin (1mmol) và lượng xúc tác sáng chế của pyridin được đặt trong THF khan (10mL) ở nhiệt độ trong phòng. Các hợp chất axyl clorua hoặc sulfonyl clorua được bổ sung vào hỗn hợp và khuấy trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ trong chân không và cặn thô được tinh chế bằng sắc ký trên cột silica gel sử dụng EtOAc/Hexan làm chất rửa giải (1/10 đến 1/2). Quy trình này thu được sản phẩm ghép mong đợi dưới dạng chất rắn màu trắng với hiệu suất nằm trong khoảng từ 70 đến 95%.

1.2.2.1.

N-Metyl-4-(4-(phenylsulfonamido)phenoxy)picolinamit (2)

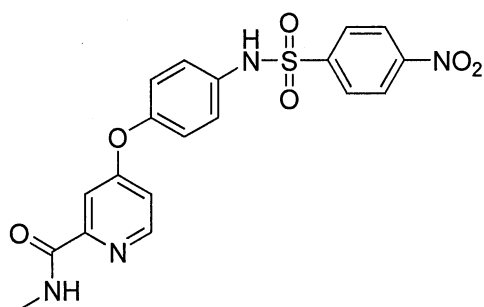


1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,36 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 8,01 (brs, 1H),

7,76 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz), 7,59 (s, 1H), 7,54 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,46 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,12 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 6,94 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 6,92-6,90 (m, 1H), 3,00 (d, 3H, $J = 5,2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166,0, 164,6, 152,1, 151,0, 149,7, 138,9, 134,2, 133,0, 129,0, 127,1, 123,9, 121,6, 114,3, 109,9, 26,1; HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$): 383,0940. Trên thực tế: 383,0941.

1.2.2.2.

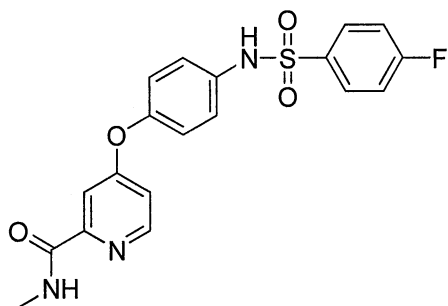
N-Metyl-4-(4-(4-nitrophenylsulfonamido)phenoxy)picolinamit (3)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,39 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 8,30 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 8,07 (brs, 1H), 7,93 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 7,49 (s, 1H), 7,17 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 7,01-6,98 (m, 3H), 3,00 (d, 3H, $J = 5,2$ Hz); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$): 428,0791. Trên thực tế: 428,0798.

1.2.2.3.

4-(4-(4-Fluorophenylsulfonamido)phenoxy)-N-metylpicolinamit(4)

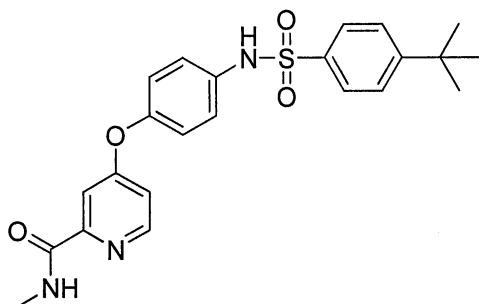


^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,37 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 8,00 (brs, 1H), 7,77-7,43 (m, 2H), 7,57 (s, 1H), 7,17-7,09 (m, 4H), 6,99-6,93 (m, 4H), 3,00 (d, 3H, $J = 4,8$ Hz); NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166,5, 165,9, 164,6, 163,9, 152,1, 151,2, 149,7, 135,0, 134,0, 130,0, 129,9, 124,1, 121,7, 116,4, 116,2, 114,5,

109,8, 26,19; HRMS theo lý thuyết đối với $C_{19}H_{16}FN_3O_4S$ ($M+H$): 401,0846. Trên thực tế: 401,0849.

1.2.2.4.

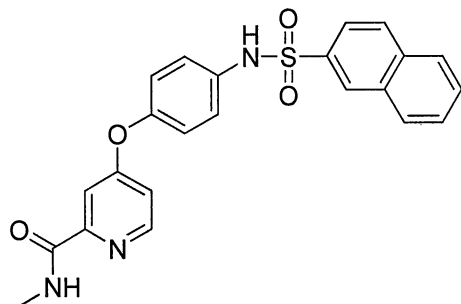
4-(4-(4-tert-Butylphenylsulfonamido)phenoxy)-N-metylpicolinamit (5)



1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,33 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 8,21 (brs, 1H), 7,79 (brs, 1H), 7,69 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz), 7,62 (s, 1H), 7,44 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz), 7,15 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz), 6,91 (s, 2H, $J = 6,8$ Hz), 6,88-6,86 (m, 1H), 2,98 (d, 3H, $J = 5,2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 166,0, 164,6, 156,8, 152,2, 150,8, 149,7, 136,1, 134,4, 127,0, 126,1, 123,6, 121,6, 114,1, 110,1, 35,1, 30,1, 26,1; HRMS theo lý thuyết đối với $C_{23}H_{25}N_3O_4S$ ($M+H$): 439,1566. Trên thực tế: 439,1564.

1.2.2.5.

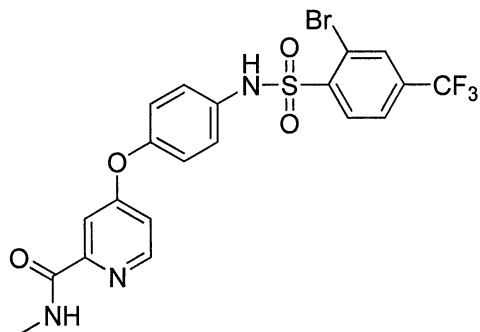
N-Metyl-4-(4-(naphthalene-2-sulfonamido)phenoxy)picolinamit (6)



1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,34 (s, 1H), 8,30 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,05-8,02 (m, 1H), 7,89-7,83 (m, 4H), 7,74 (dd, 1H, $J = 8,4, 1,6$ Hz), 7,60-7,52 (m, 3H), 7,16 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 6,88 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 6,84-6,82 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 165,9, 164,6, 152,1, 151,0, 149,7, 135,9, 134,9, 134,2, 132,0, 129,4, 129,3, 128,9, 128,7, 127,9, 127,5, 123,9, 122,2, 121,6,

114,2, 110,1, 26,2; HRMS theo lý thuyết đối với $C_{23}H_{19}N_3O_4S$ (M+H): 433,1096. Trên thực tế: 433,1079.

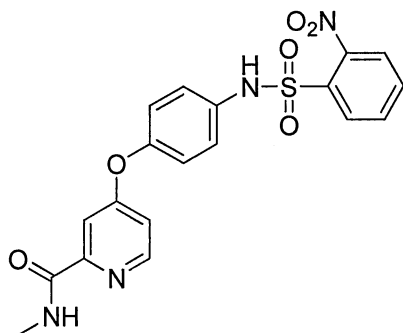
1.2.2.6. 4-(4-(2-Brom-4-(triflometyl)phenylsulfonamido)phenoxy)-N-metylpicolinamit (7)



1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,35 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 8,15 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,79 (brs, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,67 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,57 (s, 1H), 7,18 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz), 6,95 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz), 6,90-6,88 (m, 1H), 2,98 (d, 3H, $J = 5,2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 165,7, 164,5, 152,2, 151,6, 149,8, 141,5, 136,1, 135,8, 135,5, 135,2, 132,7, 132,2 (m), 124,9 (m), 124,1, 123,5, 121,7, 120,8, 120,4, 114,5, 110,0, 26,1; HRMS theo lý thuyết đối với $C_{20}H_{15}BrF_3N_3O_4S$ (M+H): 528,9919. Trên thực tế: 528,9917.

1.2.2.7.

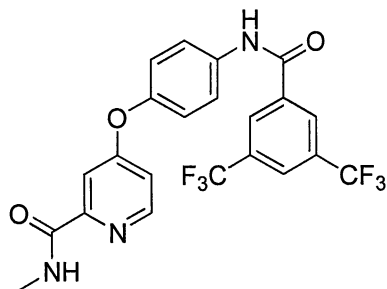
N-Metyl-4-(4-(2-nitrophenylsulfonamido)phenoxy)picolinamit (8)



1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,37 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,98 (brs, 1H), 7,86-7,83 (m, 2H), 7,72-7,68 (m, 2H), 7,55 (s, 1H), 7,24 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 6,98 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 6,94-6,92 (m, 1H), 2,98 (d, 3H, $J = 4,8$ Hz); HRMS theo lý thuyết đối với $C_{19}H_{16}N_4O_6S$ (M+H): 428,0791. Trên thực tế: 428,0796.

1,2,7,8

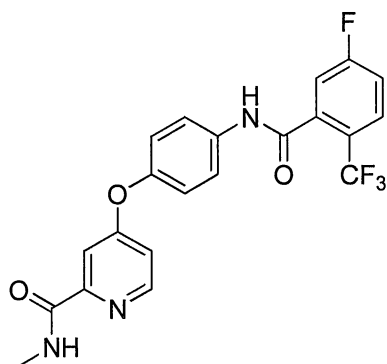
4-(4-(3,5-Bis(triflometyl)benzamido)phenoxy)-N-metylpicolinamit (9)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9,92 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,33 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 8,10 (q, 1H, $J = 5,2$ Hz), 7,90 (s, 1H), 7,71 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 7,40 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz), 6,99-6,97 (m, 1H), 6,93 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 2,91 (d, 3H, $J = 4,8$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4): δ 167,8, 166,8, 165,1, 153,4, 151,8, 151,6, 138,6, 137,6, 133,6, 133,3, 133,0, 132,6, 129,4 (d), 126,2 (m), 126,0, 124,2, 123,2, 122,4, 115,2, 110,7, 26,4; HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$): 483,1018. Trên thực tế: 483,1017.

1.2.2.9

4-(4-(5-Flo-2-(triflometyl)benzamido)phenoxy)-N-metylpicolinamit (10)

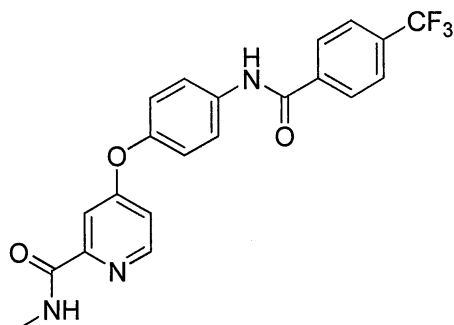


^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,66 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz), 8,31-8,26 (m, 2H), 7,93 (s, 1H), 7,70-7,65 (m, 3H), 7,56 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz), 7,24-7,19 (m, 1H), 7,02 (d, 2H, $J = 6,4$ Hz), 6,89-6,87 (m, 1H), 2,90 (d, 3H, $J = 3,2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4): δ 166,2, 164,5, 162,9, 160,4, 160,0, 159,9, 152,2, 150,4, 149,7, 135,0, 130,6 (m), 129,8 (m), 128,3, 128,1, 127,7, 127,4, 124,5, 122,5, 122,4, 122,3, 121,8, 121,5, 117,2, 117,0, 114,1, 110,1, 26,1; HRMS theo

lý thuyết đối với $C_{21}H_{15}F_4N_3O_3$ (M+H): 433,1050. Trên thực tế: 433,0152.

1.2.2.10.

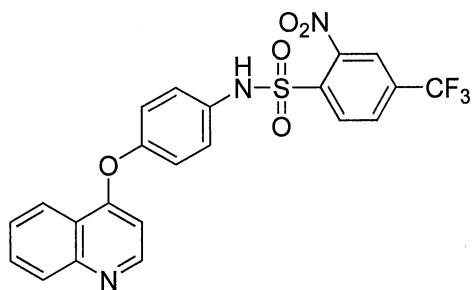
N-Metyl-4-(4-(4-(triflometyl)benzamido)phenoxy)picolinamit (11)



1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 9,45 (s, 1H), 8,31 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 8,15 (s, 1H), 8,08 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,71-7,65 (m, 3H), 7,50 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 7,47 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 6,96-6,91 (m, 3H), 2,92 (d, 3H, $J = 5,2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 166,4, 164,8, 164,7, 151,8, 149,9, 149,8, 138,8, 135,5, 131,4, 131,1, 130,8, 130,7, 130,5, 129,1, 128,1, 125,0, 124,3 (m), 122,6, 122,3, 121,2, 114,4, 109,5, 26,1; HRMS theo lý thuyết đối với $C_{21}H_{16}F_3N_3O_3$ (M+H): 415,1144. Trên thực tế: 415,1146.

1.2.2.11.

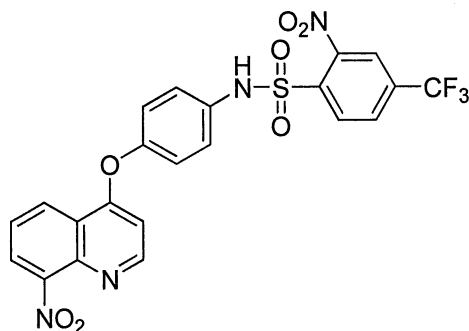
2-Nitro-N-(4-(quinolin-4-yloxy)phenyl)-4-(triflometyl)benzensulfon-amit (12)



1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,71 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,28 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8,12 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8,10 (s, 1H), 8,05 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,89 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,80-7,76 (m, 1H), 7,61-7,57 (m, 1H), 7,31 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 7,13 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 6,53 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz); HRMS theo lý thuyết đối với $C_{22}H_{14}F_3N_3O_5S$ (M+H): 489,0606. Trên thực tế: 489,0610.

1.2.2.12.

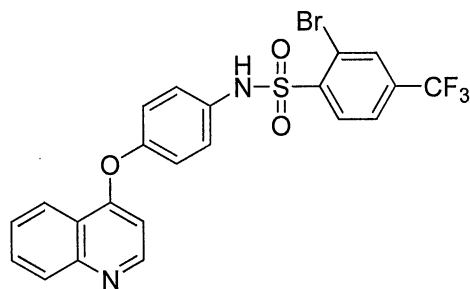
2-Nitro-N-(4-(8-nitroquinolin-4-yloxy)phenyl)-4-(triflormetyl)benzen-sulfonamit (13)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,78 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,51 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 8,19 (s, 1H), 8,12-8,02 (m, 3H), 7,89 (t, 1H, $J = 9,6$ Hz), 7,62 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,34 (d, 2H, $J = 9,6$ Hz), 7,15 (d, 2H, $J = 9,6$ Hz), 6,91 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 6,59 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 6,55 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$): 534,0457. Trên thực tế: 534,0423.

1.2.2.13

2-Brom-N-(4-(quinolin-4-yloxy)phenyl)-4-(triflormetyl)benzensulfon-amit (14)

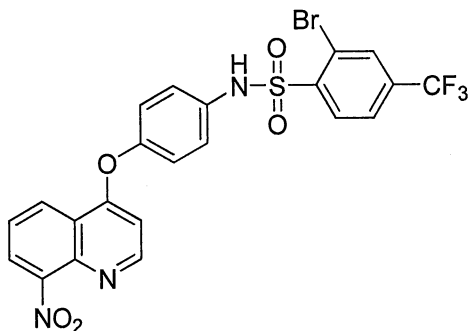


^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,65 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,25 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8,18 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8,07 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,98 (s, 1H), 7,73 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,67 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,54 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,24 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 7,05 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 6,43 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 161,3, 152,6, 150,9, 149,7, 141,4, 135,9, 135,6, 135,3, 132,7, 132,4, 132,2 (m), 130,3, 129,1, 126,3, 124,9 (m), 124,4, 123,5, 122,1, 122,0, 121,9, 121,6, 121,3, 120,8, 120,4, 116,3, 104,4; HRMS theo lý thuyết đối với

$C_{22}H_{14}BrF_3N_2O_3S$ (M+H): 521,9861. Trên thực tế: 521,9858.

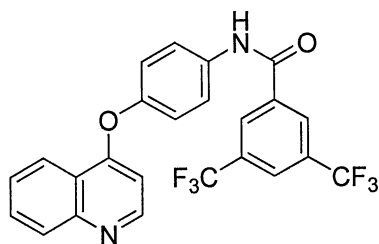
1.2.2.14.

2-Brom-N-(4-(8-nitroquinolin-4-yloxy)phenyl)-4-(triflometyl)benzen-sulfonamit (15)



1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,76 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,49 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8,18 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8,04 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,99 (s, 1H), 7,68 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,60 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,25 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 7,07 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 6,53 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz); HRMS theo lý thuyết đối với $C_{22}H_{13}BrF_3N_3O_5S$ (M+H): 566,9711. Trên thực tế: 566,9706.

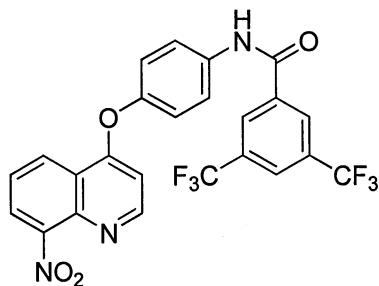
1.2.2.15.N-(4-(Quinolin-4-yloxy)phenyl)-3,5-bis(triflometyl)benzamit (16)



1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 10,02 (s, 1H), 8,59 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 8,37 (s, 2H), 8,34 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,99 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,92 (s, 1H), 7,80 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz), 7,70 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz), 6,56 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,14 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz), 6,52 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 162,6, 161,0, 151,5, 150,0, 149,2, 137,0, 136,1, 131,0, 130,7, 130,4, 130,3, 130,0, 128,8, 128,5 (m), 126,4, 125,2 (m), 124,5, 122,5, 121,7, 121,5, 121,3, 120,6, 104,3; HRMS theo lý thuyết đối với $C_{24}H_{14}F_6N_2O_2$ (M+H): 476,0959. Trên thực tế: 476,0958.

1.2.2.16

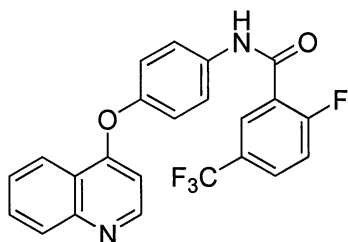
N-(4-(8-Nitroquinolin-4-yloxy)phenyl)-3,5-bis(triflometyl)benzamid (17)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9,05 (s, 1H), 8,69 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz), 8,59 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz), 8,35 (s, 2H), 8,06 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,97 (s, 1H), 7,80 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz), 7,63 (t, 1H, $J = 8,6$ Hz), 7,16 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz), 6,62 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{24}\text{H}_{13}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$): 521,0810. Trên thực tế: 521,0814.

1.2.2.17 2-Flo-N-(4-(quinolin-4-yloxy)phenyl)-5-(triflometyl)benzamid

(18)

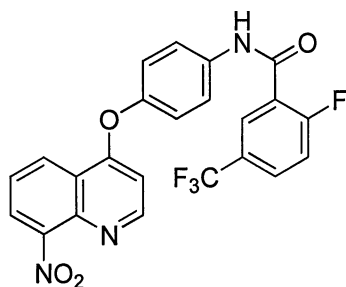


^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,83 (d, 1H, $J = 12,8$ Hz), 8,68 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,39-8,30 (m, 2H), 8,11 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,79-7,67 (m, 4H), 7,58 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,27-7,22 (m, 1H), 7,18 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz), 6,56 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4): δ 164,4, 164,2, 163,8, 161,7, 151,9, 151,8, 149,7, 137,5, 132,1 (m), 131,2 (m), 128,9 (m), 128,3, 128,1, 127,9, 126,5, 126,3, 123,7, 123,6, 123,0, 122,7, 122,6, 119,1, 119,8, 118,7, 118,5, 105,2; HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$): 426,0991. Trên thực tế: 426,0991.

1.2.2.18.

2-Flo-N-(4-(8-nitroquinolin-4-yloxy)phenyl)-5-(triflometyl)benzami-de

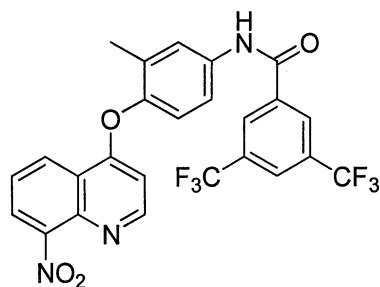
(19)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,81 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,59 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 8,53-8,47 (m, 2H), 8,06 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,83-7,77 (m, 3H), 7,64 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,37-7,32 (m, 1H), 7,23-7,20 (m, 2H), 6,68 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$): 471,0842. Trên thực tế: 471,0850.

1.2.2.19

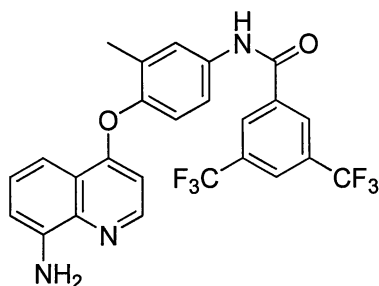
N-(3-Metyl-4-(8-nitroquinolin-4-yloxy)phenyl)-3,5-bis(triflometyl)benzamid (20)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9,86 (s, 1H), 8,45 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,38 (s, 2H), 8,31 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,92 (s, 1H), 7,89 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,69-7,63 (m, 2H), 7,53 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,33 (s, 1H), 7,28 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 6,33 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{25}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$): 535,0967 Trên thực tế: 535,0956.

1.2.2.20.

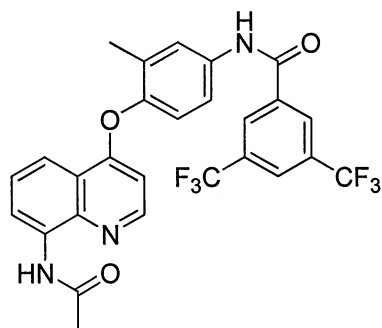
N-(4-(8-Aminoquinolin-4-yloxy)-3-metylphenyl)-3,5-bis(triflometyl)-benzamid (21)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,49 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz), 8,27 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,65 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,48-7,45 (m, 2H), 7,37-7,32 (m, 2H), 6,96 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 4,95 (s, 2H), 2,16 (s, 3H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$): 505,1225. Trên thực tế: 505,1216.

1.2.2.21.

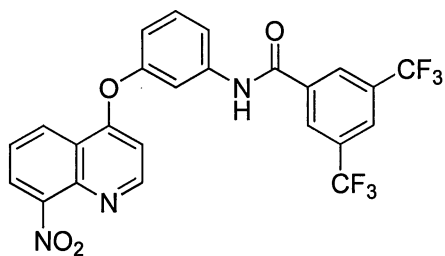
N-(4-(8-Axetamidoquinolin-4-yloxy)-3-methylphenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamidit (22)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9,77 (s, 1H), 9,36 (s, 1H), 8,65 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz), 8,46 (s, 2H), 8,44 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 7,97 (s, 1H), 7,87 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,72 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,50 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz), 7,37 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,28 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 6,41 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 2,26 (s, 3H), 2,10 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 169,2, 163,0, 161,2, 152,0, 148,8, 139,5, 137,2, 136,7, 133,8, 132,6, 132,3, 132,2, 132,0, 131,6, 127,8, 127,1, 126,3, 125,2 (m), 124,2, 121,5, 120,4, 118,8, 118,3, 116,7, 115,7, 113,8, 25,0, 15,4; HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$): 547,1331. Trên thực tế: 547,1325.

1.2.2.22.

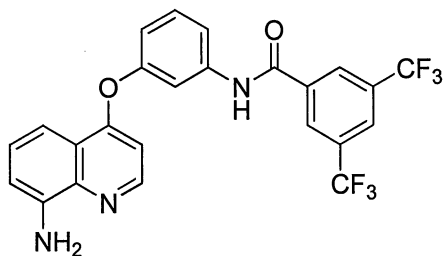
N-(3-(8-Nitroquinolin-4-yloxy)phenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamidit (23)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,78 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 8,58 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8,52 (s, 1H), 8,31 (s, 2H), 8,22 (s, 1H), 8,08-8,04 (m, 2H), 7,71 (s, 1H), 7,64 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,53-7,49 (m, 2H), 7,03 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz), 6,71 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{24}\text{H}_{13}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$): 521,0810. Trên thực tế: 521,0821.

1.2.2.23.

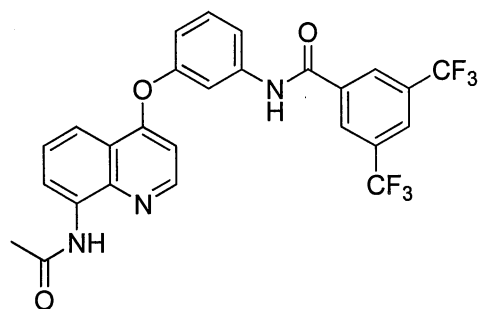
N-(3-(8-Aminoquinolin-4-yloxy)phenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamidit (24)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,55 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz), 8,29 (s, 2H), 8,05 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,60 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,55 (s, 1H), 7,70-7,43 (m, 2H), 7,34 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,01 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 6,96 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 6,63 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 163,1, 161,3, 155,3, 147,9, 143,6, 139,9, 138,8, 136,5, 132,7, 132,4, 132,1, 131,7, 130,6, 127,5 (d), 127,0, 126,8, 125,3 (m), 124,1, 122,0, 118,7, 117,4, 117,2, 113,1, 111,1, 110,0, 105,4; HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{24}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$): 491,1068. Trên thực tế: 491,1068.

1.2.2.24.

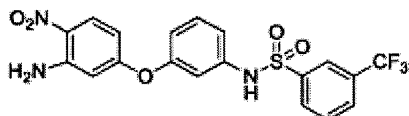
N-(3-(8-Acetamidoquinolin-4-yloxy)phenyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzamidit (25)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9,77 (s, 1H), 8,74 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 8,54 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,48 (s, 1H), 8,39 (s, 2H), 8,04 (s, 1H), 7,87 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,67-7,60 (m, 2H), 7,50-7,43 (m, 2H), 7,37 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,00 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 6,65 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 2,30 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 169,3, 163,1, 161,7, 154,6, 148,7, 139,6, 136,6, 133,8, 132,7, 132,4, 132,1, 131,7, 130,8, 127,8 (d), 126,9, 126,5, 125,3 (m), 124,2, 121,5, 120,8, 117,7, 117,3, 116,8, 115,7, 113,2, 104,9, 25,0; HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{26}\text{H}_{17}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$): 533,1174. Trên thực tế: 533,1167.

1.2.2.25

N-(3-(triflometyl)benzen-sulfonyl)-3-(3-amino-4-nitrophenoxy) -
benzenamin (SC-40)

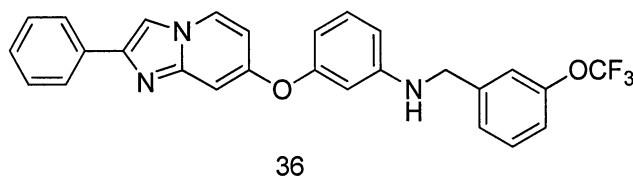


^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,06 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,96 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,81 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,61 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,27 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,91- 6,80 (m, 3H), 6,19 (dd, $J = 9,6$ Hz, 2,4 Hz, 1H), 6,14 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 6,10 (brs, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 163,1, 155,5, 146,7, 140,0, 137,6, 132,0, 131,6, 130,9, 130,3, 130,0, 129,9 (m), 128,8, 128,0, 124,4, 124,3, 124,2, 124,2, 124,0, 121,6, 117,8, 117,6, 113,6, 107,6, 104,3; LC-MS (ESI): M/Z 452 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5\text{F}_3\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 452,0528. Trên thực tế: 452,0529.

1.2.3 hợp chất 36-38

1.2.3.1

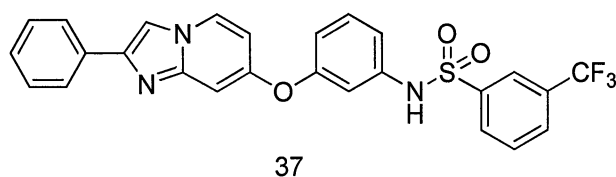
3-(2-phenylH-imidazo[1,2-a]pyridin-7-yloxy)-N-(3-(triflometoxy)-benzyl)benzenamin (36)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,96 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,89 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,71 (s, 1H), 7,40 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,35- 7,24 (m, 3H), 7,18 (s, 1H), 7,14 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,09 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,98 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 6,60 (dd, $J = 7,2$ Hz, 2,4 Hz, 1H), 6,46- 6,40 (m, 2H), 6,32 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H), 4,31 (s, 1H), 4,20 (s, 1H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 476,1586. Trên thực tế: 476,1592.

1.2.3.2

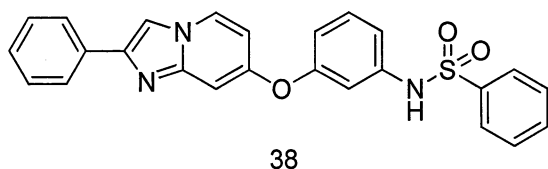
N-(3-(2-phenylimidazo[1,2-a]pyridin-7-yloxy)phenyl)-3-(triflometyl)benzensulfonamit (37)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,03 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H), 7,92 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,87 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H), 7,76 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H), 7,60 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,39 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,30 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H), 7,21 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,96- 6,90 (m, 2H), 6,83 (dd, $J = 13,6$ Hz, 2,4 Hz, 1H), 6,82 (t, $J = 2,0$ Hz, 2H), 6,60 (dd, $J = 7,2$ Hz, 2,4 Hz, 1H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 510,1099. Trên thực tế: 510,1100.

1.2.3.3

N-(3-(2-phenylimidazo[1,2-a]pyridin-7-yloxy)phenyl)benzensulfon-amit (38)



^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 8,52 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,93 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,76- 7,70 (m, 2H), 7,66- 7,54 (m, 3H), 7,43 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,33- 7,26 (m, 2H), 6,92 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,84- 6,76 (m, 3H), 6,64 (dd, $J = 7,6$ Hz, 2,4 Hz, 1H); HRMS theo lý thuyết đối với $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 442,1225. Trên thực tế: 442,1216.

Ví dụ 2: Thử nghiệm sinh học

2.1 Các nguyên liệu và phương pháp

2.1.1. Các chất tham gia phản ứng và các kháng thể

Sorafenib (Nexavar[®]) được cung cấp bởi Bayer Pharmaceuticals (West Haven, CT). Natri vanadat và chất ức chế SHP-1 do Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) bán trên thị trường. Các kháng thể để tạo vết miễn dịch như Raf-1, xylcin D1, và PARP do Santa Cruz Biotechnology (San Diego, CA) bán trên thị trường. Các kháng thể khác như anti-pVEGFR2 (Y1175), VEGFR2, survivin, phospho-STAT3 (Tyr705), và STAT3 do Cell Signaling (Danvers, MA) bán trên thị trường.

2.1.2. Nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào Huh-7 HCC thu được từ The Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan; JCRB0403). Các dòng tế bào PLC/PRF/5 (PLC5), Sk-Hep-1, và Hep3B thu được từ American Type Culture Collection (Manassas, VA). Các tế bào được duy trì trong DMEM có bổ sung FBS 10%, 100 đơn vị/mL penixilin G, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin sulfat và 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B trong lò ủ được làm ẩm ở nhiệt độ 37°C trong khí quyển CO_2 5% trong không khí. Các dòng tế bào khác, bao gồm các tế bào ung thư vú cụ thể là MDAMB231, MDAMB468, MCF-7, và các tế bào ung thư bạch cầu cụ thể là HL-60, KG-1 và L-1 cũng được cung cấp cho các thử nghiệm được mô

tả dưới đây.

2.1.3. ELISA phát hiện sự chết tế bào

Tác dụng của các hợp chất của sáng chế lên khả năng thay đổi của tế bào được đánh giá bằng thử nghiệm ELISA chết tế bào (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Các tế bào được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm ví dụ ở nồng độ 5 và 10 μ M trong thời gian 24 giờ. Các tế bào được thu gom và ghi vào biên bản chuẩn bởi nhà sản xuất.

2.1.4. Phân tích cơ chế gây chết tế bào theo chương trình

Các tế bào chết theo chương trình được đo bằng dòng tế bào kế (sub-G1). Sau xử lý bằng các hợp chất khác nhau, các tế bào được trypsin hóa, được thu gom bằng cách ly tâm và treo lại trong PBS. Sau khi ly tâm, các tế bào được rửa trong PBS và treo lại trong dung dịch tạo vết kali iodua (PI). Các mẫu được ủ trong bóng tối trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C và sau đó được phân tích bằng dòng tế bào kế EPICS Profile II (Coulter Corp., Hialeah, FL). Tất cả các thí nghiệm được tiến hành ba lần.

2.1.5. Mức Phospho-STAT3

Kit ELISA kẹp PathScan Phospho-Stat3 (Tyr705) được sử dụng để phát hiện phospho-STAT3 (Cell Signaling, Danvers, MA). Các tế bào được xử lý trước bằng IL-6 1 ng/ml và sau đó tiếp xúc với các hợp chất khác nhau ở nồng độ 10 μ M trong thời gian 24 giờ. Sau khi ủ bằng các dịch thủy phân tế bào, cả non-phospho- và phospho-Stat3 protein được giữ lại bởi kháng thể bọc. Sự biểu hiện của phospho-STAT3 được đo ở phổ hấp thụ 450nm.

2.1.6. Tạo vết phương tây

Các tế bào được xử lý bằng các hợp chất khác nhau ở nồng độ 5 và 10 μ M trong thời gian 24 giờ. Các dịch thủy phân tế bào được phân tích bằng tạo vết phương tây.

2.1.7. Tiêu diệt gen sử dụng siRNA

siRNA bơi thông minh, bao gồm gen kiểm soát (D-001810-10), Raf-1,

SHP-1, SHP-2, và PTP-1B, tất cả do Dharmacon Inc. (Chicago, IL) bán trên thị trường. Quy trình được mô tả từ trước (Chen KF *et al. J Biol Chem* 2009; 284:11121-11133).

2.1.8. PLC5 với sự biểu hiện ectopic của STAT3

STAT3 cDNA (KIAA1524) và STAT3-C do Addgene plasmid repository (<http://www.addgene.org/>) bán trên thị trường. Tóm lại, sự chuyển nạp sau đây, các tế bào được ủ có mặt G418 (0,78 mg/mL). Sau 8 tuần chọn, các khuẩn lạc sống sót, tức là, các khuẩn lạc phát sinh từ các tế bào chuyển nạp ổn định, được chọn và khuếch đại riêng.

2.1.9. Hoạt tính phosphatase và kinaza

Kit thử nghiệm RediPlate 96 EnzChek® Tyrosin Phosphatase (R-22067) được sử dụng cho thử nghiệm hoạt tính SHP-1 (Molecular Probes, Carlsbad, CA). Kit thử nghiệm Raf-1 kinaza cascade (Upstate-Millipore, Billerica, MA) được sử dụng để đánh giá hoạt tính Raf-1 kinaza. Kit hoạt tính JAK2 kinaza do Reaction Biology Corp. (Malvern, PA) bán trên thị trường.

2.1.10. Thử nghiệm gen chỉ thị STAT3

Các tế bào được cấy trên tấm 96 lỗ và xử lý sơ bộ bằng IL-6 ở liều lượng 10ng/μl trong thời gian 30 phút. Kit gen chỉ thị STAT3 là do SABiosciences (Frederick, MD) bán trên thị trường.

2.1.11. Sự phát triển khối u xenograft

Các con chuột trụi lông đực NCr athymic (5-7 tuần tuổi) thu được từ The National Laboratory Animal Center (Taipei, Taiwan). Tất cả các quy trình thí nghiệm sử dụng các con chuột này được tiến hành theo các biên bản được phê chuẩn bởi National Taiwan University. Khi các khối u Huh-7 đạt 100-200mm³, các con chuột được sử dụng sorafenib tosylat (10mg/kg) qua đường miệng một lần một ngày, hoặc SC-1 (10mg/kg) qua đường miệng một lần một ngày. Các con kiểm chứng thu được chất mang (Chen KF *et al. Cancer Res.* 2008; 68:6698-6707).

2.1.12. Phân tích thống kê.

So sánh các giá trị trung bình được tiến hành sử dụng thử nghiệm *t* các mẫu độc lập trong SPSS đối với phần mềm Windows 11.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL) (Chen KF et al. Cancer Res 2008; 68:6698-6707).

2.2 Các kết quả

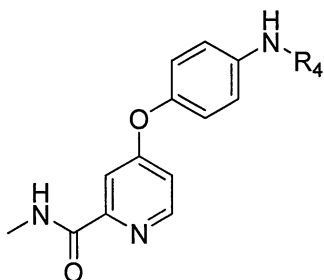
2.2.1 Hợp chất có công thức 1 không ảnh hưởng đến hoạt tính Raf kinaza

Như được mô tả ở trên, các tác giả đã tổng hợp một dẫn xuất sorafenib mà không tạo ra khả năng của chất cho hydro bằng cách thay vòng pyridin và nhóm chức amit bằng phenyl xyanua. Sau đó, các tác giả thử nghiệm hợp chất có công thức 1 đối với khả năng ức chế hoạt tính Raf kinaza của nó ở các tế bào PLC5, so với sorafenib. Như được thể hiện trên Fig.3, sorafenib có thể ức chế 50% hoạt tính Raf-1 kinaza của các tế bào không được xử lý trong các tế bào PLC5 ở nồng độ 5 μ M; tuy nhiên, các tế bào được xử lý bằng hợp chất có công thức 1 thể hiện cùng hoạt tính Raf-1 như kiểm soát mang. Sự tổn thất ức chế Raf-1 giả sử có thể góp phần vào khả năng gắn kết hydro tổn thất, như kết quả của việc thay vòng pyridin và nhóm chức amit bằng phenyl xyanua.

2.2.2. Mối tương quan hoạt tính cấu trúc của việc thay nhóm ure và vòng pyridin trong sự chết tế bào

Như được mô tả ở trên, các tác giả thay liên kết nhóm chức ure của sorafenib bằng amit và sulfonamit khác nhau, tạo ra các hợp chất 2-11. Các hợp chất này được phân tích bằng thử nghiệm MTT đối với sự phát triển của tế bào trong các tế bào PLC5. Bảng 4 thể hiện các kết quả.

Bảng 4



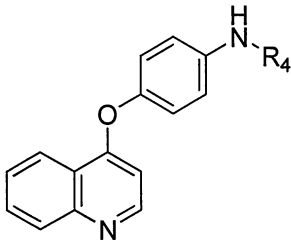
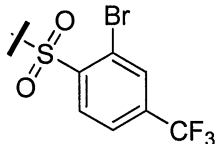
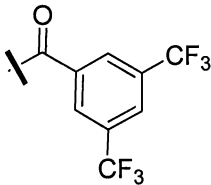
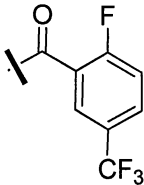
Cpd	R ₄	IC ₅₀ (μM) trong các tế bào PLC5	Cpd	R ₄	IC ₅₀ (μM) trong các tế bào PLC5
Sorafenib		8,3			
1		7,5	7		>40
2		>40	8		>40
3		>40	9		>40
4		>40	10		>40
5		>40	11		>40
6		>40			

Các kết quả thể hiện rằng không một dẫn xuất nào trong số các dẫn xuất này trong nhóm cho điện tử hoặc nhận điện tử thể hiện độc tố tế bào lớn hơn

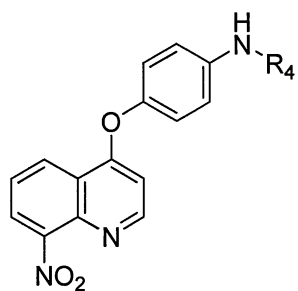
sorafenib và hợp chất có công thức 1.

Tiếp theo, các tác giả sáng chế thay pyridin thành vòng quinolin và liên kết amit để tạo ra các hợp chất có công thức 12-25. Các hợp chất này cũng được phân tích bằng thử nghiệm MTT đối với sự phát triển của tế bào trong các tế bào PLC5. Bảng 5 thể hiện các kết quả.

Bảng 5

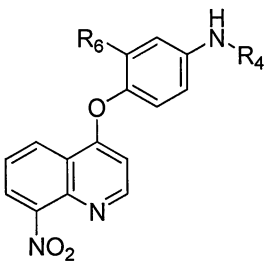
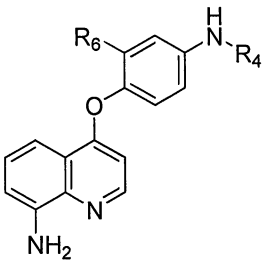
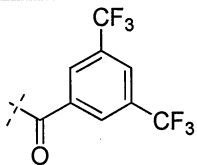
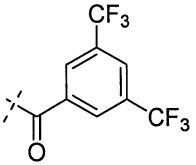
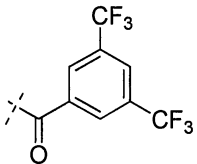
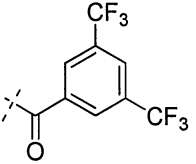
Cpd	R ₄	IC ₅₀ (μM)
		trong các tế bào PLC5
12		>40
14		>40
16		16,0
18		21,1

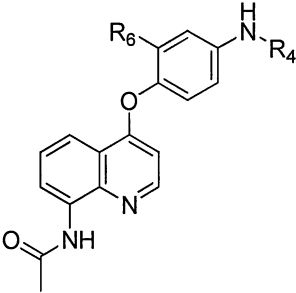
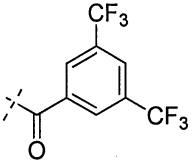
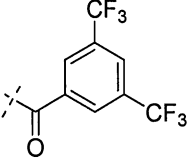
Bảng 6



Cpd	R_4	IC_{50} (μM) trong các tế bào PLC5
13		>40
15		>40
17		>40
19		>40

Bảng 7

					
Cpd	R ₄	IC ₅₀ (μM) R ₆ trong các tế bào PLC5	Cpd	R ₄	IC ₅₀ (μM) R ₆ trong các tế bào PLC5
20		Me >40	21		Me 25,4
23		H >40	24		H 19,0

			
Cpd	R ₄	R ₆	IC ₅₀ (μM) trong các tế bào PLC5
22		Me	>40
25		H	10,8

Liên kết amit thể hiện xác nhận khác từ liên kết sulfonyl, thể hiện hoạt tính tốt hơn các hợp chất liên kết sulfonyl. Ví dụ, hợp chất có công thức 16 thể hiện độc tố tế bào tốt hơn hợp chất có công thức 12. Hợp chất 25 thể hiện độc tố tế bào so với sorafenib và hợp chất có công thức 1. Các tác giả sáng chế kết luận rằng ure và các liên kết amit thể hiện độc tố tế bào tiềm tàng nhất ở các tế bào PLC5.

2.2.3. Đánh giá cơ chế của chế độ hoạt động của cá dẫn xuất sorafenib

Để kiểm tra quá trình dephosphoryl hóa của STAT3 bởi các dẫn xuất sorafenib, các tác giả sáng chế đánh giá trạng thái P-STAT3 ở các tế bào PLC5 tiếp xúc với 10uM mỗi hợp chất trong thời gian 24 giờ bởi ELISA. Như được thể hiện trên Fig.4, các hợp chất liên kết sulfonyl thể hiện không có thay đổi đáng kể trong P-STAT3; tuy nhiên, hợp chất có công thức 1 và một số các hợp chất liên kết amit thể hiện mức độ dephosphoryl hóa cao của STAT3. Mức độ giảm của P-STAT3 gây ra bởi các dẫn xuất này tương quan với độc tính tế bào. Nói cách khác, các dẫn xuất này gây ra sự chết tế bào một phần qua sự ức chế của STAT3..

Ngoài ra, các tác giả sáng chế thử nghiệm đường tín hiệu phía xuôi dòng sau sự ức chế của P-STAT3. Các mức biểu hiện của cyclin D1 và survivin, các gen mục tiêu phía xuôi dòng của STAT3, được đánh giá sử dụng các hợp chất có công thức 1 và 12. Như được thể hiện trên Fig.5, hợp chất có công thức 1 với hoạt tính ức chế STAT3, có thể giảm cyclin D1 và mức sống sót, nhưng hợp chất có công thức 12 không có tác dụng trên protein. Hơn nữa, phân đoạn DNA và phép phân tích đếm tế bào dòng của các tế bào PLC5 xử lý bằng hợp chất có công thức 1 được tiến hành, và các kết quả thể hiện rằng sự chết tế bào góp phần vào việc ức chế STAT3 và còn gây ra tín hiệu chết theo chương trình (Fig.6).

Tiền đề của các tác giả là sự ức chế sorafenib của Raf và STAT3 có thể được phân tách cấu trúc được sinh ra bởi hợp chất có công thức 1, không có hoạt tính Raf, thể hiện cùng mức điều chỉnh xuống của P-STAT3 như mức của sorafenib. Các tác giả sáng chế gợi ý rằng nhóm xyanua của hợp chất có công

thức 1 giảm sự tương tác với Raf. Sự cải biến tiếp theo của sorafenib bằng cách thay đổi chất liên kết và vòng pyridin thành amit và quinolin (các hợp chất có công thức 1, 16, và 25, tương ứng) dẫn đến giảm tiềm năng dệp STAT3.

2.2.4. SC-1, dẫn xuất sorafenib, thiếu chức năng ức chế Raf-1 thể hiện tác dụng làm chết tế bào tương tự với sorafenib trong các dòng tế bào HCC.

In vitro này, các tác giả sáng chế đánh giá lại các tác dụng của sorafenib và SC-1 về hoạt tính raf-1. Raf-1 kết tủa miễn dịch từ các dịch chiết tế bào PLC5 hoặc Hep3B được ủ với protein tái tổ hợp MEK và phospho-MEK được thử nghiệm tình trạng trong các tế bào được xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1. Các tác giả sáng chế đã quan sát sự giảm từ 20-40 % hoạt tính Raf-1 kinaza có mặt sorafenib; tuy nhiên, SC-1 không thể hiện hoạt tính của Raf-1, gợi ý rằng SC-1 không là chất ức chế Raf-1 (Fig.7A). Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm quá trình phosphoryl hóa VEGFR2, mục tiêu chính của sorafenib trong việc điều trị bệnh ung thư. Sự biểu hiện của p-VEGFR2 (Tyr1175) bị giảm đi ở các tế bào PLC5 xử lý bằng sorafenib trong khi đó SC-1 không có tác dụng đáng kể (Fig.7B). Các dữ liệu này gợi ý rằng SC-1 dẫn xuất từ sorafenib không ảnh hưởng đến sự ức chế kinaza.

Tiếp theo, các tác giả sáng chế xem xét các tác dụng chống lại sự nảy nở của sorafenib và SC-1. Cả hai SC-1 và sorafenib giảm khả năng tồn tại của các tế bào HCC khác nhau bao gồm PLC5, SK-Hep1, Huh7, và Hep3B theo kiểu liều phụ thuộc (Fig.8A). Ngoài ra, các tế bào HCC xử lý bằng SC-1 hoặc sorafenib thể hiện sự gia tăng đáng kể ở sự tập trung pha G1 phụ 24 giờ sau khi tiếp xúc (Fig.8B). Cả hai được chất gây ra sự chết tế bào kiểu chết theo chương trình đáng kể như được phát hiện do đoạn AND gây ra trong các tế bào HCC được xử lý bằng SC-1 hoặc sorafenib (Fig.8C). Các dữ liệu này chỉ ra rằng SC-1 có hiệu quả đáng kể lên cơ chế gây chết tế bào theo chương trình và mạnh như sorafenib trong việc ức chế sự phát triển tế bào HCC thậm chí qua SC-1 không có khả năng chặn hoạt tính kinaza, gợi ý rằng cơ chế mà nhờ đó sorafenib gây ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong HCC không thể liên quan đến

hoạt tính ức chế kinaza của nó.

2.2.5. STAT3 là quan trọng đối với tác dụng nhạy của sorafenib và SC-1 trong các dòng tế bào HCC.

Để xác nhận việc điều chỉnh cường độ của p-STAT3 có phụ thuộc vào sự ức chế kinaza của sorafenib hay không, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm tiếp đường phát tín hiệu liên quan đến STAT3 trong các tế bào HCC được xử lý bằng SC-1. Với thực tế là STAT3 được điều chỉnh xuống bởi sorafenib và dẫn đến gây ra sự chết tế bào, các phân tử liên quan đến chết theo chương trình bao gồm Mcl-1, cyclinD1, và tỷ lệ sống sót được đánh giá. Các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng sự ngăn chặn p-STAT3 đóng vai trò trung gian của sự chết tế bào do SC-1 gây ra hoặc do sorafenib gây ra. Sự biểu hiện giảm của SC-1 của các protein liên quan STAT3 trong các tế bào HCC. Quá trình phosphoryl hóa của STAT3 ở tyrosin 705 là rất quan trọng đối với chuyển hoạt tính STAT3. SC-1 cũng như sorafenib điều chỉnh xuống p-STAT3 ở phần dư Y705 và Mcl-1 và cyclin D1 bị chặn trong tất cả các dòng tế bào HCC thử nghiệm bao gồm PLC5, Huh7, và Sk-Hep1 (Fig.9A). Đáng kể là, tổng STAT3 protein không bị ảnh hưởng bởi sorafenib và SC-1 (Fig.9A). Ngoài ra, SC-1 và sorafenib điều chỉnh xuống p-STAT3 theo cách tùy thuộc vào liều và thời gian (Fig.9B). Các dữ liệu này còn gợi ý rằng STAT3 bị ức chế bởi sorafenib bằng cơ chế kinaza độc lập.

Các tác giả sáng chế cũng đánh giá trạng thái kích hoạt của p-STAT3 bởi STAT3 ELISA. 24 giờ trước khi tiếp xúc với sorafenib hoặc SC-1, các tế bào Sk-Hep1 được xử lý trước bằng IL-6 tái tổ hợp thành mức biểu hiện mimic cao của STAT3 và sau đó các tế bào được xử lý bằng SC-1 hoặc sorafenib trong 24 giờ nữa có mặt các dịch chiết tế bào IL-6. SC-1 hoặc sorafenib được ủ bằng kháng thể chống lại STAT3 phosphoryl hóa ở Y705. Các kết quả ELISA thể hiện rằng sorafenib cũng như SC-1 giảm đáng kể hoạt tính của p-STAT3 (Fig.9C, *bên trái*). Để đánh giá hoạt tính phiên mã, vùng gắn kết STAT3 được nhân bản vô tính thành chỉ thị *Luc*. Các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng phiên mã hoạt tính của STAT3 được giảm đáng kể có mặt sorafenib hoặc SC-1

(Fig.9C, *bên phải*). Luciferaza hoạt hóa đom đóm được đánh giá và bình thường hóa bởi luciferaza bướm. Các kết quả này thể hiện rằng cả sorafenib và SC-1 giảm tiềm tàng mức phosphoryl hóa STAT3 qua sự ngăn chặn phiên mã. Các tác giả sáng chế sau đó thiết lập khuôn lạc ổn định quá mức STAT3 của các tế bào HCC để xác nhận tác dụng của sorafenib trong HCC. Như được thể hiện trên Fig.9D, cả cơ chế gây chết tế bào theo chương trình do sorafenib gây ra và do SC-1 gây ra đã được bãi bỏ trong các tế bào HCC biểu hiện quá mức STAT3 như được chứng minh bởi phân tích G1 phụ, gợi ý rằng STAT3 là chất trung gian chính của cơ chế gây chết tế bào theo chương trình do sorafenib và SC-1 gây ra.

2.2.6. SHP-1 phosphatase đóng một vai trò trong tác dụng của sorafenib và SC-1 lên phospho-STAT3 và cơ chế gây chết tế bào theo chương trình.

Để nghiên cứu tiếp sorafenib ức chế STAT3 trong HCC như thế nào, các tác giả sáng chế xem xét một loạt các protein phosphatase mà có thể liên quan đến sự điều chỉnh p-STAT3. Các kết quả thể hiện rằng natri vanadat, chất ức chế phosphatase chung giảm cơ chế gây chết tế bào theo chương trình và tăng p-STAT3 (Fig.10A, *bên trái*). Các dữ liệu gợi ý rằng sorafenib và SC-1 có thể ảnh hưởng đến p-STAT3 bằng cách nhắm vào các protein phosphatase liên quan đến STAT3. Ngoài ra, các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng chất ức chế SHP-1 phosphatase cụ thể gây ra sự chết tế bào bởi sorafenib ngược và sự ức chế của p-STAT3 (Fig.10A, *bên phải*). Để xác định tiếp vai trò của việc gây ra sự ức chế SHP-1 in SC-1 và sorafenib của p-STAT3, các tác giả sáng chế áp dụng siRNA cụ thể lên SHP-1 để đánh giá ảnh hưởng của sorafenib và SC-1. Các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng sự triệt âm của cơ chế gây chết tế bào theo chương trình và sự ức chế của p-STAT3 do SHP-1 sorafenib hoặc SC-1 ngược gây ra (Fig.10B, *bên trái*). Ngoài ra, cả sorafenib và SC-1 tăng hoạt tính SHP-1 đến ba lần so với các tế bào kiểm soát ($P < 0,05$) (Fig.10B, *giữa*). Các tế bào PLC5 được xử lý bằng sorafenib hoặc SC-1 được kết tủa miễn dịch bằng kháng thể SHP-1 cụ thể, và sau đó phức chứa SHP-1 chịu thử nghiệm nhóm phospho trên cơ sở huỳnh quang. Lưu ý rằng, hoặc sorafenib hoặc SC-1 ảnh hưởng đến tương tác của

STAT3 và SHP-1 như được chứng minh bởi kết tủa miễn dịch SHP-1 kết tủa miễn dịch (Fig.10B, *bên phải*). Các dữ liệu này gợi ý rằng sorafenib gây ra sự chết tế bào nhờ việc khử hoạt tính STAT3 phụ thuộc SHP-1.

Ngoài SHP-1, các phosphatase khác như SHP-2 và PTP-1B, đã được thông báo là điều chỉnh p-STAT3. Như được thể hiện trên Fig.10C, các tác dụng của sorafenib lên cơ chế gây chết tế bào theo chương trình và p-STAT3 không ảnh hưởng ngược bởi sự triệt âm SHP-2 hoặc PTP-1B, gợi ý rằng không SHP-2 hoặc PTP-1B đóng vai trò tác dụng trung gian của sorafenib hoặc SC-1 trên p-STAT3.

2.2.7. SC-1 điều chỉnh xuống p-STAT3 và gây ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong các tế bào HUVEC.

Để làm rõ tác dụng của sorafenib lên p-VEGFR2, mục đích chính của sorafenib trong việc điều trị bệnh ung thư, các tác giả sáng chế xem xét tác dụng của sorafenib và SC-1 trong các tế bào HUVEC. Như được thể hiện trên Fig.11A, *bên trái*, cả sorafenib lẫn SC-1 điều chỉnh xuống p-STAT3 trong các tế bào HUVEC và gây ra sự chết tế bào kiểu chết theo chương trình trong HCC ($P < 0,05$). Lưu ý rằng, sorafenib nhưng không phải là SC-1 điều chỉnh xuống quá trình phosphoryl hóa VEGFR trong các tế bào HUVEC (Fig.7A, *giữa*). Các kết quả này chỉ ra rằng cả Raf-1 lẫn VEGFR không làm trung gian tác dụng của sorafenib lên cơ chế gây chết tế bào theo chương trình và p-STAT3.

Nghiên cứu trước đây cũng gợi ý rằng Mcl-1 là quan trọng trong việc làm trung gian tác dụng của sorafenib lên sự nhạy TRAIL. Điều thú vị là, các dữ liệu thể hiện rằng SC-1 cũng thể hiện sự gia tăng tương tự của cơ chế gây chết tế bào theo chương trình do TRAIL gây ra trong HCC bằng cách điều chỉnh xuống p-STAT3 (Fig.11B). Để điều tra thêm xem sự ức chế của p-STAT3 bằng sorafenib kết hợp với Raf-1 hay không, các tác giả sáng chế diệt Raf-1 bằng cách sử dụng ARN can thiệp nhỏ. Sự triệt âm Raf-1 không ảnh hưởng đến các tác dụng của sorafenib hoặc SC-1 trên p-STAT3 (Fig.11C), chỉ ra rằng Raf-1 không làm trung gian tác dụng của sorafenib trên p-STAT3. Lưu ý rằng, cả sorafenib lẫn SC-1

gian tác dụng của sorafenib trên p-STAT3. Lưu ý rằng, cả sorafenib lẫn SC-1 thay đổi hoạt tính kinaza của JAK2 (Fig.11D), gợi ý rằng JAK2 không làm trung gian các tác dụng của cả hai hợp chất trên p-STAT3. Ngoài ra, dữ liệu thể hiện rằng sorafenib và SC-1 không ảnh hưởng đến các mức protein của SOCS-1 và SOCS-3 (Fig.11E). Điều thú vị, các tế bào HCC với STAT-3 hoạt hóa liên tục (STAT3-C) không hoàn toàn kháng SC-1 (Fig.11F). Khi hoạt tính của SHP-1 gia tăng bởi SC-1 (Fig.11B, *giữa*), các dữ liệu gợi ý rằng ngoài STAT-3, các phân tử liên quan đến SHP-1 khác cũng có thể đóng vai trò trong việc làm trung gian tác dụng của SC-1. Để xem xem sorafenib hoặc SC-1 có trực tiếp nhắm vào SHP-1 hay không, các tế bào PLC5 được kết tủa miễn dịch với kháng thể SHP-1 sau đó ủ với sorafenib hoặc SC-1 trong thời gian 6 giờ. Như được thể hiện trên Fig.11G, sorafenib và SC-1 gia tăng hoạt tính của SHP-1 trong các sản phẩm phân giải, gợi ý rằng sorafenib và SC-1 trực tiếp nhắm vào SHP-1.

2.2.8. Đánh giá tác dụng điều trị của SC-1 và sorafenib lên các con chuột mang Huh7.

Để đánh giá tác dụng điều trị của SC-1, các tác giả sáng chế còn áp dụng các xenograft SC-1 đến HCC để đánh giá ý nghĩa của nó *in vivo*. Trước tiên, các con chuột mang Huh7 được xử lý hàng ngày qua đường miệng bằng chất mang hoặc sorafenib ở liều lượng 10mg/kg/ngày. Việc xử lý sorafenib ức chế đáng kể sự phát triển khối u Huh7 xenograft và các con vật được xử lý bằng sorafenib có kích thước khối u nhỏ hơn một nửa kích thước của các con chuột kiểm chứng (Fig.12A, *bên trái*). Không có khác biệt rõ ràng về trọng lượng cơ thể hoặc tính độc ở chuột bất kỳ (dữ liệu không được thể hiện). Ngoài ra, dịch chiết khối u từ chuột được xử lý bằng chất mang và sorafenib được tạo vết miễn dịch đối với p-STAT3. p-STAT3 được điều chỉnh xuống trong khối u được xử lý bằng sorafenib (Fig.12A, *bên phải*). p-STAT3/STAT3 được quan sát trong các chất đông chất của ba khối u Huh7 điển hình. Ngoài ra, các tác giả sáng chế xem xét hoạt tính SHP-1 trong Huh7 xenograft xử lý bằng sorafenib. Khối u xử lý bằng sorafenib thể hiện hoạt tính SHP-1 đáng kể *in vivo* (Fig.12A, *bên phải*). Cùng nhau, các kết quả này khẳng định rằng sorafenib có thể gia tăng hoạt tính SHP-1

để ngăn chặn p-STAT3 liên quan đến sự ức chế khối u trong mẫu HCC xenograft.

Ngoài ra, việc xử lý bằng SC-1 có tác dụng ức chế mạnh ($P < 0,05$) và kích cỡ khối u ở nhóm này chỉ là 25% kích cỡ của chuột được xử lý bằng chất mang ở giai đoạn xử lý đầu (Fig.12B, *bên trái*). Vết miễn dịch đối với p-STAT3 và thử nghiệm hoạt tính SHP-1 cũng được thực hiện trên mẫu khối u từ các con vật được xử lý bằng SC-1. Điều thú vị là, SC-1 gây ra sự gia tăng đáng kể hoạt tính SHP-1 và điều chỉnh xuống p-STAT3 (Fig.12B, *bên phải*). Các dữ liệu này chỉ ra rằng SC-1, chất chủ vận SHP-1 và chất ức chế STAT3, thể hiện các tác dụng điều trị ức chế sự phát triển khối u.

2.2.9. Ức chế sự phát triển của tế bào ung thư

Các tác giả sáng chế cũng xem xét các tác dụng của SC-1 và SC-43 trong các dòng tế bào ung thư khác, bao gồm các dòng ung thư vú cụ thể là MDAMB231, MDAMB468, MCF-7, và các dòng tế bào ung thư bạch cầu cụ thể là HL-60, KG-1 và ML-1. Fig.13 thể hiện các kết quả. Các dữ liệu này thể hiện rằng các hợp chất theo sáng chế là hữu hiệu trong việc ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư.

2.2.10. Các hiệu quả chống bệnh ung thư trong các tế bào HCC

Các tế bào HCC được xử lý bằng các dẫn xuất sorafenib (SC-43 hoặc SC-40) ở các liều lượng quy định trong thời gian 24 giờ. Các tế bào đã gom lại được cố định trong 75% Etanol và làm bản bằng 20 ug/ml Propidium Iodua (PI). Phân tích G1 phụ được tiến hành bằng dòng tế bào kế. Fig.14 thể hiện rằng SC-43 và SC-40, các dẫn xuất sorafenib, thể hiện các tác dụng chống bệnh ung thư đáng kể trong các tế bào HCC, (A), (B), (C), (D) và (E) gọi là SC-43 lần lượt đối với các tế bào PLC5, HepG2, Hep3B, HA59T và SK-Hep1; và (F), (G), (H), (I) và (J) gọi là SC-40 lần lượt đối với các tế bào PLC5, HepG2, Hep3B, HA59T và SK-Hep1. Các điểm, ý nghĩa; các thanh ghi, SD ($n = 6$).

2.2.11 Các tác dụng của sorafenib hoặc SC-43 lên các protein liên quan đến STAT3.

Các tế bào HCC được xử lý bằng SC-43 (10 μ M trong thời gian 24 giờ) được thu gom bởi đệm tiêu RIPA. Các kháng thể để tạo vết miễn dịch như xyclin D1 do Santa Cruz Biotechnology bán trên thị trường. Các kháng thể khác như survivin, phospho-STAT3 (Tyr705), STAT3, Mcl-1, SOCS1, và SOCS3 là từ Cell Signaling. Fig.15 thể hiện rằng SC-43 điều chỉnh xuống đường phát tín hiệu liên quan đến phospho-STAT3 trong HCC.

2.2.12 Các tác dụng của sorafenib hoặc SC-40 lên các protein liên quan đến STAT3.

Các tế bào HCC được xử lý bằng SC-40 (10 μ M trong thời gian 24 giờ) được thu gom bởi đệm tiêu RIPA. Các kháng thể để tạo vết miễn dịch như xyclin D1 do bán trên thị trường Santa Cruz Biotechnology. Các kháng thể khác như survivin, phospho-STAT3 (Tyr705), STAT3, Mcl-1, SOCS1, và SOCS3 là từ Cell Signaling. Fig.16 thể hiện rằng SC-40 điều chỉnh xuống đường phát tín hiệu liên quan đến phospho-STAT3 trong HCC.

2.2.13 Các tác dụng của sorafenib hoặc SC-43 lên các protein liên quan đến STAT3

Các tế bào HCC được xử lý bằng SC-43 (10 μ M trong thời gian 24 giờ) được thu gom bởi đệm tiêu RIPA. Các kháng thể để tạo vết miễn dịch như xyclin D1 do Santa Cruz Biotechnology bán trên thị trường. Các kháng thể khác như survivin, phospho-STAT3 (Tyr705), STAT3, và Mcl-1 là từ Cell Signaling. Fig.17 thể hiện rằng SC-43 thể hiện sự ức chế đường phát tín hiệu liên quan đến p-STAT3 tốt hơn sorafenib trong HCC, (A) PLC5 và (B) Hep 3B. SC-43 thể hiện sự ức chế đáng kể các protein liên quan đến p-STAT3 ở việc điều trị với liều lượng thấp hơn sorafenib.

2.2.14 Các tác dụng của SC-43 và SC-40 lên hoạt tính STAT3

Hoạt tính p-STAT3:

Các tế bào PLC5 được xử lý bằng các dẫn xuất SC được thu gom ở đệm tiêu RIPA và phân tích trong kit p-STAT3 ELISA. Biên bản thử nghiệm theo

nhà sản xuất.

Thử nghiệm gen chỉ thị STAT3:

Các tế bào PLC5 được cấy trong tấm 96 lỗ.

Các tế bào được chuyển nạp trước bằng cấu trúc gen chỉ thị STAT3 trong thời gian 24 giờ và xử lý bằng các dẫn xuất trong 24 giờ nữa. Kit gen chỉ thị STAT3 là do SABiosciences bán trên thị trường.

Các tế bào được xử lý bằng SC-43 hoặc SC-40 ở nồng độ 10 μ M trong thời gian 24 giờ và phospho-STAT3 ELISA hoặc luciferaza hoạt tính được đo. Fig.18 thể hiện rằng cả hai SC-43 và SC-40 gây ra sự ức chế mạnh của hoạt tính p-STAT3, (A) và (B) p-STAT3 ELISA for SC-43 và SC-40, tương ứng, và thử nghiệm gen thông báo (C) và (D) STAT3 lần lượt đối với SC-43 và SC-40.

2.2.15 Các tác dụng của SC-43/40 lên hoạt tính phosphataza

Dịch chiết PLC5 protein được ủ với kháng thể kháng SHP-1 trong đệm kết tủa miễn dịch qua đêm. Dòng nhanh Protein G Sepharosa 4 (GE Healthcare Bio-Science) được bổ sung vào mỗi mẫu, sau đó ủ trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ 4°C có quay. Dịch chiết protein chứa SHP-1 này được ủ tiếp với các hợp chất SC (10 hoặc 100nmol/L) trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Kit thử nghiệm RediPlate 96 EnzChek Tyrosin Phosphataza (R-22067) được sử dụng cho thử nghiệm hoạt tính SHP-1 (các que phân tử). Fig.19 thể hiện rằng các dẫn xuất SC gia tăng hoạt tính phosphataza của SHP-1 *in vitro*, (A) SC-43, (B) SC-40, và (C) SC-49.

2.2.16 Các tác dụng của các dẫn xuất SC lên hoạt tính phosphataza trong SHP-1 tái tổ hợp

Kit thử nghiệm RediPlate 96 EnzChek Tyrosin Phosphataza (R-22067) được sử dụng cho thử nghiệm hoạt tính SHP-1 (các que phân tử). Protein SHP-1 tái tổ hợp (25 ng) được ủ với hoặc SC-43 hoặc SC-40 ở các liều lượng quy định trong thời gian 30 phút và sau đó được phân tích bởi hoạt tính phosphataza của SHP-1. Fig.20 thể hiện rằng các dẫn xuất SC gia tăng hoạt tính phosphataza của

SHP-1 *in vitro*, (A) SC-43 và (B) SC-40.

2.2.17 Tác dụng *in vivo* của SC-40 lên xenograft mang PLC5.

Các con chuột không lông đực NCr athymic (5-7 tuần tuổi) thu được từ The National Laboratory Animal Center (Taipei, Taiwan). Tất cả các quy trình thí nghiệm sử dụng các con chuột này được thực hiện theo các biên bản được phê chuẩn bởi The Institutional Laboratory Animal Care và Use Committee of National Taiwan University. Mỗi con chuột được được chủng s.c. ở bên lưng với 1×10^6 tế bào PLC5 treo trong 0,1mL môi trường không có huyết thanh chứa 50% Matrigel (BD Biosciences). Khi khối u đạt từ 100 đến 200mm³, chuột được dùng qua đường miệng SC-40 tosylat (10 hoặc 20mg/kg) một lần một ngày. Các khối u được đo hàng tuần sử dụng các compa đo khẩu kính, và các thể tích của chúng được tính sử dụng công thức chuẩn sau: chiều rộng x chiều dài x chiều cao x 0,52.

Fig.21 thể hiện rằng (A) tác dụng chống u của SC-40 lên các khối u PCL5; các điểm, ý nghĩa (n = 6); các thanh ghi, SE; (B) Phân tích vết phươg đông của p-STAT3 và STAT3 ở các khối u PCL5; (C) trọng lượng cơ thể của các con vật; và (D) trọng lượng khối u và (E) hoạt tính của SHP-1 ở các khối u PCL5. Các kết quả thể hiện rằng SC-40 có hiệu quả chống u đáng kể lên các khối u PCL5, nhưng không ảnh hưởng đến thể trọng của các con vật. Trọng lượng cơ thể không có sự khác nhau đáng kể giữa các con chuột kiểm chứng và được xử lý bằng SC-40.

2.2.18 Tác dụng chống u của SC-43

Trong ví dụ này, các tác giả sáng chế thể hiện rằng SC-43 thể hiện tác dụng chống u *in vitro* và *in vivo*. SC-43 thể hiện độc tố tế bào đáng kể trong các tế bào HCC (IC₅₀~0,5 μ M). Cũng vậy, SC-43 gây ra sự ức chế phát triển khối u đáng kể trong chuột mang HCC. Đường phát tín hiệu liên quan đến SHP-1/STAT3 tác động làm mục tiêu quan trọng đối với tác dụng chống u của SC-43. Xem Fig.22 (A), độc tố tế bào của SC-43 trong các tế bào HCC, (B) tác dụng chống u của SC-43 trong chuột mang HCC, (C) hoạt tính của SHP-1 gây ra bởi

SC-43, và (D) Phân tích vết phươg đơng của p-STAT3 và STAT3 trong các tế bào HCC đượ xử lý bằng SC-43 (10 μ M và 20 μ M).

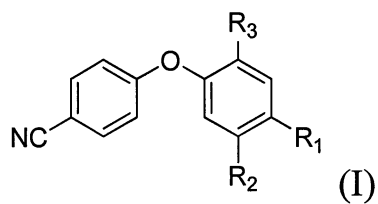
2.2.19 Tác dụng in vivo của SC-43 lên mẫu PLC5/luc orthotopic

Các con chuột không lông đượ NCr athymic (5-7 tuần tuổi) thu đượ từ The National Laboratory Animal Center (Taipei, Taiwan). Tất cả các quy trình thí nghiệm sử dụng các chuột này đượ thực hiện theo các biên bản đượ phê chuẩn bởi The Institutional Laboratory Animal Care và Use Committee of National Taiwan University. Mỗi con chuột đượ chủng bên trong gan ở bên lưng bằng 1×10^4 tế bào PLC5/luc đượ treo trong 0,1mL môi trường không có huyết thanh chứa 50% Matrigel (BD Biosciences). Khi khối u tạo thành, chuột đượ cho dùng qua sorafenib hoặc SC-43 tosylat (10mg/kg) một lần một ngày. Sự phát triển khối u đượ giám sát bởi hệ thống chụp ảnh in vivo không can thiệp (IVIS) hai lần một tuần.

SC-40 thể hiện tác dụng chống u đáng kể lên các con chuột mang PLC5 đúng vị trí. Sự phát triển khối u đượ giám sát tại thời điểm đã định bằng hệ thống ảnh IVIS. Các tế bào chuột đượ xử lý bằng hoặc chất mang hoặc sorafenib (10mg/kg) hoặc SC-43 (10mg/kg). Fig.23 thể hiện (A) các ảnh của chuột xử lý, (B) thể hiện trọng lượng cơ thể của chuột, và (C) thể hiện đường cong tỷ lệ sống sót giữa chuột kiểm chứng và đượ xử lý. Các kết quả thể hiện rằng SC-40 thể hiện tác dụng chống u đáng kể lên chuột mang PLC5 đúng vị trí. Trọng lượng cơ thể không có sự khác biệt đáng kể giữa các chuột kiểm chứng và đượ xử lý bằng SC-43.

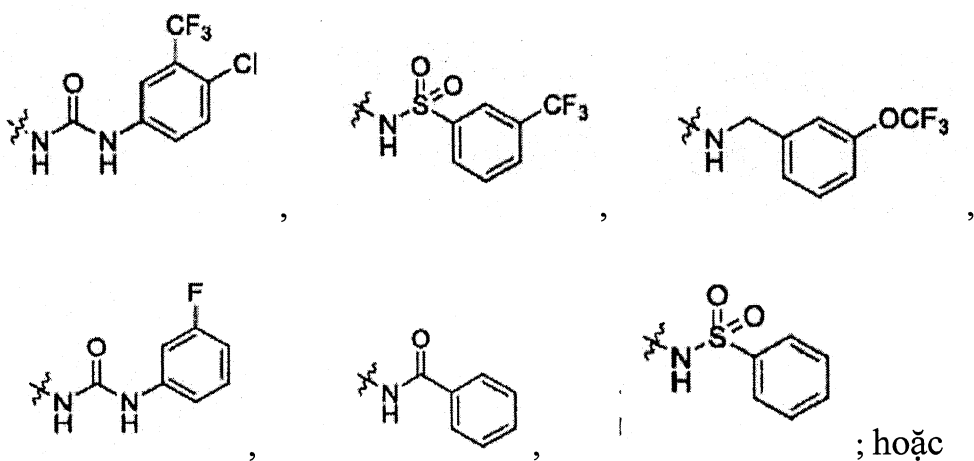
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất được biểu diễn bằng công thức I



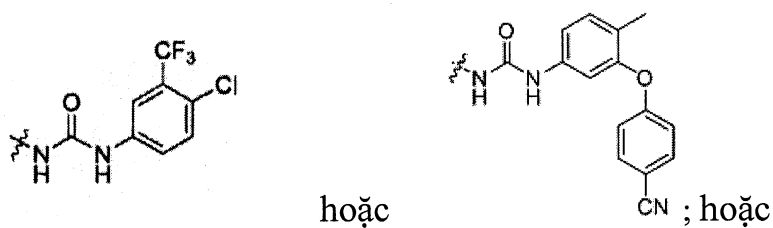
trong đó:

R_1 , và R_3 độc lập là hydro, và R_2 là



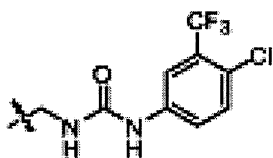
trong đó:

R_1 , độc lập là hydro, R_3 là methyl; và R_2 là

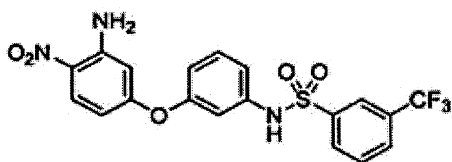


trong đó:

R_2 và R_3 độc lập là hydro; và R_1 là



2. Hợp chất có công thức sau đây:



3. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc 2 và chất mang dược dụng.

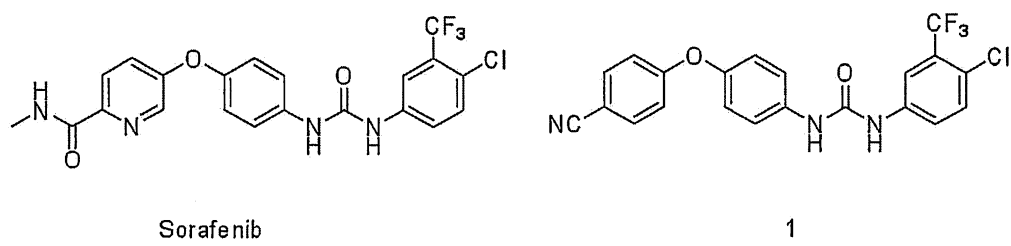
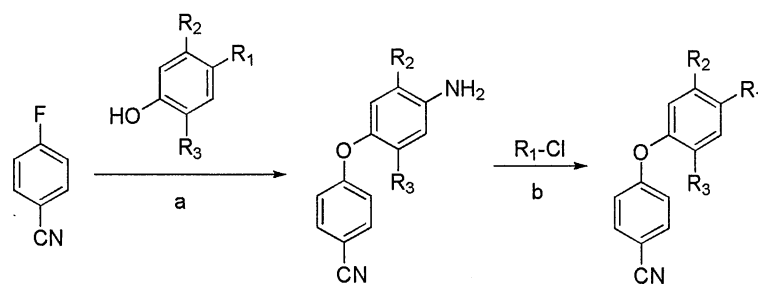
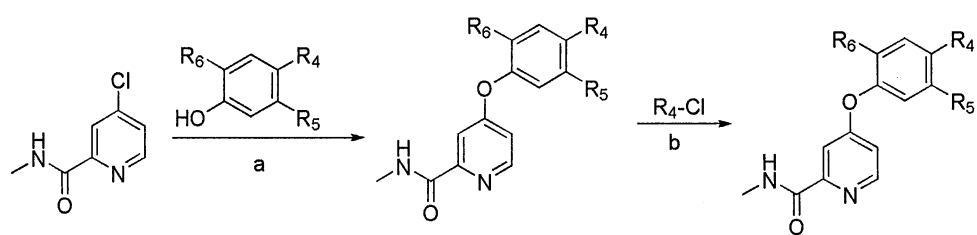


Fig. 1

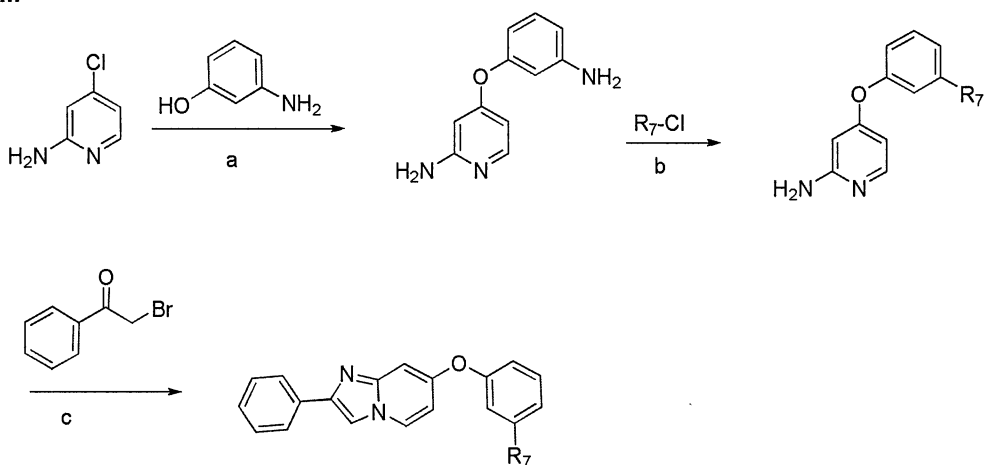
Công thức I



Công thức II



Công thức III



Quy trình tổng hợp chung hợp chất có công thức I, II, III: a, K_2CO_3 , DMF; b, pyridin, THF; c. Et_3N , dioxan

Fig. 2

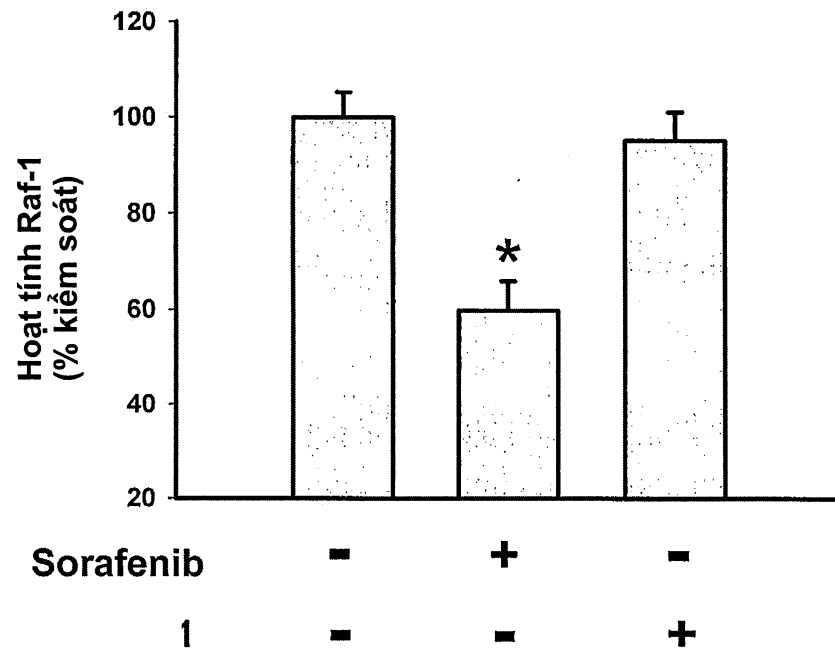


Fig. 3

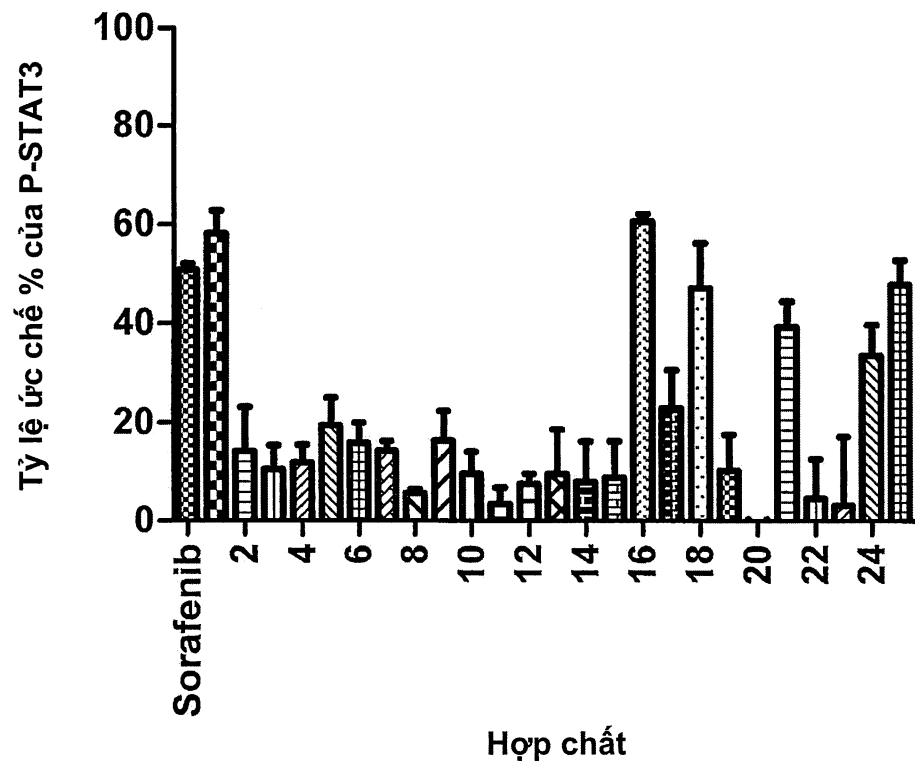


Fig. 4

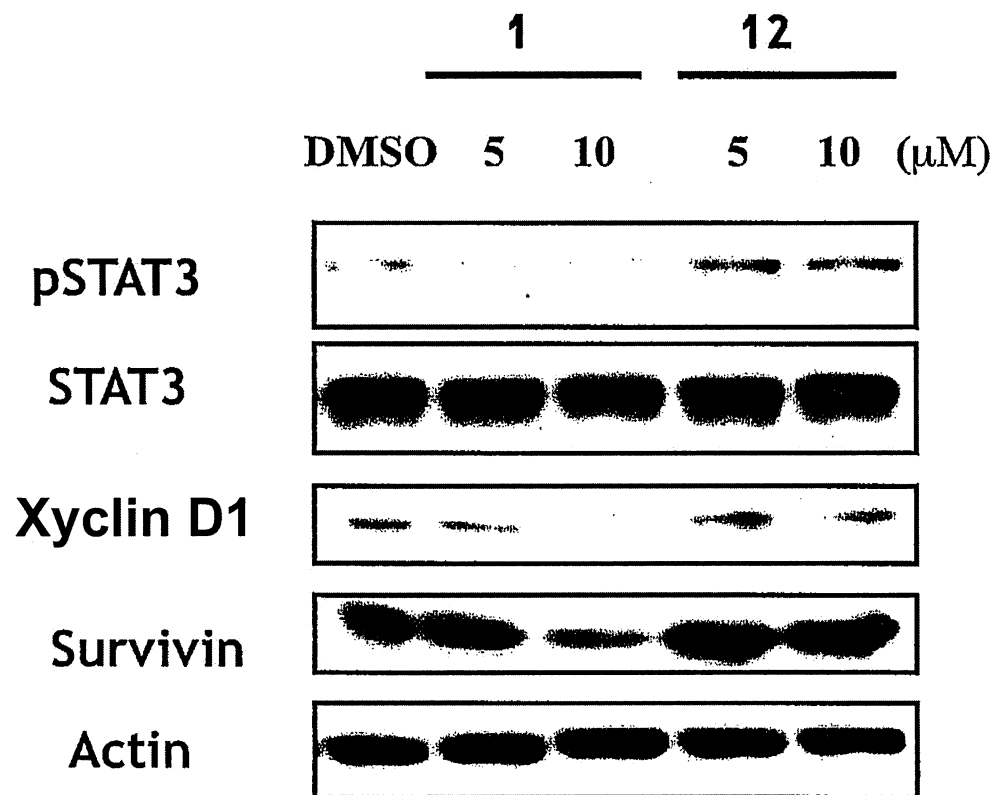


Fig. 5

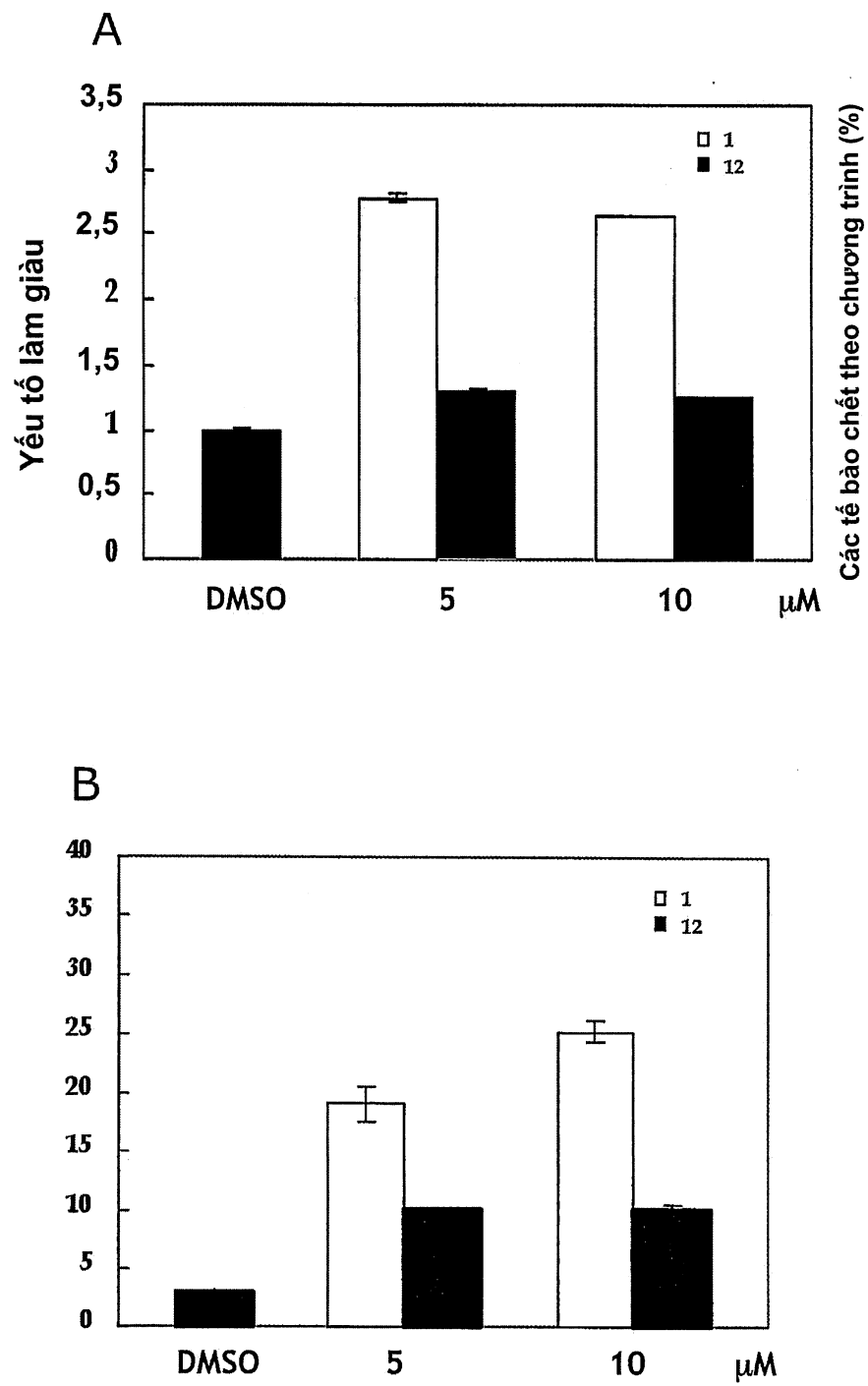
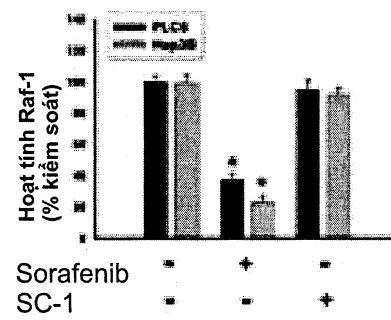


Fig. 6

A



B

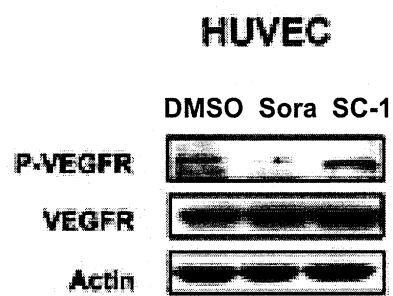
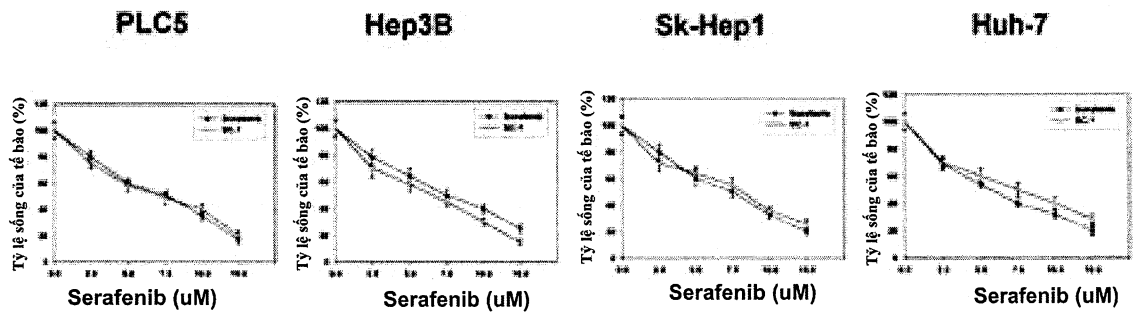
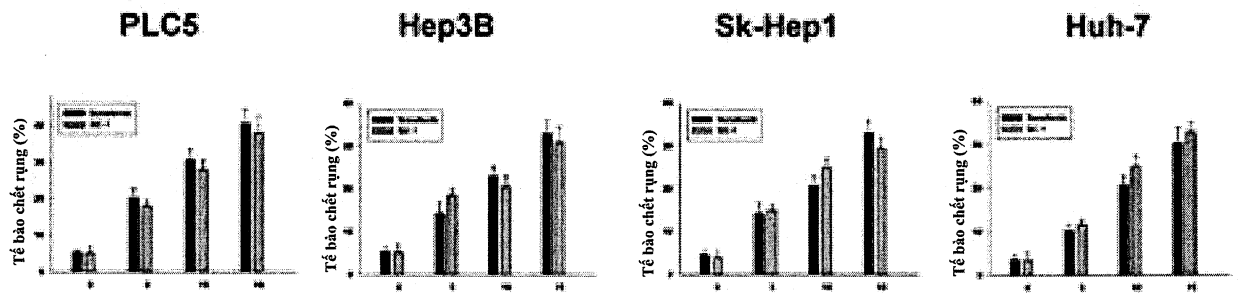


Fig. 7

A



B



C

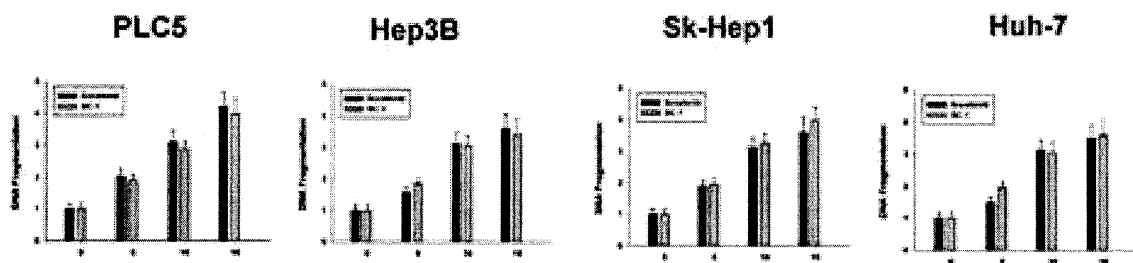


Fig. 8

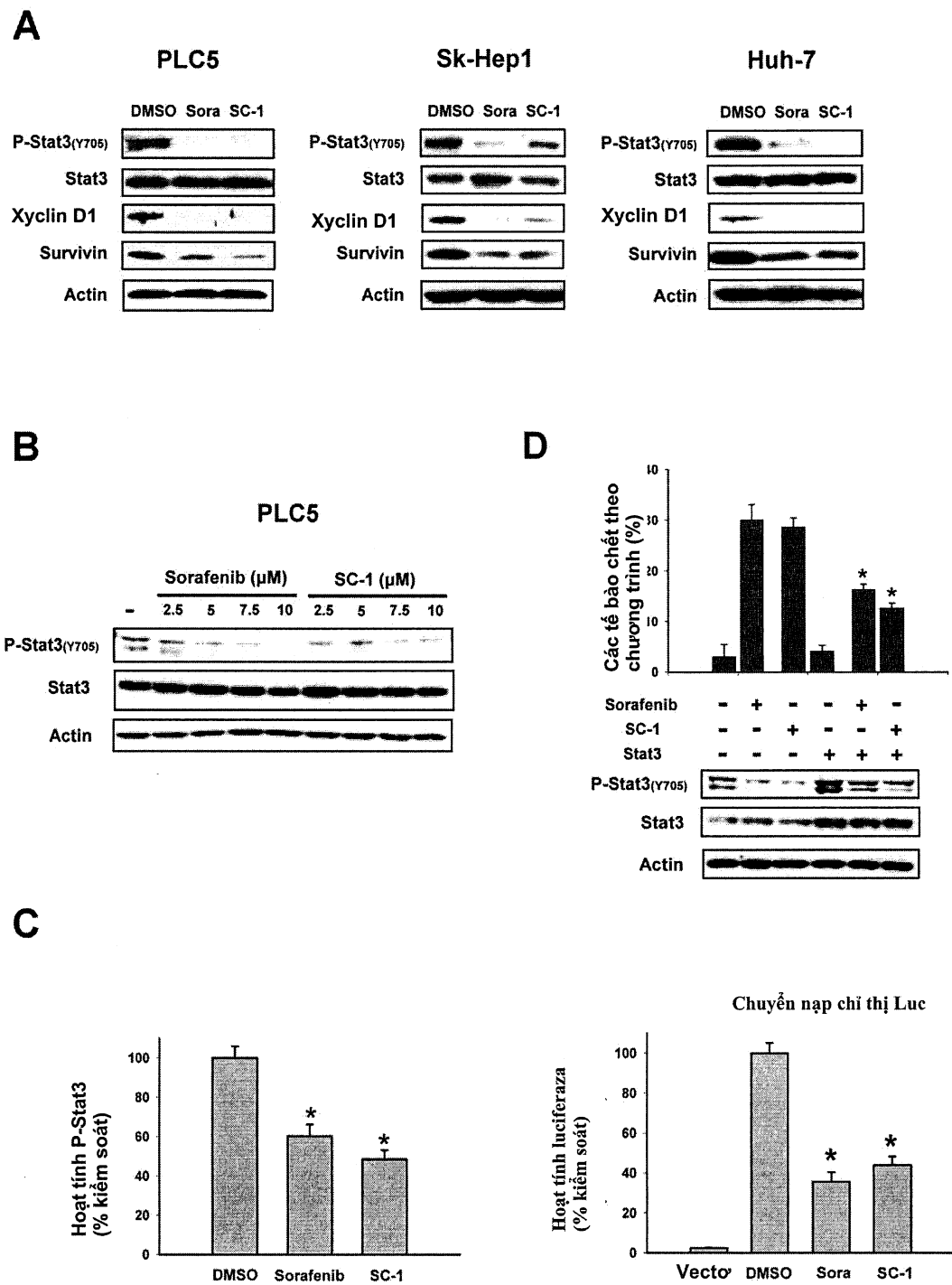


Fig. 9

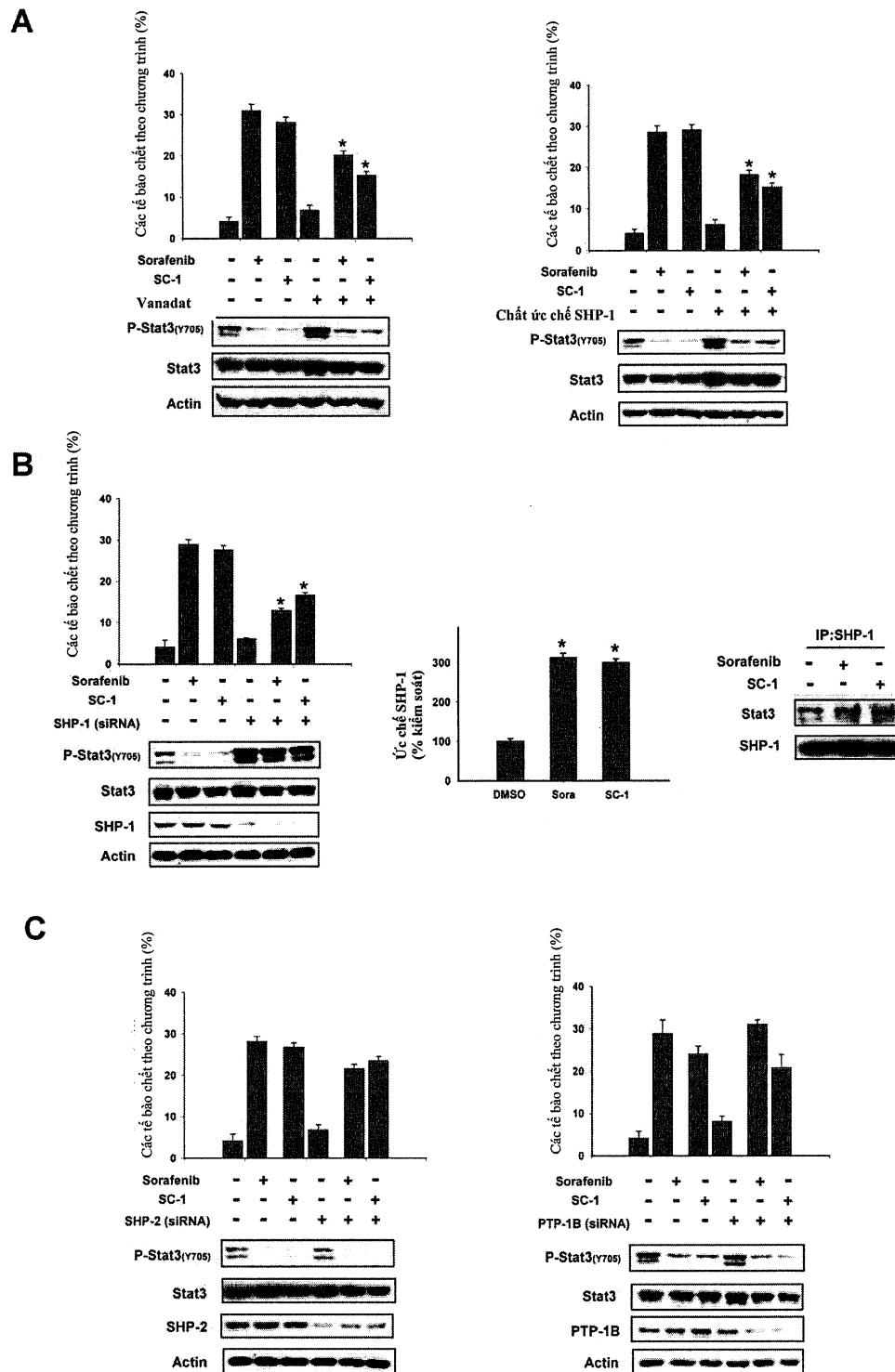


Fig. 10

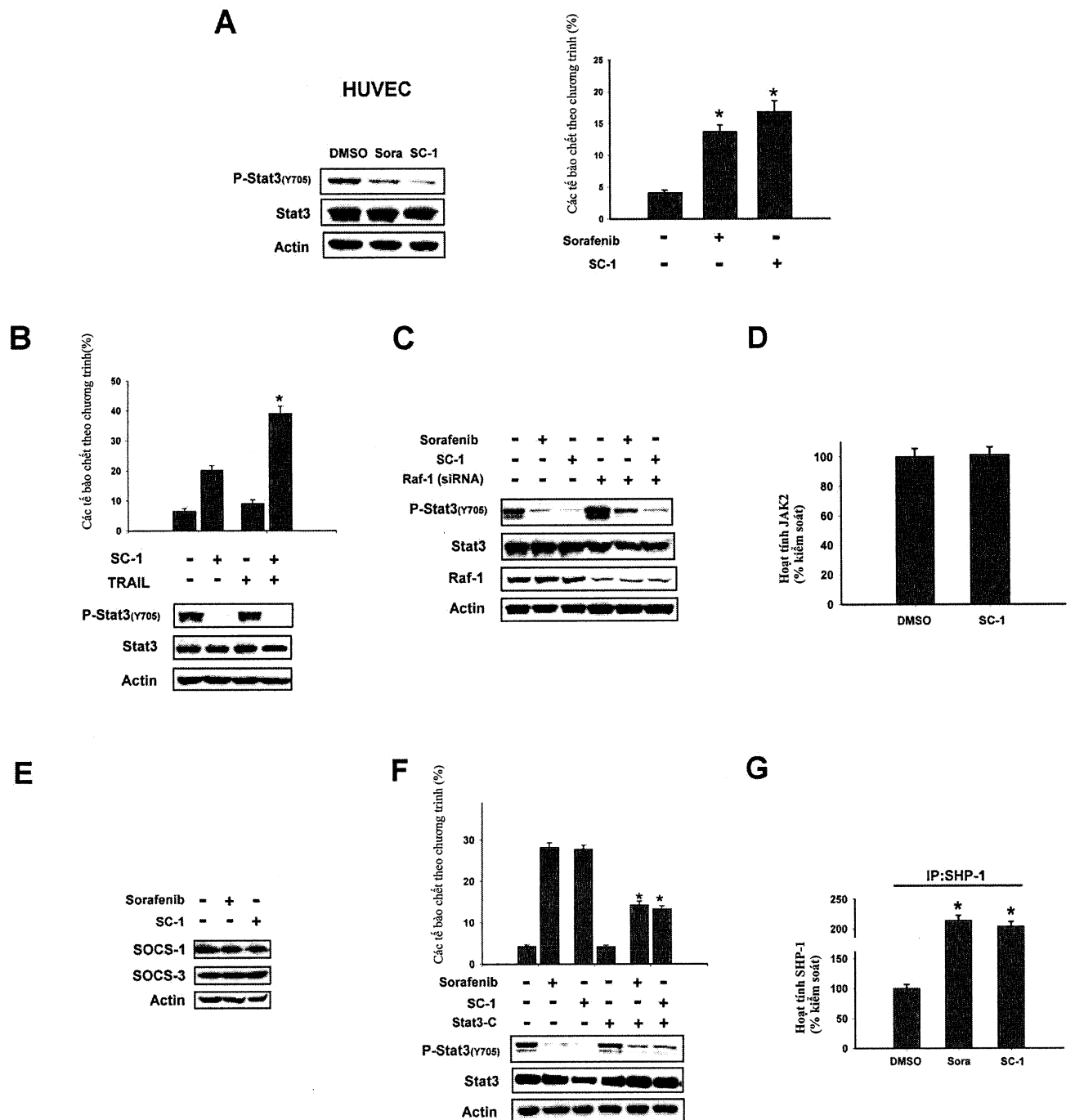


Fig. 11

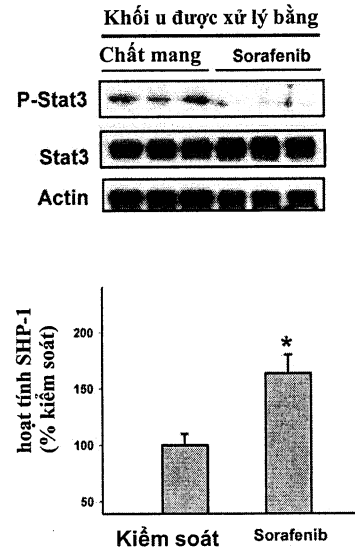
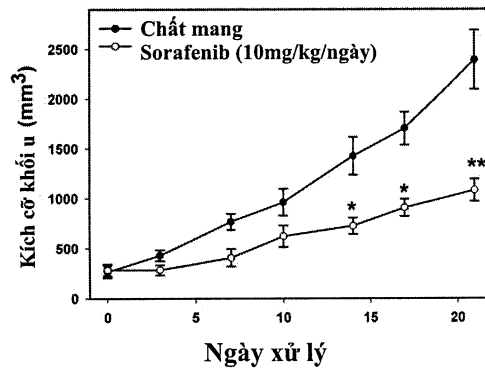
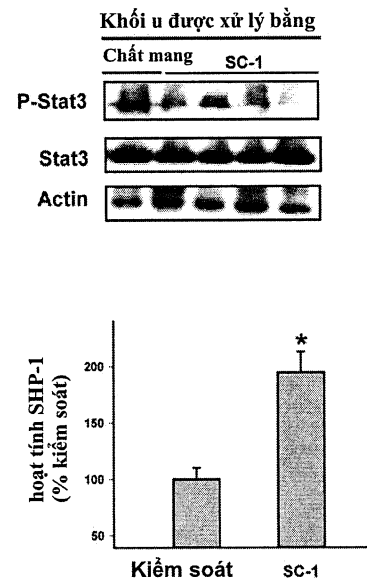
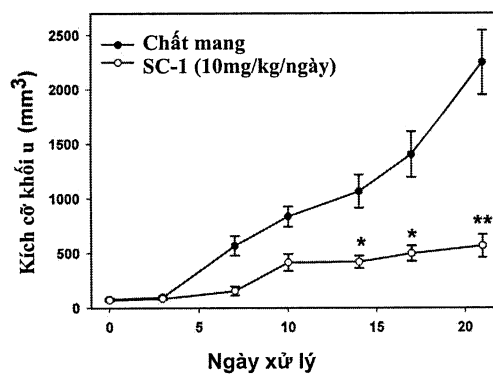
A**B**

Fig. 12

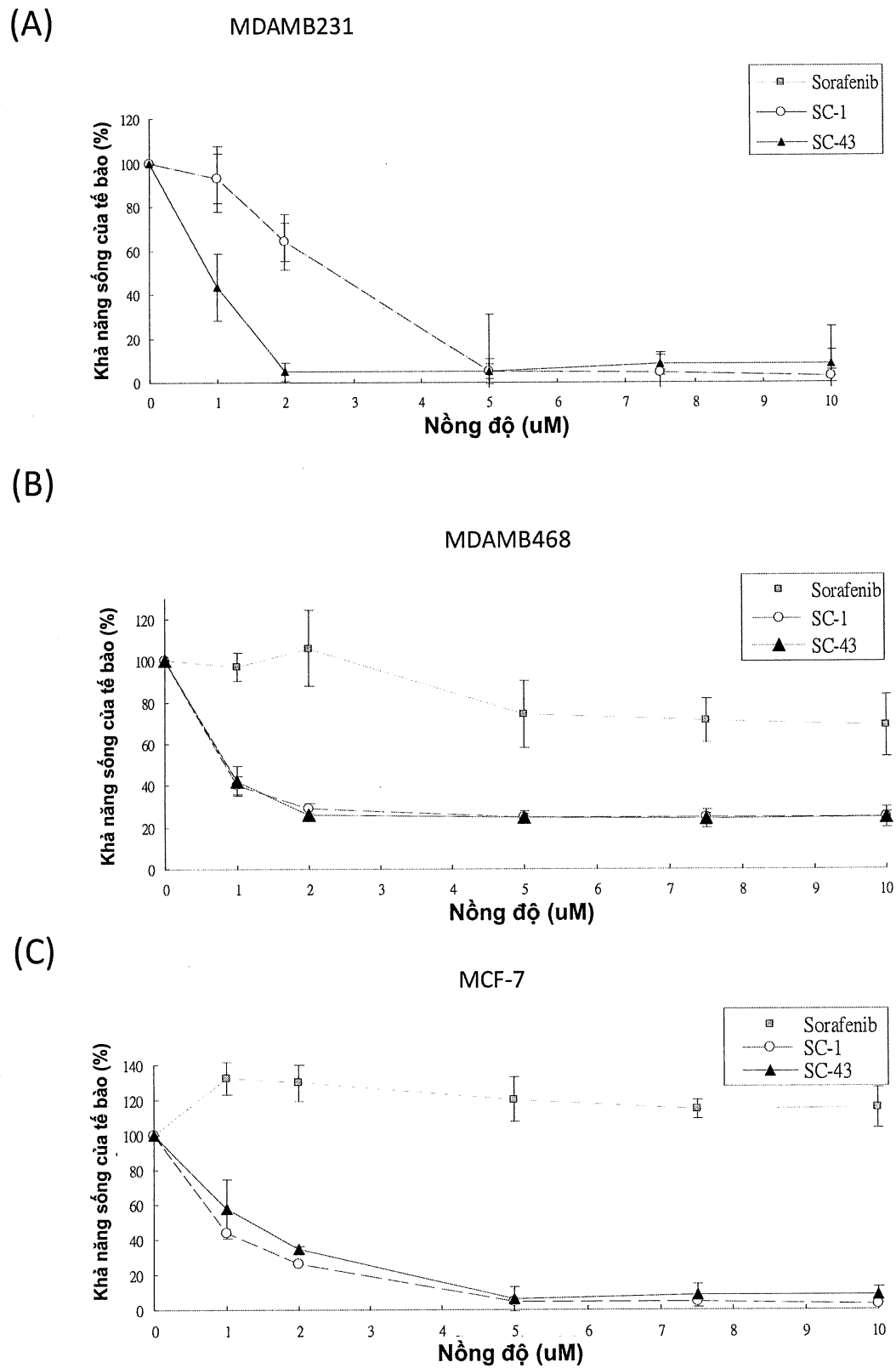
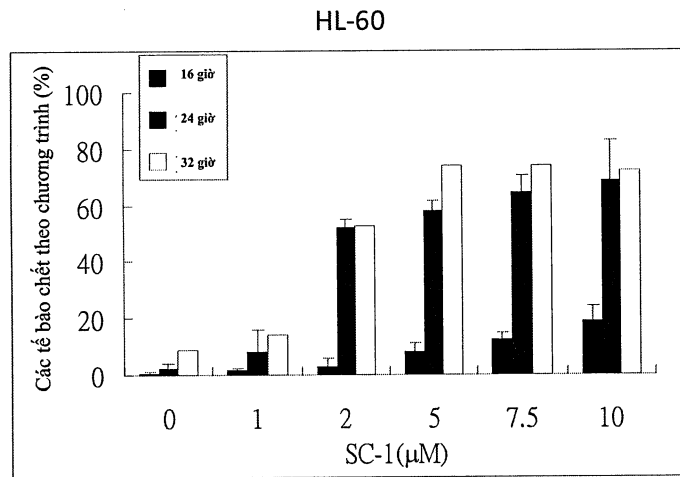
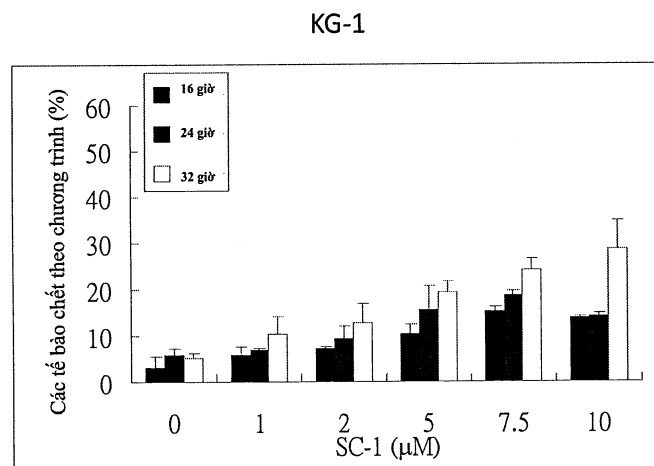


Fig. 13

(D)



(E)



(F)

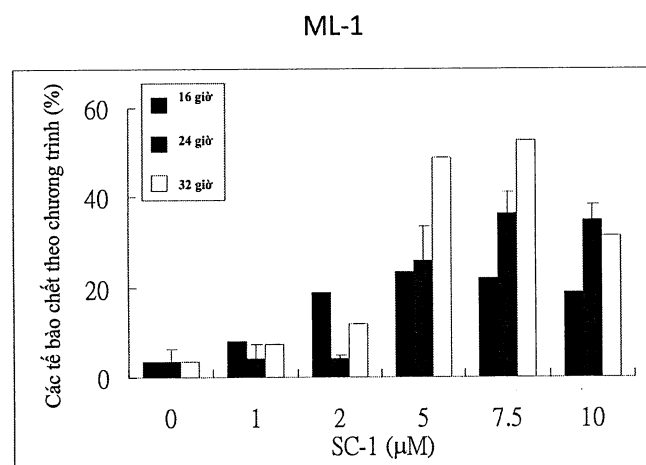


Fig. 13

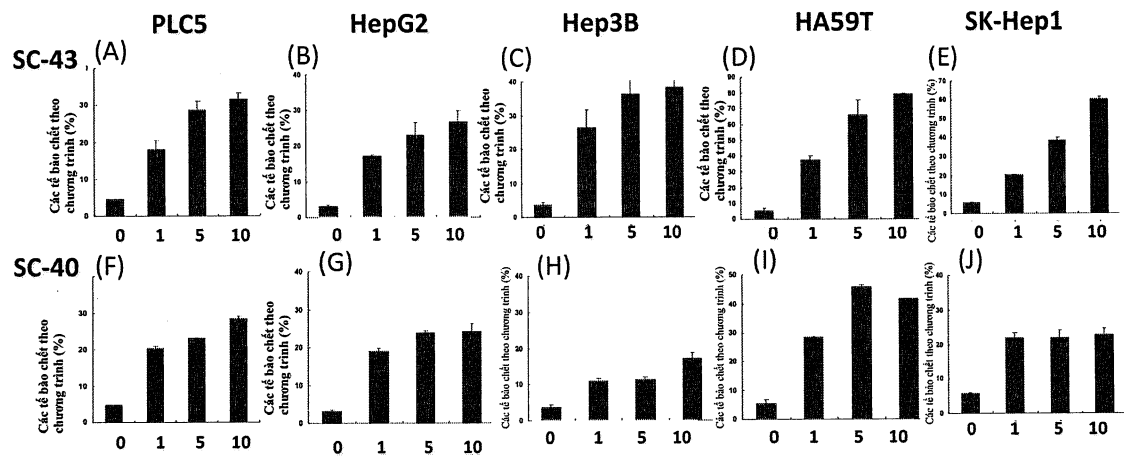


Fig. 14

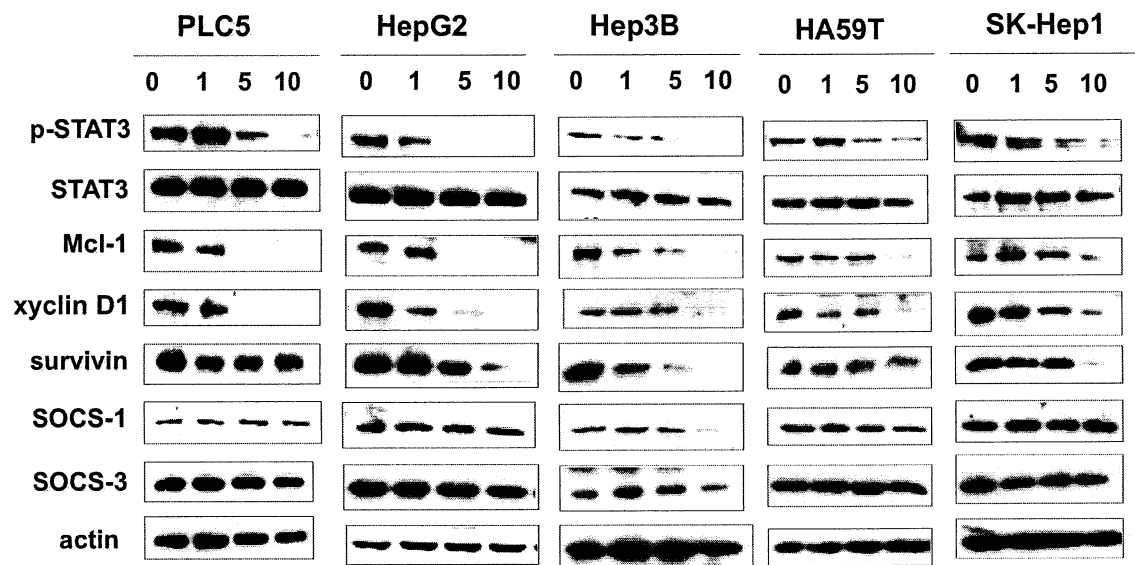


Fig. 15

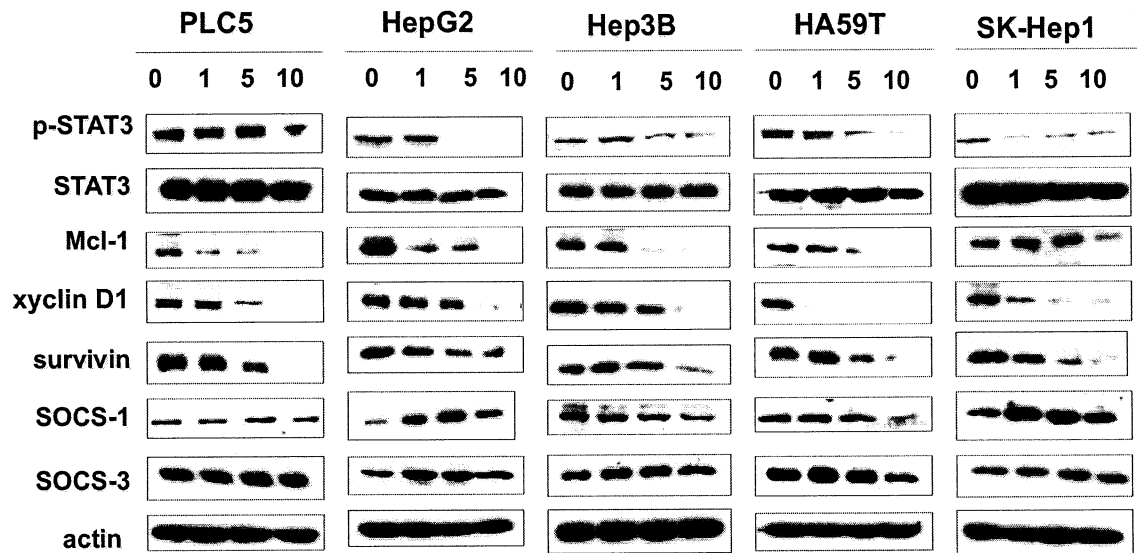


Fig. 16

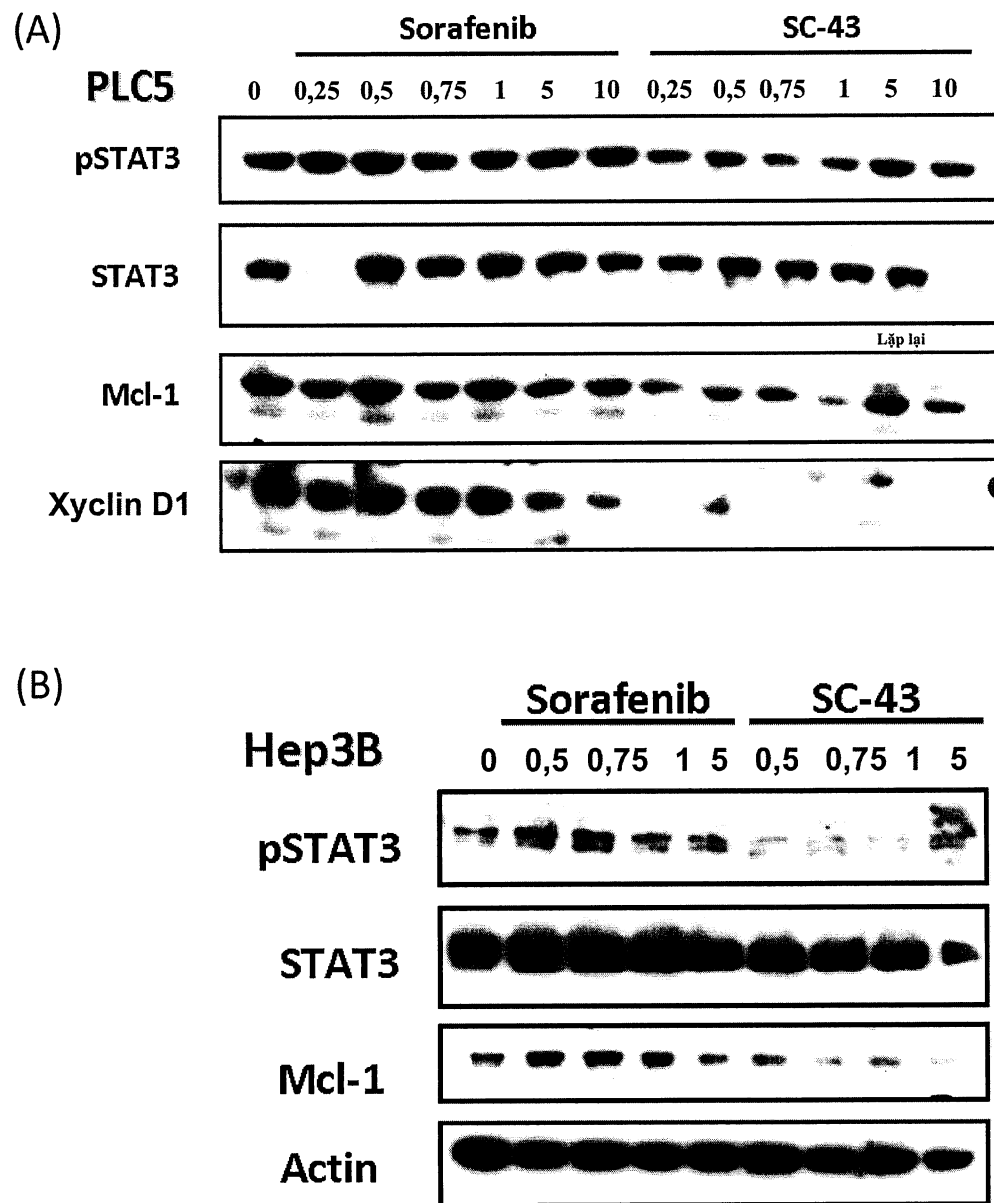


Fig. 17

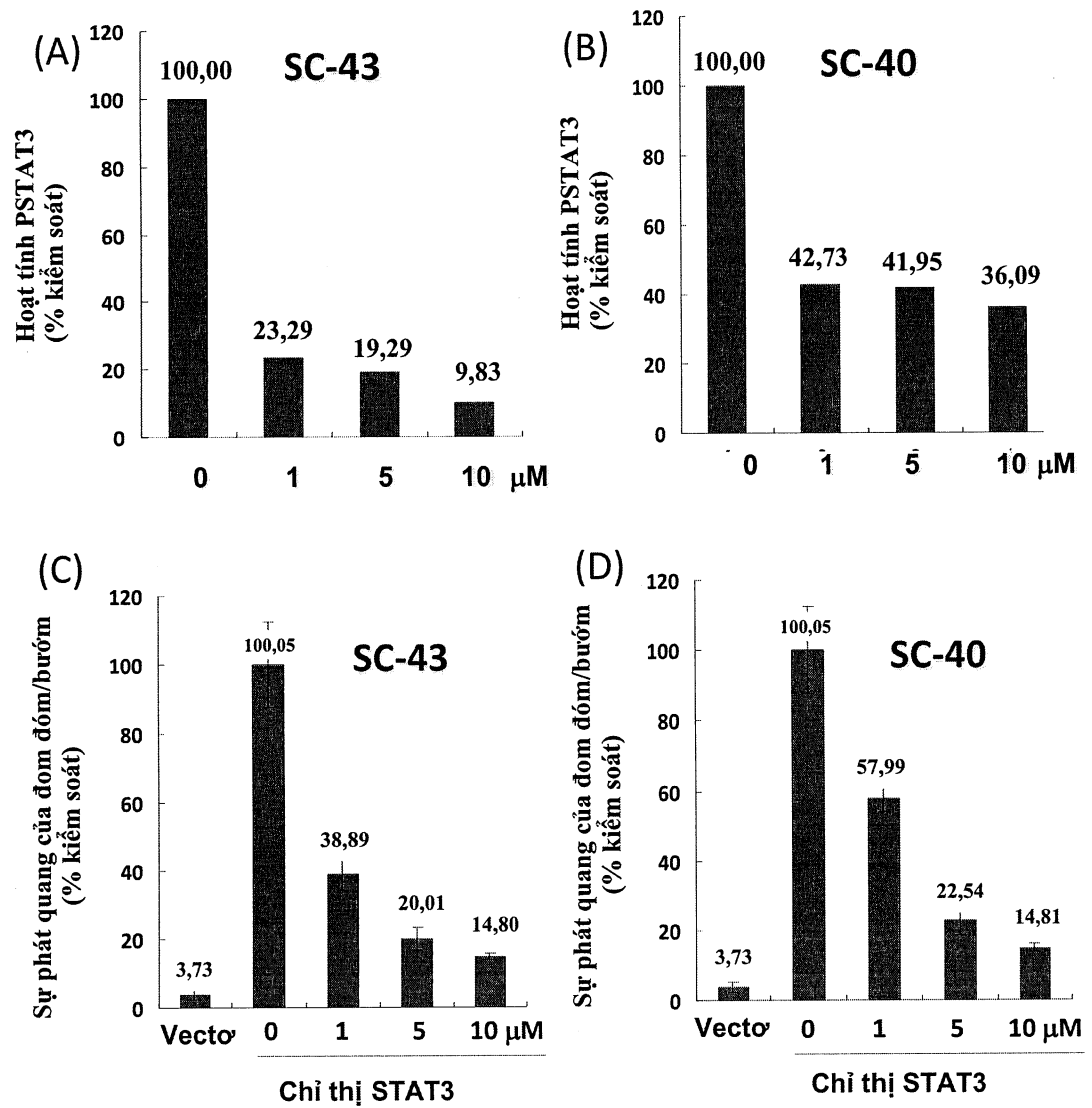


Fig. 18

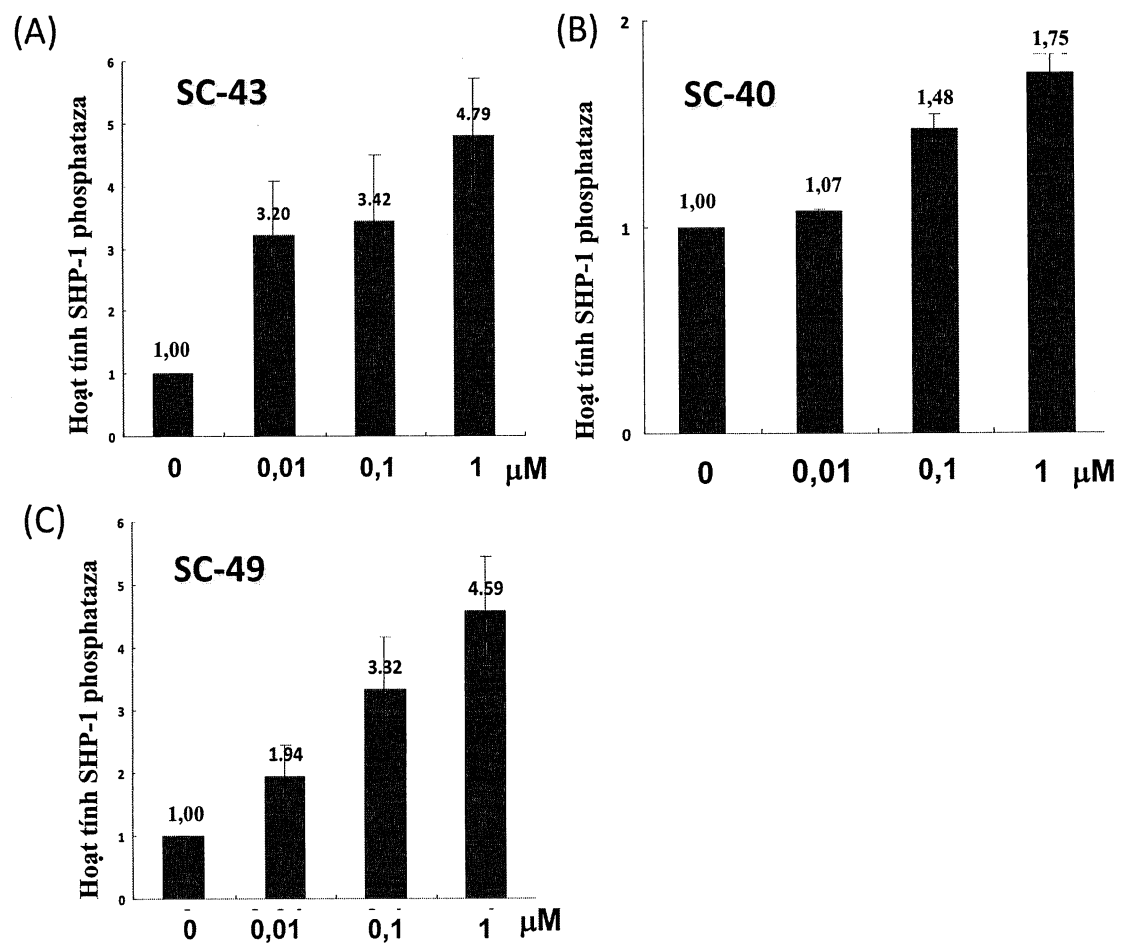


Fig. 19

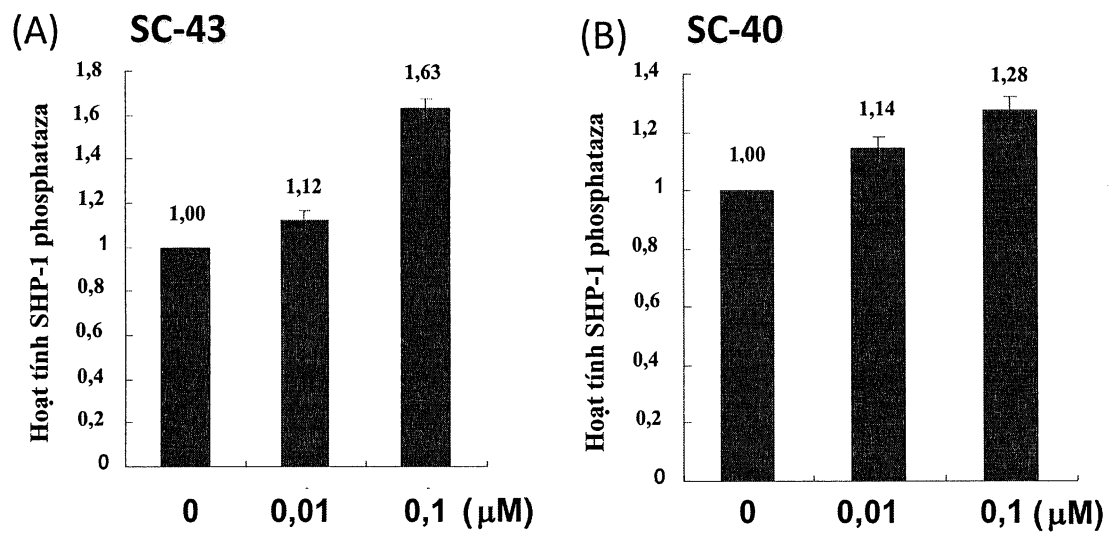


Fig. 20

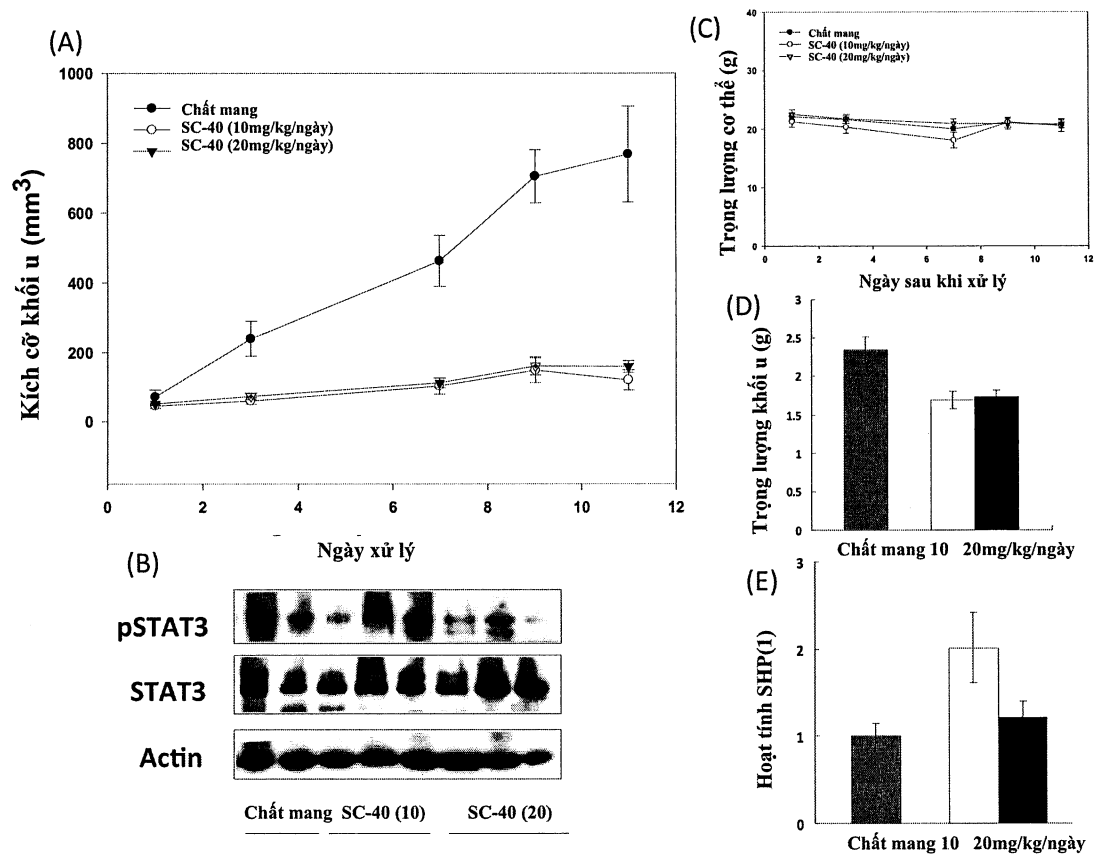


Fig. 21

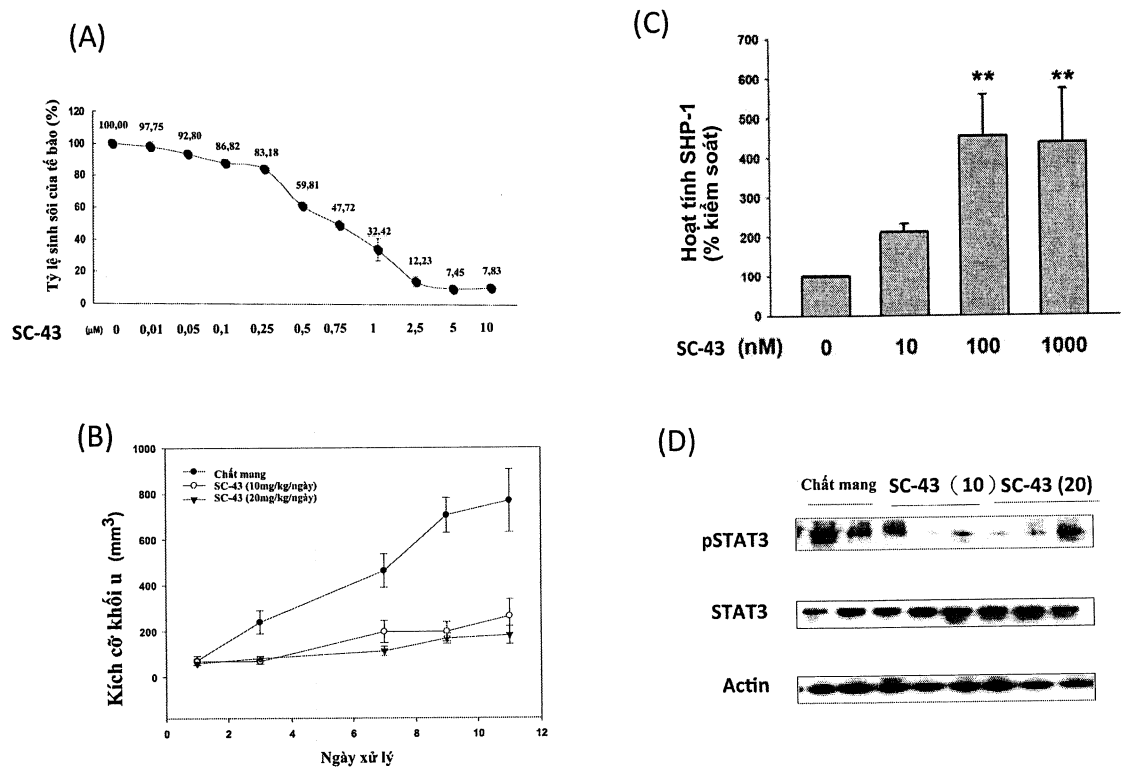


Fig. 22

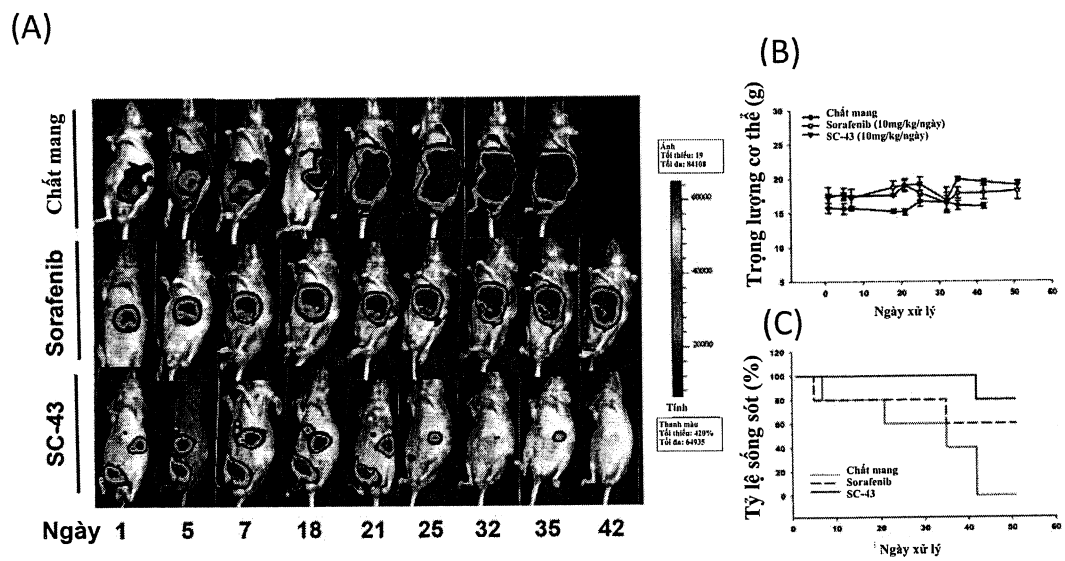


Fig. 23