



(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)



1-0026951

(51)⁷ C07D 498/04; A61K 31/5365; A61P (13) B
29/00

(21) 1-2015-02129

(22) 26/11/2013

(86) PCT/IB2013/060412 26/11/2013

(87) WO2014/102630 03/07/2014

(30) P/2012/22895 26/11/2012 GC; 13915014000307213 04/12/2012 IR

(45) 25/01/2021 394

(43) 26/10/2015 331A

(73) NOVARTIS AG (CH)

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland

(72) Konstanze HURTH (DE); Christoph KALIS (DE); Karen KAMMERTOENS (FR);
Nicolas SOLDERMANN (FR); Frédéric ZECRI (FR).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) HỢP CHẤT ĐIHYĐRO-PYRİĐO-OXAZIN Ở DẠNG TINH THỂ KHAN, DƯỢC
PHẨM VÀ TỔ HỢP CHỨA NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-
{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-
yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan; dược phẩm và tổ hợp chứa hợp chất
dạng tinh thể này, cũng như dạng tinh thể của hợp chất này dùng để điều trị bệnh lý như
bệnh lý hoặc rối loạn bệnh lý mà gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K gây ra.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất dihydro-pyrido-oxazin ở dạng tinh thể rắn mới, dược phẩm và tổ hợp chứa nó,

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đơn sáng chế quốc tế số PCT/IB2012/057554, số công bố WO2013/093849, bộc lộ chất dẫn xuất của dihydro-benzo-oxazin và chất dẫn xuất của dihydro-pyrido-oxazin mà là thích hợp để điều trị rối loạn bệnh lý hoặc bệnh mà gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K gây ra. PCT/IB2012/057554 bộc lộ (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-methoxy-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon và các phương pháp tạo ra hợp chất này.

Các hợp chất này là hữu dụng đối với việc điều trị, riêng rẽ hoặc kết hợp, với một hoặc nhiều dược chất khác, các bệnh liên quan đến PI3K bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh rối loạn tự miễn dịch, các bệnh viêm, các bệnh dị ứng, các bệnh hô hấp, như bệnh hen và COPD, đào thải cấy ghép, các bệnh ung thư ví dụ bệnh ung thư có nguồn gốc sinh huyết hoặc u rắn.

Các hợp chất này còn là hữu dụng để điều trị, riêng rẽ hoặc kết hợp, với một hoặc nhiều dược chất khác, các tình trạng bệnh lý, các bệnh hoặc các rối loạn bệnh lý ví dụ các bệnh rối loạn tự miễn dịch, các bệnh viêm, các bệnh dị ứng, các bệnh hô hấp, như bệnh hen và COPD, đào thải cấy ghép; sản sinh kháng thể, trình diện kháng nguyên, sản sinh xytokin hoặc sự phát sinh cơ quan dạng bạch huyết là bất thường hoặc là không mong muốn, kể cả bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh pemphigut nói chung, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, bệnh ban đỏ toàn thân, bệnh xơ cứng rải rác, chứng nhược cơ nặng, hội chứng Sjögren, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn dịch, bệnh viêm mạch liên quan đến ANCA, bệnh cryoglobulin huyết, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối, bệnh mày đay tự miễn dịch mạn tính, bệnh dị ứng (bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm da do tiếp xúc, bệnh viêm mũi dị ứng), hội chứng Goodpasture, AMR (đào thải cấy ghép gián tiếp do kháng thể), đào thải cấy ghép siêu cấp tính, cấp tính và mạn tính gián tiếp do tế

bào B gây ra và các bệnh ung thư có nguồn gốc sinh huyết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chứng đa u tủy; bệnh bạch cầu; bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính; bệnh bạch cầu mãn dòng tủy; bệnh bạch cầu tế bào lympho; bệnh bạch cầu thể tủy; u bạch huyết không thuộc dạng Hodgkin; u bạch huyết; chứng tăng hồng cầu vô căn; chứng tăng tiểu cầu bản chất; xơ hóa tủy xương với chứng dị sản mô tủy; và bệnh Walden stroem; đặc biệt hơn nữa là các tình trạng bệnh lý trong số các bệnh viêm đa khớp dạng thấp (RA), bệnh pemphigut thông thường (PV), bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP), bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn dịch (AIHA), bệnh rối loạn đông máu mắc phải typ A (AHA), bệnh ban đỏ toàn thân (SLE), bệnh xơ cứng rải rác (MS), chứng nhược cơ nặng (MG), hội chứng Sjögren (SS), bệnh viêm mạch liên quan đến ANCA, bệnh cryoglobulin huyết, bệnh mày đay tự miễn dịch mạn tính (CAU), bệnh dị ứng (bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm da do tiếp xúc, bệnh viêm mũi dị ứng), hội chứng Goodpasture, đào thải cấy ghép và các bệnh ung thư có nguồn gốc sinh huyết cũng như ở bệnh hoặc bệnh miễn dịch liên quan đến nhiễm trùng, ví dụ, ở bệnh sốt rét nghiêm trọng và bệnh sốt rét thể não, bệnh trùng mũi khoan, bệnh Leishmania, bệnh nhiễm toxoplasma và bệnh ấu trùng sán dây thần kinh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan; các dược phẩm và các tổ hợp chứa dạng này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dược phẩm và các tổ hợp chứa dạng tinh thể khan nêu trên dùng để điều trị các bệnh gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K, tốt hơn là do hoạt tính của dạng đồng chức năng PI3Kδ, gây ra.

Đã biết rõ rằng dạng tinh thể của thành phần dược tính (API) của thuốc cụ thể thường là yếu tố quan trọng quyết định mức độ dễ bào chế của thuốc, độ ẩm, mức độ ổn định, độ hòa tan, mức độ ổn định khi bảo quản, mức độ dễ pha chế, tốc độ hòa tan trong dịch dạ dày-ruột và độ sinh khả dụng *in vivo*. Các dạng tinh thể xuất hiện khi chế phẩm đó kết tinh theo sắp xếp mạng tinh thể khác nhau tạo ra các tính chất nhiệt động lực khác nhau và tính ổn định đặc hiệu với dạng tinh thể cụ thể này. Các dạng tinh thể còn có thể

bao gồm các hydrat hoặc các solvat khác nhau của cùng hợp chất. Khi quyết định dạng nào được ưu tiên, nhiều tính chất của các dạng được so sánh và dạng được ưu tiên đã được chọn trên cơ sở nhiều biến số về tính chất vật lý. Điều hoàn toàn có thể là một dạng có thể được ưu tiên trong một số trường hợp khi một số khía cạnh như tính dễ điều chế, tính ổn định, v.v. được xem là quan trọng. Trong một số tình huống khác, dạng khác có thể được ưu tiên vì tốc độ hòa tan cao hơn và/hoặc độ sinh khả dụng tốt hơn. Vẫn chưa thể dự đoán liệu hợp chất cụ thể sẽ tạo ra các chất đa hình hay không, liệu chất đa hình bất kỳ trong số các chất đa hình này sẽ là thích hợp đối với ứng dụng thương mại trong dược phẩm để điều trị bệnh, hoặc các chất đa hình nào sẽ thể hiện các tính chất mong muốn đó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là giản đồ nhiễu xạ bột tia X của Ví dụ F1, hợp chất ở dạng tinh thể khan.

Hình 2 là đồ thị phân tích đo nhiệt lượng quét vi phân của Ví dụ F1, hợp chất ở dạng tinh thể khan.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dạng tinh thể khan của (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihiđro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon.

Theo phương án khác, dạng tinh thể khan (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihiđro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon khác biệt ở chỗ mẫu nhiễu xạ bột tia X gồm các pic sau ở độ 2-theta +/- 0,2 độ: 9,1, 10,2, 11,9, 13,0, 17,1, 17,7, 18,7, 20,3, 20,8, 26,0, 26,7, 23,2, 24,1, 24,8, 29,3, 27,4, và 21,4.

Theo phương án khác, dạng tinh thể khan (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihiđro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon có phổ nhiễu xạ tia X gần như giống phổ nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Hình 1.

Theo phương án khác, dạng tinh thể khan (1,1-đioxa-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon có đồ thị phân tích đo nhiệt lượng quét vi phân gần giống như được thể hiện trên Hình 2.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “dạng theo sáng chế” được dùng để chỉ dạng tinh thể khan của (1,1-đioxa-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon.

Tốt hơn, nếu các thuật ngữ chung được dùng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh của sáng chế này có nghĩa dưới đây, trừ khi có quy định khác:

Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo phần mô tả dưới đây, kể cả nghĩa dưới đây của các thuật ngữ và các ví dụ mang tính kết luận. Các thuật ngữ "bao gồm", "gồm" và "chứa" được dùng trong bản mô tả này theo nghĩa mở không mang tính giới hạn.

Thuật ngữ "chất mang dược dụng" được dùng trong bản mô tả này bao gồm từng và mọi dung môi, môi trường phân tán, lớp bao, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa, chất bảo quản (ví dụ, tác nhân diệt vi khuẩn, tác nhân diệt nấm), chất đẳng trương, tác nhân trì hoãn sự hấp thụ, muối, chất bảo quản, chất làm ổn định thuốc, chất kết dính, tá dược, tác nhân phân rã, chất làm trơn, chất tạo ngọt, tác nhân tạo vị, chất màu, và tác nhân tương tự và hỗn hợp của chúng, mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết (ví dụ, xem tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Chỉ trừ khi chất mang thông thường bất kỳ không tương thích với hoạt chất, còn lại thì việc sử dụng nó trong các chế phẩm điều trị bệnh hoặc các dược phẩm được dự tính.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu để điều trị bệnh" của hợp chất theo sáng chế được dùng để chỉ lượng của hợp chất theo sáng chế mà sẽ gây ra đáp ứng sinh học hoặc đáp ứng y học

của đối tượng, ví dụ, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của enzym hoặc hoạt tính của protein, hoặc làm giảm các triệu chứng, làm thuyên giảm tình trạng bệnh lý, làm chậm hoặc trì hoãn diễn tiến của bệnh, hoặc ngăn ngừa bệnh, v.v.. Theo một phương án không giới hạn phạm vi của sáng chế, thuật ngữ “lượng hữu hiệu để điều trị bệnh” được dùng để chỉ lượng hợp chất theo sáng chế mà, khi được dùng cho đối tượng, thì có tác dụng (1) làm thuyên giảm, ức chế, phòng ngừa và/hoặc làm giảm ít nhất một phần tình trạng bệnh lý, hoặc rối loạn bệnh lý hoặc bệnh (i) gián tiếp do PI3K gây ra hoặc (ii) liên quan đến hoạt tính của PI3K, hoặc (iii) đặc trưng bởi hoạt tính (bình thường hoặc bất thường) của PI3K hoặc (2) làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của PI3K hoặc (3) làm giảm hoặc ức chế mức độ biểu hiện của PI3K. Theo phương án khác không mang tính giới hạn phạm vi của sáng chế, thuật ngữ “lượng hữu hiệu để điều trị bệnh” được dùng để chỉ lượng hợp chất theo sáng chế mà, khi được dùng cho tế bào, hoặc mô, hoặc nguyên liệu sinh học phi tế bào, hoặc môi trường, có tác dụng làm giảm hoặc ức chế ít nhất một phần hoạt tính của PI3K; hoặc ít nhất một phần làm giảm hoặc ức chế sự biểu hiện của PI3K. Nghĩa của thuật ngữ “lượng hữu hiệu để điều trị bệnh” như được minh họa trong phương án nêu trên đối với PI3K cũng áp dụng theo cùng cách như protein/peptit/enzym bất kỳ khác có liên quan.

Thuật ngữ “đối tượng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ động vật. Thông thường, động vật là động vật có vú. Đối tượng còn chỉ, ví dụ, các động vật linh trưởng (ví dụ, người, nam hoặc nữ), bò cái, cừu, dê, ngựa, chó, mèo, thỏ, chuột to, chuột nhắt, cá, chim và các động vật tương tự. Theo các phương án nhất định, đối tượng là động vật linh trưởng. Theo các phương án khác nữa, đối tượng là người.

Thuật ngữ “ức chế”, “việc ức chế” hoặc “sự ức chế” được dùng trong bản mô tả này để chỉ việc làm giảm hoặc việc ngăn chặn tình huống, triệu chứng, hoặc rối loạn bệnh lý, hoặc bệnh nhất định, hoặc làm giảm đáng kể hoạt tính gốc của hoạt tính sinh học hoặc quy trình sinh học.

Thuật ngữ “điều trị”, “việc điều trị” hoặc “quy trình điều trị” bệnh hoặc rối loạn bệnh lý bất kỳ được dùng trong bản mô tả này để chỉ, theo một phương án, việc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn bệnh lý này (tức là làm chậm hoặc dùng hoặc làm giảm sự phát triển

của bệnh này hoặc ít nhất một trong số các triệu chứng lâm sàng của chúng). Theo phương án khác, các thuật ngữ “điều trị bệnh”, “việc điều trị bệnh” hoặc “quy trình điều trị bệnh” được dùng để chỉ việc làm giảm hoặc làm thuyên giảm ít nhất là một thông số vật lý kể cả các thông số mà bệnh nhân không thể nhận thấy rõ. Theo phương án khác nữa, các thuật ngữ “điều trị bệnh”, “việc điều trị bệnh” hoặc “quá trình điều trị bệnh” được dùng để chỉ việc điều biến bệnh hoặc rối loạn bệnh lý này, về mặt thực thể, (ví dụ, làm ổn định triệu chứng có thể nhận thấy rõ), về mặt sinh lý, (ví dụ, làm ổn định thông số vật lý), hoặc cả hai. Theo phương án khác nữa, thuật ngữ “điều trị bệnh”, “việc điều trị bệnh” hoặc “quy trình điều trị bệnh” được dùng để chỉ việc phòng bệnh hoặc trì hoãn sự khởi phát hoặc sự phát triển hoặc tiến triển của bệnh hoặc rối loạn bệnh lý này.

Khái niệm đối tượng “có nhu cầu” điều trị được dùng trong bản mô tả này nếu đối tượng đó hưởng lợi ích về mặt sinh học, y học hoặc về chất lượng sống nhờ việc điều trị bệnh.

Thuật ngữ “một”, “cái”, “này” và các thuật ngữ tương tự được dùng trong bản mô tả này được dùng trong ngữ cảnh của sáng chế, đặc biệt là trong phạm vi trong các điểm yêu cầu bảo hộ, cần được hiểu là bao trùm cả số ít và số nhiều trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này hoặc rõ ràng trái ngược trong ngữ cảnh đó.

Tất cả các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo trình tự thích hợp trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này hoặc theo cách khác rõ ràng là trái ngược với ngữ cảnh. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ làm ví dụ, ví dụ “như”, với điều kiện trong bản mô tả này chỉ nhằm để minh họa rõ hơn sáng chế và không giới hạn phạm vi của sáng chế mà đã được yêu cầu bảo hộ.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa dạng theo sáng chế và chất mang được dùng. Dược phẩm có thể được bào chế cho đường dùng cụ thể như qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, và qua đường trực tràng, v.v. Ngoài ra, các dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng rắn (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, viên nang, viên nén, viên tròn, hạt, bột hoặc viên đặt hậu môn), hoặc ở dạng lỏng (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch, các loại huyền phù hoặc nhũ tương). Các dược phẩm có thể được áp dụng các phương pháp bào chế dược thông thường như tiết trùng

và/hoặc có thể chứa các chất pha loãng, các tác nhân làm trơn, hoặc các chất đệm, cũng như các tá dược thông thường, như các chất bảo quản, các chất làm ổn định, các tác nhân thẩm ướt, các chất nhũ tương và các dung dịch đệm, v.v..

Nói chung, dược phẩm là viên nén hoặc viên nang gelatin chứa hoạt chất cùng với

- a) các chất pha loãng, ví dụ, lactoza, dextroza, sucroza, manitol, sorbitol, xenluloza và/hoặc glyxin;
- b) các chất làm trơn, ví dụ, silic đioxit, talc, axit stearic, muối magie hoặc muối canxi của nó và/hoặc polyetylglycol; đối với cả các viên nén
- c) các chất kết dính, ví dụ, magie nhôm silicat, bột nhão tinh bột, gelatin, tragacan, metylxenluloza, natri carboxymetylxenluloza và/hoặc polyvinylpyrrolidon; nếu muốn
- d) các chất gây rã, ví dụ, tinh bột, aga, axit alginic hoặc muối natri của nó, hoặc hỗn hợp sủi; và/hoặc
- e) các chất hấp thụ, các chất tạo màu, các chất tạo vị và các chất làm ngọt.

Viên nén có thể được bao màng hoặc được bao tan trong ruột theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các dược phẩm thích hợp để dùng qua đường miệng chứa lượng hữu hiệu của dạng theo sáng chế ở dạng viên nén, viên ngậm, huyền phù trong nước hoặc trong dầu, bột hoặc hạt có thể phân tán được, nhũ tương, viên nang cứng hoặc viên nang mềm, hoặc siro hoặc cồn ngọt. Các dược phẩm nhằm để dùng qua đường miệng được bào chế theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để sản xuất dược phẩm và các dược phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều tác nhân được chọn từ nhóm bao gồm các chất tạo ngọt, các tác nhân tạo vị, các tác nhân tạo màu và các chất bảo quản để tạo ra các chế phẩm dược dễ chịu và dễ dùng. Viên nén có thể chứa hoạt chất trong hỗn hợp với các tá dược được dùng không độc mà là thích hợp để sản xuất viên nén. Các tá dược này, ví dụ, là chất pha loãng, như canxi cacbonat, natri cacbonat, lactoza, canxi phosphat hoặc natri phosphat; các tác nhân nghiền hạt và các chất gây rã, ví dụ, tinh bột ngô, hoặc axit alginic; các tác nhân liên kết, ví dụ, tinh bột, gelatin hoặc acacia; và các tác nhân làm trơn, ví dụ, magie stearat, axit stearic hoặc talc. Các viên nén không được bao hoặc được bao theo các kỹ thuật đã biết để trì hoãn sự phân rã và sự hấp thụ trong dải dạ dày-ruột

non và bằng cách đó tạo ra tác dụng kéo dài trong thời gian dài. Ví dụ, chất giải phóng chậm được chất như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat có thể được sử dụng. Các chế phẩm để dùng qua đường miệng có thể được trình bày ở dạng viên nang gelatin cứng, trong đó hoạt chất được trộn với chất pha loãng rắn trơ, ví dụ, canxi cacbonat, canxi phosphat hoặc cao lanh, hoặc ở dạng viên nang gelatin mềm, trong đó hoạt chất được trộn với môi trường nước hoặc môi trường dầu, ví dụ, dầu lạc, parafin lỏng hoặc dầu ô liu.

Một số dược phẩm để tiêm truyền là dung dịch nước đẳng trương hoặc huyền phù, và viên đặt hậu môn được bào chế một cách có lợi từ nhũ tương hoặc huyền phù béo. Các dược phẩm này có thể được tiệt trùng và/hoặc chứa các tá dược, như tác nhân bảo quản, tác nhân làm ổn định, tác nhân thẩm ướt hoặc tác nhân nhũ hóa, các tác nhân trợ xúc tác dung dịch, các muối để điều tiết áp suất thẩm thấu và/hoặc các dung dịch đệm. Ngoài ra, chúng còn có thể chứa các dược chất có giá trị khác. Các dược phẩm này được bào chế lần lượt theo các phương pháp trộn, nghiền tạo hạt hoặc bao thông thường, và chứa khoảng 0,1% đến 75%, hoặc chứa khoảng 1% đến 50%, hoạt chất.

Các dược phẩm thích hợp để dùng qua da chứa lượng hữu hiệu của dạng theo sáng chế với chất mang thích hợp. Các chất mang thích hợp để phân phối qua da bao gồm các dung môi được dụng để bị hút để hỗ trợ quá trình đi qua da của vật chủ. Ví dụ, thiết bị để dùng qua da ở dạng băng dán gồm phần lót, nguồn chứa hợp chất tùy ý với các chất mang, tùy ý hàng rào kiểm soát tốc độ phân phối hợp chất đến da của vật chủ ở mức độ định trước và được kiểm soát trong khoảng thời gian kéo dài, và phương tiện để giữ thiết bị này vào da.

Các dược phẩm thích hợp để dùng khu trú, ví dụ, vào da và mắt, bao gồm các dung dịch nước, các loại huyền phù, các loại dầu bôi, các loại kem bôi, các gel hoặc các chế phẩm xịt, ví dụ, để phân phối nhờ sol khí hoặc tương tự. Các hệ phân phối khu trú này sẽ là đặc biệt thích hợp để dùng trên da, ví dụ, để điều trị bệnh ung thư da, ví dụ, đối với các ứng dụng phòng ngừa trong các loại kem bôi chống nắng, các loại nước xúc, thuốc xịt và các loại tương tự. Chúng là đặc biệt thích hợp để dùng khu trú, bao gồm các loại mỹ phẩm đã

biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các loại này có thể chứa các chất hòa tan, các chất làm ổn định; các tác nhân làm gia tăng trương lực, các dung dịch đệm và chất bảo quản.

Cách dùng khu trú như được dùng trong bản mô tả này còn có thể liên quan đến việc dùng bằng cách xông/khí dung hoặc dùng trong mũi. Chúng có thể được phân phối một cách thuận tiện ở dạng bột khô (riêng rẽ, ở dạng hỗn hợp, ví dụ, hỗn hợp khô với lactoza, hoặc hạt thành phần trộn lẫn, ví dụ, với các phospholipit) từ máy khí dung bột khô hoặc dạng phun sol khí từ vật chứa chịu áp, bơm, ống phun, máy phun mù hoặc máy khí dung, có sử dụng hoặc không sử dụng chất đẩy thích hợp.

Sáng chế còn đề xuất các dược phẩm khan và các dạng liều chứa dạng theo sáng chế làm hoạt chất, vì nước có thể tạo điều kiện thuận lợi cho sự thoái biến của một số hợp chất.

Các dược phẩm và các dạng liều khan theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách sử dụng các thành phần khan hoặc các thành phần có hàm lượng ẩm thấp và các điều kiện hàm lượng ẩm thấp hoặc các điều kiện độ ẩm thấp. Dược phẩm khan có thể được bào chế và bảo quản sao cho tính khan của nó được duy trì. Do đó, các dược phẩm khan được bao gói bằng cách sử dụng các nguyên liệu đã biết để ngăn ngừa tiếp xúc với nước sao cho chúng có thể được đưa vào các kit bào chế thích hợp. Các ví dụ về việc bao gói thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lá kim loại bọc kín khí, các chất dẻo, vật chứa liều đơn vị (ví dụ, lọ), gói vỉ thuốc, và gói dải.

Sáng chế còn đề xuất các dược phẩm và các dạng liều mà chứa một hoặc nhiều tác nhân làm giảm tốc độ mà hoạt chất là hợp chất theo sáng chế sẽ phân hủy. Các tác nhân đó, mà trong bản mô tả này được gọi là "chất làm ổn định", bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất chống oxy hóa như axit ascorbic, các dung dịch đệm độ pH, hoặc các dung dịch đệm muối, v.v..

Dạng theo sáng chế có thể được dùng để điều trị các tình trạng bệnh lý, các bệnh hoặc các rối loạn bao gồm bệnh hoặc bệnh miễn dịch liên quan đến nhiễm trùng, trong đó một hoặc nhiều chức năng của tế bào B như sản sinh kháng thể, trình diện kháng nguyên, sản sinh xytokin hoặc sự phát sinh cơ quan dạng bạch huyết là bất thường hoặc là không

mong muốn, bao gồm bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh pemphigut thông thường và các bệnh có liên quan, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, bệnh ban đỏ toàn thân, bệnh xơ cứng rải rác, chứng nhược cơ nặng, hội chứng Sjögren, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn dịch, bệnh viêm mạch liên quan đến ANCA, bệnh cryoglobulin huyết, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối, bệnh mày đay tự miễn dịch mạn tính, bệnh dị ứng (bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm da do tiếp xúc, bệnh viêm mũi dị ứng), hội chứng Goodpasture, AMR (đào thải cấy ghép gián tiếp do kháng thể), đào thải cấy ghép siêu cấp tính, cấp tính và mạn tính gián tiếp do tế bào B và các bệnh ung thư có nguồn gốc sinh huyết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đa u tủy; bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính; bệnh bạch cầu mãn dòng tủy; bệnh bạch cầu tế bào lympho; bệnh bạch cầu thể tủy; u bạch huyết không thuộc dạng Hodgkin; u bạch huyết; chứng tăng hồng cầu vô căn; chứng tăng tiểu cầu bản chất; xơ hóa tủy xương với chứng dị sản mô tủy; và bệnh Waldenstroem.

Theo các phương án khác, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn bệnh lý (ví dụ, gián tiếp do PI3K gây ra) được chọn từ nhóm bao gồm: chứng tăng hồng cầu vô căn, chứng tăng tiểu cầu bản chất, xơ hóa tủy xương với chứng dị sản mô tủy, bệnh hen, COPD, ARDS, hội chứng Löffler, bệnh viêm phổi tăng bạch cầu ái toan, vật hại ký sinh (cụ thể là động vật đa bào) (bao gồm hội chứng tăng bạch cầu ưa eosin các bệnh nhiệt đới), bệnh viêm phế quản-phổi do nhiễm nấm *aspergillosis*, bệnh viêm đa động mạch nút (bao gồm hội chứng Churg-Strauss), u hạt tế bào ưa eosin, các rối loạn bệnh lý liên quan đến tế bào ưa eosin ảnh hưởng đến đường hô hấp xảy ra do phản ứng với thuốc, bệnh vẩy nến, bệnh viêm da do tiếp xúc, bệnh viêm da cơ địa, chứng rụng tóc từng vùng, ban đỏ đa dạng, bệnh viêm da dạng herpes, bệnh cứng bì, bệnh bạch biến, bệnh viêm mạch máu tăng cảm, bệnh mày đay, bóng rộp dạng pemphigut, bệnh luput ban đỏ, bệnh pemphigut, bệnh ly thượng bì bong nước mắc phải, các rối loạn huyết học bệnh lý tự miễn dịch (ví dụ, bệnh thiếu máu do tan máu, bệnh thiếu máu ngừng triển, bệnh thiếu máu tế bào hồng cầu tinh khiết và chứng giảm tiểu cầu tự phát), bệnh ban đỏ toàn thân, bệnh viêm đa sụn, bệnh cứng bì, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm da-cơ, bệnh viêm gan mạn tính còn hoạt động, chứng nhược cơ nặng, hội chứng Steven-Johnson, bệnh viêm ruột loét miệng tự phát, bệnh viêm ruột tự miễn dịch (ví dụ, bệnh viêm ruột kết gây loét và bệnh Crohn), bệnh lý mắt nội tiết, bệnh Grave, bệnh sarcoid, bệnh viêm phế nang, bệnh viêm phổi mạn tính quá nhạy, bệnh

xơ cứng rải rác, bệnh xơ mật nguyên phát, bệnh viêm màng mạch nhỏ (trước và sau), chứng xơ hóa kẽ phổi, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh viêm cuộn tiểu cầu thận, các bệnh tim mạch, chứng xơ vữa động mạch, chứng cao huyết áp, chứng huyết khối sâu trong tĩnh mạch, chứng đột quy, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt không ổn định, bệnh huyết khối tắc mạch, nghẽn mạch phổi, các bệnh do sự tan huyết khối gây ra, chứng thiếu máu cục bộ cấp tính ở động mạch, chứng tắc huyết khối ngoại biên, và bệnh động mạch vành, tổn thương do tái truyền, bệnh lý vồng mạc, như bệnh vồng mạc do bệnh đái tháo đường gây ra hoặc bệnh lý vồng mạc bội áp do oxy gây ra, và các tình trạng bệnh lý đặc trưng bởi áp suất tăng trong mắt hoặc mức độ tiết dịch thể nước trong mắt, như bệnh tăng nhãn áp.

Theo phương án khác, dạng theo sáng chế có thể được dùng để điều trị, phòng ngừa, hoặc làm thuyên giảm bệnh tự miễn và các tình trạng bệnh lý viêm, cụ thể là các tình trạng bệnh lý viêm với nguyên nhân bệnh bao gồm thành phần tự miễn dịch như bệnh viêm khớp (ví dụ bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp mạn tính progrediente và bệnh viêm khớp biến dạng) và các bệnh thấp khớp, kể cả các tình trạng bệnh lý viêm và các bệnh thấp khớp liên quan đến sự tiêu xương, cơn đau do viêm, bệnh khớp ở cột sống bao gồm bệnh viêm cột sống dính khớp, hội chứng Reiter, bệnh viêm khớp phản ứng, bệnh viêm khớp vảy nến, và bệnh viêm khớp kết hợp với viêm ruột, các tình trạng quá nhạy (bao gồm cả quá nhạy hô hấp và quá nhạy da) và các bệnh dị ứng. Các bệnh tự miễn dịch đặc biệt mà các dạng theo sáng chế có thể được sử dụng bao gồm các rối loạn huyết học tự miễn dịch (kể cả ví dụ bệnh thiếu máu tan huyết, bệnh thiếu máu ngừng triển, bệnh thiếu máu tế bào hồng cầu tinh khiết và chứng giảm tiểu cầu tự phát), bệnh rối loạn đông máu di truyền mắc phải A, bệnh ngưng kết tổ lạnh, bệnh cryoglobulin huyết, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối, hội chứng Sjögren, bệnh ban đỏ toàn thân, các rối loạn cơ viêm, bệnh viêm đa sụn, bệnh cứng bì, chứng viêm mạch liên quan đến kháng thể của bào chất kháng bạch cầu trung tính, bệnh thần kinh gián tiếp do IgM gây ra, hội chứng lác rung giật mắt, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm da-cơ, bệnh viêm gan mạn tính còn hoạt động, chứng nhược cơ nặng, bệnh vảy nến, hội chứng Steven-Johnson, bệnh pemphigut nói chung, bệnh pemphigut thể lá, bệnh viêm ruột loét miệng tự phát, bệnh viêm ruột tự miễn dịch (bao gồm ví dụ bệnh viêm ruột kết gây loét, bệnh Crohn và hội chứng rối loạn tiêu hóa), bệnh nhãn khoa nội tiết, bệnh Graves, bệnh sarcoid, bệnh xơ cứng

rải rác, bệnh viêm tủy-thị thần kinh, bệnh xơ mật nguyên phát, bệnh đái tháo đường ở người trẻ (bệnh đái tháo đường typ I), bệnh viêm màng mạch nhỏ (phía trước, giữa và phía sau cũng như bệnh viêm màng bồ đào lan tỏa), bệnh viêm giác-kết mạc khô và bệnh viêm giác mạc-kết mạc mùa xuân, chứng xơ hóa kẽ phổi, bệnh viêm khớp vảy nến và bệnh viêm cuộn tiểu cầu thận (có và không có hội chứng hư thận, ví dụ bao gồm hội chứng thận tự phát hoặc bệnh thận thay đổi tối thiểu), các khối u, bệnh viêm da và giác mạc, bệnh viêm mô cơ, lỏng cấy ghép xương, các rối loạn chuyển hóa, như chứng xơ vữa động mạch, bệnh đái tháo đường, và chứng rối loạn lipid máu.

Theo phương án khác, dạng theo sáng chế có thể được dùng để điều trị các tình trạng bệnh lý hoặc các rối loạn bệnh lý được chọn từ nhóm bao gồm u bạch huyết nguyên phát tế bào B ở da, bệnh bóng nước miễn dịch, bệnh pemphigut nói chung, bệnh pemphigut thể lá, dạng địa phương của bệnh pemphigut Brazil (Fogo selvagem), pemphigut gần khối u, bóng rộp dạng pemphigut, dạng pemphigut màng nhầy, bệnh ly thượng bì bong nước mắt phải, bệnh mạn tính mà trong đó bộ phận cấy ghép chống vật chủ, bệnh viêm da-cơ, bệnh ban đỏ toàn thân, chứng viêm mạch, chứng viêm mạch nhỏ, bệnh mày đay viêm mao mạch giảm hỗ trợ, bệnh viêm mạch liên quan đến kháng thể bào chất kháng bạch cầu trung tính, bệnh cryoglobulin huyết, hội chứng Schnitzler, chứng đại globulin huyết thanh Waldenstrom, chứng phù mạch, bệnh bạch biến, bệnh ban đỏ toàn thân, bệnh ban xuất huyết giảm tiêu cầu tự phát, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh ngưng kết tổ lạnh, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn dịch, chứng viêm mạch liên quan đến kháng thể của bào chất kháng bạch cầu trung tính, bệnh trong đó bộ phận cấy ghép chống vật chủ, bệnh cryoglobulin huyết và chứng giảm tiêu cầu huyết khối.

Do đó, theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất dạng tinh thể khan (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon dùng trong việc điều trị bệnh. Theo phương án khác nữa, việc điều trị được chọn từ bệnh mà có thể được điều trị bằng cách ức chế PI3K. Theo phương án khác, bệnh này được chọn từ danh mục nêu trên, đặc biệt là trong số các bệnh rối loạn tự miễn dịch, các bệnh viêm, các bệnh dị ứng, các bệnh hô hấp, như bệnh hen và COPD, đào thải cấy ghép; sản sinh kháng thể, trình diện kháng nguyên, sản sinh xytokin hoặc sự phát sinh cơ quan dạng bạch huyết là

bất thường hoặc là không mong muốn kể cả bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh pemphigut nói chung, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, bệnh ban đỏ toàn thân, bệnh xơ cứng rải rác, chứng nhược cơ nặng, hội chứng Sjögren, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn dịch, bệnh viêm mạch liên quan đến ANCA, bệnh cryoglobulin huyết, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối, bệnh mày đay tự miễn dịch mạn tính, bệnh dị ứng (bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm da do tiếp xúc, bệnh viêm mũi dị ứng), hội chứng Goodpasture, AMR (đào thải cấy ghép gián tiếp do kháng thể), đào thải cấy ghép siêu cấp tính, cấp tính và mạn tính gián tiếp do tế bào B và các bệnh ung thư có nguồn gốc sinh huyết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đa u tủy; bệnh bạch cầu; bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính; bệnh bạch cầu mãn dòng tủy; bệnh bạch cầu tế bào lympho; bệnh bạch cầu thể tủy; u bạch huyết không thuộc dạng Hodgkin; u bạch huyết; chứng tăng hồng cầu vô căn; chứng tăng tiểu cầu bản chất; xơ hóa tủy xương với chứng dị sản mô tủy; và bệnh Waldenstrom; đặc biệt hơn nữa là trong số bệnh viêm đa khớp dạng thấp (RA), bệnh pemphigut thông thường (PV), bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP), bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn dịch (AIHA), bệnh rối loạn đông máu mắc phải typ A (AHA), bệnh ban đỏ toàn thân (SLE), bệnh xơ cứng rải rác (MS), chứng nhược cơ nặng (MG), hội chứng Sjögren (SS), bệnh viêm mạch liên quan đến ANCA, bệnh cryoglobulin huyết, bệnh mày đay tự miễn dịch mạn tính (CAU), bệnh dị ứng (bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm da do tiếp xúc, bệnh viêm mũi dị ứng), hội chứng Goodpasture, đào thải cấy ghép và các bệnh ung thư có nguồn gốc sinh huyết cũng như ở bệnh hoặc bệnh miễn dịch liên quan đến nhiễm trùng, ví dụ, ở bệnh sốt rét nghiêm trọng và bệnh sốt rét thể não, bệnh trùng mũi khoan, bệnh Leishmania; bệnh nhiễm toxoplasma và bệnh ấu trùng sán dây thần kinh.

Do đó, theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất (1,1-đioxo-hexahydro-11amda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan dùng để bào chế thuốc. Theo phương án khác nữa, thuốc là để điều trị bệnh mà có thể được điều trị bằng cách ức chế PI3K. Theo phương án khác, bệnh này được chọn từ danh mục nêu trên, đặc biệt là trong số các bệnh rối loạn tự miễn dịch, các bệnh viêm, các bệnh dị ứng, các bệnh hô hấp, như bệnh hen và COPD, đào thải cấy ghép; sản sinh kháng thể, trình diện kháng nguyên, sản sinh xytokin hoặc sự phát sinh cơ quan dạng bạch huyết là bất thường hoặc

là không mong muốn bao gồm bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh pemphigut nói chung, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, bệnh ban đỏ toàn thân, bệnh xơ cứng rải rác, chứng nhược cơ nặng, hội chứng Sjögren, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn dịch, bệnh viêm mạch liên quan đến ANCA, bệnh cryoglobulin huyết, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối, bệnh mày đay tự miễn dịch mạn tính, bệnh dị ứng (bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm da do tiếp xúc, bệnh viêm mũi dị ứng), hội chứng Goodpasture, AMR (đào thải cấy ghép gián tiếp do kháng thể), đào thải cấy ghép siêu cấp tính, cấp tính và mạn tính gián tiếp do tế bào B và các bệnh ung thư có nguồn gốc sinh huyết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đa u tủy; bệnh bạch cầu; bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính; bệnh bạch cầu mãn dòng tủy; bệnh bạch cầu tế bào lympho; bệnh bạch cầu thể tủy; u bạch huyết không thuộc dạng Hodgkin; u bạch huyết; chứng tăng hồng cầu vô căn; chứng tăng tiểu cầu bản chất; xơ hóa tủy xương với chứng dị sản mô tủy; và bệnh Walden stroem; đặc biệt hơn nữa là trong số các bệnh viêm đa khớp dạng thấp (RA), bệnh pemphigut thông thường (PV), bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP), bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn dịch (AIHA), bệnh rối loạn đông máu mắc phải typ A (AHA), bệnh ban đỏ toàn thân (SLE), bệnh xơ cứng rải rác (MS), chứng nhược cơ nặng (MG), hội chứng Sjögren (SS), bệnh viêm mạch liên quan đến ANCA, bệnh cryoglobulin huyết, bệnh mày đay tự miễn dịch mạn tính (CAU), bệnh dị ứng (bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm da do tiếp xúc, bệnh viêm mũi dị ứng), hội chứng Goodpasture, đào thải cấy ghép và các bệnh ung thư có nguồn gốc sinh huyết cũng như ở bệnh hoặc bệnh miễn dịch liên quan đến nhiễm trùng, ví dụ, ở bệnh sốt rét nghiêm trọng và bệnh sốt rét thể não, bệnh trùng mũi khoan, bệnh Leishmania, bệnh nhiễm toxoplasma và bệnh ấu trùng sán dây thần kinh.

Dược phẩm hoặc tổ hợp theo sáng chế có thể ở dạng liều đơn vị chứa 1mg đến 1000mg (các) hoạt chất cho đối tượng có thể trọng nằm trong khoảng từ 50kg đến 70kg, hoặc chứa 1mg đến 500mg hoặc chứa 1mg đến 250mg hoặc chứa 1mg đến 150mg hoặc chứa 0,5mg đến 100mg, hoặc chứa 1mg đến 50mg hoạt chất. Liều lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất, dược phẩm, hoặc hỗn hợp của chúng, phụ thuộc vào loài đối tượng, thể trọng, lứa tuổi và tình trạng của cá thể đó, rối loạn bệnh lý này hoặc bệnh hoặc mức độ nghiêm trọng của chúng được điều trị. Bác sỹ, thầy thuốc hoặc bác sỹ thú y chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định lượng hữu hiệu của từng hoạt chất

cần thiết để ngăn ngừa, điều trị hoặc ức chế tiến triển của rối loạn bệnh lý này hoặc bệnh này.

Các tính chất của liều lượng nêu trên có thể giải thích được bằng các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* bằng cách sử dụng theo cách có lợi các động vật có vú, ví dụ, chuột nhắt, chuột to, chó, khỉ hoặc các cơ quan, các mô và các chế phẩm đã được phân lập của chúng. Dạng theo sáng chế có thể được áp dụng *in vitro* ở dạng dung dịch, ví dụ, dung dịch nước, và *in vivo* trong ruột, ngoài đường tiêu hóa, theo cách có lợi qua đường tĩnh mạch, ví dụ, ở dạng huyền phù hoặc trong dung dịch nước. Liều lượng *in vitro* có thể nằm trong khoảng nồng độ từ 10mol đến 3mol và 10mol đến 9mol. Lượng hữu hiệu để điều trị bệnh *in vivo* có thể tùy theo đường dùng, nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến 500mg/kg, hoặc nằm trong khoảng từ 1mg/kg đến 100mg/kg.

Dạng theo sáng chế có thể được dùng đồng thời với, hoặc trước hoặc sau khi, một hoặc nhiều tác nhân khác để điều trị bệnh. Dạng theo sáng chế có thể được dùng riêng rẽ, theo cùng một đường dùng hoặc theo đường dùng khác nhau, hoặc trong cùng một dược phẩm như các tác nhân khác.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất sản phẩm chứa dạng tinh thể khan (1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon và ít nhất một tác nhân khác để điều trị bệnh ở dạng chế phẩm kết hợp để dùng đồng thời, riêng rẽ hoặc liên tục trong việc điều trị bệnh. Theo một phương án, việc điều trị là điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K. Các sản phẩm được cung cấp ở dạng chế phẩm kết hợp bao gồm chế phẩm chứa (1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan và (các) dược chất khác trong cùng một dược phẩm, hoặc (1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan và dược chất khác ở dạng riêng rẽ, ví dụ ở dạng kit.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan và (các) dược chất khác để điều trị bệnh. Tùy ý, được phẩm có thể chứa chất mang dược dụng, như trên.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kit chứa hai hoặc nhiều được phẩm riêng rẽ, ít nhất một gốc trong số các gốc mà chứa (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan. Theo một phương án, kit này bao gồm bộ phận để duy trì riêng rẽ các được phẩm này, như vật chứa, chai chia liều, hoặc gói lá kim chia liều. Ví dụ về kit này là gói vỉ thuốc, như thường được dùng để bao gói các viên nén, các viên nang và các dạng tương tự.

Kit theo sáng chế có thể được sử dụng để dùng các dạng liều khác nhau, ví dụ, qua đường miệng và ngoài đường tiêu hóa, để dùng các được phẩm riêng rẽ với khoảng cách thời gian khác nhau giữa các liều, hoặc để chuẩn độ các được phẩm riêng rẽ với nhau. Để hỗ trợ việc tuân thủ, kit theo sáng chế thường bao gồm hướng dẫn sử dụng.

Trong các phép điều trị kết hợp theo sáng chế, dạng theo sáng chế và dược chất khác này có thể được sản xuất và/hoặc được bào chế bởi cùng một nhà sản xuất hoặc các nhà sản xuất khác nhau. Hơn thế nữa, dạng theo sáng chế và dược chất khác có thể được đưa vào phép điều trị kết hợp: (i) trước khi đưa sản phẩm hỗn hợp đến thầy thuốc (ví dụ, trong trường hợp của kit chứa dạng theo sáng chế và dược chất khác này); (ii) bởi chính các thầy thuốc (hoặc theo hướng dẫn của thầy thuốc) ngay trước khi dùng; (iii) ở chính bệnh nhân, ví dụ trong quá trình dùng liên tục dạng theo sáng chế và dược chất khác này.

Sáng chế còn đề xuất (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan để sử dụng làm được phẩm.

Do đó, sáng chế đề xuất (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-

pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan để điều trị bệnh. Sáng chế còn đề xuất (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan dùng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K, trong đó thuốc được bào chế để dùng với dược chất khác để điều trị bệnh. Sáng chế còn đề xuất dược chất khác để điều trị bệnh để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K, trong đó thuốc được dùng với (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan.

Sáng chế còn đề xuất (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan để dùng trong phương pháp điều trị bệnh. Sáng chế còn đề xuất (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan để dùng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K, trong đó (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan được điều chế để dùng với dược chất khác để điều trị bệnh. Sáng chế còn đề xuất dược chất khác để điều trị bệnh để dùng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K, trong đó dược chất khác này được điều chế để dùng với (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan. Sáng chế còn đề xuất (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan để dùng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K, trong đó (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan được dùng với dược chất khác để điều trị bệnh. Sáng chế

còn đề xuất được chất khác để điều trị bệnh để dùng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K, trong đó được chất khác này được dùng với (1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan

Sáng chế còn đề xuất (1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan dùng để điều trị bệnh. Sáng chế còn đề xuất (1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan dùng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K, trong đó bệnh nhân đã được điều trị (ví dụ, trong vòng 24 giờ) bằng được chất khác để điều trị bệnh. Sáng chế còn đề xuất được chất khác dùng để điều trị bệnh để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gián tiếp do hoạt tính của các enzym PI3K, trong đó bệnh nhân đã được điều trị (ví dụ, trong vòng 24 giờ) bằng (1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan.

(1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan có thể được dùng làm hoạt chất duy nhất hoặc kết hợp với, ví dụ làm tá dược cho, các thuốc khác, ví dụ tác nhân ức chế miễn dịch hoặc tác nhân điều biến miễn dịch hoặc tác nhân kháng viêm khác, ví dụ để điều trị hoặc phòng bệnh đào thải cấp tính hoặc mạn tính mô ghép cùng loài hoặc mô ghép khác loài hoặc rối loạn viêm hoặc rối loạn tự miễn dịch, hoặc tác nhân hóa trị liệu, ví dụ tác nhân chống tăng sinh tế bào ác tính. Ví dụ, (1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế canxineurin, ví dụ cyclosporin A hoặc FK 506; chất ức chế mTOR, ví dụ rapamycin, 40-O-(2-hydroxyetyl)-rapamycin, CCI779, ABT578, AP23573, TAFA-93, biolimus-7 hoặc biolimus-9; ascomycin có các tính chất kìm hãm miễn dịch, ví dụ ABT-281, ASM981,

v.v.; corticosteroid; xyclophosphamid; azathiopren; metotrexat; leflunomit; mizoribin; axit mycophenolic hoặc muối; mycophenolat mofetil; 15-đeoxyispergualin hoặc chất đồng đẳng ức chế miễn dịch, chất tương tự hoặc chất dẫn xuất của chúng; chất ức chế PKC, ví dụ như đã được bộc lộ trong WO 02/38561 hoặc WO 03/82859, ví dụ hợp chất theo Ví dụ 56 hoặc 70; chất ức chế kinaza JAK3, ví dụ N-benzyl-3,4-đihydroxy-benzyliden-xyanoaxetamid α -xyano-(3,4-đihydroxy)-]N-benzylxinamamid (Tyrphostin AG 490), prodigiosin 25-C (PNU156804), [4-(4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazolin] (WHI-P131), [4-(3'-bromo-4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazolin] (WHI-P154), [4-(3',5'-đibromo-4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazolin] WHI-P97, KRX-211, 3-{(3R,4R)-4-methyl-3-[methyl-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-amino]-piperidin-1-yl}-3-oxo-propionitril, ở dạng tự do hoặc ở dạng muối được dùng, ví dụ monoxitrat (còn được gọi CP-690,550), hoặc hợp chất như đã được bộc lộ trong WO 04/052359 hoặc WO 05/066156; ức chế miễn dịch các kháng thể đơn dòng, ví dụ, các kháng thể đơn dòng đối với các thụ thể bạch cầu, ví dụ, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD52, CD58, CD80, CD86 hoặc các phối tử của chúng; các hợp chất điều biến miễn dịch khác, ví dụ phân tử liên kết tái tổ hợp có ít nhất phần miền ngoại bào của CTLA4 hoặc thể đột biến của chúng, ví dụ ít nhất phần ngoại bào của CTLA4 hoặc thể đột biến của chúng kết hợp vào trình tự protein không phải của CTLA4, ví dụ CTLA4Ig (ví dụ được gọi là ATCC 68629) hoặc thể đột biến của chúng, ví dụ LEA29Y; các chất ức chế phân tử bám dính, ví dụ các chất đối kháng LFA-1, các chất đối kháng ICAM-1 hoặc -3, chất đối kháng VCAM-4 hoặc chất đối kháng VLA-4; hoặc các chất kháng histamin; hoặc các thuốc chữa ho, hoặc tác nhân làm giãn phế quản; hoặc chất phong bế thụ thể angiotensin; hoặc tác nhân chống lây nhiễm.

Nếu (1,1-đioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-methoxy-5-methylpyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan được dùng kết hợp với điều trị ức chế miễn dịch/điều biến miễn dịch, kháng viêm, hóa trị liệu hoặc chống lây nhiễm khác, thì liều lượng của chất ức chế miễn dịch, chất điều biến miễn dịch, chất kháng viêm, tác nhân hóa trị liệu hoặc chất chống lây nhiễm được dùng đồng thời tất nhiên sẽ thay đổi tùy theo thuốc được dùng đồng thời, ví dụ nếu nó là steroid hoặc chất ức chế canxineurin, tùy theo thuốc cụ thể được dùng, tùy theo tình trạng bệnh lý được điều trị và vân vân.

(1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan còn có thể được dùng để khai thác lợi thế của việc kết hợp với các dược chất khác để điều trị bệnh, đặc biệt là các tác nhân chống tăng sinh khác. Các tác nhân chống tăng sinh này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, aromataza các chất ức chế; các chất kháng estrogen; các chất ức chế topoisomeraza I; các chất ức chế topoisomeraza II; các hoạt chất vi ống; các tác nhân alkyl hóa; các chất ức chế histon deacetylaza; các hợp chất, mà gây ra quá trình biệt hóa tế bào; các chất ức chế xyclooxygenaza; các chất ức chế MMP; các chất ức chế mTOR; các chất chống chuyển hóa chống u; các hợp chất platin; các hợp chất hướng đến đích/làm giảm hoạt tính của protein hoặc lipit kinaza và các hợp chất chống tạo mạch khác nữa; các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của protein hoặc lipit phosphataza; các chất chủ vận gonadorelin; kháng androgen; các chất ức chế methionin aminopeptidaza; bisphosphonat; tác nhân cải biến đáp ứng sinh học; các kháng thể chống tăng sinh; các chất ức chế heparanaza; các chất ức chế dạng đồng chức năng gây bệnh ung thư của Ras; các chất ức chế telomeraza; các chất ức chế proteasom; các tác nhân được dùng để điều trị các khối u ác tính huyết học; các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của Flt-3; chất ức chế Hsp90; temozolomit (TEMODAL®); và leucovorin.

Thuật ngữ "chất ức chế aromataza" được dùng trong bản mô tả này để chỉ hợp chất mà ức chế sự sản sinh estrogen, tức là bước chuyển hóa cơ chất androstenedion và testosterone lần lượt thành estron và estradiol. Thuật ngữ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, steroid, đặc biệt là atamestan, exemestan và formestan; và, cụ thể là, phi steroid, đặc biệt là aminoglutethimit, roglethimit, pyridoglutethimit, trilostan, testolacton, ketoconazol, vorozol, fadrozol, anastrozol và letrozol. Exemestan có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu AROMASIN. Formestan có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu LENTARON. Fadrozol có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu AFEMA. Anastrozol có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu ARIMITX. Letrozol có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu FEMARA

hoặc FEMAR. Aminoglutethimit có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu ORIMETEN. Dạng kết hợp theo sáng chế chứa tác nhân hóa trị liệu mà là chất ức chế aromataza là đặc biệt hữu dụng dùng để điều trị các khối u dương tính với thụ thể hormon, ví dụ, u vú.

Thuật ngữ "kháng estrogen" được dùng trong bản mô tả này để chỉ hợp chất mà làm mất tác dụng của tác động của estrogen ở mức độ thụ thể estrogen. Thuật ngữ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tamoxifen, fulvestrant, raloxifen và raloxifen hydroclorua. Tamoxifen có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu NOLVADEX. Raloxifen hydroclorua có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu EVISTA. Fulvestrant có thể được bào chế như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,659,516 hoặc nó có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu FASLODEX. Dạng kết hợp theo sáng chế chứa tác nhân hóa trị liệu mà là kháng estrogen là đặc biệt hữu dụng dùng để điều trị các khối u dương tính đối với thụ thể estrogen, ví dụ, u vú.

Thuật ngữ "kháng androgen" được dùng trong bản mô tả này để chỉ chất bất kỳ mà có khả năng ức chế các tác dụng sinh học của các hormon androgen và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bicalutamit (CASODEX), mà có thể được bào chế, ví dụ, như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,636,505.

Thuật ngữ "chất chủ vận gonadorelin" được dùng trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, abarelix, goserelin và goserelin axetat. Goserelin đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,100,274 và có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu ZOLADEX. Abarelix có thể được bào chế, ví dụ, như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,843,901.

Thuật ngữ "chất ức chế topoisomeraza I" được dùng trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, topotecan, gimatecan, irinotecan, camptothecin và các chất tương tự nó, 9-nitrocamptothecin và thể tiếp hợp camptothecin đại phân tử PNU-166148 (hợp chất A1 trong công bố đơn quốc tế số WO 99/17804). Irinotecan có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu CAMPTOSAR.

Topotecan có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu HYCAMTIN.

Thuật ngữ "chất ức chế topoisomeraza II" được dùng trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, anthracyclin, như doxorubixin, bao gồm chế phẩm liposom, ví dụ, CAELYX; daunorubixin; epirubixin; idarubixin; nemorubixin; anthraquinon mitoxantron và losoxantron; và podophillotoxin etoposit và teniposit. Etoposit có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu ETOPOPHOS. Teniposit có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu VM 26-BRISTOL. Doxorubixin có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu ADRIBLASTIN hoặc ADRIAMYXIN. Epirubixin có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu FARMORUBIXIN. Idarubixin có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu ZAVEDOS. Mitoxantron có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu NOVANTRON.

Thuật ngữ "hoạt chất vi ống" được dùng để chỉ tác nhân làm ổn định vi ống, tác nhân làm mất ổn định vi ống và các chất ức chế polyme hóa microtubulin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, taxan, ví dụ, paclitaxel và docetaxel; vinca alkaloid, ví dụ, vinblastin, đặc biệt là vinblastin sulfat; vincristin, đặc biệt là vincristin sulfat và vinorelbin; discodermolite; cochixin; và epothilon và các chất dẫn xuất của chúng, ví dụ, epothilon B hoặc D hoặc các chất dẫn xuất của chúng. Paclitaxel có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, TAXOL. Docetaxel có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu Taxoter. Vinblastin sulfat có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu VINBLASTIN R.P. Vincristin sulfat có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu FARMISTIN. Discodermolite có thể thu được, ví dụ, như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,010,099. Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là các chất dẫn xuất epothilon mà đã được bộc lộ trong WO 98/10121, patent Mỹ số 6,194,181, WO 98/25929, WO 98/08849, WO 99/43653, WO 98/22461 và WO 00/31247. Được đặc biệt ưu tiên là epothilon A và/hoặc B.

Thuật ngữ "tác nhân alkyl hóa" được dùng trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xyclophosphamit, ifosfamid, melphalan hoặc nitrosoure (BCNU hoặc Gliadel). Xyclophosphamit có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu CYCLOSTIN. Ifosfamid có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu HOLOXAN.

Thuật ngữ "các chất ức chế histon deacetylaza" hoặc "các chất ức chế HDAC" được dùng để chỉ các hợp chất mà ức chế histon deacetylaza và mà có hoạt tính chống tăng sinh. Chúng bao gồm các hợp chất đã bộc lộ trong WO 02/22577, đặc biệt là *N*-hydroxy-3-[4-[[[(2-hydroxyetyl)[2-(1*H*-indol-3-yl)etyl]-amino]metyl]phenyl]-2*E*-2-propenamit, *N*-hydroxy-3-[4-[[[2-(2-metyl-1*H*-indol-3-yl)-etyl]-amino]metyl]phenyl]-2*E*-2-propenamit và muối được dùng của nó. Nó còn đặc biệt bao gồm axit suberoylanilit hydroxamic (SAHA).

Thuật ngữ "chất chống chuyển hóa chống khối u" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 5-floraxil hoặc 5-FU; capexitabin; gemxitabin; các tác nhân khử metyl hóa đối với ADN, như 5-azaxytidin và dexitabin; metotrexat và edatrexat; và các chất đối kháng axit folic, như pemetxed. Capexitabin có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu XELODA. Gemxitabin có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu GEMZAR. Kháng thể đơn dòng trastuzumab mà có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu HERCEPTIN, cũng được bao gồm.

Thuật ngữ "hợp chất platin" được dùng trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, carboplatin, *cis*-platin, cisplatin và oxaliplatin. Carboplatin có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu CARBOPLAT. Oxaliplatin có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu ELOXATIN.

Thuật ngữ "các hợp chất hướng đến đích/làm giảm hoạt tính của protein hoặc lipid kinaza; hoặc hoạt tính của protein hoặc lipid phosphataza; hoặc các hợp chất chống tạo mạch

khác" được dùng trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất ức chế protein tyrosin kinaza và/hoặc chất ức chế serin và/hoặc threonin kinaza hoặc chất ức chế lipit kinaza, ví dụ,

- a) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của thụ thể yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGFR), như các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của PDGFR, đặc biệt là các hợp chất mà ức chế thụ thể PDGF, ví dụ, chất dẫn xuất của *N*-phenyl-2-pyrimidin-amin, ví dụ, imatinib, SU101, SU6668 và GFB-111;
- b) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của thụ thể yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (FGFR);
- c) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của thụ thể yếu tố sinh trưởng kiểu insulin I (IGF-IR), như các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của IGF-IR, đặc biệt là các hợp chất mà ức chế thụ thể IGF-IR, như các hợp chất đã bộc lộ trong WO 02/092599;
- d) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của họ tyrosin kinaza của thụ thể Trk;
- e) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của họ tyrosin kinaza của thụ thể Axl;
- f) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của thụ thể c-Met;
- g) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của tyrosin kinaza của thụ thể Kit/SCFR;
- h) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của các tyrosin kinaza của thụ thể C-kit - (một phần của họ PDGFR), như các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của họ tyrosin kinaza của thụ thể c-Kit, đặc biệt là các hợp chất mà ức chế thụ thể c-Kit này, ví dụ, imatinib;
- i) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của các thành viên của họ c-AbI và các sản phẩm dung hợp gen của chúng, ví dụ, kinaza Bcr-Abl, như các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của thành viên thuộc họ c-AbI và các sản phẩm dung hợp gen của chúng, ví dụ, chất dẫn

xuất *N*-phenyl-2-pyrimidin-amin, ví dụ, imatinib, PD180970, AG957, NSC 680410 hoặc PD173955 từ ParkeDavis;

j) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của các thành viên của protein kinaza C (PKC) và họ Raf gồm các serin/threonin kinaza, các thành viên của họ MEK, SRC, JAK, FAK, PDK và Ras/MAPK, hoặc họ PI(3) kinaza, hoặc thuộc họ kinaza liên quan đến PI(3)-kinaza, và/hoặc các thành viên của họ kinaza phụ thuộc cyclin (CDK) và đặc biệt là các chất dẫn xuất staurosporin đã bộc lộ trong patent Mỹ số 5,093,330, ví dụ, midostaurin; các ví dụ về hợp chất khác nữa bao gồm, ví dụ, UCN-01; safingol; BAY 43-9006; Bryostatin 1; Perifosine; Ilmofosine; RO 318220 và RO 320432; GO 6976; Isis 3521; LY333531/LY379196; các hợp chất isochinolin, như các hợp chất đã bộc lộ trong WO 00/09495; FTIs; PD184352; hoặc QAN697 (chất ức chế P13K);

k) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của các chất ức chế protein-tyrosin kinaza, như các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của các chất ức chế protein-tyrosin kinaza bao gồm imatinib mesylat (GLEEVEC) hoặc tyrphostin. Tốt hơn, nếu tyrphostin là hợp chất phân tử lượng thấp ($M_r < 1500$), hoặc muối được dụng của chúng, đặc biệt là hợp chất được chọn từ nhóm benzyliđienmalonitril hoặc nhóm gồm các hợp chất *S*-arylbenzenmaloniril hoặc quinolin cơ chất kép, đặc biệt hơn nữa là hợp chất bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm Tyrphostin A23/RG-50810, AG 99, Tyrphostin AG 213, Tyrphostin AG.1748, Tyrphostin AG 490, Tyrphostin B44, chất đồng phân đối ảnh Tyrphostin B44 (+), Tyrphostin AG 555, AG 494, Tyrphostin AG 556, AG957 và axit adaphostin (4-[(2,5-dihydroxyphenyl)metyl]amino}-benzoic adamantyl este, NSC 680410, adaphostin; và

l) các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của họ yếu tố sinh trưởng biểu bì gồm các tyrosin kinaza của thụ thể (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 ở dạng homodime hoặc heterodime), như các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của họ thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì đặc biệt là các hợp chất, các protein hoặc các kháng thể mà ức chế các thành viên của họ tyrosin kinaza của thụ thể EGF, ví dụ, thụ thể EGF, ErbB2, ErbB3 và ErbB4 hoặc liên kết với EGF hoặc các phối tử liên quan đến EGF, và cụ thể là các hợp chất, các

protein hoặc các kháng thể đơn dòng đã bộc lộ chung và cụ thể trong WO 97/02266, ví dụ, hợp chất theo Ví dụ 39, hoặc trong EP 0 564 409; WO 99/03854; EP 0520722; EP 0 566 226; EP 0 787 722; EP 0 837 063; patent Mỹ số 5,747,498; WO 98/10767; WO 97/30034; WO 97/49688; WO 97/38983 và, đặc biệt là, WO 96/30347, ví dụ, hợp chất đã được biết là CP 358774; WO 96/33980, ví dụ, hợp chất ZD 1839; và WO 95/03283, ví dụ, hợp chất ZM105180, ví dụ, trastuzumab (HERCEPTIN), cetuximab, Iressa, Tarceva, OSI-774, CI-1033, EKB-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 hoặc E7.6.3; và các chất dẫn xuất 7*H*-pyrolo-[2,3-*d*]pyrimidin mà được bộc lộ trong WO 03/013541.

Các hợp chất chống tạo mạch khác bao gồm các hợp chất có cơ chế hoạt tính khác của chúng, ví dụ, không liên quan đến việc ức chế protein hoặc lipit kinaza, ví dụ, thalidomit (THALOMID) và TNP-470.

Các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của protein hoặc lipit phosphataza, ví dụ, là các chất ức chế của phosphataza 1, phosphataza 2A, PTEN hoặc CDC25, ví dụ, axit okadaic hoặc chất dẫn xuất của chúng.

Các hợp chất mà gây ra quá trình biệt hóa tế bào ví dụ là axit retinoic, α - γ - hoặc δ -tocopherol hoặc α - γ - hoặc δ -tocotrienol.

Thuật ngữ xyclooxygenaza chất ức chế, như được dùng trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, các chất ức chế COX-2, axit 2-arylaminophenylaxetic đã được thế 5-alkyl và các chất dẫn xuất, như celecoxib (CELEBREX), rofecoxib (VIOXX), etoricoxib, valdecoxib hoặc axit 5-alkyl-2-arylaminophenylaxetic, ví dụ, 5-metyl-2-(2'-clo-6'-floanilino)phenyl axit axetic hoặc lumiracoxib.

Thuật ngữ "bisphosphonat" được dùng trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit etridonic, clodronic, tiludronic, pamidronic, alendronic, ibandronic, risedronic và zoledronic. "Axit etridonic" có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu DIDRONEL. "Axit clodronic" có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu

BONEFOS. "Axit tiludronic" có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu SKELID. "Axit pamidronic" có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu AREDIA™. "Axit alendronic" có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu FOSAMAX. "Axit ibandronic" có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu BONDRANAT. "Axit risedronic" có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu ACTONEL. "Axit zoledronic" có thể được dùng, ví dụ, ở dạng như sản phẩm được đưa ra thị trường, ví dụ, với nhãn hiệu ZOMETA.

Thuật ngữ "các chất ức chế mTOR" được dùng để chỉ các hợp chất mà ức chế đích của rapamycin ở động vật có vú (mTOR) và có hoạt tính chống tăng sinh, như sirolimus (Rapamune®), everolimus (Certican™), CCI-779 và ABT578.

Thuật ngữ "chất ức chế heparanaza" được dùng trong bản mô tả này để chỉ các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế sự thoái biến của heparin sulphat. Thuật ngữ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PI-88.

Thuật ngữ "tác nhân cải biến đáp ứng sinh học" được dùng trong bản mô tả này để chỉ lymphokin hoặc interferon, ví dụ, interferon γ .

Thuật ngữ "chất ức chế của dạng đồng chức năng gây bệnh ung thư của Ras", ví dụ, H-Ras, K-Ras hoặc N-Ras được dùng trong bản mô tả này để chỉ các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính gây bệnh ung thư của Ras, ví dụ, "chất ức chế farnesyl transferaza", ví dụ, L-744832, DK8G557 hoặc R115777 (Zarnestra).

Thuật ngữ "chất ức chế telomeraza" được dùng trong bản mô tả này để chỉ các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của telomeraza. Các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của telomeraza đặc biệt là các hợp chất mà ức chế thụ thể telomeraza, ví dụ, telomestatin.

Thuật ngữ "chất ức chế methionin aminopeptidaza" được dùng trong bản mô tả này để chỉ các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của methionin aminopeptidaza. Các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của methionin aminopeptidaza, ví dụ, là bengamit hoặc chất dẫn xuất của chúng.

Thuật ngữ "chất ức chế proteasom" được dùng trong bản mô tả này để chỉ các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của proteasom. Các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của proteasom bao gồm, ví dụ, PS-341 và MLN 341.

Thuật ngữ "chất ức chế proteinaza kim loại của nền" hoặc "chất ức chế MMP" được dùng trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất ức chế giả peptit và không giả peptit các chất ức chế của collagen, các chất dẫn xuất của tetracyclin, ví dụ, chất ức chế giả peptit của hydroxamat là batimastat và chất tương tự sinh khả dụng qua đường miệng của nó là marimastat (BB-2516), prinomastat (AG3340), metastat (NSC 683551) BMS-279251, BAY 12-9566, TAA211, MMI270B hoặc AAJ996.

Thuật ngữ "tác nhân được dùng để điều trị các khối u ác tính huyết học" được dùng trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất ức chế tyrosin kinaza kiểu FMS, ví dụ, các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của các thụ thể tyrosin kinaza kiểu FMS (Flt-3R); interferon, 1- β -D-arabinofuransylxytosin (ara-c) và bisulfan; và các chất ức chế ALK, ví dụ, các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế kinaza của u bạch huyết tủy ghép.

Các hợp chất mà hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của các thụ thể tyrosin kinaza kiểu FMS (Flt-3R) đặc biệt là các hợp chất, các protein hoặc các kháng thể mà ức chế các thành viên của họ thụ thể kinaza Flt-3R, ví dụ, PKC412, midostaurin, chất dẫn xuất của staurosporin, SU11248 và MLN518.

Thuật ngữ "các chất ức chế HSP90" được dùng trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính ATPaza thực của HSP90; làm thoái biến, hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế các

protein khách của HSP90 theo chu trình ubiquitin proteasom. Các hợp chất hướng đến đích, làm giảm hoặc ức chế hoạt tính ATPaza thực của HSP90 đặc biệt là các hợp chất, các protein hoặc các kháng thể mà ức chế hoạt tính ATPaza của HSP90, ví dụ, 17-allylamino,17-demetoxygeldanamixin (17AAG), chất dẫn xuất của geldanamixin, các hợp chất khác có liên quan đến geldanamixin, các chất ức chế radicicol và các chất ức chế HDAC.

Thuật ngữ "các kháng thể chống tăng sinh" được dùng trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trastuzumab (Herceptin™), Trastuzumab-DM1, erlotinib (Tarceva™), bevacizumab (Avastin™), rituximab (Rituxan®), PRO64553 (kháng-CD40) và kháng thể 2C4. Kháng thể có nghĩa là, ví dụ, các kháng thể đơn dòng nguyên vẹn, các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ ít nhất hai kháng thể nguyên vẹn, và các các đoạn kháng thể chừng nào chúng thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn. Để điều trị bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (AML), (1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan có thể được sử dụng kết hợp với phép điều trị bệnh bạch cầu chuẩn, đặc biệt được kết hợp với phép điều trị được áp dụng để điều trị AML. Cụ thể, (1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan có thể được dùng kết hợp với, ví dụ, các chất ức chế farnesyl transferaza và/hoặc các thuốc khác hữu dụng để điều trị AML, như daunorubixin, adriamixin, Ara-C, VP-16, teniposit, mitoxantron, idarubixin, carboplatin và PKC412.

(1,1-đioxo-hexahydro-1lamda*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan còn có thể được dùng để khai thác ưu điểm của việc kết hợp với các dược chất khác để điều trị bệnh, đặc biệt là các tác nhân khác chống bệnh sốt rét. Các tác nhân chống bệnh sốt rét này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, proguanil, chlorproguanil, trimethoprim, cloquin, mefloquin, lumefantrin, atovaquon, pyrimethamin-sulfadoxin, pyrimethamin-đapson, halofantrin, quinin, quinidin, amodiaquin, amopyroquin, sulphonamit, artemisinin, arteflen, artemete, artesunat, primaquin, NO ở dạng hít vào, L-

arginin, dipropylentri-amin NONOat (thể cho NO), Rosiglitazon (chất chủ vận PPAR γ), than hoạt tính, Erythropoietin, Levamisol, và pyronaridin.

Dạng tinh thể khan của (1,1-đioxa-hexahydro-1 λ da*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon còn có thể được dùng để khai thác lợi thế của việc kết hợp với các dược chất khác để điều trị bệnh, như được dùng để điều trị bệnh Leishmania, bệnh trùng mũi khoan, bệnh nhiễm toxoplasma và bệnh ấu trùng sán dây thần kinh. Các tác nhân này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cloquin sulfat, atovaquon-proguanil, artemete-lumefantrin, quinin-sulfat, artesunat, quinin, doxyxycilin, clindamixin, meglumin antimoniat, natri stibogluconat, miltefosin, ketoconazol, pentamidin, amphotericin B (AmB), AmB liposom, paromomixin, eflornithin, nifurtimox, suramin, melarsoprol, prednisolon, benznidazol, sulfadiazin, pyrimethamin, clindamixin, trimetopim, sulfamethoxazol, azitromixin, atovaquon, dexamethason, praziquantel, albendazol, beta-lactam, floquinolon, macrolit, aminoglycosit, sulfadiazin và pyrimethamin.

Cấu trúc của các hoạt chất xác định được theo mã số, tên thông thường hoặc tên thương mại có thể được lấy từ phiên bản thật của bản trích yếu chuẩn "The Merck Index" hoặc từ các cơ sở dữ liệu, ví dụ, Patents International, ví dụ, IMS World Publications.

Các hợp chất nêu trên, mà có thể được sử dụng kết hợp với dạng tinh thể khan (1,1-đioxa-hexahydro-1 λ da*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon, có thể được điều chế và được dùng như đã được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này, như trong các tài liệu nêu trên.

(1,1-đioxa-hexahydro-1 λ da*6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan còn có thể được dùng để khai thác lợi thế của việc kết hợp với các quy trình điều trị đã biết, ví dụ, cách dùng các hormon hoặc đặc biệt là chiếu xạ.

Cụ thể, (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan có thể được dùng làm chất cảm thụ phóng xạ, đặc biệt là dùng để điều trị các khối u mà thể hiện tính miễn cảm kém đối với phép điều trị bằng phóng xạ.

Thuật ngữ "kết hợp" có nghĩa là được kết hợp cố định vào dạng đơn vị một liều, hoặc kit gồm các phần để dùng kết hợp, trong đó (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan và đối tác kết hợp có thể được dùng độc lập tại cùng một thời điểm hoặc riêng rẽ trong các khoảng thời gian mà đặc biệt cho phép đối tác kết hợp thể hiện tác dụng hợp tác, ví dụ, tác dụng hiệp đồng, hoặc kết hợp các tác dụng này theo cách bất kỳ. Các thuật ngữ "dùng đồng thời" hoặc "dùng kết hợp" hoặc các thuật ngữ tương tự được dùng trong bản mô tả này nhằm để bao gồm việc dùng đối tác kết hợp đã được chọn cho một đối tượng có nhu cầu điều trị (ví dụ, bệnh nhân), và dự định bao gồm các phác đồ điều trị mà trong đó các tác nhân không nhất thiết được dùng qua cùng một đường dùng hoặc tại cùng một thời điểm. Thuật ngữ "được phẩm kết hợp" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là sản phẩm mà tạo ra được bằng cách trộn hoặc kết hợp nhiều hơn một hoạt chất và bao gồm cả việc kết hợp cố định và việc kết hợp không cố định các hoạt chất. Thuật ngữ "kết hợp cố định" có nghĩa là các hoạt chất, ví dụ (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan và đối tác kết hợp, cả hai được cho bệnh nhân dùng đồng thời ở dạng một thể hoặc một liều. Thuật ngữ "hỗn hợp không cố định" có nghĩa là các hoạt chất, ví dụ (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon) ở dạng tinh thể khan và đối tác kết hợp, cả hai được cho bệnh nhân dùng ở dạng các thực thể riêng rẽ cùng một lúc, đồng thời hoặc lần lượt và không giới hạn thời gian cụ thể, trong đó cách dùng này tạo ra lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hai hợp chất trong cơ thể của bệnh nhân. Cách thứ hai này áp dụng cho cách điều trị hỗn hợp, ví dụ cách dùng ba hoặc nhiều hoạt chất.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Chi tiết thử nghiệm:

Các ví dụ dưới đây nhằm để minh họa sáng chế và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Nhiệt độ được thể hiện theo nhiệt độ Bách phân. Nếu không có quy định khác, tất cả các bước làm bay hơi được thực hiện ở điều kiện áp suất giảm, thường là nằm trong khoảng từ 15mm Hg đến 100mm Hg (= 20mbar đến 133mbar). Cấu trúc của các sản phẩm cuối cùng, các chất trung gian và nguyên liệu ban đầu được xác nhận theo các phương pháp phân tích chuẩn, ví dụ, các đặc tính vi phân tích và các đặc tính quang phổ, ví dụ, MS, IR, NMR. Các chữ viết tắt được sử dụng là thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Tất cả các nguyên liệu ban đầu, các khối kết cấu, các chất phản ứng, các axit, các bazơ, các tác nhân loại nước, các dung môi, và các chất xúc tác được dùng để tổng hợp các dạng theo sáng chế có bán trên thị trường hoặc có thể được tạo ra theo các phương pháp tổng hợp hữu cơ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết (Houben-Weyl 4th Ed. 1952, *Methods of Organic Synthesis*, Thieme, Volume 21). Ngoài ra, các dạng theo sáng chế có thể được tạo ra theo các phương pháp tổng hợp hữu cơ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết như được thể hiện trong các ví dụ dưới đây.

Các chữ viết tắt

ACN	axetonitril
AcOH	axit axetic
aq.	nước
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Boc ₂ O	đi- <i>tert</i> -butyl dicacbonat
tBu	<i>tert</i> -butyl
tBuOH	<i>tert</i> -butanol
BrettPhos	2-(dixyclohexylphosphino)-3,6-đimetoxy-2'-4'-6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl

br s	vạch đơn rộng
COMU	(1-xyano-2-etoxy-2-oxoetylidenaminoxy)đimetylaminomorpholino-carbenium hexaflophosphat
conc.	đặc
d	ngày
d	vạch đôi
dd	vạch đôi kép
dba	đibenzylidenaxeton
DCM	điclometan
DEA	đietylamin
DEAD	đietyl azodicarboxylat
DEAP	đietylaminopyridin
DIPEA	điisopropyletylamin
DMF	đimetylformamit
DMME	đimetoxymetan
DMSO	đimetylsulfoxit
DPPA	điphenylphosphoryl azit
DPPF	1,1'-bis(điphenylphosphino)feroxen
EDC	1-(3-đimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua
eq.	đương lượng
ESI	ion hóa phun điện tử
Et ₃ N	trietylamin
Et ₂ O	đietylete
EtOAc	etyl axetat
EtOH	etanol
h	giờ
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflophosphat
HBTU	O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflophosphat
HMDS	hexametylđisilazan
HOBT	1-hydroxy-benzotriazol

HPLC	sắc ký lỏng cao áp
IPA	isopropanol
LCMS	sắc ký lỏng và đo phổ khối
mCPBA	axit <i>meta</i> -cloperoxybenzoic
MeOH	metanol
m	đa vạch
min	phút
MS	phổ khối
mw	vi sóng
NMR	phổ cộng hưởng từ hạt nhân
NaOtBu	natri tert-butoxit
NP	pha thường
OBD	tỷ trọng tăng tối ưu
Pd ₂ (dba) ₃	tris(đibenzylidenaxeton)đipaladi
PL-HCO ₃ MP SPE	khay bicacbonat đỡ bằng polyme để loại bỏ axit
prep.	điều chế
PPh ₃	triphenylphosphin
q	vạch bốn
Rac-BINAP	triệt quang 2,2'-bis(đi- <i>p</i> -tolylphosphino)-1,1'-binaphtyl
RP	pha đảo
Rt	thời gian lưu
rt	nhiệt độ trong phòng
RuPhos	2-đixyclohexylphosphino-2',6'-đi-isopropoxy-1,1'-biphenyl
sat.	bão hòa/no
SCX-2	polystyren lỗ to axit sulfonic đỡ bằng polyme
soln.	dung dịch
t	vạch ba
TBME	<i>tert</i> -butyl metyl ete
TBAF	tetrabutylamoni florua
TBDMSCl	<i>tert</i> -butylđimetylsilylclorua tetrametyl-t-butyl
-XPhos	2-đi-t-butylphosphino-3,4,5,6-tetrametyl-2',4',6'-triisopropyl-biphenyl

TFA	axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran
TLC	sắc ký lớp mỏng
UPLC	sắc ký lỏng hiệu suất siêu cao
XPhos	2-điisopropylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl
Pd[RuPhos]	(2-điisopropylphosphino-2',6'-diisopropyl-1,1'-biphenyl)(2-(2-aminoethyl)phenyl)paladi(II)

Thiết bị vi sóng được sử dụng là Biotage Initiator®

Tất cả các hợp chất được gọi tên bằng cách áp dụng AutoNom.

Thông tin chung về sắc ký

Phương pháp LCMS M1 (Rt_{M1})

Kích thước cột HPLC:	2,1 x 50mm
Loại cột HPLC:	Acquity UPLC HSS T3, 1,8μm
Dịch rửa giải HPLC:	A) nước + 0,05% thể tích axit formic + 3,75mM amoni axetat B) ACN + 0,04% thể tích axit formic
Gradient HPLC:	2% đến 98% B trong thời gian 1,4 phút, 98% B 0,45 phút, lưu tốc = 1,2ml/phút
HPLC-nhiệt độ của cột:	50°C

Phương pháp LCMS M2 (Rt_{M2})

Kích thước cột HPLC:	2,1 x 30mm
Loại cột HPLC:	Ascentis Express C18, 2,7μm
Dịch rửa giải HPLC	A) nước + 0,05% thể tích axit formic + 3,75mm amoni axetat B) ACN + 0,04% thể tích axit formic
Gradient HPLC:	2% đến 98% B trong thời gian 1,4 phút, 0,75 phút 98% B, lưu tốc = 1,2ml/phút
HPLC-nhiệt độ của cột:	50°C

Phương pháp LCMS M3 (Rt_{M3})

Kích thước cột HPLC: 2,1 x 30mm
 Loại cột HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 μ m
 Dịch rửa giải HPLC A) nước + 0,05% thể tích axit formic + 3,75mm amoni axetat
 B) ACN + 0,04% thể tích axit formic
 Gradient HPLC: 2% đến 98% B trong 8,5 phút, 1 phút 98% B, lưu tốc = 1,2ml/phút
 HPLC-nhiệt độ của cột: 50°C

Phương pháp LCMS M4 (Rt_{M4})

Kích thước cột HPLC: 4,6 x 50mm
 Loại cột HPLC: SunFire C18, 5 μ m
 Dịch rửa giải HPLC A) nước + 0,1% thể tích TFA, B) ACN + 0,1% thể tích TFA
 Gradient HPLC: 5% đến 100% B trong thời gian 8,0 phút B, lưu tốc = 2ml/phút
 HPLC-nhiệt độ của cột: 40°C

Phương pháp LCMS M5 (Rt_{M5})

Kích thước cột HPLC: 0,46x25cm
 Loại cột HPLC: Chiralcel OJ-H (1189)
 Dịch rửa giải HPLC EtOH/MeOH theo tỷ lệ 60:40
 Gradient HPLC: đẳng dung môi, lưu tốc = 0,5ml/phút
 Bộ dò: UV 220nm

Phương pháp LCMS M6 (Rt_{M6})

Kích thước cột HPLC: 2,1 x 30mm
 Loại cột HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 μ m
 Dịch rửa giải HPLC A) nước + 0,05% TFA, B) ACN + 0,04% TFA
 Gradient HPLC: 2% đến 98% B trong thời gian 1,4 phút, 0,75 phút 98% B, lưu tốc = 1,2ml/phút
 HPLC-nhiệt độ của cột: 50°C

Phương pháp LCMS M7 (Rt_{M7})

Kích thước cột HPLC: 2,1 x 30mm
 Loại cột HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 μ m
 Dịch rửa giải HPLC: A) nước + 0,05% TFA, B) ACN + 0,04% TFA
 Gradient HPLC: 10% đến 95% B trong 3,0 phút, 1 phút 95% B, lưu tốc = 1,2ml/phút
 HPLC-nhiệt độ của cột: 50°C

Phương pháp LCMS M8 (Rt_{M8})

Kích thước cột HPLC: 2,1 x 30mm
 Loại cột HPLC: Ascentis Express C18 2,7 μ m
 Dịch rửa giải HPLC: A) nước + 0,05% axit formic + 3,75mM amoni axetat, B) axetonitril + 0,04% axit formic
 Gradient HPLC: 10% đến 95% B trong 3,0 phút, lưu tốc = 1,2ml/phút

Phương pháp LCMS M9 (Rt_{M9})

Kích thước cột HPLC: 2,1 x 30mm
 Loại cột HPLC: Ascentis Express C18 2,7 μ m
 Dịch rửa giải HPLC: A) nước + 0,05% axit formic + 3,75mM amoni axetat, B) axetonitril + 0,04% axit formic
 Gradient HPLC: 10% B từ 0,0 phút đến 0,5 phút sau đó từ 0,5 phút đến 3,0 phút gradient 10% đến 95% B, lưu tốc = 1,2ml/phút

Phương pháp LCMS M10 (Rt_{M10})

Kích thước cột HPLC: 2,1 x 50mm
 Loại cột HPLC: Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m
 Dịch rửa giải HPLC: A) nước + 0,1% thể tích axit formic, B) axetonitril
 Gradient HPLC: 20% đến 25% B trong 1,00 phút, sau đó 25% đến 95% B trong 3,20 phút, sau đó 95% đến 100% B trong 0,10 phút, sau đó 100% trong 0,20 phút, lưu tốc = 0,7ml/phút

Phương pháp LCMS M11 (Rt_{M11})

Kích thước cột HPLC: 2,1 x 50mm

Loại cột HPLC: Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m
 Dịch rửa giải HPLC: A) nước + 0,1% thể tích axit formic, B) axetonitril
 Gradient HPLC: 5% đến 10% B trong 1,00 phút, sau đó 10% đến 90% B trong 3,00 phút, sau đó 90% đến 100% B trong 0,10 phút, sau đó 100% trong 0,40 phút, lưu tốc = 0,7ml/phút

Phương pháp LCMS M12 (Rt_{M12})

Kích thước cột HPLC: 2,1 x 30mm
 Loại cột HPLC: Ascentis Express C18 2,7 μ m
 Dịch rửa giải HPLC: A) nước + 0,1% thể tích TFA, B) axetonitril
 Gradient HPLC: 10% đến 95% B trong thời gian 1,7 phút và 1,2ml/phút làm lưu tốc dung môi và sau đó 95 5 B trong thời gian 0,7 phút, lưu tốc = 1,4 ml/phút.

Phương pháp LCMS M13 (Rt_{M13})

Kích thước cột HPLC: 2,1 x 30mm
 Loại cột HPLC: Ascentis Express C18 2,7 μ m
 Dịch rửa giải HPLC: A) nước + 0,05% axit formic + 3,75mm amoni axetat, B) axetonitril +0,04% axit formic
 Gradient HPLC: 10% đến 95% B trong 3,7 phút, lưu tốc = 1,2ml/phút

Phương pháp LCMS M14 (Rt_{M14})

Kích thước cột HPLC: 2,1 x 30mm
 Loại cột HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 μ m
 Dịch rửa giải HPLC: A) nước + 0,05% axit formic + 3,75mm amoni axetat, B) axetonitril +0,04% axit formic
 Gradient HPLC: 10% đến 95% B trong 1,5 phút, 1 phút 95% B, lưu tốc = 1,2ml/phút

Phương pháp LCMS M15 (Rt_{M15})

Kích thước cột HPLC: 0,46x25cm
 Loại cột HPLC: Chiralcel OD-H (1194)

Dịch rửa giải HPLC	Hexan/EtOH 50:50 + 0,05% DEA
Gradient HPLC:	đẳng dung môi, lưu tốc = 0,5ml/phút
Bộ dò:	UV 220nm

Phương pháp LCMS M16 (R_{tM16})

Kích thước cột HPLC:	2,1 x 50mm
Loại cột HPLC:	Acquity UPLC HSS T3, 1,8 μ m
Dịch rửa giải HPLC:	A) nước + 0,05% thể tích axit formic + 3,75mm amoni axetat B) ACN + 0,04% thể tích axit formic
Gradient HPLC:	5% đến 98% B trong thời gian 1,4 phút, 98% B 0,4 phút, lưu tốc = 1,0ml/phút
HPLC-nhiệt độ của cột:	60°C

Nhiều xạ bột tia X

Dụng cụ:

Phương pháp X1

Dụng cụ	Bruker D8 GADDS Discover
Chiếu xạ	CuK α (40kV, 40mA)
Thiết bị dò	Thiết bị dò vùng HI-STAR
Khoảng quét	6° đến 39° (trị số 2 theta)

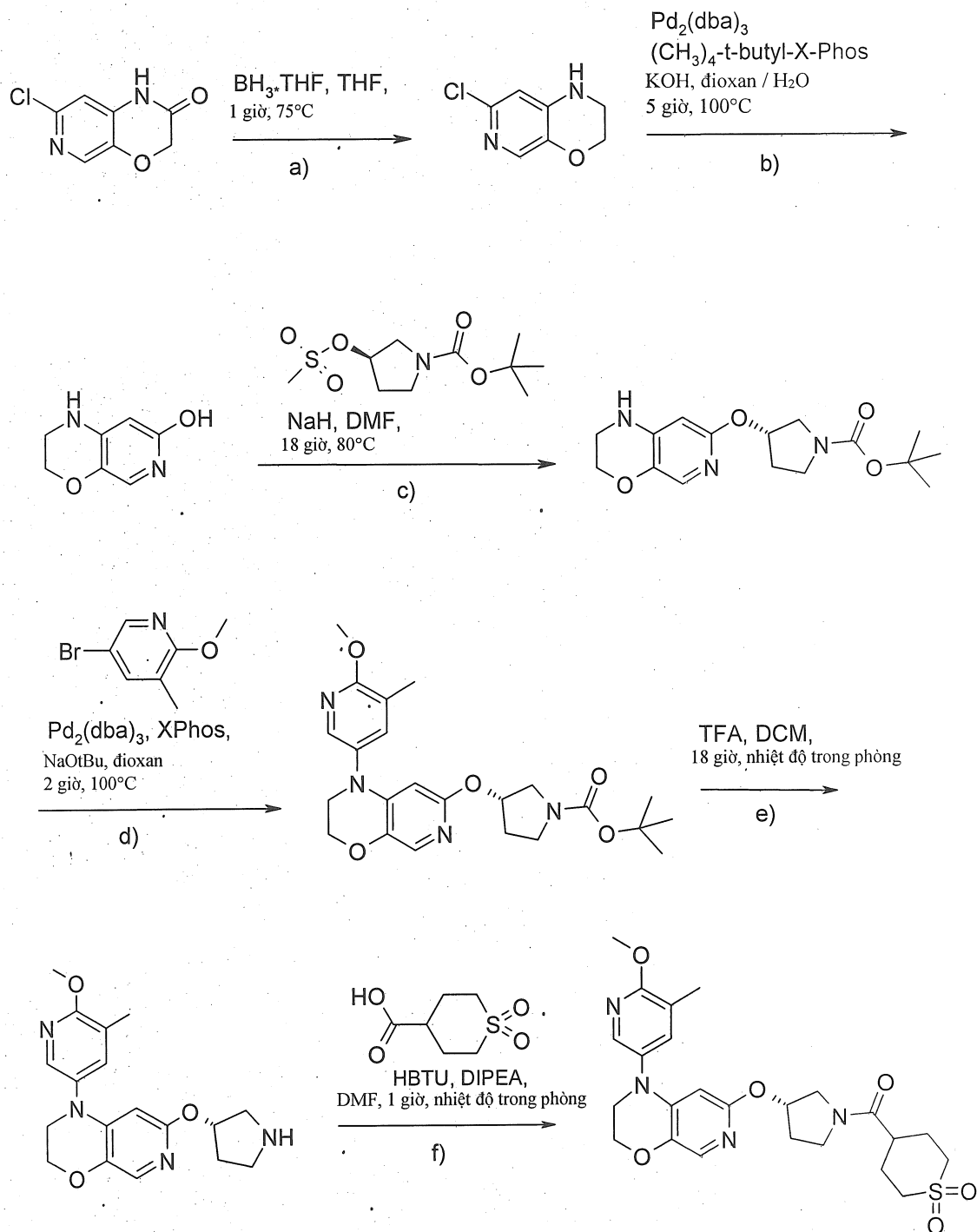
Xác định nhiệt độ nóng chảy:

Nhiệt độ nóng chảy được xác định theo phân tích đo nhiệt lượng quét vi phân (DSC). DSC là như được ghi trên DSC Q2000 do TA Instruments cung cấp bằng cách sử dụng tốc độ đun nóng 10°C/phút. Mẫu 0,6mg được cân vào chảo nhôm chuẩn (chảo + nắp, TA 900786.901, 900779.901). Dụng cụ này được vận hành bằng cách sử dụng phần mềm Thermal Advantage Q-Series V.2.6.0.367 và phần mềm Thermal Advantage V4.6.9. Các hiện tượng nhiệt được xác định tính chất bằng cách sử dụng Universal Analysis V4.3A Build 4.3.0.6. Các mẫu được đo so với chảo mẫu không có lỗ pin. Mẫu này được xử lý theo quy trình dưới đây:

Bước 1: CÂN BẰNG ở 0°C

Bước 2: Ramp 10°C/phút đến 300°C

Ví dụ F1: (1,1-đioxo-hexahydro-1λ⁶-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon



a) 7-clo-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin

Dung dịch chứa 7-clo-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-2-on (số đăng ký sản phẩm CAS 928118-43-8) (3,70g, 20mmol) trong THF (63ml) được xử lý bằng $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1M trong THF, 47ml, 47mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 75°C trong thời gian 1 giờ, sau đó được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được tôi bằng metanol (24ml, 600mmol). Hỗn hợp phản ứng này được cô ở điều kiện áp suất giảm và cặn được lấy đi cùng với EtOAc và rửa bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa. Lớp hữu cơ được làm khô trên MgSO_4 , lọc và cô ở điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm nêu ở đề mục này ở dạng rắn màu vàng nhạt (3,3g, hiệu suất 96%).

UPLC $\text{Rt}_{\text{M1}} = 0,47$ phút; ESIMS: 171 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 7,53 (s, 1H), 7,11 (br s, 1H), 6,47 (s, 1H), 4,09 (t, 2H), 3,17-3,38 (m, 2H).

b) 2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-ol

Hỗn hợp gồm 7-clo-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin (1,08g, 6,33mmol), dung dịch nước KOH (1,07g, 19mmol KOH trong 5,4ml nước), 2-đi-t-butylphosphino-3,4,5,6-tetrametyl-2',4',6-tri-i-propylbiphenyl 98% (0,30g, 0,63mmol) và $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0,29g, 0,32mmol) trong dioxan (32,5ml) được loại khí ba lần bằng nitơ, ống nghiệm này được bịt kín và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 100°C trong thời gian 5 giờ. Sau khi làm giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng này được lọc qua hyflo, rửa bằng EtOAc và metanol. Các dịch lọc được cô và hợp chất nêu ở đề mục này thu được sau khi sắc ký cực nhanh trên silicagel (DCM/MeOH, theo tỷ lệ 98:2 đến 75:25) ở dạng cặn màu cam (660mg, hiệu suất 69%)

UPLC $\text{Rt}_{\text{M1}} = 0,34$ phút; ESIMS: 153 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 10,33 (br s, 1H), 7,03 (br s, 1H), 6,71 (s, 1H), 5,15 (s, 1H), 3,95 (t, 2H), 3,25 (m, 2H).

c) tert-butyl este của axit (S)-3-(2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy)-pyrrolidin-1-carboxylic

Dung dịch khan chứa 2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-ol (0,66g, 4,34mmol) và tert-butyl este của axit (R)-3-metansulfonyloxy-pyrrolidin-1-carboxylic (số đăng ký sản phẩm CAS127423-61-4) (1,73g, 6,51mmol) trong DMF (40ml) được xử lý bằng natri hydrua (60% trong dầu khoáng, 0,21g, 8,68mmol) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy

ở 80°C trong thời gian 18 giờ. Sau khi làm giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng TBME và rửa bằng dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa. Lớp hữu cơ được làm khô trên MgSO₄, lọc, cô và hợp chất nêu ở đề mục này thu được sau khi sắc ký cực nhanh trên silicagel (xyclohexan/EtOAc, theo tỷ lệ 95:5 đến 30:70) ở dạng dầu màu vàng (1,035g, 75% độ tinh khiết, hiệu suất 56%)

UPLC Rt_{M1}=0,65 phút; ESIMS: 322 [(M+H)⁺].

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7,54 (s, 1H), 5,86 (s, 1H), 5,42 (br s, 1H), 4,25-4,41 (m, 1H), 4,19 (t, 2H), 3,38-3,66 (m, 6H), 2,00-2,18 (m, 2H), 1,46 (d, 9H).

d) tert-butyl este của axit (S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-carboxylic

Hỗn hợp gồm tert-butyl este của axit (S)-3-(2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy)-pyrrolidin-1-carboxylic (254mg, 0,79mmol), 5-bromo-2-metoxi-3-metylpyridin (số đăng ký sản phẩm CAS 760207-87-2) (208mg, 1,03mmol), XPhos (30mg, 0,06mmol), và NaOtBu (167mg, 1,74mmol) trong đioxan (6ml) được loại khí bằng argon trong thời gian 5 phút, sau đó Pd₂(dba)₃ (29mg, 0,03mmol) được bổ sung vào. Ống nghiệm này được nạp argon, được đậy kín và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 100°C trong thời gian 2 giờ. Sau khi làm giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng này được lọc qua hyflo, rửa bằng EtOAc và các dịch lọc được rửa bằng dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa. Lớp nước được chiết lại hai lần bằng EtOAc, các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên Na₂SO₄, lọc, cô và hợp chất nêu ở đề mục này thu được sau khi sắc ký cực nhanh trên silicagel (heptan/EtOAc, theo tỷ lệ 100:0 đến 50:50) ở dạng gồm trong (274mg, hiệu suất 78%). UPLC Rt_{M1}=1,20 phút; ESIMS: 443 [(M+H)⁺].

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7,93 (d, 1H), 7,61 (br s, 1H), 7,30-7,35 (m, 1H), 5,71 (s, 1H), 5,34-5,46 (m, 1H), 4,31 (br s, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,68 (t, 2H), 3,34-3,62 (m, 4H), 2,23 (s, 3H), 2,01-2,09 (m, 2H), 1,44 (s, 9H).

e) 1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-7-((S)-pyrrolidin-3-yloxy)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin

Dung dịch chứa tert-butyl este của axit (S)-3-[1-(6-metoxi-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-carboxylic (364mg, 0,82mmol) trong DCM (6ml) được xử lý bằng TFA (0,63ml, 8,23mmol) và hỗn hợp phản

ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ, sau đó được tôi bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa và chiết bằng DCM. Lớp hữu cơ được làm khô trên MgSO_4 , lọc và cô ở điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm nêu ở đề mục này ở dạng dầu màu đỏ, mà được sử dụng ở bước tiếp theo không cần tinh chế thêm (313mg, độ tinh khiết 90%, hiệu suất định lượng).

UPLC R_{tM1} = 0,65 phút; ESIMS: 343 $[(M+H)^+]$.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7,93 (d, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,32 (d, 1H), 5,70 (s, 1H), 5,26-5,36 (m, 1H), 4,31 (t, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,67 (t, 2H), 2,95-3,15 (m, 3H), 2,81-2,92 (m, 1H), 2,22 (s, 3H), 1,98-2,10 (m, 1H), 1,79-1,90 (m, 1H).

f) (1,1-đioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-yloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon

Dung dịch chứa axit 1,1-đioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-carboxylic (số đăng ký sản phẩm CAS64096-87-3) (106mg, 0,59mmol) trong DMF (4ml) được xử lý bằng HBTU (225mg, 0,59mmol) và DIPEA (0,24ml, 1,37mmol). Dung dịch màu cam tạo ra được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút, sau đó dung dịch chứa 1-(6-metoxo-5-metyl-pyridin-3-yl)-7-((S)-pyrrolidin-3-yloxy)-2,3-đihydro-1H-pyrido[3,4-b]-[1,4]oxazin (156mg, 0,46mmol) trong DMF (2ml) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, sau đó được cô ở điều kiện áp suất giảm và cặn được lấy đi cùng với DCM và rửa bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa. Lớp hữu cơ được làm khô bằng cách cho nó qua khay tách pha, cô và hợp chất nêu ở đề mục này thu được sau khi sắc ký SFC (cột DEAP (250mm x 30mm, 60Å, 5 μm) Princeton, gradien 11% đến 16% metanol trong CO_2 siêu tới hạn trong thời gian 6 phút) ở dạng rắn hơi bất màu (112mg, hiệu suất 49%).

UPLC R_{tM1} = 0,81 phút; ESIMS: 503 $[(M+H)^+]$.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,01 (s, 1H), 7,61 (m, 1H), 7,52 (d, 1H), 5,52 (d, 1H), 5,24-5,43 (m, 1H), 4,26 (br s, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,59-3,79 (m, 3H), 3,41-3,56 (m, 2H), 3,21-3,39 (m, 1H), 2,98-3,21 (m, 4H), 2,67-2,83 (m, 1H), 1,84-2,20 (m, 9H).

^1H NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,01 (s, 1H), 7,63-7,59 (m, 1H), 7,55-7,51 (m, 1H), 5,55-5,51 (m, 1H), 5,43-5,24 (m, 1H), 4,29-4,22 (m, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,80-3,60 (m,

2H), 3,56-3,37 (m, 3H), 3,28-2,99 (m, 5H), 2,89-2,66 (m, 1H), 2,19-2,09 (m, 4H), 2,08-1,98 (m, 2H), 1,98-1,86 (m, 3H).

Kết tinh hợp chất thu được theo Ví dụ F1 bằng cách làm nóng và làm nguội trong isopropanol / diethyl ete

474mg hợp chất theo Ví dụ F1 ở dạng vô định hình được tạo huyền phù trong 1,4ml isopropanol. Hỗn hợp này được tăng nhiệt độ đến 70°C và khuấy ở 70°C để cho phép hòa tan hoàn toàn hợp chất theo Ví dụ F1. Dung dịch này được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, cặn dạng keo được tạo ra. 2ml diethyl ete được bổ sung vào và huyền phù đặc được khuấy trong thời gian 48 giờ. Huyền phù màu trắng được tạo ra. Huyền phù này được lọc và chất rắn được làm khô ở 40°C, 15mbar. Bột mịn màu trắng thu được. Nguyên liệu này chỉ chứa một chút dung môi còn sót lại (<0,5%). Hợp chất theo Ví dụ F1 ở dạng tinh thể khan với điểm bắt đầu nóng chảy 148,77°C thu được.

Danh mục gồm hầu hết các pic 2-theta đáng kể từ mẫu nhiễu xạ bột tia X với dung sai $\pm 0,5$ so với hợp chất theo Ví dụ F1 ở dạng khan (phương pháp M1) (kể cả các pic thấp/yếu nhằm mục đích thông tin). Lưu ý: danh mục pic này là không triệt để mà chỉ "không bao gồm những cái khác".

2-theta độ	Cường độ
9,1	Thấp
10,2	Trung bình
11,9	Trung bình
13,0	Thấp
17,1	Mạnh
17,7	Trung bình, không hòa tan
18,7	Trung bình
20,3	Trung bình, không hòa tan
20,8	Trung bình, không hòa tan
26,0	Trung bình/thấp
26,7	Trung bình

23,2	Trung bình/thấp
24,1	Trung bình/thấp
24,8	Trung bình/thấp
29,3	Trung bình/thấp
27,4	Trung bình/thấp
21,4	Trung bình/thấp

Đánh giá sinh học

Hoạt tính của hợp chất có thể được đánh giá theo các phương pháp *in vitro* & *in vivo* dưới đây.

Thử nghiệm sinh học

1 Xác định mức độ ức chế của dạng đồng chức năng PI3K alpha và PI3K deltaenzym

1.1 Thử nghiệm về hoạt tính lipit kinaza

Hiệu quả của các hợp chất làm PI3 chất ức chế các kinaza có thể được thể hiện như sau:

Phản ứng kinaza được thực hiện trong thể tích cuối cùng 50 μ l mỗi lỗ ở một nửa diện tích COSTAR, đĩa loại 96 lỗ. Nồng độ cuối cùng của ATP và phosphatidyl inositol trong thử nghiệm này lần lượt là 5 μ M và 6 μ g/ml. Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung PI3 kinaza, ví dụ PI3 kinaza δ , vào.

p110 δ . Các thành phần của thử nghiệm này được bổ sung vào mỗi lỗ như sau:

- 10 μ l hợp chất thử nghiệm trong 5% DMSO mỗi lỗ trong các cột 2-1.
- Tổng hoạt tính được xác định bằng cách bổ sung 10 μ l 5% thể tích DMSO trong 4 lỗ đầu tiên của cột 1 và 4 lỗ cuối cùng của cột 12.
- Nền được xác định bằng cách bổ sung 10 μ M hợp chất đối chứng vào 4 lỗ cuối cùng của cột 1 và 4 lỗ đầu tiên của cột 12.
- 2ml 'Hỗn hợp thử nghiệm' được điều chế mỗi đĩa:

1,912ml HEPES dung dịch đệm thử nghiệm

8,33 μ l dung dịch gốc 3mM chứa ATP để tạo ra nồng độ cuối cùng 5 μ M mỗi lỗ

1 μ l [33 P]ATP vào ngày hoạt tính để tạo ra 0,05 μ Ci mỗi lỗ

30 μ l dung dịch gốc PI 1mg/ml để tạo ra nồng độ cuối cùng 6 μ g/ml mỗi lỗ

5 μ l dung dịch gốc $MgCl_2$ 1M để tạo ra nồng độ cuối cùng 1mM mỗi lỗ

- 20 μ l hỗn hợp thử nghiệm này được bổ sung vào mỗi lỗ.
- 2ml ‘Hỗn hợp enzym’ được điều chế mỗi đĩa (x^* μ l PI3 kinaza p110 β trong 2ml dung dịch đệm kinaza). ‘Hỗn hợp enzym’ này được giữ trên nước đá trong khi bổ sung vào các đĩa thử nghiệm.
- 20 μ l ‘Hỗn hợp enzym’ được bổ sung vào/lỗ để bắt đầu phản ứng.
- Sau đó, đĩa này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 90 phút.
- Phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung 50 μ l huyền phù hạt WGA-SPA (hạt thử nghiệm nhấp nháy gần được bọc bằng agglutinin của mầm lúa mì) vào mỗi lỗ.
- Đĩa thử nghiệm được bịt kín lại bằng cách sử dụng TopSeal-S (bịt bằng nhiệt đối với các vi đĩa polystyren, do PerkinElmer LAS [Deutschland] GmbH, Rodgau, Germany, cung cấp) và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian ít nhất 60 phút.
- Sau đó, đĩa thử nghiệm này được ly tâm với tốc độ 1500 vòng/phút trong thời gian 2 phút bằng cách sử dụng máy ly tâm lắp trên Jouan (do Jouan Inc., Nantes, France, cung cấp).
- Đĩa thử nghiệm được đếm bằng cách sử dụng Packard TopCount, mỗi lỗ được đếm trong 20 giây.

* thể tích của enzym phụ thuộc vào hoạt tính enzym của mẻ này được sử dụng.

Trong thử nghiệm được ưu tiên hơn nữa, phản ứng kinaza được thực hiện trong thể tích cuối cùng 10 μ l CORNING không liên kết thể tích ít mỗi lỗ, đĩa đen loại 384 lỗ (số sản phẩm theo danh mục #3676). Nồng độ cuối cùng của ATP và phosphatidyl inositol (PI) trong thử nghiệm này lần lượt là 1 μ M và 10 μ g/ml. Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung ATP vào:

Thành phần của thử nghiệm này được bổ sung mỗi lỗ như sau:

50nl các hợp chất thử nghiệm trong 90% DMSO mỗi lỗ, trong các cột 1 đến 20, 8 nồng độ (1/3 và cách bước 1/3,33 pha loãng theo bậc) trong một.

- Đối chứng thấp: 50nl 90% DMSO trong một nửa số lỗ của các cột 23 đến 24 (0,45% trong dung dịch cuối cùng).
- Đối chứng cao: 50nl hợp chất tham chiếu (ví dụ, Hợp chất theo Ví dụ 7 trong công bố đơn quốc tế số WO 2006/122806) trong một nửa còn lại của các cột 23 đến 24 (2,5 μ M trong dung dịch cuối cùng).
- Chuẩn: 50nl hợp chất tham chiếu như được nêu trên đã được pha loãng như các hợp chất thử nghiệm trong các cột 21 đến 22.

- 20ml ‘dung dịch đệm’ được điều chế mỗi thử nghiệm :

200 μ l TRIS HCl 1M, độ pH=7,5 (10mM trong dung dịch cuối cùng)

60 μ l MgCl₂ 1M (3mM trong dung dịch cuối cùng)

500 μ l NaCl 2M (50mM trong dung dịch cuối cùng)

100 μ l CHAPS 10% (0,05% trong dung dịch cuối cùng)

200 μ l DTT 100mM (1mM trong dung dịch cuối cùng)

18,94ml nước tinh lọc nano

- 10ml ‘PI’ được điều chế trong mỗi thử nghiệm :

200 μ l l-alpha-phosphatidylinositol 1mg/ml (Liver Bovine, sản phẩm theo danh mục của Avanti Polar Lipids số 840042C phân tử lượng =909,12) được điều chế trong 3% OctylGlucosit (10 μ g/ml trong dung dịch cuối cùng)

9,8ml ‘dung dịch đệm’

- 10ml ‘ATP’ được điều chế mỗi thử nghiệm :

6,7 μ l dung dịch gốc chứa ATP 3mM để tạo ra nồng độ cuối cùng 1 μ M mỗi lỗ

10ml ‘dung dịch đệm’

- 2,5ml mỗi cấu trúc PI3K được điều chế cho mỗi thử nghiệm trong ‘PI’ với nồng độ cuối cùng dưới đây :

10nM PI3K alfa EMV B1075

25nm beta EMV BV949

10nM delta EMV BV1060

150nM gama EMV BV950

- 5µl 'PI/PI3K' được bổ sung vào mỗi lỗ.
- 5µl 'ATP' được bổ sung vào mỗi lỗ để bắt đầu phản ứng.
- Sau đó, các đĩa này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 60 phút (alfa, beta, delta) hoặc 120 phút (gama).
- Phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung 10µl kinaza-Glo (sản phẩm theo danh mục của Promega số #6714) vào.
- Các đĩa thử nghiệm này được đọc sau 10 phút trong bộ đọc Synergy 2 (do BioTek, Vermont USA cung cấp) với thời gian tích hợp 100 mili giây và độ nhạy được đặt đến 191.
- Đầu ra: Đối chứng cao là khoảng 60.000 đơn vị và đối chứng thấp bằng 30.000 hoặc thấp hơn
- Thử nghiệm phát quang này cho tỷ lệ Z hữu dụng trong khoảng từ 0,4 đến 0,7

Trị số Z là phép đo chung về độ thô của thử nghiệm. Z' nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,0 được xem là thử nghiệm tốt.

Đối với thử nghiệm này, các cấu trúc PI3K đã nêu được điều chế như sau:

1.2 Tạo cấu trúc gen

Hai cấu trúc khác nhau, BV 1052 và BV 1075, được dùng để tạo ra các protein PI3 kinaza α để sàng lọc hợp chất.

PI3K α BV-1052 Đuôi His đầu tận cùng C của p85(iSH2)-nhóm liên kết Gly-p110 α (D20aa)

Các sản phẩm PCR đối với miền bên trong SH2 (iSH2) của cấu trúc siêu phân tử p85 và đối với cấu trúc siêu phân tử p110-a (có xóa bỏ 20 axit amin đầu tiên) được tạo ra và được dung hợp theo phương pháp PCR gộp đầu.

Sản phẩm PCR của iSH2 được tạo ra từ ADN bổ trợ sợi thứ nhất ban đầu bằng cách sử dụng các đoạn mồi

gwG130-p01 (5'-CGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 1) và gwG130-p02 (5'-TGGTTT-AATGCTGTTCATACGTTTGTCAAT-3') (SEQ ID NO: 2). Tiếp theo, trong phản ứng PCR bậc hai, các vị trí AttB1 tái tổ hợp Gateway (do Invitrogen AG, Basel, Thụy sĩ cung cấp) và các trình tự của nhóm liên kết được bổ sung lần lượt ở đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' của đoạn iSH2 của p85, bằng cách sử dụng các đoạn mồi

gwG130-p03 (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATAT-ACATAT-GCGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 3) và gwG152-p04 (5'-TACCATAATTCCACCACCACCACCGGAAATTCCCCCTGGTTT-AATGCTGTTCATACGTTTGTCAAT-3') (SEQ ID NO: 4).

Đoạn p110-a cũng được tạo ra từ ADN bổ trợ sợi thứ nhất, ban đầu bằng cách sử dụng các đoạn mồi gwG152-p01 (5'-CTAGTGGAATGTTTACTACCAAATGG-3') (SEQ ID NO: 5) và gwG152-p02 (5'-GTTCAATG-CATGCTGTTTAATTGTGT-3') (SEQ ID NO: 6).

Trong phản ứng PCR tiếp theo, trình tự của nhóm liên kết và đuôi histidin được bổ sung vào lần lượt ở đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' của đoạn p110-a, bằng cách sử dụng các đoạn mồi

gw152-p03 (5'-GGGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTATGGTAC-TAGTG-GAATGTTTACTACC-AAATGGA-3') (SEQ ID NO: 7) và gwG152-p06 (5'-AGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCCGTTCAATG-CAT-GCTGTTTAATTGTGT-3') (SEQ ID NO: 8).

Protein dung hợp p85-iSH2/p110-a được ghép vào trong phản ứng PCR thứ ba bằng các nhóm liên kết gôi đầu ở đầu tận cùng 3' của đoạn iSH2 và đầu tận cùng 5' của đoạn p110-a, bằng cách sử dụng đoạn mồi gwG130-p03 nêu trên và đoạn mồi chứa đuôi histidin gôi đầu và các trình tự tái tổ hợp AttB2

(5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAGCTCCGTGATGGTGATG-GTGAT-GTGCTCC-3') (SEQ ID NO: 9).

Thành phẩm này được tái tổ hợp trong (do Invitrogen cung cấp) hoặc phản ứng thành vật truyền của thể cho pDONR201 để tạo ra dòng tách vào ORF318. Dòng tách này được xác nhận bằng cách xác định trình tự và sử dụng trong phản ứng Gateway LR để chuyển vật chèn vào vật truyền pBlueBac4.5 (do Invitrogen cung cấp) đã được làm thích ứng Gateway để tạo ra vật truyền biểu hiện baculovirus LR410.

PI3K α BV-1075 Đuôi His đầu tận cùng C của p85(iSH2)-nhóm liên kết 12 XGly-p110a(D20aa)

Cấu trúc đối với Baculovirus BV-1075 được tạo ra bằng bước nối ba phần bao gồm đoạn p85 và đoạn p110-a đã được tác dụng vào vật truyền pBlueBac4.5. Đoạn p85 thu được từ plasmid p1661-2 đã được xử lý bằng Nhe/Spe. Đoạn p110-a thu được từ LR410 (xem trên đây) ở dạng đoạn SpeI/HindIII. Vật truyền tách dòng pBlueBac4.5 (do Invitrogen cung cấp) này được xử lý bằng Nhe/HindIII. Bước này dẫn đến cấu trúc PED 153.8

Thành phần p85 (iSH2) được tạo ra theo phương pháp PCR bằng cách sử dụng ORF 318 (nêu trên) ở dạng khuôn và một đoạn môi xuôi

KAC1028 (5'-GCTAGCATGCGAGAATATGATAGATTATATGAAGAATATACC)
(SEQ ID NO: 10) và hai đoạn môi ngược,

KAC1029 (5'-GCCTCCACCACCTCCGCCTGGTTTAATGCTGTTCATACGTTTGT-
C) (SEQ ID NO: 11) và

KAC1039 (5'-TACTAGTCCGCCTCCACCACCTCCGCCTCCACCACCTCCGCC)
(SEQ ID NO: 12).

Hai đoạn môi ngược này chồng chập và kết hợp nhóm liên kết 12x Gly và trình tự ở đầu tận cùng N của gen p110a vào vị trí SpeI. Nhóm liên kết 12x Gly thay thế nhóm liên kết trong cấu trúc BV1052. Đoạn PCR được tách dòng vào pCR2.1 TOPO (do Invitrogen cung cấp). Trong số các dòng tách tạo ra, p1661-2 được xác định là đúng. Plasmid này được phân cắt bằng Nhe và SpeI và đoạn tạo ra được phân lập bằng gel và được tinh chế để tách dòng phụ.

Đoạn tách dòng p110-a được tạo ra bằng cách phân cắt bằng enzym dòng LR410 (xem trên đây) với Spe I và HindIII. Vị trí SpeI ở trong vùng ghi mã của gen p110a. Đoạn tạo ra được phân lập bằng gel và tinh chế để tách dòng phụ.

Vật truyền tách dòng này, pBlueBac4.5 (do Invitrogen cung cấp) được chuẩn bị bằng cách phân cắt bằng enzym với Nhe và HindIII. Vật truyền cắt được tinh chế với cột Qiagen (do Quiagen N.V, Venlo, Hà lan cung cấp) và sau đó khử phosphoryl bằng phosphatase kiềm của ruột bê (CIP) (do New England BioLabs, Ipswich, MA cung cấp). Sau khi hoàn thành phản ứng CIP, vật truyền cắt lại được tinh chế bằng cột để tạo ra vật truyền cuối cùng. Bước nối 3 phần được thực hiện bằng cách sử dụng ligaza nhanh do Roche cung cấp và mô tả sản phẩm của nhà cung cấp.

PI3K β BV-949 Đuôi His của đầu tận cùng C của p85(iSH2)-nhóm liên kết Gly-p110b (dài đầy đủ)

Các sản phẩm PCR đối với miền bên trong SH2 (iSH2) của cấu trúc siêu phân tử p85 và đối với cấu trúc siêu phân tử p110-b dài đầy đủ được tạo ra và được dung hợp theo phương pháp PCR gói đầu.

Sản phẩm PCR của iSH2 được tạo ra từ ADN bổ trợ sợi thứ nhất ban đầu bằng cách sử dụng các đoạn mồi

gwG130-p01 (5'-CGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 1) và gwG130-p02 (5'-TGGTTT-AATGCTGTTCATACGTTTGTCAAT-3') (SEQ ID NO: 2).

Sau đó, trong phản ứng PCR thứ hai Gateway (do Invitrogen cung cấp) các vị trí AttB1 tái tổ hợp và các trình tự của nhóm liên kết được bổ sung lần lượt ở đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' của đoạn iSH2 của p85, bằng cách sử dụng các đoạn mồi

gwG130-p03 (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATA-TACATATGCGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 3) và gwG130-p05 (5'-ACTGAAGCATCCTCCTCCTCCTCCTGTTTAAT-GCTGTT-CATACGTTTGTGTC-3') (SEQ ID NO: 13).

Đoạn p110-b cũng được tạo ra từ ADN bổ trợ sợi thứ nhất ban đầu bằng cách sử dụng các đoạn mồi gwG130-p04 (5'-ATTAAACCAGGAGGAGGAGGAGGAGGATGCTTCAG-TTTCATAATGCC-TCCTGCT-3') (SEQ ID NO: 4) mà chứa các trình tự của nhóm liên kết và đầu tận cùng 5' của p110-b và gwG130-p06 (5'-AGCTCCGTGATGGTGATGGT-GATGTGCTCCAGATCTGTAGTCTTT-CCGAACCTGTGTG-3') (SEQ ID NO: 14) mà chứa các trình tự của đầu tận cùng 3' của p110-b ngưng tụ với đuôi histidin.

Protein dung hợp p85-iSH2/p110-b được ghép vào theo phương pháp PCR gộp đầu phản ứng của các nhóm liên kết ở đầu tận cùng 3' của đoạn iSH2 và đầu tận cùng 5' của đoạn p110-b, bằng cách sử dụng đoạn mồi gwG130-p03 nêu trên và đoạn mồi chứa đuôi histidin gộp đầu và các trình tự tái tổ hợp AttB2 (5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAA-GCTGGGTFT-AAGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCC-3') (SEQ ID NO: 15).

Thành phẩm được tái tổ hợp trong Gateway (do Invitrogen cung cấp) hoặc phản ứng thành vật truyền của thể cho pDONR201 để tạo ra dòng nhánh vào ORF253. Dòng tách này được xác nhận bằng cách xác định trình tự và sử dụng trong phản ứng Gateway LR để chuyển vật chèn vào vật truyền pBlueBac4.5 đã được làm thích ứng Gateway (do Invitrogen cung cấp) để tạo ra vật truyền biểu hiện baculovirus LR280.

PI3Kδ BV-1060 Đuôi His đầu tận cùng C của p85(iSH2)-nhóm liên kết Gly-p110d (dài đầy đủ)

Các sản phẩm PCR đối với miền bên trong SH2 (iSH2) của cấu trúc siêu phân tử p85 và đối với cấu trúc siêu phân tử p110-d dài đầy đủ được tạo ra và được dung hợp theo phương pháp PCR gộp đầu.

Sản phẩm PCR của iSH2 được tạo ra từ ADN bổ trợ sợi thứ nhất ban đầu bằng cách sử dụng các đoạn mồi

gwG130-p01 (5'-CGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 1) và gwG130-p02 (5'-TGGTTT-AATGCTGTTTCATACGTTTGTCAAT-3') (SEQ ID NO: 2).

Sau đó, trong phản ứng PCR thứ hai Gateway (do Invitrogen cung cấp) các vị trí AttB1 tái tổ hợp và các trình tự của nhóm liên kết được bổ sung lần lượt ở đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' của đoạn iSH2 của p85, bằng cách sử dụng các đoạn mồi

gwG130-p03 (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATAT-ACAT-ATGCGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 3) và

gwG154-p04 (5'-TCCTCCTCCTCCTCCTCCTGGTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGT-
TC-3') (SEQ ID NO: 16).

Đoạn p110-a cũng được tạo ra từ ADN hỗ trợ sợi thứ nhất ban đầu bằng cách sử dụng các đoạn mồi gwG154-p01 (5'-ATGCCCCCTGGGGTGGACTGCCCCAT-3') (SEQ ID NO: 17) và gwG154-p02 (5'-CTACTG-CCTGTTGTCTTTGGACACGT-3') (SEQ ID NO: 18).

Trong phản ứng PCR tiếp theo, các trình tự của nhóm liên kết và đuôi histidin được bổ sung vào lần lượt ở đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' của đoạn p110-d, bằng cách sử dụng các đoạn mồi

gw154-p03 (5'-ATTAAACCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGACCCCCTGGGGTGGAC-TGCCCATGGA-3') (SEQ ID NO: 19) và gwG154-p06 (5'-AGCTCCGTGATGGT-GAT-GGTGATGTGCT-CCCTGCCTGTTGTCTTTGGACACGTTGT-3') (SEQ ID NO: 20).

Protein dung hợp p85-iSH2/p110-d được ghép vào phản ứng PCR thứ ba bằng các nhóm liên kết gối đầu ở đầu tận cùng 3' của đoạn iSH2 và đầu tận cùng 5' của đoạn p110-d, bằng cách sử dụng đoạn mồi gwG130-p03 nêu trên và đoạn mồi chứa đuôi histidin gối đầu và các trình tự tái tổ hợp AttB2 Gateway (do Invitrogen cung cấp) (5'-GGGACCAC-TTTGTA-CAAGAAAGCTGGGTTT-AAGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCT-CC-3') (SEQ ID NO: 21).

Thành phẩm này được tái tổ hợp trong Gateway (do Invitrogen cung cấp) hoặc phản ứng vào vật truyền của thể cho pDONR201 để tạo ra dòng tách vào ORF319. Dòng tách này được xác nhận bằng cách xác định trình tự và sử dụng trong phản ứng Gateway LR để chuyển vật chèn vào vật truyền pBlueBac4.5 đã được làm thích ứng Gateway (do Invitrogen cung cấp) để tạo ra vật truyền biểu hiện baculovirus LR415.

PI3Kγ BV-950 *Đuôi His ở đầu tận cùng C của p110g(D144aa)*

Cấu trúc này thu được từ phòng thí nghiệm Roger Williams, phòng thí nghiệm sinh học phân tử MRC, Cambridge, UK (November, 2003). Mô tả về cấu trúc được tìm thấy trong tài liệu: Pacold M. E. *et al.* (2000) *Cell* 103, 931-943.

1.3 Biểu hiện và tinh chế protein

Phương pháp để tạo ra baculovirus tái tổ hợp và protein cho các dạng đồng chức năng của PI3K:

Các plasmit pBlue-Bac4.5 (đối với các dạng đồng chức năng a, b, và d) hoặc pVL1393 (đối với g) chứa gen kinaza PI3 khác nhau được đồng chuyển nhiễm với ADN hệ gen BaculoGold WT (do BD Biosciences, Franklin lakes, NJ, Mỹ cung cấp) bằng cách áp dụng các phương pháp do nhà cung cấp đề xuất. Sau đó, baculovirus tái tổ hợp thu được từ việc chuyển nhiễm được tinh chế mảng trên các tế bào côn trùng Sf9 để tạo ra vài thể phân lập biểu hiện protein tái tổ hợp. Các dòng dương tính được chọn theo phương pháp tây kháng thể kháng HIS hoặc kháng dạng đồng chức năng. Đối với các dạng đồng chức năng PI3K alpha và delta, bước tinh chế mảng thứ hai được thực hiện trên dung dịch gốc virut tách dòng thứ nhất chứa PI3K. Việc khuếch đại tất cả thể phân lập baculovirut được thực hiện ở mức đa nhiễm (moi) thấp để tạo ra chuẩn độ cao, mức độ chuyển dung dịch gốc qua thấp để sản sinh protein. Baculovirut được gọi là BV1052 (α) và BV1075 (α), BV949 (β), BV1060 (δ) và BV950 (γ).

Quá trình sản sinh protein bao gồm bước gây nhiễm (lần chuyển 3 hoặc thấp hơn) của các tế bào Tn5 (*Trichoplusia ni*) hoặc TiniPro (do Expression Systems, LLC, Woodland, CA, Mỹ cung cấp) được tạo huyền phù trong môi trường không có protein ở moi nằm trong khoảng từ 2 đến 10 trong thời gian 39 giờ đến 48 giờ trong bình thủy tinh Erlenmyer loại dung tích 2l (110 vòng/phút) hoặc bình phản ứng dùng được trong lò vi sóng (22 vòng/phút đến 25 vòng/phút). Ban đầu, bình phản ứng dùng được trong lò vi sóng loại có dung tích làm việc 10l được cấy ở mật độ 3×10^5 tế bào/ml ở mức độ một nửa dung lượng (5l). Bình phản ứng được lắc với tốc độ 15 vòng/phút trong giai đoạn sinh trưởng của tế bào pha trong thời gian 72 giờ, có bổ sung 5% oxy đã được trộn với không khí (0,2l mỗi phút). Ngay trước khi gây nhiễm, giống cấy trong bình phản ứng chịu được vi sóng được phân tích mật độ, sức sống và được pha loãng đến $1,5 \times 10^6$ tế bào/ml. 100ml đến 500ml dịch cấy chuyển virut chậm chuẩn độ cao hơn được bổ sung vào sau khoảng thời gian 2 giờ đến 4 giờ nuôi cấy thêm. Oxy được tăng đến 35% trong giai đoạn gây nhiễm 39 giờ đến 48 giờ và tốc độ lắc tính theo vòng/phút tăng đến 25. Trong quá trình gây nhiễm, các tế bào được theo dõi bằng thiết bị phân tích sức sống Vicell (do Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, Mỹ cung cấp) về quy trình sinh học gồm sức sống, đường kính và mật độ. Các chỉ số đọc trên thiết bị phân tích sinh học Nova (do NOVA Biomedical Corp., Waltham, MA, Mỹ cung cấp) về các thông số khác nhau và các chất chuyển hóa (pH,

mức độ bão hòa O₂, glucoza, v.v.) được lấy 12 giờ đến 18 giờ một lần cho đến khi thu hoạch. Các tế bào trong bình phản ứng dùng được trong lò vi sóng được gom trong vòng 40 giờ sau khi nhiễm. Các tế bào này được gom bằng cách ly tâm (4 độ C với tốc độ 1500 vòng/phút), và sau đó duy trì trên nước đá trong khi gom các viên để phân giải và tinh chế. Các phần viên được gom với lượng ít môi trường Grace lạnh không bổ sung chất phụ trợ (không chứa chất ức chế proteaza).

Quy trình tinh chế PI3K alpha đối với HTS (BV1052)

PI3K alpha được tinh chế theo ba bước sắc ký: sắc ký theo ái lực kim loại đã được cố định trên nhựa Ni Sepharosa (do GE Healthcare, thuộc General Electric Company, Fairfield, CT, Mỹ cung cấp), lọc gel bằng cách sử dụng cột Superdex 200 26/60 (do GE Healthcare cung cấp), và cuối cùng là bước trao đổi cation trên cột SP-XL (do GE Healthcare cung cấp). Tất cả các dung dịch đệm đều được làm lạnh đến 4°C và bước phân giải được thực hiện trong điều kiện làm lạnh trên nước đá. Bước phân đoạn trong cột được thực hiện nhanh ở nhiệt độ trong phòng.

Các tế bào côn trùng thường đã làm lạnh được dung giải trong dung dịch đệm phân giải ưu trương và phun lên cột IMAC đã được chuẩn bị. Nhựa được rửa bằng dung dịch đệm phân giải với thể tích gấp 3 đến 5 lần thể tích cột, tiếp theo là dung dịch đệm rửa chứa 45mM imidazol với thể tích gấp 3 đến 5 lần thể tích cột, và sau đó protein đích được rửa giải bằng dung dịch đệm chứa 250mM imidazol. Các phân đoạn được phân tích bằng gel nhuộm Coomassie SDS-PAGE, và các phân đoạn chứa protein đích được gom và phun lên cột GFC đã được chuẩn bị. Các phân đoạn từ cột GFC được phân tích bằng SDS-PAGE gel nhuộm Coomassie, và các phân đoạn chứa protein đích được gom. Vốn gom từ cột GFC được pha loãng vào dung dịch muối đệm thấp và phun lên cột SP-XL đã được chuẩn bị. Cột này được rửa bằng dung dịch muối đệm thấp cho đến khi đạt được mức độ hấp thụ ranh giới A280 ổn định, và được rửa giải bằng cách sử dụng 20 lần thể tích cột gradien từ 0mM NaCl đến 500mM NaCl. Một lần nữa, các phân đoạn từ cột SP-XL được phân tích bằng gel nhuộm Coomassie SDS-PAGE, và các phân đoạn chứa protein đích được gom. Vốn cuối cùng được thẩm tách vào dung dịch đệm bảo quản chứa 50% glyxerol và bảo quản ở -20°C. Vốn cuối cùng được thử nghiệm về hoạt tính trong thử nghiệm phosphoinosititol kinaza.

Quy trình tinh chế PI3K beta đối với HTS (BV949)

PI3K beta được tinh chế trong hai bước sắc ký: sắc ký theo ái lực kim loại đã được cố định (IMAC) trên nhựa Ni Sepharosa (do GE Healthcare cung cấp) và lọc gel (GFC) bằng cách sử dụng cột Superdex 200 26/60 (do GE Healthcare cung cấp). Tất cả các dung dịch đệm được làm lạnh đến 4°C và bước phân giải được thực hiện ướp lạnh trên nước đá. Bước phân đoạn bằng cột được thực hiện nhanh ở nhiệt độ trong phòng.

Các tế bào côn trùng thường đã làm lạnh được dung giải trong dung dịch đệm phân giải ưu trương và áp dụng cho cột IMAC đã được chuẩn bị. Nhựa được rửa bằng dung dịch đệm phân giải với thể tích gấp 3 lần đến 5 lần thể tích cột, tiếp theo là dung dịch đệm rửa chứa 45mM imidazol 3 lần đến 5 lần thể tích cột, và sau đó protein đích được rửa giải bằng dung dịch đệm chứa 250mM imidazol. Các phân đoạn được phân tích bằng gel nhuộm Coomassie SDS-PAGE, và các phân đoạn chứa protein đích được gom và áp dụng lên cột GFC đã được chuẩn bị. Các phân đoạn từ cột GFC được phân tích bằng gel nhuộm Coomassie SDS-PAGE, và các phân đoạn chứa protein đích được gom. Vốn cuối cùng được thẩm tách vào dung dịch đệm bảo quản chứa 50% glyxerol và bảo quản ở -20°C. Vốn cuối cùng được thử nghiệm về hoạt tính theo thử nghiệm phosphoinositol kinaza.

Quy trình tinh chế PI3K gama đối với HTS (BV950)

PI3K gama được tinh chế trong hai bước sắc ký: sắc ký theo ái lực kim loại đã được cố định (IMAC) trên nhựa Ni Sepharosa (do GE Healthcare cung cấp) và lọc gel (GFC) bằng cách sử dụng cột Superdex 200 26/60 (do GE Healthcare cung cấp). Tất cả các dung dịch đệm được làm lạnh đến 4°C và bước phân giải được thực hiện ướp lạnh trên nước đá. Bước phân đoạn bằng cột được thực hiện nhanh ở nhiệt độ trong phòng. Thông thường, các tế bào côn trùng đã làm đông lạnh được dung giải trong dung dịch đệm phân giải ưu trương và áp dụng lên cột IMAC đã được chuẩn bị. Nhựa được rửa bằng dung dịch đệm phân giải với thể tích gấp 3 lần đến 5 lần thể tích cột, tiếp theo là dung dịch đệm rửa chứa 45mM imidazol với thể tích 3 lần đến 5 lần thể tích cột, và sau đó protein đích được rửa giải bằng dung dịch đệm chứa 250mM imidazol. Các phân đoạn được phân tích bằng gel nhuộm Coomassie SDS-PAGE, và các phân đoạn chứa protein đích được gom và áp dụng lên cột GFC đã được chuẩn bị. Các phân đoạn từ cột GFC được phân tích bằng gel nhuộm Coomassie SDS-PAGE, và các phân đoạn chứa protein đích được

gom. Vốn cuối cùng được thẩm tách vào dung dịch đệm bảo quản chứa 50% glyxerol và bảo quản ở -20°C . Vốn cuối cùng được thử nghiệm về hoạt tính theo thử nghiệm phosphoinositol kinaza.

Quy trình tinh chế PI3K delta đối với HTS (BV1060)

PI3K delta được tinh chế theo ba bước sắc ký: sắc ký theo ái lực kim loại đã được cố định trên nhựa Ni Sepharosa (do GE Healthcare cung cấp), lọc gel sử dụng cột Superdex 200 26/60 (do GE Healthcare cung cấp), và cuối cùng là bước trao đổi anion trên cột Q-HP (do GE Healthcare cung cấp). Tất cả các dung dịch đệm được làm lạnh đến 4°C và bước phân giải được thực hiện ướp lạnh trên nước đá. Bước phân đoạn bằng cột được thực hiện nhanh ở nhiệt độ trong phòng. Thông thường, các tế bào côn trùng đã làm đông lạnh được dung giải trong dung dịch đệm phân giải ưu trương và áp dụng lên cột IMAC đã được chuẩn bị. Nhựa được rửa bằng dung dịch đệm phân giải với thể tích gấp 3 lần đến 5 lần thể tích cột, tiếp theo là dung dịch đệm rửa chứa 45mM imidazol với thể tích gấp 3 lần đến 5 lần thể tích cột, và sau đó protein đích được rửa giải bằng dung dịch đệm chứa 250mM imidazol. Các phân đoạn được phân tích bằng gel nhuộm Coomassie SDS-PAGE, và các phân đoạn chứa protein đích được gom và áp dụng lên cột GFC đã được chuẩn bị. Các phân đoạn từ cột GFC được phân tích bằng gel nhuộm Coomassie SDS-PAGE, và các phân đoạn chứa protein đích được gom. Vốn từ cột GFC được pha loãng vào dung dịch muối đệm thấp và phun lên cột Q-HP đã được chuẩn bị. Cột này được rửa bằng dung dịch muối đệm thấp cho đến khi đạt đến mức độ hấp thụ ranh giới A280, và được rửa giải bằng cách sử dụng 20 lần thể tích cột gradien từ 0mM NaCl đến 500mM NaCl. Một lần nữa, các phân đoạn từ cột Q-HP được phân tích bằng gel nhuộm Coomassie SDS-PAGE, và các phân đoạn chứa protein đích được gom. Vốn cuối cùng được thẩm tách vào dung dịch đệm bảo quản chứa 50% glyxerol và bảo quản ở -20°C . Vốn cuối cùng được thử nghiệm về hoạt tính theo thử nghiệm phosphoinositol kinaza.

IC_{50} được xác định theo thông lệ khớp đường cong bốn thông số cùng với cách "khớp trội". Phương trình logistic bốn thông số được áp dụng để tính trị số IC_{50} (IDBS XLfit) của tỷ lệ phần trăm mức độ ức chế mỗi hợp chất ở 8 nồng độ (thường là $10\mu\text{M}$, $3,0\mu\text{M}$, $1,0\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$, $0,1\mu\text{M}$, $0,030\mu\text{M}$, $0,010\mu\text{M}$ và $0,003\mu\text{M}$). Theo cách khác, trị số IC_{50} được tính bằng cách áp dụng mẫu idbsXLfit 204, mà là mẫu logistic 4 thông số.

Theo cách khác nữa, đối với thử nghiệm làm kiệt ATP, các hợp chất sẽ được thử được hòa tan trong DMSO và được phân phối một cách trực tiếp vào đĩa trắng loại 384 lỗ ở mức 0,5µl mỗi lỗ. Để bắt đầu phản ứng, 10µl dung dịch chứa 10nM PI3 kinaza và 5µg/ml 1-alpha-phosphatidylinositol (PI) được bổ sung vào từng lỗ, tiếp theo là 10µl dung dịch chứa 2µM ATP. Phản ứng được thực hiện cho đến khi kiệt khoảng 50% ATP, và sau đó được dừng bằng cách bổ sung 20µl dung dịch kinaza-Glo (do Promega Corp., Madison, WI, USA cung cấp) vào. Hỗn hợp phản ứng đã dừng được ủ trong thời gian 5 phút và sau đó ATP còn lại được phát hiện phát quang. Tiếp đó, trị số IC₅₀ được xác định. Theo một phương án của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta, trong đó khoảng hoạt tính, được thể hiện bằng IC₅₀, trong thử nghiệm enzym PI3K delta nằm trong khoảng từ 1nM đến 500nM.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta, trong đó khoảng hoạt tính, được thể hiện bằng IC₅₀, trong thử nghiệm enzym PI3K delta, nằm trong khoảng từ 1nM đến 100nM.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta, trong đó khoảng hoạt tính, được thể hiện bằng IC₅₀, trong thử nghiệm enzym PI3K delta nằm trong khoảng từ 0,5nM đến 10nM.

Theo một phương án của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta, trong đó khoảng hoạt tính, được thể hiện bằng IC₅₀, trong thử nghiệm PI3K delta tế bào nằm trong khoảng từ 1nM đến 1000nM.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta, trong đó khoảng hoạt tính, được thể hiện bằng IC₅₀, trong thử nghiệm PI3K delta tế bào nằm trong khoảng từ 1nM và 500nM.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta, trong đó chất ức chế thể hiện mức độ chọn lọc đối với dạng đồng chức năng PI3K delta so với một hoặc nhiều dạng đồng chức năng khác, trong đó mức độ chọn lọc này ít nhất gấp 10 lần.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta, trong đó chất ức chế thể hiện mức độ chọn lọc đối với dạng đồng chức năng PI3K delta so với một hoặc nhiều dạng đồng chức năng khác, trong đó mức độ chọn lọc này ít nhất gấp 20 lần.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta trong đó chất ức chế thể hiện mức độ chọn lọc đối với dạng đồng chức năng PI3K delta so với các paralog khác PI3K α và β , trong đó mức độ chọn lọc này ít nhất gấp 10 lần.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta trong đó chất ức chế thể hiện mức độ chọn lọc đối với dạng đồng chức năng PI3K delta so với các paralog khác PI3K α và β , trong đó mức độ chọn lọc này ít nhất gấp 20 lần.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta, trong đó khoảng hoạt tính, được thể hiện bằng IC_{50} , trong thử nghiệm PI3K delta tế bào nằm trong khoảng từ 1nM đến 500nM và trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta trong đó chất ức chế thể hiện mức độ chọn lọc đối với dạng đồng chức năng PI3K delta so với các paralog khác PI3K α và β , trong đó mức độ chọn lọc này ít nhất gấp 10 lần.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế PI3K, trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta, trong đó khoảng hoạt tính, được thể hiện bằng IC_{50} , trong thử nghiệm PI3K delta tế bào nằm trong khoảng từ 1nM đến

500nM và trong đó chất ức chế nêu trên có tác động ức chế đến dạng đồng chức năng PI3K delta trong đó chất ức chế thể hiện mức độ chọn lọc đối với dạng đồng chức năng PI3K delta so với các paralog khác PI3K α và β , trong đó mức độ chọn lọc này ít nhất gấp 20 lần.

2. Thử nghiệm tế bào

2.1 Phosphoryl hóa Akt 1/2 (S473) gián tiếp nhờ phosphoinositit-3 kinaza (PI3K) ở các tế bào Rat-1

Các tế bào Rat-1 biểu hiện quá mức một cách ổn định dạng đã được myristoyl hóa của cấu trúc siêu phân tử xúc tác phosphoinositit-3 kinaza (PI3K) alpha, beta hoặc delta của người được cho vào đĩa trong các đĩa loại 384 lỗ ở mật độ 7500 (PI3K alpha), 6200 (PI3K beta), hoặc 4000 (PI3K delta) tế bào trong 30ul môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh (môi trường Eagle đã được cải biến theo Dulbecco (DMEM chứa hàm lượng glucoza cao) có bổ sung 10% (thể tích) huyết thanh bào thai bê, 1% (thể tích) MEM axit amin không cơ bản, 10mM HEPES, 2mM L-glutamin, 10 μ g/ml puromyxin và 1% (thể tích) Penixilin/Streptomycin) và ủ ở 37°C/5%CO₂/95% độ ẩm trong thời gian 24 giờ. Các hợp chất được pha loãng trong các đĩa hỗn hợp loại 384 lỗ để thu được các dịch pha loãng theo 8 bậc trong 40 hợp chất thử nghiệm trong 90% DMSO, cũng như 4 hợp chất quy chiếu cộng với 16 đối chứng cao và 16 đối chứng thấp (ức chế). Các đĩa đã được pha loãng sơ bộ được chuẩn bị bằng cách pha bằng pipet 250nl dung dịch hợp chất vào các đĩa polypropylen loại 384 lỗ bằng cách sử dụng thiết bị pha chế cỡ nanolit Hummingwell. Các hợp chất được pha loãng sơ bộ bằng cách bổ sung 49,75ul môi trường sinh trưởng hoàn chỉnh. 10ul dung dịch hợp chất đã được pha loãng sơ bộ được chuyển sang đĩa tế bào bằng cách sử dụng pipet loại 384 lỗ, tạo ra nồng độ DMSO cuối cùng 0,11%. Các tế bào được ủ trong thời gian 1 giờ ở 37°C/5%CO₂/độ ẩm 95%. Dịch nổi được loại bỏ, các tế bào được phân giải trong 20ul dung dịch đệm phân giải để phát hiện AlphaScreen® SureFire®.

Để phát hiện p-AKT(Ser473), kit thử nghiệm SureFire® p-Akt 1/2 (Ser473) (do PerkinElmer, U.S.A cung cấp) được sử dụng. 5ul dịch phân giải tế bào được chuyển sang các đĩa proxi thể tích ít loại 384 lỗ để phát hiện bằng cách sử dụng pipet loại 384 lỗ. Việc bổ sung các chất phản ứng AlphaScreen® SureFire® vào được thực hiện theo quy trình

của nhà sản xuất. Trước hết, 5ul dung dịch đệm phản ứng cộng với hỗn hợp dung dịch đệm hoạt hóa chứa hạt thể nhận AlphaScreen® được bổ sung vào, đĩa này được bịt kín, và ủ trên thiết bị lắc đĩa trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Bước thứ hai, 2ul dung dịch đệm loãng chứa hạt thể cho AlphaScreen® được bổ sung vào, và đĩa này được ủ trên thiết bị lắc đĩa như trên trong thời gian 2 giờ nữa. Đĩa này được đọc trên thiết bị đọc đĩa tương thích AlphaScreen®, bằng cách áp dụng các thiết lập AlphaScreen® chuẩn.

2.2 Xác định mức độ hoạt hóa tế bào B của chuột

Đã nhận thấy rằng PI3K điều biến chức năng của tế bào B nếu các tế bào được kích thích thông qua thụ thể của tế bào B (BCR) (Okkenhaug *et al. Science* 297:1031 (2002)). Để đánh giá tính chất ức chế của các hợp chất đối với hoạt hóa tế bào B, việc điều biến tăng chất đánh dấu hoạt hóa CD86 và CD69 đối với tế bào B của chuột thu được từ kháng thể từ lá lách của chuột được đo sau khi kích thích bằng kháng IgM. CD69 là chất đánh dấu hoạt hóa đã biết đối với các tế bào B và các tế bào T (Sancho *et al. Trends Immunol.* 26:136 (2005)). CD86 (còn được gọi là B7-2) được biểu hiện chủ yếu ở tế bào trình diện kháng thể, kể cả tế bào B. Tế bào B nghỉ biểu hiện CD86 ở mức độ thấp, nhưng điều tiết tăng nó sau khi kích thích, ví dụ thụ thể BCR hoặc thụ thể IL-4. CD86 trên tế bào B tương tác với CD28 trên tế bào T. Tương tác này là cần thiết cho mức độ hoạt hóa tế bào T tối ưu và để tạo ra đáp ứng IgG1 tối ưu (Carreno *et al. Annu Rev Immunol.* 20:29 (2002)).

Lá lách của các con chuột nhắt Balb/c được gom, các tế bào lá lách được phân lập và được rửa hai lần bằng RPMI chứa 10% huyết thanh bào thai bê (FBS), 10mM HEPES, 100 đơn vị/ml penixilin/streptomycin. RPMI đã được bổ trợ theo cách này sau đó được gọi là môi trường. Các tế bào được điều chỉnh đến mật độ $2,5 \times 10^6$ tế bào/ml trong môi trường và 200µl huyền phù tế bào (5×10^6 tế bào) được bổ sung vào lỗ thích hợp của đĩa loại 96 lỗ.

Tiếp đó, các tế bào được kích thích bằng cách bổ sung 50µl mAb kháng IgM trong môi trường (nồng độ cuối cùng: 30µg/ml) vào. Sau khi ủ trong thời gian 24 giờ ở 37°C, các tế bào được nhuộm bằng hỗn hợp kháng thể dưới đây: FITC kháng CD86 của chuột, PerCP-

Cy5.5 kháng CD69 của chuột, PerCP kháng CD 19 của chuột để đánh giá về tế bào B, và FITC kháng CD3 của chuột, PE kháng CD69 của chuột để đánh giá về các tế bào T (2µl mỗi kháng thể/lỗ). Sau một giờ ở nhiệt độ trong phòng (rt) trong bóng tối, các tế bào được chuyển sang đĩa loại 96 lỗ sâu. Các tế bào được rửa một lần bằng 1ml PBS chứa 2% FBS và sau khi tạo huyền phù lại trong 200µl mẫu được phân tích trên thiết bị đếm tế bào theo lưu tốc FACS Calibur. Các tế bào lympho được chặn trong ô nét đứt FSC/SSC theo kích thước và mức độ hạt và được phân tích tiếp về mức độ biểu hiện của CD19, CD3 và các chất đánh dấu hoạt hóa (CD86, CD69). Dữ liệu được tính từ các vết chấm theo tỷ lệ phần trăm của tế bào đã nhuộm dương tính đối với chất đánh dấu hoạt hóa trong quần thể CD19+ hoặc CD3+ bằng cách áp dụng phần mềm BD CellQuest.

Để đánh giá tính chất ức chế của các hợp chất, trước hết các hợp chất được hòa tan và được pha loãng trong DMSO, tiếp theo là pha loãng theo tỷ lệ 1:50 trong môi trường. Các tế bào lá lách từ các con chuột nhắt Balb/c được phân lập, được tạo huyền phù lại và được chuyển sang các đĩa loại 96 lỗ như trên (200µl/lỗ). Các hợp chất đã được pha loãng hoặc dung môi được bổ sung vào các đĩa này (25µl) và ủ ở 37°C trong thời gian 1 giờ. Tiếp đó, giống cây được kích thích bằng 25µl mAb kháng IgM/lỗ (nồng độ cuối cùng 30µg/ml) trong thời gian 24 giờ ở 37°C và được nhuộm bằng FITC kháng CD86 của chuột và PerCP kháng CD 19 của chuột (2µl mỗi kháng thể/lỗ). Mức độ biểu hiện của CD86 trên tế bào B dương tính với CD19 được định lượng bằng cách đếm tế bào theo dòng như trên.

2.3 Xác định mức độ hoạt hóa tế bào B của chuột

Đã thấy rằng PI3Kδ điều biến chức năng của tế bào B nếu các tế bào được kích thích thông qua thụ thể của tế bào B (BCR) (Okkenhaug *et al. Science* 297:1031 (2002)). Để đánh giá tính chất ức chế của các hợp chất đối với việc hoạt hóa tế bào B, mức độ điều biến tăng chất đánh dấu hoạt hóa CD86 trên tế bào B của chuột thu được từ máu nguyên chất được đo sau khi kích thích bằng kháng IgM và tái tổ hợp IL-4. Phân tử CD86 (còn được gọi là B7-2) được biểu hiện chủ yếu ở tế bào trình diện kháng thể, kể cả tế bào B. Tế bào B nghỉ biểu hiện CD86 ở mức độ thấp, nhưng điều tiết tăng nó sau khi kích thích, ví dụ thụ thể BCR hoặc thụ thể IL-4. CD86 trên tế bào B tương tác với CD28 trên tế bào

T. Tương tác này là cần thiết để hoạt hóa tối ưu tế bào T và để gây ra đáp ứng IgG1 tối ưu (Carreno *et al. Annu Rev Immunol.* 20:29 (2002)).

Gom máu chuột

Máu nguyên chất được gom từ động mạch chủ ở vùng bụng của con chuột đực Lewis trưởng thành (LEW/HanHsd) bằng cách sử dụng xiranh loại dung tích 10ml có kim dùng để tiêm dưới da đã được bao sơ bộ bằng natri heparin. Máu được chuyển vào các ống nghiệm Falcon loại dung tích 50ml và nồng độ chất chống đông được điều chỉnh đến 100U/ml.

Kích thích tế bào B của chuột và xử lý bằng chất ức chế cụ thể

Để đánh giá về các tác dụng *in vitro* của các thuốc ức chế miễn dịch, máu đã xử lý bằng heparin được pha loãng sơ bộ đến 50% bằng môi trường. Môi trường được dùng là DMEM chứa hàm lượng glucoza cao (sản phẩm theo danh mục của Animed số 1-26F01-I) có bổ sung 100U/ml penixilin, 100mg/ml streptomycin, 2mM L-glutamin, 50mg/ml dextran 40 và 5% huyết thanh bào thai bê (FCS, Fetaclone I, Gibco #10270-106). Sau đó, 190µl máu đã được pha loãng sơ bộ được pha chế với 10µl hợp chất thử nghiệm đã được pha loãng sơ bộ trong các đĩa vi chuẩn độ đáy chữ U loại 96 lỗ (do Nunc cung cấp) tạo ra dịch pha loãng theo bậc 3 lần với nồng độ nằm trong khoảng từ 20µM đến 0,0003µM. Các lỗ đối chứng được xử lý sơ bộ bằng DMSO để thu được nồng độ cuối cùng 0,5% DMSO. Giồng cấy được thiết lập lặp lại 2 lần, được trộn kỹ bằng cách khuấy trên thiết bị lắc đĩa (Heidolph Titramax 101; 30 giây, tốc độ 900), dùng pipet hút lên và xuống và được khuấy lại trên thiết bị lắc đĩa này. Giồng cấy được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong thời gian 1 giờ. Sau đó, 20µl kháng thể (Ab) đa dòng của dê kháng IgM của chuột (Serotec, số danh mục sản phẩm 302001) và 10µl rIL-4 tái tổ hợp đã được pha loãng (sản phẩm theo danh mục của Immunotools số # 340085) được bổ sung vào để lần lượt thu được nồng độ cuối cùng 30µg/ml và 5ng/ml. Các đĩa được trộn bằng cách khuấy trên thiết bị lắc đĩa như trên và ủ trong 24 giờ ở 37°C, 5% CO₂.

Xác định mức độ hoạt hóa tế bào B bằng cách đếm tế bào theo dòng

Sau khi ủ, 15µl dung dịch EDTA 25mM được bổ sung vào mỗi lỗ và được lắc trong thời gian 15 phút để tách các tế bào bám dính. Để phân tích mức độ hoạt hóa chất đánh dấu bề mặt, các mẫu được nhuộm bằng kháng CD45RA của chuột đã được đánh dấu bằng PE-

Cy5 (sản phẩm theo danh mục của BD số # 557015) để cho phép chặn trên tế bào B trong phân tích FAC. Ngoài ra, các mẫu được nhuộm bằng kháng CD86 của chuột đã được đánh dấu bằng PE (sản phẩm theo danh mục của BD số #551396). Tất cả các quy trình nhuộm được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút trong bóng tối. Sau khi ủ, các mẫu được chuyển sang các đĩa vi chuẩn độ đáy chữ V loại có 96 lỗ sâu (sản phẩm theo danh mục của Corning số # 396096) chứa 2ml/lỗ dung dịch phân giải BD (sản phẩm theo danh mục của BD số # 349202). Sau khi phân giải hồng cầu, các mẫu được rửa bằng 2ml CellWASH (sản phẩm theo danh mục của BD số # 349524). Dữ liệu thu được trên thiết bị đếm tế bào theo lưu tốc LSRII hoặc FACScalibur (do BD Biosciences cung cấp) lần lượt bằng cách áp dụng phần mềm Cellquest Plus hoặc DIVA (phiên bản 6.1.1). Các tế bào lympho được chặn trong vết chấm FSC/SSC theo kích thước và mức độ hạt và được phân tích tiếp về mức độ biểu hiện của CD45RA và chất đánh dấu hoạt hóa. Dữ liệu được tính từ vết chấm hoặc biểu đồ theo tỷ lệ phần trăm tế bào đã nhuộm dương tính đối với chất đánh dấu hoạt hóa trong quần thể CD45RA+.

Đánh giá thống kê

Mức độ ức chế hoạt hóa tế bào B tính theo tỷ lệ phần trăm sau khi tiếp xúc với thuốc được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ mức độ ức chế} = 100 \times \frac{\text{mức độ kích thích không có thuốc} - \text{mức độ kích thích bằng thuốc}}{\text{kích thích không có thuốc} - \text{không kích thích}}$$

Phần mềm ORIGIN 7 (do OriginLab Corporation, Northampton, MA cung cấp) được áp dụng để khớp đường cong hồi quy phi tuyến tính. Nồng độ thuốc gây ra ức chế ở mức độ 50% (IC₅₀) đạt được bằng cách khớp phương trình Hill với dữ liệu ức chế.

2.4 Xác định IL-6 do TLR9 gây ra ở tế bào lá lách của chuột

Điều chế huyền phù tế bào đơn từ lá lách của chuột

Lá lách được lấy ra từ chuột nhắt C57BL/6 ngay sau khi cho chết không đau. Mỡ thừa được lọc bớt khỏi lá lách trước khi nghiền lá lách qua thiết bị lọc tế bào cỡ 0,4μM bằng cách sử dụng pittong từ xiranh loại dung tích 5ml. Huyền phù tế bào đơn được điều chế và thể tích được điều chỉnh đến 15ml trong ống nghiệm Falcon loại dung tích 50ml bằng cách sử dụng PBS lạnh. Các tế bào được ly tâm với tốc độ 1500 vòng/phút trong thời

gian 5 phút ở 4°C độ trước khi loại bỏ dịch nổi và tạo huyền phù lại trong 5ml dung dịch đệm phân giải tế bào hồng cầu đối với mỗi lá lách và ủ trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Nước đá PBS lạnh (30ml) được bổ sung vào các tế bào trước khi ly tâm ở 1500 vòng/phút trong thời gian 5 phút ở 4°C. Dịch nổi được loại bỏ và các tế bào được rửa hai lần bằng 40ml môi trường nuôi cấy tế bào lá lách của chuột (MSCM). MSCM bao gồm RPMI có bổ sung 100 đơn vị/ml penixilin và 100µg/ml streptomycin, 1 x axit amin không cơ bản, 1mM natri pyruvat, 0,05mM β-mercaptoetanol, và 10% huyết thanh bào thai bê (FBS) đã được hoạt hóa bằng hepatin. Các tế bào được tạo huyền phù lại trong 10ml đến 20ml MSCM và đếm bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào Countess. Khoảng 60×10^6 tế bào lá lách thu được từ một C57BL/6 lá lách của chuột.

Kích thích tế bào lá lách của chuột và xử lý bằng chất ức chế đặc hiệu

Các tế bào lá lách được cho vào đĩa ở mật độ cuối cùng 2×10^5 tế bào/lỗ trong thể tích 100µl trong các đĩa đáy phẳng loại 96 lỗ và ủ trong buồng ủ đã được tạo ẩm ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 2 giờ đến 4 giờ. Sau đó, các hợp chất sẽ được thử được phân tán bằng cách sử dụng máy xử lý chất lỏng tự động bằng cách sử dụng đĩa hợp chất gốc đã được điều chế từ trước. Các đĩa gốc chứa các hợp chất (theo tỷ lệ 90%/10% DMSO/ddH₂O) được tạo mảng ở 8 điểm đến 10 điểm bằng cách sử dụng dịch pha loãng 2 lần hoặc dịch pha loãng 3 lần. Máy xử lý chất lỏng phân chia 1µl mỗi dịch pha loãng từ đĩa hợp chất nguồn đã được điều chế từ trước vào lỗ đích thích hợp vào trong đĩa loại 96 lỗ. Nồng độ ban đầu cuối cùng của các hợp chất trong dịch nuôi cấy tế bào là 10µM. Nồng độ cuối cùng DMSO trong tế bào giống cấy là 0,5%. Các tế bào được ủ với các hợp chất trong thời gian 1 giờ trước khi bổ sung phối tử TLR vào. Sau đó, dịch cô 10x EC₈₀ CpG1826 được bổ sung vào trong thể tích 20µl (để có thể tích giống cấy cuối cùng là 200µl), sau đó giống cấy được ủ qua đêm trong buồng ủ đã được tạo ẩm ở nhiệt độ 37°C.

Xác định interleukin-6 theo phương pháp ELISA

Sau khi nuôi cấy qua đêm, các đĩa được ly tâm với tốc độ 2000 vòng/phút trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, 150µl mỗi dịch nuôi cấy được chuyển sang các đĩa đáy chữ V loại 96 lỗ và nồng độ IL-6 được đo bằng cách sử dụng kit ELISA theo phương pháp kẹp dành cho IL-6 của chuột có bán trên thị trường. Một cách vắn tắt, các đĩa này được bao qua đêm bằng kháng thể bắt giữ trước khi phong bế trong thời gian 1

giờ bằng PBS/0,1% BSA. Các mẫu và các chất chuẩn được bổ sung vào trong thể tích 50 μ l và đĩa này được ủ trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi loại bỏ chất chuẩn/mẫu, đĩa này được rửa bằng cách sử dụng PBS/0,05% Tween trước khi bổ sung 50 μ l kháng thể dò đã được biotinyl hóa vào, sau đó đĩa này được ủ trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng và khuấy. Các đĩa được rửa lại trước khi bổ sung 50 μ l streptavidin-peroxidaza của cây củ cải cay vào mỗi lỗ trong thời gian 20 phút. Sau các lần rửa đĩa bổ sung, 50 μ l cơ chất TMB được bổ sung vào từng lỗ và các đĩa được ủ trong thời gian 20 phút trước khi bổ sung 25 μ l dung dịch dừng vào mỗi lỗ. Nồng độ IL-6 được đo bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa SpectraMax 190 (450nm) và phân tích bằng cách áp dụng phần mềm SoftMax Pro và GraphPad Prism.

2.5 Xác định IFN α do TLR9 gây ra ở tế bào đơn nhân của máu ngoại vi (PBMC) của người

Điều chế PBMC từ máu tươi của người

Máu của người (khoảng 75ml) được gom trong 10 ống nghiệm S-Monovette chứa Heparin (S-Monovette 7,5ml NH Heparin 16 đơn vị quốc tế/ml máu; Starstedt). Các ống nghiệm Leucosep™ (30ml #227290; Greiner Bio-one) được chuẩn bị bằng cách bổ sung 15ml môi trường tách tế bào lympho LSM1077™ vào mỗi ống nghiệm (#J15-004; PAA Laboratories) và ly tâm trong thời gian 30 giây với tốc độ 1000g. Khoảng 25ml máu được chuyển sang các ống nghiệm Leucosep™ sau khi pha loãng bằng phần PBS ngang bằng (không có Ca²⁺/Mg²⁺; #14190-094). Các mẫu được ly tâm với tốc độ 800g trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 22°C bằng cách sử dụng máy ly tâm Eppendorf 5810R không có phanh. Lớp PBMC được lấy một cách cẩn thận ra khỏi bề mặt chung giữa huyết tương: môi trường tách và chuyển vào ống nghiệm sạch loại dung tích 50ml. Các tế bào được rửa một lần bằng cách bổ sung PBS (đến 45ml) vào và được ly tâm (1400 vòng/phút, 10 phút ở nhiệt độ 22°C) có phanh (đặt tốc độ ở mức 9) bằng cách sử dụng Eppendorf 5810R. Các tế bào đã kết viên được tạo huyền phù lại một cách cẩn thận trong môi trường (RPMI 1640+GlutaMAX-I, 0,05mM 2-mercaptoetanol, 10mM HEPES và 5% thể tích FCS) và các mẫu được gom. Các thành phần của môi trường 2-mercaptoetanol (#31350-010; 50mM), Hepes (#15630-056, 1M) và RPMI 1640 (1x) + GlutaMAX-I (#61870-010) nhận được từ Gibco. FCS (#2-01F36-1) nhận được từ Amimed. PBMC được đếm bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào tự động Countess® (mẫu được pha

loãng sơ bộ theo tỷ lệ 1:10 trong môi trường, trước khi bổ sung Trypan Blue với thể tích ngang bằng (10 μ l) vào). Tế bào được pha loãng đến mật độ 4×10^6 tế bào/ml và được cấy trong các đĩa loại 384 lỗ (#353962; do Becton Dickinson AG cung cấp) để tạo ra thể tích cuối cùng 25 μ l (tức là 1×10^5 tế bào/lỗ).

Kích thích PBMC và xử lý bằng chất ức chế đặc hiệu

Các hợp chất được pha loãng sơ bộ trong 100% thể tích DMSO (#41640-100ml; do Sigma-Aldrich cung cấp), tiếp theo chuyển vào môi trường (để đạt nồng độ DMSO cuối cùng 0,25%). Các tế bào được xử lý bằng dịch pha loãng hợp chất thích hợp (5 μ l) hoặc đối chứng chất dẫn (5 μ l) và ủ trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C trong buồng ủ đã được tạo ẩm trong không khí gồm 5% (thể tích) CO₂. Các tế bào được kích thích bằng CpG2216 (0,3 μ M; #tlrl-hodna; do Invivogen cung cấp) hoặc đối chứng chất dẫn (10 μ l/lỗ) và ủ trong thời gian 20 giờ. Các đĩa được ly tâm trong một thời gian ngắn (200 x g trong thời gian 2 phút ở nhiệt độ 22°C) và các mẫu dịch nổi (30 μ l) được loại ra để định lượng nồng độ IFN α .

Định lượng IFN α bằng cách áp dụng công nghệ AlphaLisa

Để định lượng IFN α , kit AlphaLISA chứa interferon của người (#AL264F) do PerkinElmer cung cấp được sử dụng. Hỗn hợp kháng thể chứa hạt thể nhận kháng IFN α (cuối cùng 5 μ g/ml) và kháng IFN α của kháng thể đã được biotinyl hóa (cuối cùng 0,5nM) được điều chế mới và được phân phối (5 μ l) vào Optiplates™ loại 384 lỗ (#6007299; do PerkinElmer cung cấp). Dịch pha loãng chứa chuẩn IFN α đã biết (IFN α B (2b) của người) được điều chế và cùng với dịch nổi tế bào (5 μ l) được bổ sung vào các đĩa nêu trên. Các đĩa được ly tâm trong một thời gian ngắn (xung ở 200g), phủ bằng màng bịt kín bám dính, được xoay và ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Hạt thể cho đã bao bằng streptavidin (20 μ g/ml cuối cùng) được chuẩn bị và bổ sung vào từng lỗ (5 μ l) trong vùng tối (hỗn hợp nhạy đối với ánh sáng). Các đĩa được ủ 30 phút ở nhiệt độ trong phòng (các đĩa không được ly tâm hoặc phủ). Sau khi ủ, các đĩa này được đọc bằng đầu đọc nhiều đĩa EnVision™ có lắp tùy chọn ALPHA bằng cách sử dụng “thiết lập chuẩn AlphaScreen” của chính dụng cụ (ví dụ, tổng thời gian đo: 550 phần nghìn giây, thời gian kích thích laser 680nm: 180 phần nghìn giây, gương: D640 như, bộ

lọc phát xạ: M570w, bước sóng trung tâm 570nm, bề ngang của dải 100nm, hệ số truyền 75%). Dữ liệu được gom để phân tích và định lượng nồng độ IFN α .

Đánh giá và phân tích dữ liệu

Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng Excel XL fit 4.0 (Microsoft) có thêm vào XLfit (IDBS; phiên bản 4.3.2). Nồng độ IFN α đặc hiệu được xác định sau khi ngoại suy với đường cong chuẩn bằng cách sử dụng IFN α B (2b) của người. Trị số IC₅₀ của từng hợp chất được xác định theo cách hồi quy phi tuyến tính sau khi khớp đường cong với các dữ liệu thử nghiệm.

3. Xác định mức độ sản sinh kháng thể đối với tế bào hồng cầu của cừu (SRBC)

Một cách vắn tắt, chuột to OFA được tiêm hồng cầu của cừu qua đường tĩnh mạch vào ngày 0 và được điều trị qua đường miệng trong bốn ngày liên tục (ngày 0 đến ngày 3) bằng các hợp chất đang thử nghiệm. Huyền phù của tế bào lá lách được chuẩn bị vào ngày 4 và các tế bào lympho được cho vào đĩa trên aga mềm khi có mặt tế bào chỉ thị (SRBC) và chất phụ trợ. Sự phân giải tế bào chỉ thị do tiết kháng thể đặc hiệu đối với SRBC (chủ yếu thuộc phân nhóm IgM) và sự có mặt của chất phụ trợ tạo mảng. Số lượng mảng trong mỗi đĩa được đếm và được thể hiện là số mảng cho mỗi lá lách.

Gây miễn dịch: các nhóm gồm năm chuột to OFA cái được gây miễn dịch vào ngày 0 với 2×10^8 /ml SRBC (thu được từ Laboratory Animal Services LAS, Novartis Pharma AG) trong thể tích 0,5ml cho mỗi con chuột bằng cách tiêm tĩnh mạch.

Điều trị bằng hợp chất: động vật được điều trị bằng hợp chất được tạo huyền phù trong 0,5% CMC, 0,5% Tween80 trong thời gian 4 ngày liên tục (các ngày 0, 1, 2 và 3) bắt đầu vào ngày gây miễn dịch. Hợp chất được dùng qua đường miệng hai lần mỗi ngày và giữa các liều cách 12 giờ trong thể tích áp dụng 5ml/kg thể trọng.

Chuẩn bị huyền phù của tế bào lá lách:

Vào ngày 4, động vật được cho chết không đau bằng CO₂. Lá lách được loại bỏ, cân, và được đặt vào các ống nghiệm nhựa chứa 10ml dung dịch muối Hank đã được cân bằng (HBSS; Gibco, độ pH=7,3, chứa 1mg Phenolred/100ml) lạnh (4°C) đối với mỗi lá lách của chuột. Lá lách được đồng nhất hóa bằng bình thủy tinh, để trên nước đá trong thời gian 5 phút và 1ml dịch nổi được chuyển vào ống nghiệm mới. Tế bào được rửa một lần

trong 4ml HBSS, sau đó dịch nổi được gạn và viên được tạo huyền phù lại trong 1ml HBSS. Số tế bào lympho đối với mỗi lá lách được xác định bằng thiết bị đếm tế bào tự động và huyền phù của tế bào lá lách được điều chỉnh đến nồng độ tế bào $30 \times 10^6/\text{ml}$.

Thử nghiệm tạo mảng:

Các đĩa petri aga mềm được điều chế với 0,7% agarosa (SERVA) trong HBSS.

Ngoài ra, một ml agarosa 0,7% được điều chế trong các ống nghiệm làm bằng chất dẻo và giữ ở nhiệt độ 48°C trong bể nước. Khoảng 50 μl huyền phù tế bào lá lách $30 \times 10^6/\text{ml}$ và 50 μl SRBC ở mật độ $40 \times 10^8/\text{ml}$ được bổ sung vào, được trộn nhanh (Vortex) và được rót vào các đĩa agarosa đã được chuẩn bị. Các đĩa petri được đặt hơi nghiêng để phân bố đều hỗn hợp tế bào trên lớp agarosa. Các đĩa này được để ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút và sau đó được ủ ở 37°C trong thời gian 60 phút. Sau đó, 1,4ml bổ trợ chuột lang (Harlan; 10%) được bổ sung vào và bước ủ được tiếp tục trong thời gian 60 phút nữa ở 37°C . Các kháng thể đặc hiệu SRBC được giải phóng bởi tế bào B cấy trên đĩa liên kết với kháng nguyên (SRBC) trong vùng lân cận của chúng. Các phức kháng nguyên-kháng thể này được hoạt hóa bổ trợ và dẫn đến sự phân giải của SRBC để lại vết (mảng) sáng trong lớp hồng cầu. Các mảng được đếm bằng kính hiển vi.

Công thức dưới đây để xác định mức độ ức chế tạo mảng được áp dụng:
 $\% \text{ Ức chế} = \frac{C}{V} \times 100$

trong đó: V = số lượng mảng trung bình/lá lách đối với nhóm dùng chất dẫn;
 C= số lượng mảng trung bình/lá lách đối với nhóm đã được xử lý bằng hợp chất

Tài liệu viện dẫn:

N.K. Jerne & A.A. Nordin (1963) Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. Science 140:405.

N.K. Jerne, A.A. Nordin & C. Henry (1963) The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. In: "Cell Bound Antibodies", B. Amos & H. Koprowski, Eds., Wistar Inst. Press, Philadelphia pp,109-125.

Dữ liệu sinh học

Thử nghiệm enzym

Ví dụ	PI3K alpha (uM)	PI3K delta (uM)
-------	-----------------	-----------------

F1	0,109	0,003
-----------	-------	-------

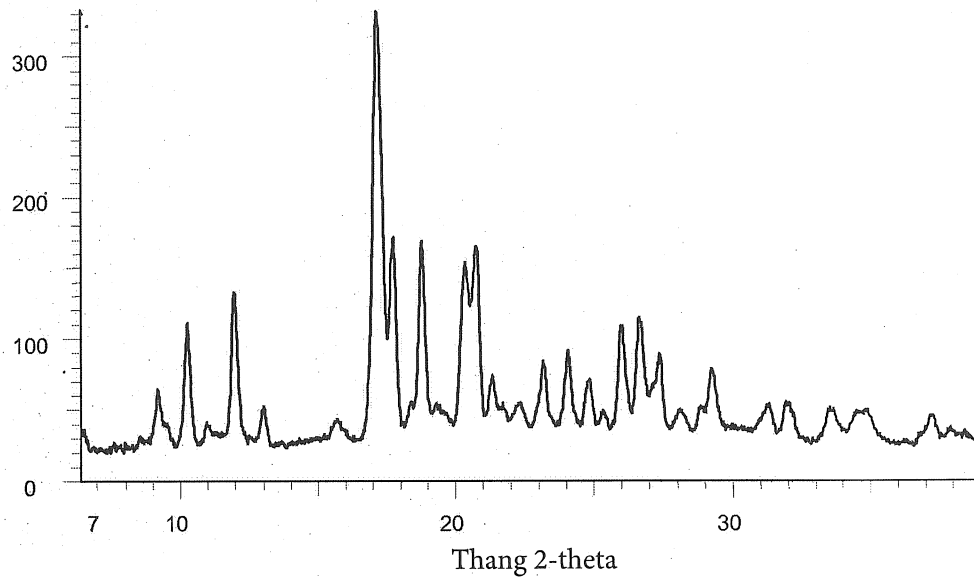
Thử nghiệm tế bào

Ví dụ	Tế bào PI3Kδ/ IC50 [umol l-1]	RWB/ IC50 CD86 [nmol l-1]
F1	0,011	7

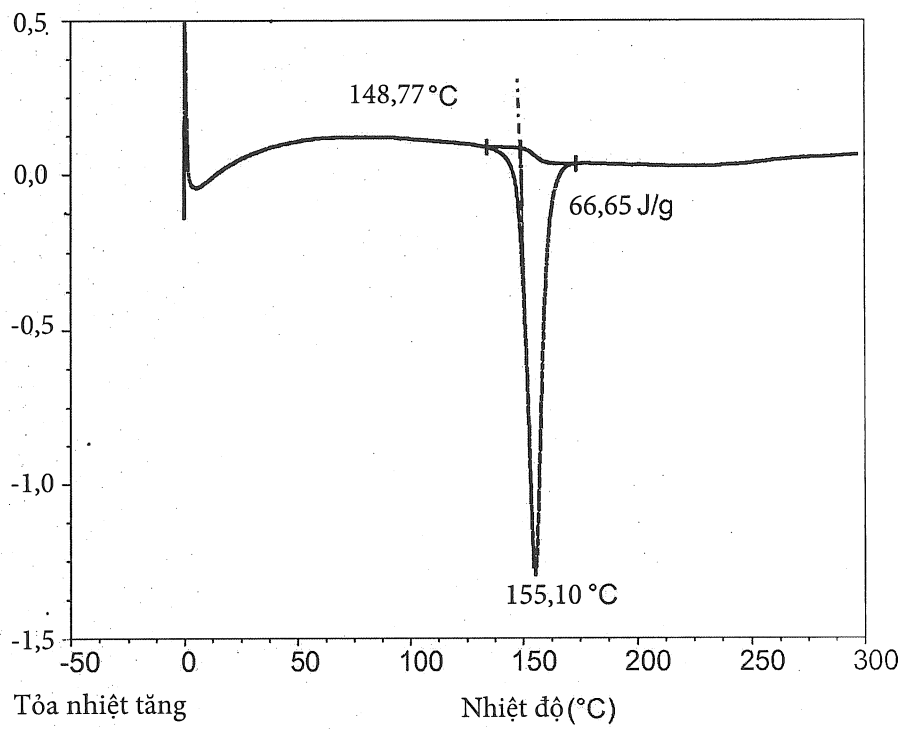
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất (1,1-dioxo-hexahydro-1 λ 6*-thiopyran-4-yl)-{(S)-3-[1-(6-methoxy-5-methyl-pyridin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-b][1,4]oxazin-7-ylloxy]-pyrrolidin-1-yl}-metanon ở dạng tinh thể khan.
2. Hợp chất ở dạng tinh thể khan theo điểm 1, khác biệt ở chỗ mẫu nhiễu xạ bột tia X gồm các đỉnh sau ở độ 2-theta $\pm$ 0,2 độ: 9,1, 10,2, 11,9, 13,0, 17,1, 17,7, 18,7, 20,3, 20,8, 26,0, 26,7, 23,2, 24,1, 24,8, 29,3, 27,4, và 21,4.
3. Hợp chất ở dạng tinh thể khan theo điểm 1, trong đó phổ nhiễu xạ tia X về cơ bản giống như phổ nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Hình 1.
4. Hợp chất ở dạng tinh thể khan theo điểm 1, trong đó đồ thị phân tích đo nhiệt lượng quét vi phân như được thể hiện trên Hình 2.
5. Tổ hợp chứa lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và một hoặc nhiều dược chất.
6. Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

Hình 1
Lin (số đếm)



Hình 2
Dòng nhiệt (W/g)



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Novartis AG	
<120>	CHẤT DẪN XUẤT CỦA ĐIIHYĐRO-PYRIDO-OXAZINE Ở DẠNG RẮN	
<130>	PAT055990A	
<160>	21	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	28	
<212>	ADN	
<213>	Nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi	
<400>	1. cgagaatatg atagattata tgaagaat	28
<210>	2	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi	
<400>	2 tggtttaatg ctgttcatac gtttgtcaat	30
<210>	3	
<211>	76	
<212>	ADN	
<213>	Nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi	
<400>	3 gggacaagtt tgtacaaaaa agcaggctac gaaggagata tacatatgcg agaatatgat agattatatg aagaat	60 76
<210>	4	
<211>	66	
<212>	ADN	
<213>	Nhân tạo	

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 4

taccataatt ccaccaccac caccggaat tccccctggg ttaatgctgt tcatacgttt 60

gtcaat 66

<210> 5

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 5

ctagtgggaat gtttactacc aaatgg 26

<210> 6

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 6

gttcaatgca tgctgtttaa ttgtgt 26

<210> 7

<211> 63

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 7

gggggaattt ccggtgggtg tgggtggaatt atggtactag tggaatgttt actaccaaatt 60

gga 63

<210> 8

<211> 56

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 8

agctccgtga tggatgatggg gatgtgctcc gttcaatgca tgctgtttaa ttgtgt 56

<210> 9

<211> 61

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 9

gggaccactt tgtacaagaa agctggggtt aagctccgtg atggatgatgg tgatgtgctc 60

c 61

<210> 10

<211> 42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 10

gctagcatgc gagaatatga tagattatat gaagaatata cc 42

<210> 11

<211> 45

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 11

gcctccacca cctccgcctg gtttaatgct gttcatagct ttgtc 45

<210> 12

<211> 42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 12

tactagtccg cctccaccac ctccgcctcc accacctccg cc 42

<210> 13
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 13
 actgaagcat cctcctcctc ctctcctgg tttaatgctg ttcatacgtt tgtc 54

<210> 14
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 14
 agctccgtga tggatgatgg gatgtgctcc agatctgtag tctttccgaa ctgtgtg 57

<210> 15
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 15
 gggaccactt tgtacaagaa agctgggttt aagctccgtg atggatgatgg tgatgtgctc 60

c 61

<210> 16
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 16
 tectctcct cctcctcctg gtttaatgct gttcatacgt ttgtc 45

<210> 17
 <211> 26

<212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi

 <400> 17
 atgccccctg ggggtggactg ccccat 26

 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi

 <400> 18
 ctactgcctg ttgtctttgg acacgt 26

 <210> 19
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi

 <400> 19
 attaaaccag gaggaggagg aggaggaccc cctgggggtgg actgccccat gga 53

 <210> 20
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi

 <400> 20
 agctccgtga tggatgatgg gatgtgctcc ctgcctgttg tctttggaca cgttgt 56

 <210> 21
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 21

gggaccactt tgtacaagaa agctggggtt aagctccgtg atggtgatgg tgatgtgctc 60

c

61