



(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)



1-0030381

(51)⁷ C07D 405/06; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2016-04662

(22) 13/05/2015

(86) PCT/US2015/030464 13/05/2015

(87) WO 2015/175594 19/11/2015

(30) 61/993,423 15/05/2014 US

(45) 25/12/2021 405

(43) 26/06/2017 351A

(73) EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)

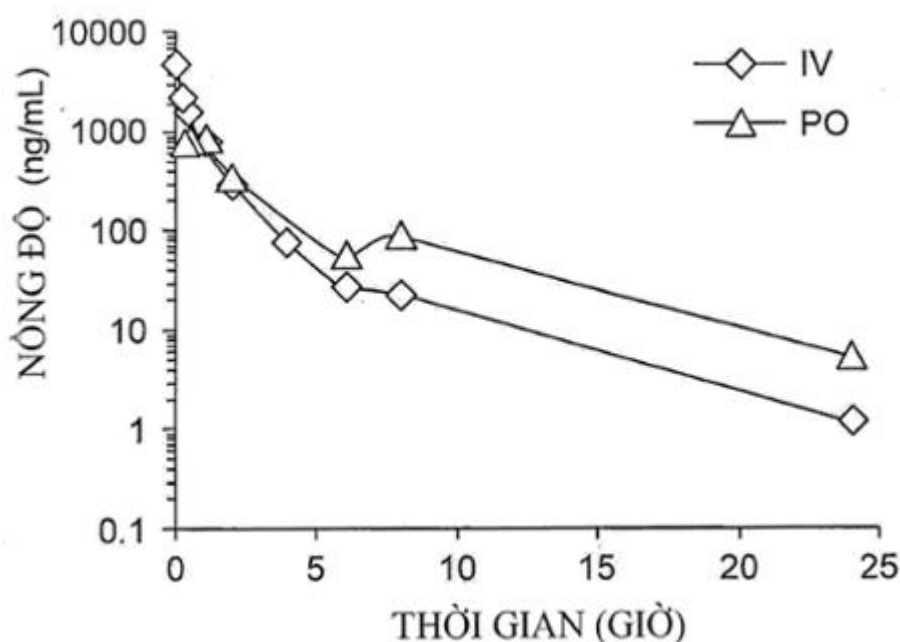
6-10 Koishikawa, 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, Japan

(72) KEANEY, Gregg F. (US); WANG, John (US); GERARD, Baudouin (FR); ARAI, Kenzo (JP); LIU, Xiang (CN); ZHENG, Guo Zhu (US); KIRA, Kazunobu (JP); TIVITMAHAISOON, Parcharee (US); PRAJAPATI, Sudeep (NP); GEARHART, Nicholas C. (US); KOTAKE, Yoshihiko (JP); NAGAO, Satoshi (JP); KANADA SONOBE, Regina (BR); MIYANO, Masayuki (JP); MURAI, Norio (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT PLADIENOLIT PYRIDIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất pladienolit pyridin và dược phẩm chứa hợp chất này. Các hợp chất này có thể hữu ích trong việc điều trị ung thư, đặc biệt là các bệnh ung thư mà đã biết là có thể sử dụng chất hướng đích vào phân tử cắt-nối và các đột biến trong đó.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất hợp chất hữu cơ và dược phẩm chứa hợp chất này. Các hợp chất này là hữu ích trong việc điều trị ung thư, đặc biệt là các bệnh ung thư mà đã biết là có thể sử dụng chất hướng đích vào phần tử cắt-nối và các đột biến trong đó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ở các sinh vật có nhân điển hình, ARN thông tin vừa mới được tổng hợp thường có nhiều intron, mà nó được cắt để tạo ra ARN thông tin trưởng thành. Phần tử cắt-nối là cấu trúc phức tạp siêu phân tử thực hiện nhiệm vụ này. Phần tử cắt-nối cấu thành năm ARN nhân nhỏ (snARN; U1-6) kết hợp với các loại protein. Đã phát hiện được các đột biến trong gen của phần tử cắt-nối trong các loại các bệnh ung thư khác nhau.

Ví dụ, đột biến trong cấu trúc siêu phân tử 1 của yếu tố tách intron 3B (SF3B1) của phần tử cắt-nối tồn tại trong nhiều loại bệnh ung thư và chứa đích của tác nhân chống ung thư. Các bệnh ung thư này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndrome-MDS), bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (chronic lymphocytic leukemia-CLL), bệnh bạch cầu tủy đơn nhân mạn tính (chronic myelomonocytic leukemia-CMML), và bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (acute myeloid leukemia-AML), và khối u rắn như ung thư vú và u hắc mạc.

Các hợp chất phân lập được từ vi khuẩn *Streptomyces platensis* (Sakai, Takashi; Sameshima, Tomohiro; Matsufuji, Motoko; Kawamura, Naoto; Dobashi, Kazuyuki; Mizui, Yoshiharu. Pladienolides, New Substances from Culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Screening. *The Journal of Antibiotics*. 2004, Vol. 57, No,3.), được gọi là pladienolit và phát hiện được trong khi sàng lọc chất ức chế cho chất kích hoạt yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (vascular endothelial growth factor-VEGF), ức chế sự biểu hiện gen thông báo được kiểm soát bởi chất kích hoạt VEGF của người, việc ức chế nó đã biết là cơ chế tác dụng hữu ích đối với tác nhân chống ung thư.

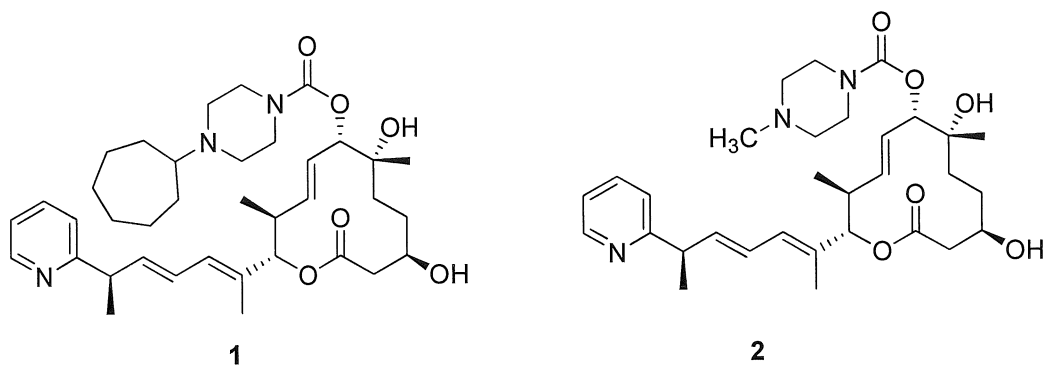
Các hợp chất này còn ức chế sự tăng sinh của tế bào u thần kinh đệm U251 của người *in vitro*. Hợp chất công hiệu nhất trong số các hợp chất này, Pladienolit B, ức chế sự biểu hiện gen được kích hoạt bởi VEGF với IC₅₀ bằng 1,8nM, và ức chế sự

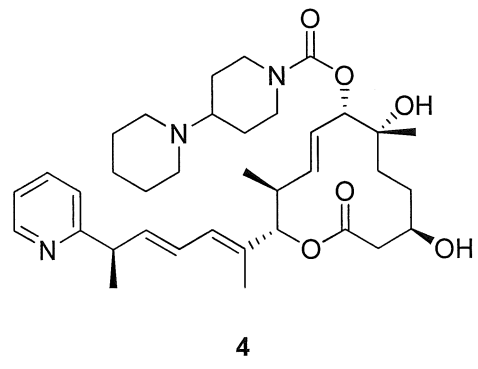
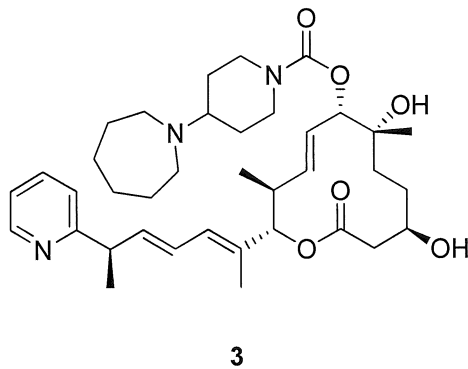
tăng sinh u thần kinh đệm với IC₅₀ bằng 3,5nM. Công thức cấu tạo của pladienolit B là đã biết, (Sakai, Takashi; Sameshima, Tomohiro; Matsufuji, Motoko; Kawamura, Naoto; Dobashi, Kazuyuki; Mizui, Yoshiharu. Pladienolides, New Substances from Culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. II. Physico-chemical Properties and Structure Elucidation. *The Journal of Antibiotics*. Vol. 57, No. 3. (2004)) và pladienolit B là đã biết là hướng đích phần tử cắt-nối SF3b để ức chế việc tách intron và thay đổi kiểu biểu hiện gen (Kotake et al., "Splicing factor SF3b as a target of antitumor natural product pladienolide", *Nature Chemical Biology* 2007, 3, 570-575).

Hợp chất pladienolit B nhất định, cũng như các hợp chất pladienolit khác, cũng là đã biết, như được bộc lộ trong các đơn yêu cầu cấp patent sau: WO 2002/060890; WO 2004/011459; WO 2004/011661; WO 2004/050890; WO 2005/052152; WO 2006/009276; và WO 2008/126918. Ví dụ, hợp chất pladienolit, (8E,12E,14E)-7-((4-xycloheptylpiperazin-1-yl)cacbonyl)oxy-3,6,16,21-tetrahydroxy-6,10,12,16,20-pentametyl-18,19-epoxytricos-8,12,14-trien-11-olit, còn được gọi là E7107, là chất dẫn xuất bán tổng hợp của sản phẩm pladienolit D tự nhiên, và kết quả của nghiên cứu Pha I của nó đã được thông báo. Tuy nhiên, cũng cần tìm ra các tác nhân bổ sung hữu ích trong việc điều trị ung thư, đặc biệt là các bệnh ung thư mà trong đó tác nhân hướng vào phần tử cắt-nối và các đột biến trong đó được biết là hữu ích.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất có công thức 1 ("hợp chất 1"), hợp chất có công thức 2 ("hợp chất 2"), hợp chất có công thức 3 ("hợp chất 3"), và hợp chất có công thức 4 ("hợp chất 4"):





và muối được dụng của nó.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất được phẩm chứa hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 4, hoặc muối được dụng của nó. Các được phẩm này có thể được bào chế với một hoặc nhiều chất mang được dụng. Các được phẩm này được bào chế để sử dụng qua các đường dùng thông thường khác nhau, bao gồm dùng trong tĩnh mạch, qua đường miệng, dưới da, hoặc trong bắp.

Sáng chế còn đề xuất hợp chất để dùng trong phương pháp điều trị vật chủ mắc bệnh ung thư bao gồm bước cho vật chủ dùng lượng hữu hiệu hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 4, hoặc muối được dụng của nó, effective để tạo ra đáp ứng có lợi về mặt trị liệu. Bệnh ung thư có thể là hội chứng loạn sản tủy, bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, bệnh bạch cầu tăng lympho bào cấp tính, bệnh bạch cầu tủy đơn nhân mạn tính, hoặc bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, hoặc khối u rắn như ung thư ruột kết, ung thư tuyến tụy, ung thư màng trong tử cung, buồng trứng ung thư, ung thư vú, u hắc mạc, ung thư dạ dày, ung thư đường mật, ung thư phổi, hoặc nhóm phụ bất kỳ của nó. Bệnh ung thư này có thể có kết quả thử nghiệm dương tính với một hoặc nhiều đột biến ở gen hoặc protein của phần tử cắt-nối, các gen được nêu trong Bảng 1.

Phần mô tả còn mô tả việc sử dụng hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 4, hoặc muối được dụng của nó, trong phương pháp điều trị trị liệu, ví dụ, điều trị bệnh ung thư. Bệnh ung thư có thể là hội chứng loạn sản tủy, bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, bệnh bạch cầu tăng lympho bào cấp tính, bệnh bạch cầu tủy đơn nhân mạn tính, hoặc bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, hoặc khối u rắn như ung thư ruột kết, ung thư tuyến tụy, ung thư màng trong tử cung, buồng trứng ung thư, ung thư vú, u hắc mạc, ung thư dạ dày, ung thư đường mật, ung thư phổi, hoặc nhóm phụ bất kỳ của nó. Bệnh ung thư này có thể có kết quả thử nghiệm dương tính với một

hoặc nhiều đột biến ở gen hoặc protein của phần tử cắt-nối, các gen được nêu trong Bảng 1.

Phần mô tả còn mô tả việc sử dụng hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 4, hoặc muối được dụng của nó, để bào chế thuốc. Cụ thể, thuốc này có thể dùng để điều trị ung thư. Bệnh ung thư có thể là hội chứng loạn sản tủy, bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, bệnh bạch cầu tăng lympho bào cấp tính, bệnh bạch cầu tủy đơn nhân mạn tính, hoặc bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, hoặc khối u rắn như ung thư ruột kết, ung thư tuyến tụy, ung thư màng trong tử cung, buồng trứng ung thư, ung thư vú, u hắc mạc, ung thư dạ dày, ung thư đường mật, ung thư phổi, hoặc nhóm phụ bất kỳ của nó. Bệnh ung thư này có thể có kết quả thử nghiệm dương tính với một hoặc nhiều đột biến ở gen hoặc protein của phần tử cắt-nối, các gen được nêu trong Bảng 1.

Phần mô tả còn bộc lộ việc sử dụng hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 4, hoặc muối được dụng của nó, để hướng đến phần tử cắt-nối, *ví dụ*, cấu trúc siêu phân tử 1 của SF3B phần tử cắt-nối.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện kết quả của nghiên cứu dược lý (pharmacokinetic-PK) trên chuột CD-1 được dùng hợp chất **2** với liều 5mg/kg trong tĩnh mạch (intravenous-IV) hoặc 10mg/kg qua đường miệng (per oral-PO).

Fig. 2 thể hiện hiệu quả của hợp chất **2 trong** mô hình chuột ghép khác loài Nalm-6 (dòng tiền tế bào B của người) mang đột biến SF3B1^{K700E} được thiết kế. Các con chuột được dùng 2,5, 5, hoặc 10mg/kg hợp chất **2** một lần mỗi ngày (QD) trong 14 ngày, và thể tích khối u được đo trong thời gian 40 ngày.

Fig. 3 thể hiện kết quả phân tích dược lý và dược động của hợp chất **2 trong** mô hình chuột ghép khác loài Nalm-6 (dòng tiền tế bào B của người) mang đột biến SF3B1^{K700E} được thiết kế. Các con chuột được dùng hợp chất **2** với liều 10mg/kg PO, và mật độ khối u ($\mu\text{g/g}$) và xác định sự thay đổi cấu trúc gen trong sự biểu hiện của Pre-EIF4A1 (tiền ARN thông tin của EIF4A1 sản phẩm phiên mã) và SLC25A19 (ARN thông tin trưởng thành của sản phẩm phiên mã SLC25A19) so với chất dẫn thuốc.

Fig. 4 thể hiện kết quả của thử nghiệm khả năng sống sót mức tế bào với hợp chất **2** trong dòng tế bào ung thư PANC0504 (SF3B1^{MUT}) (đột biến PANC 05.04) so với các dòng tế bào ung thư tuyến tụy SF3B1 loại hoang BXPC3, HPAFII, PANC0403, PANC1005, CFPAC1 và MIAPACA2.

Fig. 5 thể hiện sự điều biến việc tách intron chuyển đổi đối với E7107 và hợp chất **2** (cmpd **2**) dựa trên phân tích Nanostring. Dấu "+" và "-" lần lượt thể hiện trị số dương hoặc âm, trong bảng so màu, thể hiện các mức biểu hiện khác nhau của các điểm nổi khác nhau.

Fig. 6 thể hiện kết quả của nghiên cứu PK trên chuột CD-1 được dùng hợp chất **1** với liều 5mg/kg trong tĩnh mạch (IV) hoặc 12mg/kg qua đường miệng (PO).

Fig. 7 thể hiện hiệu quả của hợp chất **1** trong mô hình chuột ghép khác loài Nalm-6 mang đột biến SF3B1^{K700E} được thiết kế. Các con chuột này được dùng hợp chất **1** với liều 7,5 hoặc 10mg/kg một lần mỗi ngày (QD) trong 14 ngày, và thể tích khối u được đo trong thời gian 30 ngày.

Fig. 8 thể hiện phân tích dược lý và dược động của hợp chất **1** trong mô hình chuột ghép khác loài Nalm-6 mang đột biến SF3B1^{K700E} được thiết kế. Các con chuột được dùng hợp chất **1** với liều đơn PO, và xác định mật độ khối u ($\mu\text{g/g}$) và sự thay đổi cấu trúc gen trong sự biểu hiện of Pre-EIF4A1 (tiền ARN thông tin của sản phẩm phiên mã EIF4A1) và SLC25A19 (ARN thông tin trưởng thành của SLC25A19 sản phẩm phiên mã) so với chất dẫn thuốc.

Fig. 9 thể hiện kết quả của nghiên cứu PK trên chuột CD-1 được dùng hợp chất **3** với liều 5,964 mg/kg trong tĩnh mạch (IV) hoặc 13,307 mg/kg qua đường miệng (PO).

Fig. 10 thể hiện kết quả của nghiên cứu PK trên chuột CD-1 được dùng hợp chất **4** với liều 5mg/kg trong tĩnh mạch (IV) hoặc 10 mg/kg qua đường miệng (PO).

Mô tả chi tiết sáng chế

A. Định nghĩa

Như được sử dụng ở đây, những định nghĩa dưới đây sẽ được áp dụng trừ khi được quy định theo cách khác.

"Chất đồng phân" dùng để chỉ các hợp chất có cùng số lượng và loại nguyên tử, và do đó, có cùng phân tử lượng, nhưng khác về sự bố trí hoặc cấu hình của nguyên

tử. “Chất đồng phân lập thể” dùng để chỉ hợp chất có sự kết nối nguyên tử giống nhau nhưng sự bố trí của các nguyên tử của chúng trong không gian thì khác nhau. “Chất đồng phân không đối quang” dùng để chỉ chất đồng phân lập thể không phải là chất đồng phân đối ảnh. “Chất đồng phân đối ảnh” dùng để chỉ chất đồng phân lập thể không trùng lên ảnh qua gương của nó. “Chất đồng phân hình học” dùng để chỉ chất đồng phân cis-trans có các vị trí của các nhóm với liên kết đôi hoặc nhân hoặc nguyên tử trung tâm khác nhau.

Chất đồng phân đối ảnh được đề cập trong bản mô tả này có thể bao gồm các chất đồng phân “tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh” chứa chủ yếu là một loại chất đồng phân đối ảnh, ví dụ, bằng hoặc lớn hơn 90%, 92%, 95%, 98%, hoặc 99%, hoặc bằng 100% một loại chất đồng phân đối ảnh, ở một hoặc các tâm bất đối xứng cụ thể. Thuật ngữ “tâm bất đối xứng” hoặc “tâm không đối xứng” dùng để chỉ nguyên tử cacbon tứ diện chứa bốn phần tử thay thế khác nhau.

Thuật ngữ “tinh khiết về mặt đồng phân lập thể” được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ hợp chất hoặc chế phẩm chứa nó chứa một chất đồng phân lập thể của hợp chất này và gần như không chứa các chất đồng phân lập thể khác của hợp chất này. Ví dụ, chế phẩm tinh khiết về mặt đồng phân lập thể của hợp chất có một tâm không đối xứng sẽ hầu như không chứa chất đồng phân đối ảnh đối diện của hợp chất này. Chế phẩm tinh khiết về mặt đồng phân lập thể của hợp chất có hai tâm không đối xứng sẽ hầu như không chứa chất đồng phân không đối quang, và hầu như không chứa chất đồng phân đối ảnh đối diện của hợp chất này. Hợp chất tinh khiết về mặt đồng phân lập thể thường chứa lớn hơn khoảng 80% khối lượng của một chất đồng phân lập thể của hợp chất này và ít hơn khoảng 20% khối lượng của chất đồng phân lập thể khác của hợp chất này, tốt hơn nữa là lớn hơn khoảng 90% khối lượng của một chất đồng phân lập thể của hợp chất này và ít hơn khoảng 10% khối lượng của chất đồng phân lập thể khác của hợp chất này, còn tốt hơn nữa là lớn hơn khoảng 95% khối lượng của một chất đồng phân lập thể của hợp chất này và ít hơn khoảng 5% khối lượng của chất đồng phân lập thể khác của hợp chất này, và nhất tốt hơn là lớn hơn khoảng 97% khối lượng của một chất đồng phân lập thể của hợp chất này và ít hơn khoảng 3% khối lượng của chất đồng phân lập thể khác của hợp chất này. Ví dụ, xem patent Mỹ số 7,189,715.

Thuật ngữ "R" và "S" mô tả các chất đồng phân are descriptors của cấu hình hóa lập thể tại nguyên tử cacbon được thể bất đối xứng. Việc chỉ định nguyên tử cacbon được thể bất đối xứng là "R" hoặc "S" được tiến hành theo nguyên tắc ưu tiên Cahn-Ingold-Prelog, mà các chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết, và được mô tả trong nguyên tắc IUPAC (International Union of Pure và Applied Chemistry) đối với Danh pháp Hóa hữu cơ (Nomenclature of Organic Chemistry). Phần E, Hóa lập thể.

Thuật ngữ "việc điều trị," "sự điều trị," hoặc "điều trị" ung thư dùng để chỉ việc đảo chiều (ví dụ, khắc phục sự phong bế biệt hóa của tế bào), làm thuyên giảm (ví dụ, làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng, như sự mệt mỏi do thiếu máu, số lượng máu thấp, v.v.), và/hoặc làm chậm sự tiến triển của (ví dụ, làm chậm sự tiến triển của tình trạng bệnh như sự biến đổi thành AML) bệnh ung thư như được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "vật chủ", được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ vật chủ là động vật, tốt hơn nếu vật chủ là động vật có vú, và đặc biệt là người.

Thuật ngữ "chất mang dược dụng" được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ chất mang, tá dược, hoặc chất dẫn thuốc không độc mà không phá hủy hoạt tính dược lý của hợp chất với các chất được bào chế. Chất mang dược dụng, tá dược hoặc chất dẫn thuốc có thể được sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất trao đổi ion, nhôm oxit, nhôm stearat, lexithin, huyết thanh protein, như albumin huyết thanh của người, các chất đệm như phosphat, glyxin, axit sorbic, kali sorbat, hỗn hợp glyxerit một phần của axit béo thực vật bão hòa, nước, muối hoặc chất điện phân, như protamin sulfat, dinatri hydro phosphat, kali hydro phosphat, natri clorua, muối kẽm, silic oxit dạng keo, magie trisilicat, polyvinyl pyrrolidon, chất gốc xenluloza, polyetylen glycol, xyclodextrin, natri carboxymetyl-xenluloza, polyacrylat, sáp, polyetylen-polyoxypropylen-polyme khối, polyetylen glycol và mỡ cừu.

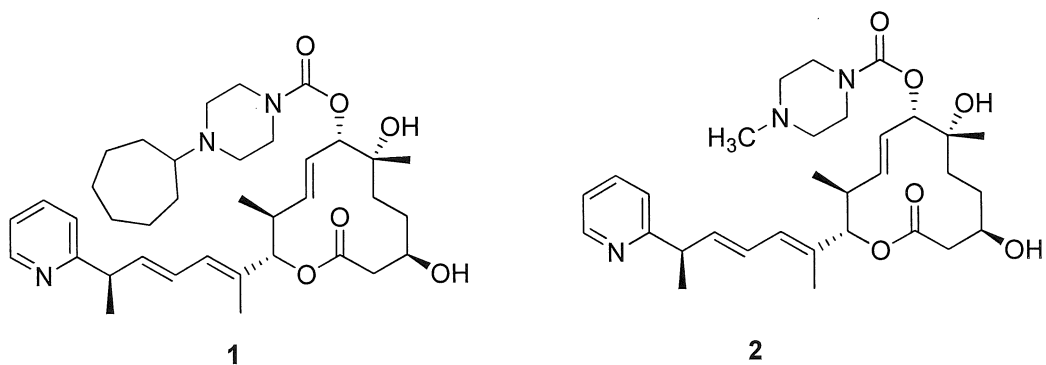
Thuật ngữ "muối dược dụng" dùng để chỉ muối mà vẫn giữ được hoạt tính sinh học mong muốn của hợp chất gốc và không có tác dụng gây độc không mong muốn. Ví dụ về các muối này là: (a) muối cộng axit được tạo thành với axit vô cơ, ví dụ, axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit phosphoric, axit nitric và các dạng tương tự; và muối được tạo thành với axit hữu cơ, ví dụ, axit axetic, axit oxalic, axit tarttric,

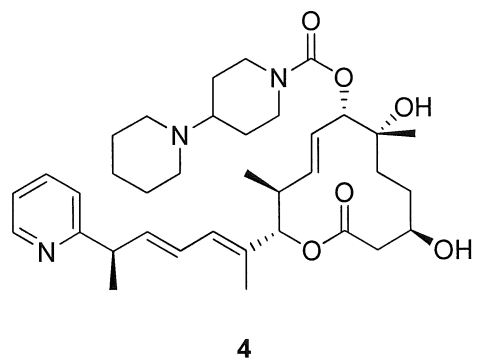
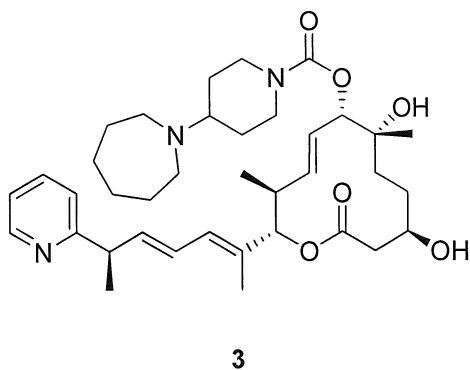
axit succinic, axit maleic, axit fumaric, axit gluconic, axit xitric, axit malic, axit ascorbic, axit benzoic, axit tanic, axit palmitic, axit alginic, axit polyglutamic, axit naphthalensulfonic, axit metansulfonic, axit p-toluensulfonic, axit naphthalendisulfonic, axit polygalacturonic, và các axit tương tự; và (b) muối được tạo thành từ các anion nguyên tố như clo, brom, và iot. Ví dụ, xem Haynes et al., "Commentary: Occurrence of Pharmaceutically Anions and Cations in the Cambridge Structural Database," J. Pharmaceutical Sciences, vol. 94, no. 10 (2005), and Berge et al., "Pharmaceutical salts", J. Pharmaceutical Sciences, vol. 66, no. 1 (1977).

B. Hợp chất

Trừ khi có quy định khác, hợp chất được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm hỗn hợp các hợp chất được mô tả trong bản mô tả này, và các dạng chất đồng phân đối ảnh, đồng phân không đối quang, và hình học (hoặc đối xứng) bất kỳ của công thức này; ví dụ, cấu hình R và S đối với mỗi tâm bất đối xứng, chất đồng phân liên kết đôi (Z) và (E), và chất đồng phân đối xứng (Z) và (E). Trừ khi có quy định khác, hợp chất được mô tả trong bản mô tả này cùng tồn tại với dạng đồng phân là cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, trừ khi có quy định khác, các công thức cấu tạo được mô tả trong bản mô tả này còn bao gồm hợp chất chỉ khác do sự có mặt của một hoặc nhiều nguyên tử được làm giàu chất đồng vị. Ví dụ, các hợp chất có công thức cấu tạo theo sáng chế ngoại trừ việc thay thế hydro bằng deuteri hoặc triti, hoặc việc thay thế cacbon bằng cacbon được làm giàu ^{13}C - hoặc ^{14}C là nằm trong phạm vi của sáng chế. Các hợp chất này có thể hữu ích, ví dụ, làm mẫu dò hoặc dụng cụ phân tích trong các thử nghiệm sinh học.

Được cung cấp trong bản mô tả này theo một số phương án là hợp chất có công thức 1 ("hợp chất 1"), hợp chất có công thức 2 ("hợp chất 2"), hợp chất có công thức 3 ("hợp chất 3"), và hợp chất có công thức 4 ("hợp chất 4"):





và muối được dụng của nó.

C. Dược phẩm

Hợp chất theo sáng chế có thể được kết hợp với chất mang được dụng để tạo ra dược phẩm của nó. Việc lựa chọn chất mang và chế phẩm cụ thể sẽ phụ thuộc vào đường dùng cụ thể của dược phẩm dự định.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế một cách thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa, qua đường miệng, thuốc xông dạng xịt, tại chỗ, trong trực tràng, trong mũi, trong má, trong âm đạo hoặc viên cấy dưới da, v.v. Thuật ngữ "ngoài đường tiêu hóa" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các kỹ thuật tiêm hoặc truyền dưới da, trong tĩnh mạch, trong bắp, nội khớp, nội hoạt dịch, trong xương ức, nội tủy mạc, trong gan, trong thương tổn và trong sọ. Theo phương án cụ thể, hợp chất này được dùng trong tĩnh mạch, qua đường miệng, dưới da, hoặc trong bắp. Dạng tiêm vô trùng của dược phẩm theo sáng chế có thể ở dạng hỗn dịch trong nước hoặc dầu. Các hỗn dịch này có thể được bào chế theo kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng tác nhân phân tán hoặc thấm ướt và tác nhân tạo huyền phù thích hợp. Chế phẩm tiêm vô khuẩn cũng có thể là dung dịch hoặc huyền phù vô khuẩn trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc, sử dụng được theo đường ngoài tiêu hóa, ví dụ, dưới dạng dung dịch trong 1,3-butandiol. Trong số các chất dẫn thuốc và dung môi chấp nhận được mà có thể được sử dụng là nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, các dầu cố định vô khuẩn thông thường được sử dụng làm dung môi hoặc môi trường huyền phù hóa.

Đối với mục đích này, dầu ôn hòa cố định bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm các mono hoặc diglyxerit tổng hợp. Axit béo, như oleic axit và các dẫn xuất glyxerit của nó là hữu ích trong việc bào chế chế phẩm tiêm, như các dầu được dụng tự nhiên,

nhu dầu oliu hoặc dầu thầu dầu, đặc biệt ở dạng polyoxyetyl hóa của chúng. Các dung dịch hoặc hỗn dịch trong dầu này có thể còn chứa chất pha loãng hoặc chất phân tán trong rượu mạch dài, như carboxymetyl xenluloza hoặc các tác nhân phân tán tương tự thường được sử dụng trong quá trình bào chế các dạng liều được dụng bao gồm nhũ tương và hỗn dịch. Các chất hoạt động bề mặt khác thường được sử dụng, như Tweens, Spans và các tác nhân nhũ hóa hoặc chất tăng cường độ sinh khả dụng khác thường được sử dụng trong quá trình bào chế các dạng liều được dụng rắn, lỏng, hoặc dạng liều khác, cũng có thể được sử dụng cho mục đích bào chế.

Để dùng qua đường miệng, hợp chất có thể được cung cấp ở dạng liều dùng qua đường miệng chấp nhận được, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, viên nang, viên nén, hỗn dịch nước hoặc dung dịch. Trong trường hợp viên nén dùng qua đường miệng, chất mang thường được sử dụng bao gồm lactoza và tinh bột ngô. Tác nhân bôi trơn, như magie stearat, cũng có thể được thêm vào. Để dùng qua đường miệng ở dạng viên nang, chất pha loãng hữu ích bao gồm lactoza và tinh bột ngô sấy khô. Khi cần có hỗn dịch nước để dùng qua đường miệng, hoạt chất được kết hợp với chất nhũ hóa và/hoặc chất tạo huyền phù. Nếu muốn, một số tác nhân tạo ngọt, tạo mùi hoặc tạo màu cũng có thể được thêm vào.

D. Vật chủ và phương pháp sử dụng

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các loại bệnh ung thư khác nhau, bao gồm các bệnh đáp ứng với tác nhân hướng đích SF3B1. Như đã lưu ý trên đây, hoạt tính chống khối u của pladienolit B được thông báo là có liên quan với đích của nó của phức SF3b, ức chế việc tách intron và sự thay đổi kiểu biểu hiện gen (Kotake et al., "Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide," *Nature Chemical Biology* 2007, 3, 570-575). Các đột biến trong gen của phần tử cắt-nối như protein của cấu trúc siêu phân tử 1 của yếu tố tách intron 3B (SF3B1) đã được biết là có liên quan trong nhiều bệnh ung thư, như các bệnh ác tính về huyết học và khối u rắn. Scott et al., "Acquired mutations that affect pre-mRNA splicing in hematologic malignancies and solid tumors," *JNCI* 105, 20, 1540-1549.

Các bệnh ác tính về huyết học có thể bao gồm các bệnh ung thư của máu (bệnh bạch cầu) hoặc các bệnh ung thư hạch bạch huyết (u lympho ác tính). Bệnh bạch cầu có thể bao gồm bệnh bạch cầu tăng lympho bào cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu dòng

tủy cấp tính (AML), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (CML), bệnh bạch cầu tủy đơn nhân mạn tính (CMML), bệnh bạch cầu đơn nhân cấp tính (AMoL), v.v. U lympho ác tính có thể bao gồm u lympho ác tính Hodgkin và u lympho ác tính không Hodgkin. Các bệnh ác tính về huyết học khác có thể bao gồm hội chứng loạn sản tủy (MDS).

Khối u rắn có thể bao gồm các ung thư biểu mô như ung thư biểu mô tuyến, ví dụ, ung thư vú, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư ruột kết hoặc trực tràng, ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư cổ, ung thư màng trong tử cung, buồng trứng ung thư, ung thư đường mật, u thần kinh đệm, u hắc tố, v.v.

Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị các bệnh ung thư mà có thể đáp ứng với tác nhân hướng vào gen hoặc protein của phần tử cắt-nối không phải SF3B1. Các ví dụ sau minh họa một số bệnh ung thư khác mà có thể đáp ứng với tác nhân hướng vào phần tử cắt-nối, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Do đó, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng cho vật chủ để điều trị các loại bệnh ung thư hoặc tình trạng bệnh này, như bệnh nhân hoặc vật chủ mắc:

a) Hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndrome-MDS): Ví dụ, xem "SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes: clinical associations and prognostic implications," Damm F. et al. Leukemia, 2011, 1-4; "Frequent pathway mutations in splicing machinery in myelodysplasia," Yoshida K. et al, Nature, 2011, 478, 64-69; "Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms," Malcovati L. et al., Blood, 2011, 118, 24, 6239-6246; "Mutations in the spliceosomes machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis," Makishima et al, Blood, 2012, 119, 3203-3210; "Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts," Pappaemanni, E. et al, New England J. Med. 2011, DOI 10.1056/NEJMoa1103283.

b) Bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (chronic lymphocytic leukemia-CLL): Ví dụ, xem "Defects in the spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis," Maciejewski, J.P., Padgett, R.A., Br. J. Haematology, 2012, 1-9; "Mutations in the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: associations with progression and fludarabine-refractoriness," Rossi et al, Blood, 2011, 118, 6904-6908; "Exome sequencing identifies recurrent mutations of the

splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia," Quesada et al, Nature Genetics, 2011, 44, 47-52.

c) Bệnh bạch cầu tủy đơn nhân mạn tính (Chronic myelomonocytic leukemia-CMML): Ví dụ, xem Yoshida et al, Nature 2011; "Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia," Kar S.A. et al, Haematologia, 2012, DOI: 10.3324/haematol,2012,064048; DeBoever et al., "Transcriptome sequencing reveals potential mechanism of cryptic 3' splice site selection in SF3B1-mutated cancers," PLOS Computational Biology, 2013, DOI: 10.1371/journal.pcbi,1004105.

d) Bệnh bạch cầu tủy cấp tính (acute myeloid leukemia -AML): Ví dụ, xem Malcovati et al., Blood 2011; Yoshida et al, Nature 2011.

e) Ung thư vú: Ví dụ, xem "Whole genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition," Ellis et al., Nature, 2012, 486, 353-360; DeBoever et al., "Transcriptome sequencing reveals potential mechanism of cryptic 3' splice site selection in SF3B1-mutated cancers," PLOS Computational Biology, 2013, DOI: 10.1371/journal.pcbi,1004105; Maguire et al., "SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer," J Pathol 2015, 235, 571-580.

f) U hắc mạc: Ví dụ, xem "SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma," Furney et al., Cancer Disc. 2013, 10, 1122-1129; DeBoever et al., "Transcriptome sequencing reveals potential mechanism of cryptic 3' splice site selection in SF3B1-mutated cancer," PLOS Computational Biology, 2013, DOI: 10.1371/journal.pcbi,1004105.

g) Ung thư màng trong tử cung: Ví dụ, xem Tefferi et al., "Myelodysplastic syndromes." N Engl J Med. 2009; 361:1872–85.

h) Ung thư da dày: Ví dụ, xem Int J Cancer. 2013 Jul;133(1):260-5, "Mutational analysis of splicing machinery genes SF3B1, U2AF1 và SRSF2 in myelodysplasia and other common tumors." Je et al.

i) Ung thư buồng trứng: Ví dụ, xem Int J Cancer. 2013 Jul;133(1):260-5, "Mutational analysis of splicing machinery genes SF3B1, U2AF1 và SRSF2 in myelodysplasia and other common tumors." Je et al.

j) Ung thư đường mật như ung thư tế bào ống mật và ung thư tụy: Ví dụ, xem Biankin et al., "Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes," Nature 2012, 491, 399-405.

k) Ung thư phổi: Ví dụ, xem "Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia," Quesada et al., Nature Genetics 44, 47–52 (2012); Scott et al., "Acquired mutations that affect pre-mRNA splicing in hematologic malignancies and solid tumors," JNCI 105, 20, 1540-1549.

Ngoài ra, Danh mục các đột biến soma trong ung thư (COSMIC) (Wellcome Trust Sanger Institute, Genome Research Limited, England) thông báo đã phát hiện được đột biến SF3B1 trong các loại mẫu ung thư khác nhau.

Hợp chất theo sáng chế có thể được dùng cho vật chủ với lượng hữu hiệu điều trị hoặc lượng hữu hiệu trị liệu. Lượng hợp chất theo sáng chế có thể được kết hợp với chất mang để tạo ra dược phẩm ở dạng liều đơn sẽ thay đổi tùy thuộc vào vật chủ được điều trị và đường dùng cụ thể. Tốt hơn, nếu dược phẩm được bào chế sao cho liều lượng hoạt chất có thể được dùng cho vật chủ nhận dược phẩm này nằm trong khoảng từ 0,01 - 100mg/kg thể trọng/ngày. Theo phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế tạo ra liều lượng nằm trong khoảng từ 0,01mg đến 50mg. Theo phương án khác, tạo ra liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 25mg hoặc nằm trong khoảng từ 5mg đến 40mg.

Cần phải hiểu rằng liều lượng và phác đồ điều trị cụ thể cho bệnh nhân cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm hoạt tính của hợp chất cụ thể được sử dụng, tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe chung, giới tính, chế độ ăn uống, thời gian dùng, tốc độ thanh thải, phối hợp thuốc, quyết định của bác sĩ điều trị, và mức độ nghiêm trọng của bệnh cụ thể được điều trị. Lượng hoạt chất theo sáng chế trong dược phẩm còn phụ thuộc vào hợp chất/muối cụ thể trong dược phẩm này.

Theo một số phương án, bệnh ung thư được thử nghiệm và/hoặc dương tính với một hoặc nhiều đột biến ở gen hoặc protein của phần tử cắt-nối, trong đó sự có mặt của (các) đột biến ("dương tính") có thể cho biết bệnh ung thư của vật chủ có đáp ứng với phương pháp điều trị bao gồm bước cho dùng hợp chất hướng vào protein và/hoặc

phần tử cắt-nối này. Ví dụ về gen của phần tử cắt-nối này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gen được nêu trong **Bảng 1**.

Bảng 1: Gen của phần tử cắt-nối và các bệnh có nguy cơ mắc phải

Gen của phần tử cắt-nối	Bệnh
Cấu trúc siêu phân tử 1 của yếu tố tách intron 3B (SF3B1)	Xem danh sách nêu trên
Yếu tố bổ trợ 1 ARN nhân nhỏ U2 (U2AF1)	MDS, AML, CMML, LUAD, UCEC CMML, MDS, PMF, AML
Yếu tố tách intron 2 giàu serin/arginin (SRSF2)	MDS
Ngón tay kềm (typ CCCH), kiểu gắn ARN và giàu serin/arginin 2 (ZRSR2)	Viêm võng mạc sắc tố
Yếu tố tách intron 8-xử lý-ARN tiền thông tin (PRPF8)	U tủy
Yếu tố bổ trợ 2 ARN nhân nhỏ U2 (U2AF2)	MDS, PRAD, COAD
Yếu tố tách 1 (SF1)	U tủy, OV, COAD
Cấu trúc siêu phân tử 1 của yếu tố tách intron 3A (SF3A1)	MDS
Yếu tố 40 đồng đẳng B xử lý ARN tiền thông tin PRP40 (PRPF40B)	LUAD
Protein kiểu gắn ARN 10 (RBM10)	COAD
Protein gắn kết Poly(rC) 1 (PCBP1)	SKCM
Yếu tố tách intron 1 ARN tiền thông tin xoắn cổ (CRNKL1)	LUSC
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) hộp helicaza 9 (DHX9)	STAD
Peptidyl-prolyl cis-trans giống isomeraza 2 (PPIL2)	SKCM
Protein kiểu gắn ARN 22 (RBM22)	LUAD

Ribonucleoprotein Sm D3 nhân nhỏ (SNRPD3)	GBM, LGG
ARN helicaza DDX5 phụ thuộc ATP phát hiện được (DDX5)	LUAD
ARN helicaza DHX15 phụ thuộc ATP yếu tố tách intron ARN tiền thông tin (DHX15)	DLBCL
Protein 1 gắn kết polyadenylat (PABPC1)	U tủy

Các chữ viết tắt:

MDS = Hội chứng loạn sản tủy

AML = Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy của người

CMML = Bệnh bạch cầu tủy đơn nhân mạn tính

LUAD = Ung thư biểu mô tuyến phổi

UCEC = Ung thư nội mạc tử cung thân tử cung

PMF = Xơ khối tiến triển

PRAD = Ung thư biểu mô tuyến tiền liệt

COAD = Ung thư biểu mô tuyến ruột kết

OV = Ung thư nang tuyến thành dịch buồng trứng

SKCM = U hắc tố da

LUSC = Ung thư biểu mô tế bào vảy phổi

STAD = Ung thư biểu mô tuyến dạ dày

GBM = U nguyên bào thần kinh đệm đa hình

LGG = U thần kinh đệm não dưới

DLBCL = U lympho tế bào B lớn lan toả

Theo một số phương án, bệnh ung thư của vật chủ có thể đáp ứng với phương pháp điều trị bao gồm bước dùng hợp chất hướng vào protein và/hoặc phần tử cắt-nối

này, thậm chí khi không có mặt các đột biến này ở gen hoặc protein của phần tử cắt-nối.

Việc sàng lọc hoặc thử nghiệm các đột biến có thể được tiến hành bằng các cách đã biết, ví dụ, xác định kiểu gen, kiểu hình, v.v., bằng cách thử nghiệm khuếch đại axit nucleic, điện di, vi đàn, thấm, chức năng, thử nghiệm miễn dịch, v.v. Phương pháp sàng lọc bao gồm, ví dụ, lấy mẫu sinh học từ vật chủ chứa tế bào/mô ung thư này.

Để có thể hiểu rõ sáng chế hơn, các ví dụ sau được đưa ra. Cần phải hiểu rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm giới hạn sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Điều chế hợp chất 1, 2, 3 và 4

Tổng quan

Tiến hành việc đun nóng bằng lò vi sóng bằng cách sử dụng lò vi sóng Biotage Emrys Liberator hoặc lò vi sóng Initiator. Sắc ký cột được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị Isco Rf200d. Việc loại bỏ dung môi được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị làm bay hơi kiểu quay Büchi hoặc thiết bị làm bay hơi ly tâm Genevac. LC/MS điều chế được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị tính chế tự động Waters và cột 19 x 100mm XTerra 5 micron MS C18 trong điều kiện pha động axit. Phổ NMR được ghi bằng cách sử dụng quang phổ kế Varian 400MHz.

Khi thuật ngữ "trơ hóa" được sử dụng để mô tả lò phản ứng (ví dụ, bình phản ứng, bình thốt cổ, lò phản ứng thủy tinh, và các dạng tương tự) có nghĩa là không khí trong lò phản ứng này đã được thay bằng khí trơ, khô hoặc gần như không ẩm (như nitơ, argon, và các khí tương tự).

Các phương pháp chung và các thử nghiệm để điều chế hợp chất theo sáng chế được nêu dưới đây.

Các chữ viết tắt dưới đây được sử dụng trong bản mô tả này:

MeOH: Metanol

DMF: Dimethylformamit

KHMDS: Kali bis(trimetylsilyl)amit

LCMS: Sắc ký lỏng – phổ khối

TBSCl: Tert-Butyldimetylsilyl clorua

THF: Tetrahydrofuran

TLC: Sắc ký lớp mỏng

Các nguyên liệu: Các hợp chất sau là có bán trên thị trường và/hoặc có thể được điều chế theo nhiều cách mà chuyên gia trong lĩnh vực tổng hợp hữu cơ đã biết. Đặc biệt hơn, các hợp chất được bộc lộ có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phản ứng và kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này. Trong phần mô tả các phương pháp tổng hợp được mô tả dưới đây, cần phải hiểu rằng tất cả các điều kiện phản ứng được đề xuất, bao gồm việc lựa chọn dung môi, môi trường phản ứng, nhiệt độ phản ứng, thời gian thử nghiệm, và quy trình xử lý, có thể được chọn là điều kiện chuẩn cho phản ứng đó, trừ khi có quy định khác. Chuyên gia trong lĩnh vực tổng hợp hữu cơ sẽ hiểu được rằng nhóm chức có mặt trên các phần khác nhau của phân tử sẽ tương thích với các chất phản ứng và các phản ứng được đề xuất. các phân tử thay thế không tương thích với các điều kiện phản ứng là hiển nhiên với các chuyên gia trong lĩnh vực này, và do đó, phương pháp khác sẽ được chỉ ra. Các nguyên liệu ban đầu cho các ví dụ là có bán trên thị trường hoặc dễ dàng điều chế được bằng phương pháp chuẩn từ các chất đã biết.

Thông tin LCMS

Pha động: A (0,1% axit formic trong H₂O) và B (0,1% axit formic trong axetonitril).

Gradien: B 5% → 95% trong 1,8 phút.

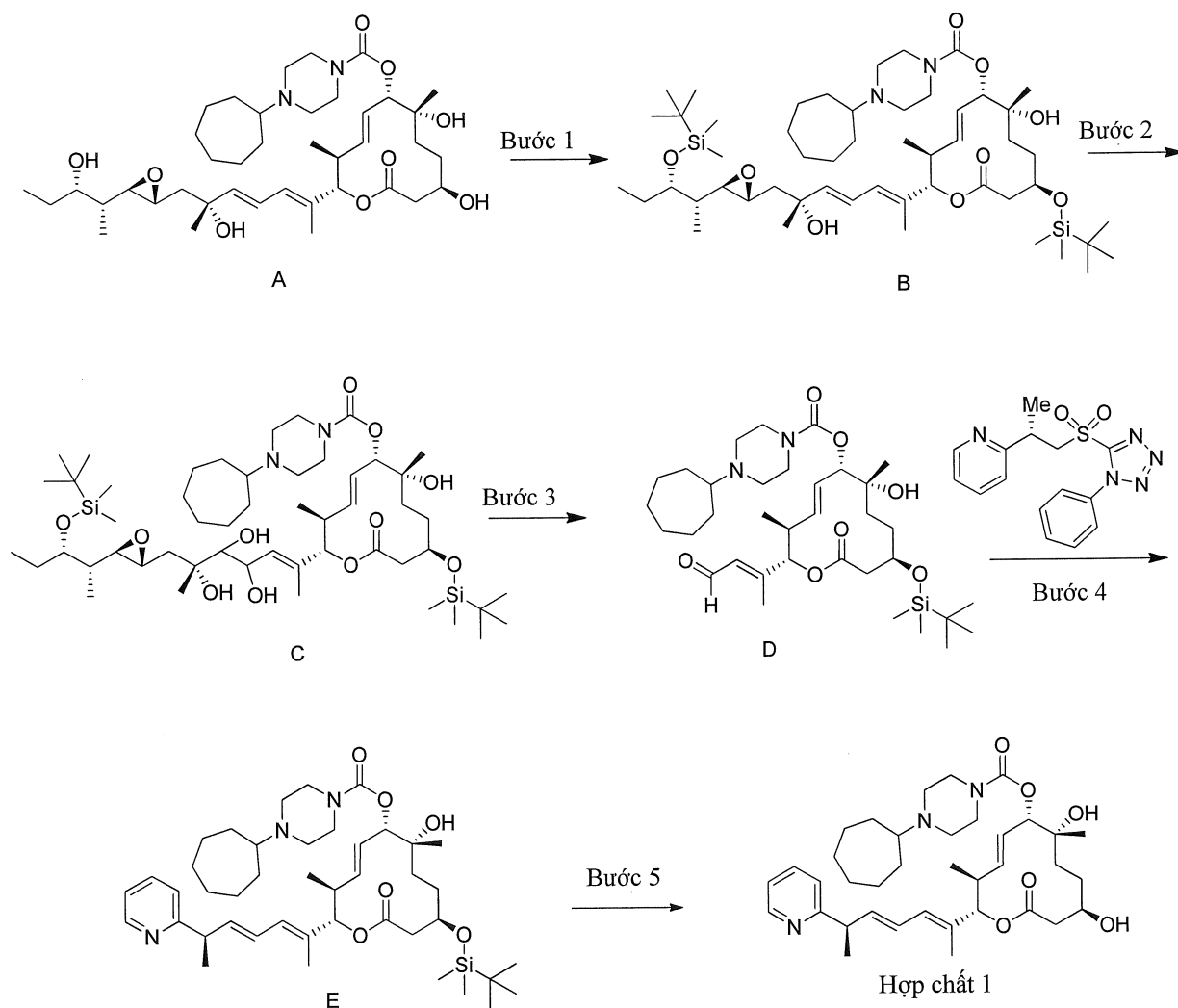
Cột: Acquity BEH C18 cột (1,7 μ m, 2,1 x 50mm).

Patent Mỹ số 7,884,128 và 7,816,401, both có đề mục: Process for Total Quy trình tổng hợp Pladienolit B và Pladienolit D, mô tả phương pháp đã biết trong lĩnh vực này for tổng hợp of Pladienolit B and D. Quy trình tổng hợp Pladienolit B and D cũng có thể be performed sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong Kanada et al., "Total Synthesis of the Potent Antitumor Macrolides Pladienolide B and D," *Angew. Chem. Int. Ed.* 46:4350-4355 (2007). Kanada et al. và Công bố đơn PCT số WO 2003/099813, có đề mục: Hoạt chất sinh lý dụng mới, mô tả phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để tổng hợp E7107 (hợp chất 45 của WO '813)

từ Pladienolit D (11107D của WO '813). Patent Mỹ tương ứng là 7,550,503 cấp cho Kotake et al.

Quy trình ví dụ tổng hợp các hợp chất

Tổng hợp Hợp chất 1



Sơ đồ I

Bước 1: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-((R,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)pentan-2-yl)-6-hydroxy-6-methylhepta-2,4-dien-2-yl)-7-hydroxy-3,7-dimethyl-12-oxooxacyclododec-4-en-6-yl 4-xycloheptylpiperazin-1-carboxylat. Bổ sung dung dịch chứa E7107 (A, 3,7g, 5,1mmol, 1,0 đương lượng) trong môi trường nitơ trong DMF (100ml, 0,05M) ở 0°C được xử lý bằng imidazol (2,5g, 36,1mmol, 7,0 đương lượng) và TBSCl (3,9g,

25,7mmol, 5,0 đương lượng) vào. Hỗn hợp phản ứng này được để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 20 giờ hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được pha loãng với ethyl axetat và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/ethyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (B, 4,7g, 5,0mmol, 96%).

Bước 2: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-2-((6R,E)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)pentan-2-yl)oxiran-2-yl)-4,5,6-trihydroxy-6-methylhept-2-en-2-yl)-7-hydroxy-3,7-dimethyl-12-oxooxacyclododec-4-en-6-yl 4-xyloheptylpiperazin-1-carboxylat. Bổ sung osmitetroxit (12,4ml, 1,0mmol, 0,2 đương lượng, dung dịch 2,5%), tiếp theo là, N-metylmorpholin N-oxit (1,16g, 9,9mmol, 2,0 đương lượng) vào dung dịch chứa olefin B (4,7g, 5,0mmol, 1,0 đương lượng) trong THF:H₂O (10:1, 133ml:13ml, 0,03M) trong môi trường nitơ ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng này được để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 13 giờ hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt bằng natri sulfit, pha loãng với ethyl axetat, và lớp hữu cơ được rửa bằng nước, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (diclometan/metanol làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (C, 4,8g, 4,9mmol, 99%).

Bước 3: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-7-hydroxy-3,7-dimethyl-12-oxo-2-((E)-4-oxobut-2-en-2-yl)oxacyclododec-4-en-6-yl 4-xyloheptylpiperazin-1-carboxylat. Bổ sung chèn tetraaxetat (4,0g, 9,0mmol, 2,0 đương lượng) vào dung dịch chứa diol C (4,4g, 4,5mmol, 1,0 đương lượng) trong benzen (100ml, 0,05M) trong môi trường nitơ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 30 phút, hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt bằng natri sulfit và pha loãng với diclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô trong chân không. Sản phẩm mong muốn (D, 1,5g, 2,3mmol, 52%) là chất thô được cải thiện.

Bước 4: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy-7-hydroxy-3,7-dimethyl-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(pyridin-2-yl)hepta-2,4-dien-2-yl)oxaxyclo-dodec-4-en-6-yl 4-xycloheptylpiperazin-1-carboxylat.

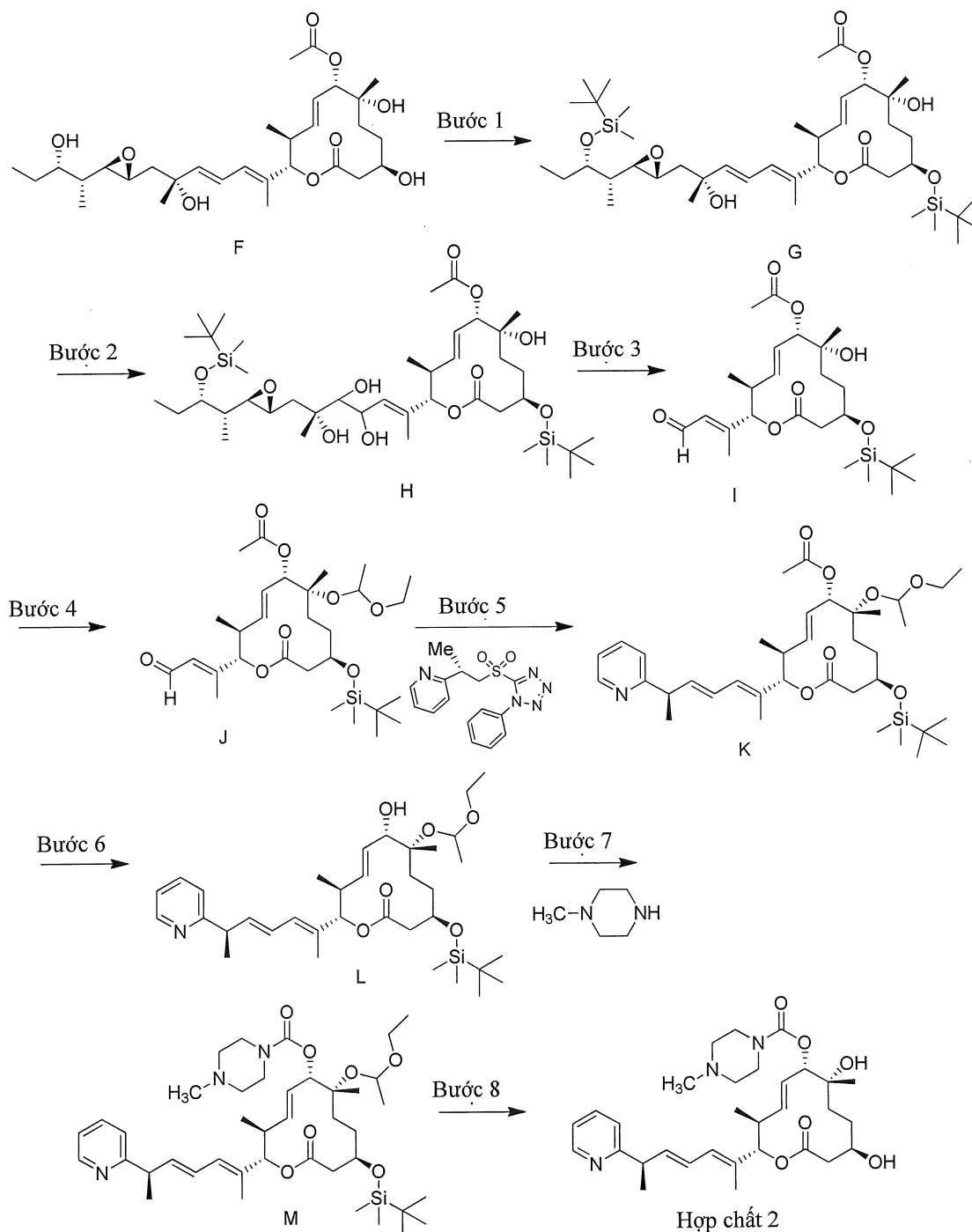
Lưu ý: Việc tổng hợp (S)-2-(1-((1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)sulfonyl)propan-2-yl)pyridin được mô tả dưới đây và được minh họa trên Sơ đồ V.

Bổ sung KHMDS (8,53 ml, 4,265mmol, 2,1 đương lượng) nhỏ giọt vào (S)-2-(1-((1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)sulfonyl)propan-2-yl)pyridin (1,67g, 5,08mmol, 2,5 đương lượng) trong THF khô (30,0ml, 0,05M) trong môi trường nitơ ở -78°C và Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 10 phút. Tiếp theo, bổ sung nhỏ giọt aldehyt D (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-7-hydroxy-3,7-dimethyl-12-oxo-2-((E)-4-oxobut-2-en-2-yl)oxaxyclo-dodec-4-en-6-yl 4-xycloheptylpiperazin-1-carboxylat (1,318g, 2,031mmol, 1,0 đương lượng) trong THF (10ml) vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở -78°C trong một giờ và tiếp theo, để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng qua đêm. Phản ứng này được dập tắt bằng nước và pha loãng với etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước và nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (E, 1,20g, 2,03mmol, 79%).

Bước 5: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-dihydroxy-3,7-dimethyl-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(pyridin-2-yl)hepta-2,4-dien-2-yl)oxaxyclo-dodec-4-en-6-yl 4-xycloheptylpiperazin-1-carboxylat (hợp chất 1). Dung dịch chứa silyl ete E (1,80g, 2,39mmol, 1,0 đương lượng) trong MeOH (10,0ml, 0,24M) trong môi trường nitơ ở nhiệt độ trong phòng được xử lý bằng pTsOH (1,14g, 5,98mmol, 2,5 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 2 giờ, hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Tiếp theo, pha loãng hỗn hợp phản ứng này với etyl axetat và rửa bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng TLC điều chế (diclometan/metanol làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (hợp chất 1, 1,19g, 1,83mmol, 76%).
¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ: 0,88 (d, *J*=6,65 Hz, 6 H) 1,23 (s, 3 H) 1,34 - 1,78 (m, 12 H) 1,44 (d, *J*=7,03 Hz, 3 H) 1,73 (s, 3 H) 2,28 - 2,39 (m, 1 H) 2,45 - 2,66 (m, 8 H) 3,48 (br. s., 5 H) 3,72 (m, 2 H) 5,01 (d, *J*=9,54 Hz, 1 H) 5,14 (d, *J*=10,67 Hz,

1 H) 5,55 - 5,72 (m, 2 H) 6,00 (dd, $J=15,00$, 7,47 Hz, 1 H) 6,11 (d, $J=11,29$ Hz, 1 H) 6,28 - 6,35 (m, 1 H) 7,12 (ddd, $J=7,47$, 4,89, 1,07 Hz, 1 H) 7,16 (d, $J=7,78$ Hz, 1 H) 7,61 (t, $J=7,65$ Hz, 1 H) 8,55 (d, $J=4,91$ Hz, 1 H). MS (ES⁺) = 638,4 [M+H]⁺.

Tổng hợp Hợp chất 2



Sơ đồ II

Bước 1: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-((R,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)pentan-2-yl)oxiran-

2-yl)-6-hydroxy-6-methylhepta-2,4-dien-2-yl)-7-hydroxy-3,7-dimethyl-12-oxooxacyclododec-4-en-6-yl axetat. Dung dịch chứa pladienolit D (F, 5,3g, 9,7mmol, 1,0 đương lượng) trong môi trường nitơ trong DMF (80ml, 0,1M) ở 0°C được xử lý bằng imidazol (4,6g, 67,8mmol, 7,0 đương lượng) và TBSCl (7,3g, 48,4mmol, 5,0 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng này được để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 20 giờ, hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được chiết bằng etyl axetat và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (G, 7,5g, 9,6mmol, 99%).

Bước 2: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-2-((6R,E)-7-((2R,3S)-3-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)pentan-2-yl)oxiran-2-yl)-4,5,6-trihydrox-6-methylhept-2-en-2-yl)-7-hydroxy-3,7-dimethyl-12-oxooxacyclododec-4-en-6-yl axetat. Bổ sung osmi tetroxit (24,4ml, 1,9mmol, 0,2 đương lượng, dung dịch 2,5% trong *tert*-butanol), tiếp theo là, N-metylmorpholin N-oxit (2,3g, 19,5mmol, 2,0 đương lượng) vào dung dịch chứa olefin G (7,6g, 9,7mmol, 1,0 đương lượng) trong THF:H₂O đã được loại khí (210ml:21ml, 0,01M) trong môi trường nitơ ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng này được để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 13 giờ, hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt bằng natri sulfit, pha loãng với etyl axetat, và lớp hữu cơ được rửa bằng nước, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (diclometan/metanol làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (H, 6,8g, 8,3mmol, 86%).

Bước 3: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-7-hydroxy-3,7-dimethyl-12-oxo-2-((E)-4-oxobut-2-en-2-yl)oxacyclododec-4-en-6-yl axetat. Bổ sung chì tetraaxetat (8,6g, 19,4mmol, 2,0 đương lượng) vào dung dịch chứa diol H (7,9g, 9,7mmol, 1,0 đương lượng) trong benzen (350ml, 0,03M) trong môi trường nitơ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 30 phút, hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Hỗn hợp phản ứng này được cô và tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (I, 2,5g, 5,26mmol, 54%).

Bước 4: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-7-(1-etoxyetoxy)-3,7-dimetyl-12-oxo-2-((E)-4-oxobut-2-en-2-yl)oxaxyclododec-4-en-6-yl axetat. Bổ sung etoxyeten (11,1ml, 40,0 đương lượng) và pyridini p-toluensulfonat (0,07g, 0,3mmol, 0,1 đương lượng) ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch chứa aldehyt I (1,4g, 2,9mmol, 1,0 đương lượng) trong THF (9,5ml, 0,5M). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 24 giờ, hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt bằng natri bicacbonat và pha loãng với etyl axetat. Lớp etyl axetat được rửa bằng nước, nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (J, 1,2g, 2,2mmol, 75%).

Bước 5: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-7-(1-etoxyetoxy)-3,7-dimetyl-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(pyridin-2-yl)hepta-2,4-dien-2-yl)-oxaxyclododec-4-en-6-yl) axetat. Bổ sung KHMDs (4,2ml, 2,1mmol, 1,5 đương lượng) nhỏ giọt vào dung dịch chứa (S)-2-(1-((1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)sulfonyl)propan-2-yl)pyridin (695,0mg, 2,1 mmol, 1,5 đương lượng) trong THF (20ml, 0,06M) trong môi trường nitơ ở -78°C và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 20 phút. Tiếp theo, bổ sung nhỏ giọt aldehyt J (780,0mg, 1,4mmol, 1,0 đương lượng) trong THF (1,0ml) vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở -78°C trong 90 phút và tiếp theo, để cho ấm đến -20°C trong 1 giờ. Phản ứng này được dập tắt bằng amoni clorua, pha loãng với etyl axetat, và làm ấm đến nhiệt độ trong phòng. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm Julia mong muốn (K, 490mg, 0,7mmol, 53%).

Bước 6: Tổng hợp (4R,7R,8S,11S,E)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-7-(1-etoxyetoxy)-8-hydroxy-7,11-dimetyl-12-((R,2E,4E)-6-(pyridin-2-yl)hepta-2,4-dien-2-yl)oxaxyclododec-9-en-2-on. Bổ sung kali cacbonat (155mg, 0,4mmol, 1,5 đương lượng) vào dung dịch chứa axetat K (490mg, 0,7mmol, 1,0 đương lượng) trong metanol (15ml, 0,05M) ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng này được tiến hành trong 24 giờ, hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt bằng nước, pha loãng với etyl axetat, rửa bằng nước muối,

làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Chất rắn dạng bột thu được (L, 459mg, 0,7mmol, 100%) được sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

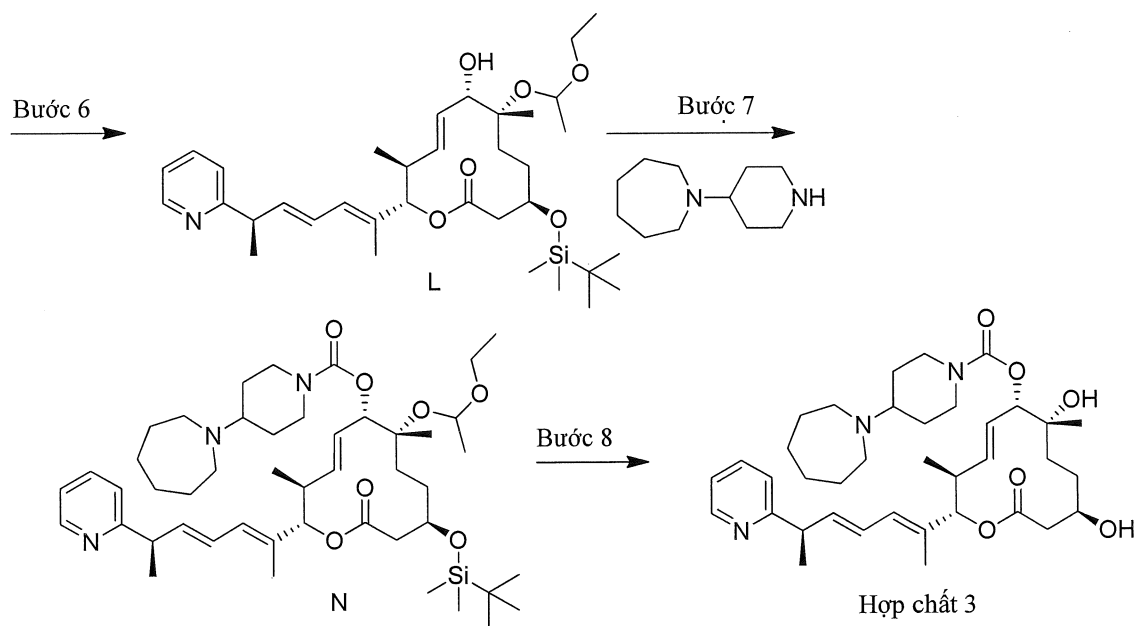
Bước 7: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-7-(1-etoxyetoxy)-3,7-dimetyl-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(pyridin-2-yl)hepta-2,4-dien-2-yl)oxaxyclododec-4-en-6-yl 4-metylpiperazin-1-carboxylat. Bổ sung N,N-dimetylaminopyridin (27,3mg, 0,2mmol, 0,3 đương lượng) và trietylamin (1,0ml, 7,4mmol, 10,0 đương lượng), tiếp theo là, 4-nitrophenyl cloformat (451mg, 0,22mmol, 3,0 đương lượng) vào dung dịch chứa rượu L (459mg, 0,7mmol, 1,0 đương lượng) trong diclometan (0,5ml, 0,1M) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong ba giờ. Tiếp theo, bổ sung *N*-metyl-piperazin (299mg, 2,98mmol, 4,0 đương lượng) vào ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi khuấy trong một giờ, phản ứng được dập tắt bằng nước và pha loãng với diclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri hydroxit 1N, và lớp hữu cơ được cô. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (M, 553mg, 0,75mmol, 100%).

Bước 8: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-dihydroxy-3,7-dimetyl-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(pyridin-2-yl)hepta-2,4-dien-2-yl)oxaxyclododec-4-en-6-yl 4-metylpiperazin-1-carboxylat (hợp chất 2). Bổ sung axit p-metoxytoluensulfonic (425mg, 2,2mmol, 3,0 đương lượng) vào dung dịch chứa silyl ete (M, 553mg, 0,74mmol, 1,0 đương lượng) trong metanol (20ml, 0,04M) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 3 giờ, hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt bằng natri bicacbonat và pha loãng với etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (hợp chất 2, 184mg, 0,33mmol, 44%). ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-*d*) δ: 0,82-1,00 (m, 3H) 1,22-1,48 (m, 8H) 1,50-1,63 (m, 1H) 1,66-1,83 (m, 4H) 1,97 (s, 1H) 2,07 (s, 1H) 2,33 (s, 3H) 2,40 (br. s., 3H) 2,45-2,68 (m, 3H) 3,44-3,61 (m, 5H) 3,74 (dd, *J*=14,2, 7,2 Hz, 2H) 5,04 (d, *J*=9,3 Hz, 1H) 5,17 (d, *J*=10,5 Hz, 1H) 5,57-5,76 (m, 2H) 6,02 (dd, *J*=15,1, 7,5 Hz, 1H) 6,13 (d, *J*=10,8 Hz,

¹H) 6,34 (ddd, $J=15,1, 10,7, 1,0$ Hz, 1H) 7,14 (t, $J=6,2$ Hz, 1H) 7,18 (d, $J=7,4$ Hz, 1H) 7,63 (t, $J=7,3$ Hz, 1H) 8,57 (d, $J=5,1$ Hz, 1H). MS (ES+) = 556,4 [M+H].

Tổng hợp Hợp chất 3

Các bước 1 – 6 được tiến hành như trên trong quy trình tổng hợp Hợp chất 2, để tạo ra rượu L.



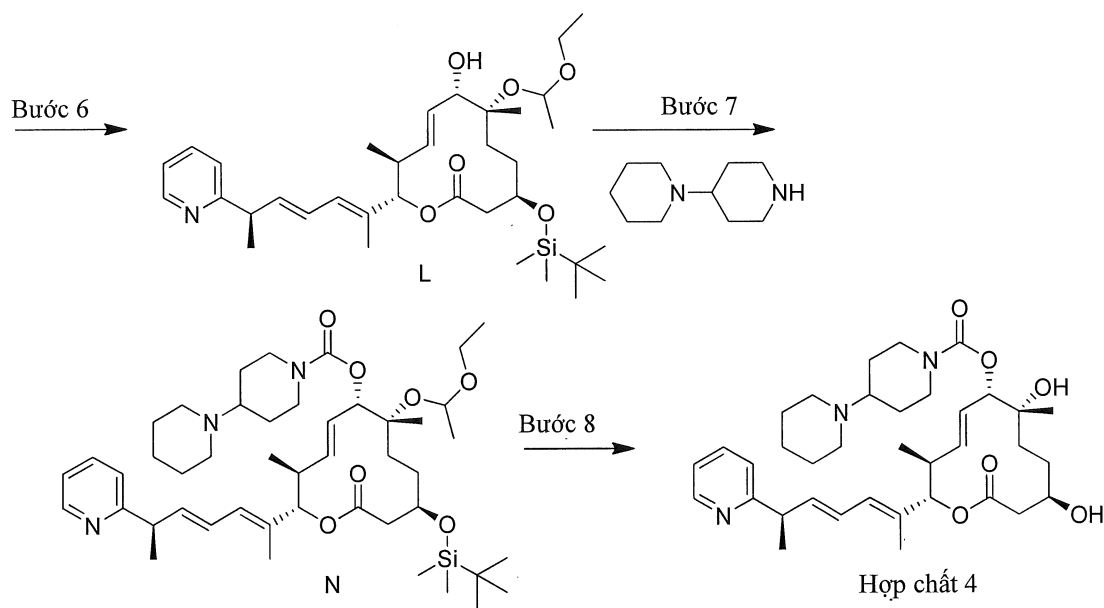
Sơ đồ III

Bước 7: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-7-(1-etoxyetoxy)-3,7-dimetyl-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(pyridin-2-yl)hepta-2,4-dien-2-yl)oxaxyclododec-4-en-6-yl 4-(azepan-1-yl)piperidin-1-carboxylat. Bổ sung N,N-dimethylaminopyridin (71,4mg, 0,58mmol, 1,2 đương lượng) và triethylamin (0,27ml, 1,95mmol, 4,0 đương lượng), tiếp theo là, 4-nitrophenyl cloformat (196mg, 0,97mmol, 2,0 đương lượng) vào dung dịch chứa rượu L (300mg, 0,49mmol, 1,0 đương lượng) trong diclometan (3,0ml, 0,15M) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong ba giờ. Tiếp theo, bổ sung 1-(piperidin-4-yl)azepan (265mg, 1,46mmol, 3,0 đương lượng) vào ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi khuấy trong một giờ, phản ứng được dập tắt bằng nước và pha loãng với diclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri hydroxit 1N, và lớp hữu cơ được cô. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (N, 400mg, 0,48mmol, 100%).

Bước 8: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-dihydroxy-3,7-dimetyl-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(pyridin-2-yl)hepta-2,4-dien-2-yl)oxaxyclododec-4-en-6-yl 4-(azepan-1-yl)piperidin-1-carboxylat (hợp chất 3). Bổ sung axit p-metoxytoluensulfonic (231mg, 1,2mmol, 2,5 đương lượng) vào dung dịch chứa silyl ete (N, 400mg, 0,48mmol, 1,0 đương lượng) trong metanol (4,0ml, 0,1M) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 3 giờ, hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt bằng natri bicacbonat và pha loãng với etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (hợp chất 3, 226mg, 0,35mmol, 73%). ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ : 0,88 (d, $J=6,53$ Hz, 3 H) 1,20 - 1,28 (m, 4 H) 1,35 (s, 3 H) 1,45 (d, $J=7,03$ Hz, 4 H) 1,59 (br. s., 10 H) 1,74 (d, $J=0,75$ Hz, 3 H) 1,75 - 1,83 (m, 2 H) 1,99 (s, 1 H) 2,46 - 2,62 (m, 3 H) 2,62 - 2,71 (m, 4 H) 2,79 (br. s., 2 H) 3,51 (d, $J=9,79$ Hz, 1 H) 3,63 - 3,82 (m, 2 H) 4,03 - 4,26 (m, 2 H) 5,01 (d, $J=9,54$ Hz, 1 H) 5,16 (d, $J=10,79$ Hz, 1 H) 5,54 - 5,64 (m, 1 H) 5,65 - 5,75 (m, 1 H) 6,01 (dd, $J=15,06, 7,53$ Hz, 1 H) 6,12 (d, $J=11,04$ Hz, 1 H) 6,25 - 6,39 (m, 1 H) 7,12 (ddd, $J=7,47, 4,83, 1,25$ Hz, 1 H) 7,17 (dt, $J=8,03, 1,00$ Hz, 1 H) 7,62 (td, $J=7,65, 1,76$ Hz, 1 H) 8,56 (ddd, $J=4,96, 1,82, 1,00$ Hz, 1 H). MS (ES+) = 638,6 [M+H].

Tổng hợp Hợp chất 4

Các bước 1 – 6 được tiến hành như trên trong quy trình tổng hợp Hợp chất 2, để tạo ra rượu L.



Sơ đồ IV

Bước 7: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-7-(1-etoxyetoxy)-3,7-dimetyl-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(pyridin-2-yl)hepta-2,4-dien-2-yl)oxaxyclododec-4-en-6-yl [1,4'-bipiperidin]-1'-carboxylat.

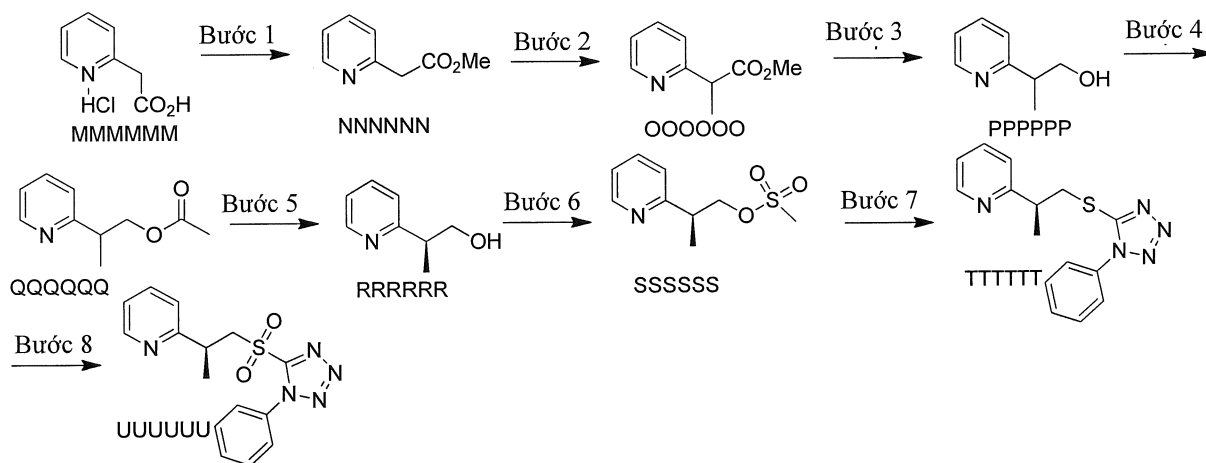
Bổ sung N,N-dimetylaminopyridin (4,8mg, 0,04mmol, 1,2 đương lượng) và trietylamin (0,02ml, 0,13mmol, 4,0 đương lượng), tiếp theo là, 4-nitrophenyl cloformat (13,1mg, 0,065mmol, 2,0 đương lượng) vào dung dịch chứa rượu L (20mg, 0,032mmol, 1,0 đương lượng) trong diclometan (0,3ml, 0,1M) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong ba giờ. Tiếp theo, bổ sung 1,4'-bipiperidin (16,4mg, 0,97mmol, 3,0 đương lượng) vào ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi khuấy trong một giờ, phản ứng được dập tắt bằng nước và pha loãng với diclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri hydroxit 1N, và lớp hữu cơ được cô. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (N, 18mg, 0,22mmol, 68,4%).

Bước 8: Tổng hợp (2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-dihydroxy-3,7-dimetyl-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(pyridin-2-yl)hepta-2,4-dien-2-yl)oxaxyclododec-4-en-6-yl [1,4'-bipiperidin]-1'-carboxylat (hợp chất 4).

Bổ sung axit p-metoxytoluensulfonic (10,6mg, 0,56mmol, 2,5 đương lượng) vào dung dịch chứa silyl ete (N, 18mg, 0,022mmol, 1,0 đương lượng) trong metanol (0,5ml, 0,04M) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 3 giờ, hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC.

Phản ứng này được dập tắt bằng natri bicacbonat và pha loãng với etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (hợp chất 4, 4,0mg, 0,006mmol, 29%). ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ : 0,90 (d, $J=6,8$ Hz, 3H) 1,17-1,42 (m, 5H) 1,46 (d, $J=7,0$ Hz, 6H) 1,51-1,65 (m, 6H) 1,65-1,78 (m, 5H) 1,85 (d, $J=11,5$ Hz, 2H) 2,44 (d, $J=11,3$ Hz, 2H) 2,49-2,66 (m, 6H) 2,80 (br. s., 2H) 3,42-3,62 (m, 1H) 3,63-3,82 (m, 2H) 4,18 (br. s., 2H) 5,02 (d, $J=9,5$ Hz, 1H) 5,17 (d, $J=10,8$ Hz, 1H) 5,57-5,75 (m, 2H) 6,02 (dd, $J=15,2, 7,4$ Hz, 1H) 6,14 (d, $J=11,0$ Hz, 1H) 6,34 (ddd, $J=15,1, 10,8, 1,0$ Hz, 1H) 7,14 (t, $J=6,1$ Hz, 1H) 7,18 (d, $J=7,5$ Hz, 1H) 7,29 (s, 2H) 7,63 (td, $J=7,7, 1,9$ Hz, 1H) 8,57 (d, $J=5,1$ Hz, 1H). MS (ES $^{+}$) = 624,6 [M+H].

Tổng hợp (S)-2-(1-((1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)sulfonyl)propan-2-yl)pyridin



Sơ đồ V

Bước 1: Bổ sung thionyl clorua (31,5ml, 432,0mmol, 1,5 đương lượng) nhỏ giọt vào dung dịch chứa 2-(pyridin-2-yl)axetic axit hydroclorua salt MMMMMM (50,0g, 288,0mmol, 1,0 đương lượng) trong metanol (500ml, 0,5M) ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0°C trong 60 phút hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt một cách thận trọng bằng natri cacbonat và lớp nước được chiết bằng etyl axetat. Gom các lớp hữu cơ, rửa bằng nước, nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Sản phẩm thu được (NNNNNN, 41,5g, 275,0mmol, 95%) được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước 2: Bổ sung natri 2-metylpropan-2-olat (28,6g, 288,3mmol, 1,05 đương lượng) vào dung dịch chứa este NNNNNN (41,5g, 275,0mmol, 1,0 đương lượng) trong THF (1500ml, 0,2M) ở 0°C và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút ở 0°C trước khi bổ sung iodometan (34,3ml, 549,1mmol, 2,0 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt bằng amoni clorua và lượng dư dung môi được loại bỏ trong chân không. Tiếp theo, chiết các chất thô bằng etyl axetat. Gom các lớp hữu cơ, rửa bằng nước muối, và làm khô trên magie sulfat. Sau khi lọc, hỗn hợp này được cô trong chân không. Metyl este thu được (OOOOOO, 41,3g, 250mmol, 91%) được sử dụng tiếp mà không cần tinh chế.

Bước 3: Bổ sung lithi nhôm hydrua (312ml, 312,4mmol, 1,2 đương lượng, dung dịch trong THF) nhỏ giọt vào dung dịch chứa metyl este OOOOOO (43,0g, 260,3mmol, 1,0 đương lượng) trong THF (1500ml, 0,1M) ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng này được để cho ấm từ từ đến 0°C trong 30 phút và tiếp theo, đến nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt một cách thận trọng bằng nước, natri hydroxit và nước. Sau khi khuấy hỗn hợp này trong 30 phút, chất kết tủa màu trắng được lọc ra và dung môi được loại bỏ trong chân không. Tiếp theo, chiết hỗn hợp phản ứng này bằng dietyl ete và gom các phân đoạn hữu cơ, rửa bằng nước, nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô trong chân không. Rượu thu được (PPPPPP, 30,0g, 219,0mmol, 84%) được sử dụng tiếp mà không cần tinh chế.

Bước 4: Bổ sung trietylamin (61,5ml, 437,4mmol, 2,0 đương lượng), và DMAP (2,7g, 21,9mmol, 0,1 đương lượng) vào dung dịch chứa rượu PPPPPP (30,0g, 219,0mmol, 1,0 đương lượng) trong diclometan (700ml, 0,3M) ở 0°C. Bổ sung axetic anhydrit (24,8ml, 262,4mmol, 1,2 đương lượng) vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút hoặc cho đến khi phản ứng này được xác định là kết thúc bằng LCMS hoặc TLC. Phản ứng này được dập tắt bằng amoni clorua, lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat và lọc. Tiếp theo, làm bay hơi dung dịch thu được và axetat thô (QQQQQQ, 37,0g, 206,0mmol, 94%) được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước 5: Dung dịch chứa axetat QQQQQQ (39,4g, 219,8mmol, 1,0 đương lượng) được hoàn tan trong diethyl ete (100ml) và tiếp theo, bổ sung 118g silicagel vào. Lượng dư ete được loại bỏ trong chân không và tiếp theo, pha loãng chất rắn thô thu được trong dung dịch đệm trong nước ở pH=7 (1970ml, 0,1M) (natri hydroxit / natri phosphat monobazơ / nước). Bổ sung lipaza tuyến tụy lợn loại II (3,3g, (15mg/mmol)) vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 37 °C trong bốn giờ hoặc cho đến khi xác định được là kết thúc bằng TLC hoặc LCMS. (Sau khi bốn giờ, độ chuyển hóa đạt 40% theo ELSD và lượng dư chất đồng phân đối ảnh được xác định bằng SFC bất đối xứng, và cho thấy tỷ lệ chất đồng phân đối ảnh là 13:1 S:R). (điều kiện SFC: SFC Investigator (Waters/Thar), phần mềm: Chromscope v1.2, phương pháp: Isocratic 15% đồng dung môi 95:5 Heptan:IPA +0,1% DEA trong 10 phút, Cột: Lux-Amylose-2, 4,6x250mm, 5µm, Lưu lượng tổng: 4ml/phút (3,80ml từ bơm CO₂, 0,20ml từ bơm cải biến), nhiệt độ lò được đặt ở 35°C và áp suất được đặt ở 100 ba (104 kPa), Thời gian lưu: mong muốn và chính chất đồng phân đối ảnh (S) 6,9 phút, phụ chất đồng phân đối ảnh (R) 8,4 phút). Silicagel được lọc ra và lớp nước được chiết bằng etyl axetat ba lần. Gom các lớp hữu cơ, rửa bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat và cô. Sản phẩm được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan:etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được rượu mong muốn (RRRRRR, 12,5g, 91mmol, 41%).

Bước 6: Bổ sung triethylamin (13,9ml, 100,1mmol, 1,1 đương lượng) vào dung dịch chứa rượu RRRRRR (12,5g, 91,0mmol, 1,00 đương lượng) trong diclometan (570ml, 0,16M) ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng này được làm lạnh xuống 0°C và tiếp theo, bổ sung metansulfonyl clorua (7,44ml, 95,5mmol, 1,05 đương lượng) vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0 °C trong 30 phút hoặc cho đến khi xác định được là kết thúc bằng TLC hoặc LCMS. Phản ứng này được dập tắt bằng natri bicacbonat và các lớp được tách ra. Tiếp theo, chiết lớp nước bằng diclometan. Gom các lớp hữu cơ, rửa bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, và cô trong chân không. Sulfonat SSSSSS thu được (19,2g, 89mmol, 98%) được dùng tiếp mà không cần tinh chế thêm.

Bước 7: Bổ sung xeri cacbonat (40,7g, 125,0mmol, 1,4 đương lượng) và 1-phenyl-1H-tetrazol-5-thiol (19,1g, 107,1mmol, 1,2 đương lượng) vào dung dịch chứa sulfonat SSSSSS (19,2g, 89mmol, 1,0 đương lượng) trong DMF (120ml, 0,1M) ở

nhệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được được khuấy ở 50°C trong 48 giờ, hoặc cho đến khi xác định được là kết thúc bằng TLC hoặc LCMS. Sau khi làm mát hỗn hợp này xuống nhiệt độ trong phòng, bổ sung nước muối vào và lớp nước được chiết ba lần bằng diethyl ete. Gôm các lớp hữu cơ, rửa bằng nước, nước muối, và làm khô trên magie sulfat. Sau khi lọc, dung môi được loại bỏ trong chân không và cặn được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat) để tạo ra sản phẩm mong muốn (TTTTTT, 28,9g, 88mmol, 99%).

Bước 8: Bổ sung amoni molybdat tetrahydrat (6,5g, 5,3mmol, 0,05 đương lượng) và hydro peroxit (108ml, 1060mmol, 5,0 đương lượng, 33% nước dung dịch) vào dung dịch chứa sulfua TTTTTT (31,5g, 105,9mmol, 1,0 đương lượng) trong EtOH (700ml, 0,1M) ở -10°C. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở -10°C trong bốn giờ hoặc cho đến khi xác định được là kết thúc bằng TLC hoặc LCMS. Phản ứng này được dập tắt bằng nước và dung dịch natri metabisulfit. Sản phẩm thô được gom bằng cách lọc và tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan:etyl axetat làm chất rửa giải) để thu được sản phẩm mong muốn (UUUUUU, 23,2g, 70,4mmol, 66%). ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ: 1,50 (d, *J*=7,03 Hz, 3 H) 1,66 (br. s., 1 H) 3,75 (m, 1 H) 3,94 (dd, *J*=14,81, 5,02Hz, 1 H) 4,55 (dd, *J*=14,68, 7,91 Hz, 1 H) 7,14 - 7,22 (m, 2 H) 7,29 (s, 1 H) 7,57 - 7,70 (m, 6 H) 8,44 - 8,49 (m, 1 H).

Tiếp theo, tái kết tinh dầu không màu bằng cách sử dụng toluen/heptan (1/1) (1ml toluen và 1ml heptan trên 100mg hợp chất. Đun nhẹ hỗn hợp này để trộn hai dung môi với nhau. Để hỗn hợp này mát xuống nhiệt độ trong phòng trong 12h. (Nếu không quan sát thấy hiện tượng tái kết tinh, bổ sung một tinh thể vào dung dịch. Tinh thể này sẽ giúp cho việc tạo thành tinh thể qua quá trình tạo mầm.) Các tinh thể được tạo thành từ từ theo thời gian. Chúng có thể tách được bằng cách lọc hoặc loại bỏ lớp chất lỏng bằng pipet. Tiếp theo, rửa các tinh thể bằng heptan và tiếp theo, rửa nhanh bằng toluen. Các chất đồng phân đối ảnh của sulfon được phân tích trước và sau khi tái kết tinh. (điều kiện SFC: điều kiện SFC: SFC Investigator (Waters/Thar), phần mềm: Chromscope v1,2, phương pháp: Isocratic 10% đồng dung môi MeOH trong 10 phút, Cột: ChiralPak IC, 4,6x250mm, 5μm, Lưu lượng tổng: 4ml/phút (3,80ml từ bơm CO₂, 0,20ml từ bơm cải biến), nhiệt độ lò được đặt ở 35 °C và áp suất được đặt ở 100

ba (10^4 kPa), Thời gian lưu: chất đồng phân đôi ảnh (S) mong muốn và chính 3,5 phút, chất đồng phân đôi ảnh (R) phụ 3,8 phút).

Đo độ ổn định pH

Các hợp chất được cho vào đĩa 96 lỗ và được thử nghiệm trong ba bản. Bốn microlit dung dịch gốc 10mM chứa hợp chất trong DMSO được phân phối vào mỗi trong số ba lỗ. Các đĩa được bảo quản ở nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ cho đến ngày phân tích. Metanol (loại HPLC) và dung dịch HCl 0,1N (EMD catalog HX0603A-6) được sử dụng để pha loãng. Axetonitril (loại HPLC), nước (Milli-Q lọc), axit trifloaxetic (loại phổ) và dung dịch đệm phosphat 0,2M (Wako, catalog số 163-14471) được sử dụng để điều chế pha động cho hai phân tích.

Dữ liệu độ ổn định thu được bằng cách sử dụng thiết bị Waters Acquity UPLC được lắp với máy phát hiện UV (Waters TUV) và máy phát hiện MS bốn cực đơn (Waters SQD). Đĩa 96 lỗ chứa (các) hợp chất quan tâm được lấy ra khỏi tủ lạnh và để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Thiết bị UPLC được làm sẵn cảm sơ bộ, làm cân bằng và hiệu suất của hệ thống được xác nhận bằng cách bơm chất chuẩn. Sau 1 giờ, mỗi trong số ba lỗ được pha loãng với 266 μL dung dịch HCl 0,1N để tạo ra pH = 1. Các đĩa được đậy nắp và cho vào máy lắc (Eppendorf Thermomixer R) trong 45 phút với tốc độ 600 vòng/phút. Các đĩa được lấy ra từ máy lắc, và các chất trong các lỗ được lọc qua đĩa lọc (Millipore catalog số MSSLBPC50) bằng chân không và bơm vào UPLC. Sau khoảng 24 giờ, các chất trong các lỗ được bơm lại vào UPLC.

Thông số thiết bị UPLC (Đo độ hòa tan và độ ổn định)

Cột	Acquity HSS T3 cột, 2,1 x 100mm, 1,8µm	
Pha động	A=0,05%TFA trong nước B= 0,05%TFA trong CH ₃ CN	
Gradient rửa giải	Thời gian	Pha động A:B
	0,0	90/10
	0,75	3/97
	1,0	3/97
	1,01	90/10
	1,5	90/10
Nhiệt độ cột	50°C	
Phát hiện	UV @ 220nm	
Thể tích bơm	1µL	
Lưu lượng	0,9ml/phút	

Độ ổn định trong một số dung dịch đệm được đo bằng cách so sánh diện tích đỉnh-% của chất đang được phân tích trong metanol so với diện tích đỉnh-% của chất đang được phân tích ở cùng thời gian lưu trong 0,1 N HCl dung dịch đệm trong thời điểm phun 24 giờ. Thử nghiệm độ ổn định được thông báo trong Bảng 2 cho thấy các hợp chất 1-4 có độ ổn định lớn hơn ở độ pH=1 hơn hợp chất E7107 trong thời 24 giờ.

Bảng 2: Kết quả thử nghiệm độ ổn định

Hợp chất	% hợp chất gốc còn lại (pH = 1, 24 giờ)
E7107	44%
Hợp chất 1	91%
Hợp chất 2	96%
Hợp chất 3	98%
Hợp chất 4	99%

Thử nghiệm sinh học

Quy trình thử nghiệm khả năng sống sót tế bào

Các tế bào (WiDr và Panc05.04 thu được từ ATCC) được gieo trong đĩa 96 lỗ, với mật độ 2000 tế bào/100 μ L/lỗ, và ủ qua đêm. Môi trường đã sử dụng được loại bỏ, và môi trường mới chứa hợp chất với 9 nồng độ khác nhau (100 μ L/lỗ) được bổ sung, với nồng độ DMSO từ dung dịch hợp chất gốc được điều chỉnh là 0,1%. Mỗi hợp chất điều trị được tiến hành thành hai bản hoặc ba bản ở mỗi nồng độ.

Một đĩa khác chứa các tế bào được gieo được gọi là đĩa giờ gốc (Tz), được bổ sung DMSO 0,1% trong môi trường (100 μ L/lỗ), tiếp theo là chất phản ứng CellTiter-Glo® (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) (50 μ L/lỗ) để đo ATP làm vật đại diện cho khả năng sống sót tế bào. Trị số trung bình từ việc đo các lỗ lặp lại của đĩa này được sử dụng làm Tz.

Các đĩa được xử lý bằng hợp chất được ủ trong 72 giờ ở 37°C. Tiếp theo, bổ sung chất phản ứng CellTiter-Glo® (50 μ L/lỗ) và đo ATP. Trị số trung bình từ việc đo hai bản hoặc ba bản các lỗ được xử lý bằng hợp chất được sử dụng làm Ti, và các đĩa được gieo môi trường chứa DMSO 0,1% không chứa hợp chất được sử dụng làm sự tăng trưởng đối chứng (C).

Tỷ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng/phần trăm khả năng sống sót được tính bằng:

$$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 \text{ đối với các nồng độ có } Ti \geq Tz$$

$$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 \text{ đối với các nồng độ có } Ti < Tz.$$

*giờ gốc (Tz), sự tăng trưởng đối chứng (C), và sự sinh trưởng thử nghiệm với sự có mặt của hợp chất (Ti)

Tỷ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng/phần trăm khả năng sống sót được lập đồ thị theo nồng độ hợp chất để xác định E_{max} .

Tỷ lệ ức chế sinh trưởng 50% (GI_{50}) được tính từ $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$, là nồng độ thuốc tạo ra việc giảm 50% độ tăng thực của ATP trong mẫu tăng trưởng đối chứng (C) trong quá trình điều trị bằng hợp chất này.

Quy trình thử nghiệm tách intron *in vitro* (hóa sinh)

ARN tiền thông tin được đánh dấu biotin của sản phẩm thiết kế adenovirus typ 2 với đoạn khuyết của trình tự can thiệp (Ad2) (Berg, M.G., et al. 2012 Mol. Cell Bio., 32(7):1271-83) được điều chế bằng cách phiên mã *in vitro*. Sản phẩm thiết kế Ad2

chứa Exon 1 (41 nucleotit), Intron (231 nucleotit), và Exon 2 (72 nucleotit) được tạo ra bằng cách tổng hợp gen và tách dòng vào vị trí EcoRI và XbaI của vector pGEM®-3Z (Promega) do Genewiz® (South Plainfield, New Jersey) cung cấp. Tiếp theo, plasmit được duỗi thẳng bằng cách tiêu hóa XbaI và tinh chế. Việc phiên mã và việc tinh chế *in vitro* ARN tiền thông tin đã phiên mã được tiến hành bằng cách sử dụng lần lượt kit phiên mã MEGAscript® T7 (Invitrogen™, Life Technologies™, Grand Island, New York) và kit dọn phiên mã MEGAclean™ (Invitrogen™, Life Technologies™, Grand Island, New York), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tỷ lệ giữa biotin-16-UTP (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, Indiana) với UTP lạnh là 1:13 để kết hợp khoảng hai phân tử biotin trên mỗi ARN thông tin Ad2 được nối.

Thử nghiệm tách intron *in vitro* được tiến hành ở 30°C trong 25µL hỗn hợp phản ứng chứa 95µg dịch chiết nhân HeLa (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), 47nM ARN tiền thông tin Ad2, 25U chất ức chế RNasin RNaza (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), 1X dung dịch đệm SP (0,5mM ATP, 20mM creatin phosphat, 1,6mM MgCl₂), và các hợp chất trong DMSO (nồng độ cuối DMSO là 1%). Sau khi ủ 90 phút, phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung 18µL dung dịch NaCl 5M, và hỗn hợp này được ủ với 10µL hạt từ được bao streptavidin M-280 (Invitrogen™, Life Technologies™, Grand Island, New York) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng để bắt ARN tiền thông tin Ad2 và ARN thông tin được nối. Các hạt từ được rửa hai lần bằng 100uL dung dịch đệm chứa 10mM Tris pH=7,5, 1mM EDTA và NaCl 2M, và tiếp theo ủ trong đệm tải gel ARN chứa 95% formamit ở 70°C trong 10 phút để rửa giải ARN. ARN Ad2 được phân giải bằng gel TBE-UREA 6%, chuyển vào màng nylon, được tạo liên kết ngang bằng UV, và phát hiện bằng streptavidin được đánh dấu IRDye® (LI-COR, Lincoln, Nebraska). Lượng ARN được nối được định lượng bằng cách đo cường độ dải huỳnh quang bằng cách sử dụng phần mềm chụp ảnh LI-COR.

Kết quả

Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây. E_{max} dùng để chỉ đáp ứng đạt được tối đa với hợp chất trong khoảng liều được thử nghiệm, với trị số âm thể hiện khả năng làm chết tế bào. Trị số E_{max} càng âm cho thấy khả năng làm chết tế bào càng

lớn của hợp chất đó. Ví dụ, ở các tế bào Panc 05.04, dòng tế bào SF3B1 đột biến, trị số $E_{\max}$ càng âm cho thấy hợp chất 1 có khả năng làm chết tế bào lớn hơn nhiều hợp chất 2.

Các tế bào WiDr-R là tế bào ung thư ruột kết có đột biến R1074H được gây ra bằng phương pháp hóa học và đã được thấy là chịu được pladienolit B về mặt ức chế sinh trưởng (Yokoi, A., et al., 2011 FEBS Journal, 278:4870-4880). Việc sàng lọc ngược các hợp chất trong thử nghiệm khả năng sống sót này với dòng tế bào WiDr-R "kháng" có thể cho biết liệu các hợp chất này có tác dụng hướng đích hay không. Các hợp chất không có hoạt tính ức chế sinh trưởng (GI_{50}) trong dòng tế bào WiDr-R kháng nhưng duy trì được hoạt tính trong dòng tế bào WiDr gốc cho thấy sự điều biến tách intron theo cơ chế là chịu trách nhiệm đối với việc ức chế sinh trưởng là quan sát thấy trong dòng tế bào WiDr gốc.

Thử nghiệm tách intron in vitro (IVS) được mô tả trên đây là thử nghiệm hóa sinh theo dõi sự ức chế việc tách intron của ARN tiền thông tin làm ví dụ thành ARN thông tin. Thử nghiệm hóa sinh giúp cho các nhà nghiên cứu đánh giá tại nồng độ nào của hợp chất, việc tách intron của sản phẩm phiên mã cụ thể bị ức chế ở mức không phải tế bào và được sử dụng để chứng minh hoạt tính ức chế việc tách intron theo cơ giới.

Bảng 3: Hoạt tính sinh học của hợp chất 1, 2, 3 và 4

Hợp chất số	Panc 05.04 (tế bào mt SF3B1) $E_{\max}$ (%)	Panc 05.04 (tế bào mt SF3B1), GI_{50} (nM)	WiDr GI_{50} (nM)	WiDr-R GI_{50} (nM)	Thử nghiệm tách intron in vitro (IVS) (nM)
1	-86,85	19,48	15,85	>1000	188,00
2	-66,09	32,72	31,78	>1000	1330,00
3	-90,81	20,75	26,29	>1000	770,00
4	-86,16	11,81	12,98	>1000	89,00

Bảng so màu

Tế bào Panc 05.04: Tế bào ung thư tuyến tụy, dòng tế bào SF3B1 đột biến (Q699H và K700E đột biến trong SF3B1)

tế bào WiDr: Tế bào ung thư ruột kết (SF3B1 loại hoang)

Tế bào WiDr-R: Tế bào ung thư ruột kết (SF3B1 đột biến được gây ra bằng phương pháp hóa học kháng lại E7107 (R1074H đột biến))

Thử nghiệm bổ sung với các hợp chất

Nghiên cứu dược lý (PK) trên chuột

Hợp chất 2 được dùng liều 5mg/kg IV (trong tĩnh mạch) hoặc 10mg/kg PO (dùng qua đường miệng) cho chuột CD-1. Sau khi dùng, máu mẫu được lấy vào thời điểm đã định từ năm con chuột bằng cách lấy mẫu theo dây từ tĩnh mạch đuôi. Máu được lấy vào thời điểm 0,083 (chỉ 0,167 giờ với PO), 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, và 24 giờ sau khi dùng. Các mẫu máu được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút để lấy huyết tương trong thời gian 30 phút sau khi lấy máu. Sau khi chiết, các mẫu được thử nghiệm bằng cách sử dụng LCMS. Các thông số PK được tính bằng cách sử dụng phân tích không ngăn trong WinNonlin v6.3.

Các dữ liệu cho thấy hợp chất 2 có độ sinh khả dụng qua đường miệng và có các đặc tính dược lý thuận lợi trên mô hình chuột (FIG. 1, Bảng 4).

Bảng 4

Đặc tính dược lý	Liều	
	5mg/kg IV	10mg/kg PO
C_{max} (ng/mL)	NA	840,73
C_{max}/D (ng/mL/D)	NA	84,07
t_{max} (h)	NA	1,00
$t_{1/2}$ (h)	3,88	4,04
AUC_{0-t} (ng•h/mL)	3156,95	2513,35
AUC_{0-inf} (ng•h/mL)	3163,56	2544,86
AUC_{0-inf}/D (ng•h/mL/D)	632,71	254,49
CL (L/kg/h)	1,58	NA
V_{ss} (L/kg)	2,37	NA
%F	NA	40,22

Mô hình ghép khác loài trên chuột

Hiệu quả của hợp chất 2 được thử nghiệm trong mô hình chuột ghép khác loài. Tế bào cùng gen Nalm-6 SF3B1^{K700E} (dòng tiền tế bào B của người, 10×10^6 tế bào) được cấy dưới da vào hông chuột CB17-SCID cái. Các con chuột được xử lý bằng hợp chất 2 (10% etanol, 5% TWEEN-80, 85% nước muối) hoặc đối chứng là chất dẫn thuốc. Các con chuột được dùng liều hằng ngày qua đường miệng trong 14 ngày (QDx14 PO) với lượng được nêu trên FIG.2 và được theo dõi cho đến khi chúng đạt một trong các điểm cuối sau: 1) thể tích khối u thừa được đo ba lần một tuần (thể tích khối u được tính bằng cách sử dụng công thức tính hình elip: $(\text{Chiều dài} \times \text{Chiều rộng}^2)/2$); hoặc 2) xuất hiện các vấn đề về sức khỏe như mất cảm giác hoặc sụt cân nhiều. Việc nghiên cứu các con chuột được tiến hành theo Hướng dẫn Biomedicine H3 cho việc chăm sóc và sử dụng động vật trong phòng thí nghiệm (H3 Biomedicine Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

Kết quả cho thấy hợp chất 2 là hữu hiệu khi được dùng qua đường miệng và làm giảm sự phát triển khối u trên mô hình chuột ghép khác loài (FIG. 2).

Thử nghiệm PK/PD trên mô hình chuột ghép khác loài

Đặc tính dược lý (PK)/dược động (PD) của hợp chất 2 còn được phân tích trên mô hình chuột ghép khác loài Nalm-6. Tế bào cùng gen Nalm-6 SF3B1^{K700E} (dòng tiền tế bào B của người, 10×10^6 tế bào) được cấy dưới da vào hông chuột CB17-SCID cái. Các con chuột được dùng qua đường miệng liều đơn 10mg/kg hợp chất 2 (10% etanol, 5% TWEEN-80, 85% nước muối), và các khối u được lấy vào thời điểm đã định sau khi dùng dùng để phân tích.

ARN được tách bằng cách sử dụng kit tinh chế RiboPure™ ARN (Ambion®) và được sử dụng cho phân tích qPCR. ARN được phiên mã ngược theo hướng dẫn của kit tổng hợp SuperScript® VILO™ ADNc (Invitrogen™), và 0,04μl ADNc được sử dụng cho PCR định lượng (qPCR). qPCR cho ARN tiền thông tin EIF4A1 và ARN thông tin SLC24A19 trưởng thành và việc đánh giá PK được tiến hành như thông báo trên đây (Eskens, F. A. et al. Nghiên cứu dược lý và dược động pha I của chất ức chế phân tử cắt-nối E7107 đầu tiên ở bệnh nhân mắc khối u rắn tiến triển. *Clin Cancer*

Res. 19, 6296-6304, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0485 (2013)). Việc nghiên cứu các con chuột được tiến hành theo Hướng dẫn Biomedicine H3 cho việc chăm sóc và sử dụng động vật trong phòng thí nghiệm (H3 Biomedicine Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

Kết quả thể hiện trên FIG. 3 cho thấy hợp chất 2 có đáp ứng PD với liều dung nạp được khi dùng qua đường miệng.

Thử nghiệm khả năng sống sót tế bào

Để đánh giá khả năng sống sót của tế bào ung thư Panc 05.04 (SF3B1^{MUT}) (Q699H và K700E đột biến trong SF3B1) với sự có mặt của hợp chất 2, tế bào được gieo với mật độ 750 tế bào trên mỗi lỗ vào đĩa 384-lỗ và xử lý bằng hợp chất 2 với nồng độ được nêu trên FIG. 4 trong 72 giờ ở 37°C. Số lượng tương đối của các tế bào sống hoặc chết được đo bằng huỳnh quang bằng cách sử dụng thử nghiệm khả năng sống sót tế bào CELLTITER-GLO® (Promega).

Kết quả cho thấy khả năng làm chết tế bào khác nhau trong dòng tế bào ung thư tuyến tụy SF3B1đột biến cao hơn dòng tế bào ung thư tuyến tụy SF3B1 loại hoang (FIG. 4).

So sánh việc nối chuyển đổi của E7107 và hợp chất 2

Sự điều biến việc tách intron chuyển đổi đối với E7107 và hợp chất 2 được xác định bằng cách sử dụng hệ phân tích nCounter® (NanoString Technologies, Inc., Seattle, Washington). Các tế bào cùng gen Nalm-6 được xử lý bằng hợp chất 2 hoặc E7107 (thu được từ Eisai, Inc.) với nồng độ 10 x GI₅₀ for 6 giờ. ARN được tách bằng cách sử dụng kit tinh chế RiboPure™ ARN (Ambion®) và được sử dụng cho phân tích. ARN được phiên mã ngược theo hướng dẫn của kit tổng hợp SuperScript® VILO™ ADNc (Invitrogen™), và 0,04μl ADNc được sử dụng cho qPCR.

Kết quả thể hiện trên FIG. 5 cho thấy profile điều biến việc tách intron của hợp chất 2 khác hoàn toàn profile của E7107.

Nghiên cứu dược lý (PK) của hợp chất 1 trên chuột

Hợp chất 1 được dùng liều 5mg/kg IV hoặc 12 mg/kg PO cho chuột CD-1. Sau khi dùng, máu mẫu được lấy vào thời điểm đã định từ năm con chuột bằng cách lấy mẫu theo dây từ tĩnh mạch đuôi. Máu được lấy vào thời điểm 0,083 (chỉ 0,167 giờ với PO), 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, và 24 giờ sau khi dùng. Các mẫu máu được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút để lấy huyết tương trong thời gian 30 phút sau khi lấy máu. Sau khi chiết, các mẫu được thử nghiệm bằng cách sử dụng LCMS. Các thông số PK được tính bằng cách sử dụng phân tích không ngăn trong WinNonlin v6.3.

Các dữ liệu cho thấy hợp chất 1 có độ sinh khả dụng qua đường miệng và có các đặc tính dược lý thuận lợi trên mô hình chuột (FIG. 6, Bảng 5).

Bảng 5

Đặc tính dược lý	Liều	
	5mg/kg IV	12mg/kg PO
C _{max} (ng/mL)	NA	1810,81
C _{max} /D (ng/mL/D)	NA	141,47
t _{max} (h)	NA	0,50
t _{1/2} (h)	2,54	3,00
AUC _{0-t} (ng·h/mL)	4453,75	6206,20
AUC _{0-inf} (ng·h/mL)	4670,80	6234,38
AUC _{0-inf} /D (ng·h/mL/D)	934,15	487,06
CL (L/kg/h)	1,07	NA
V _{ss} (L/kg)	2,10	NA
%F	NA	52,14

Hiệu quả của hợp chất 1 trên mô hình chuột ghép khác loài

Hiệu quả của hợp chất 1 được thử nghiệm trong mô hình chuột ghép khác loài. Tế bào cùng gen Nalm-6 SF3B1^{K700E} (dòng tiền tế bào B của người, 10x10⁶ tế bào) được cấy dưới da vào hông chuột CB17-SCID cái. Các con chuột được xử lý bằng hợp chất 1 (10% etanol, 5% TWEEN-80, 85% nước muối) hoặc đối chứng là chất dẫn thuốc. Các con chuột được dùng liều hằng ngày qua đường miệng trong 14 ngày

(QDx14 PO) với lượng 7,5mg/kg hoặc 10mg/kg hợp chất 1 hoặc chất dẫn thuốc và được theo dõi cho đến khi chúng đạt một trong các điểm cuối sau: 1) thể tích khối u thừa được đo ba lần một tuần (thể tích khối u được tính bằng cách sử dụng công thức tính hình elip: $(\text{Chiều dài} \times \text{Chiều rộng}^2)/2$); hoặc 2) xuất hiện các vấn đề về sức khỏe như mất cảm giác hoặc sụt cân nhiều. Việc nghiên cứu các con chuột được tiến hành theo Hướng dẫn Biomedicine H3 cho việc chăm sóc và sử dụng động vật trong phòng thí nghiệm (H3 Biomedicine Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

Kết quả cho thấy hợp chất 1 là hữu hiệu khi được dùng qua đường miệng và làm giảm sự phát triển khối u trên mô hình chuột ghép khác loài (FIG. 7).

Thử nghiệm PK/PD của hợp chất 1 trên mô hình chuột ghép khác loài

Đặc tính dược lý (PK)/dược động (PD) của hợp chất 1 còn được phân tích trên mô hình chuột ghép khác loài Nalm-6. Tế bào cùng gen Nalm-6 SF3B1^{K700E} (dòng tiền tế bào B của người, 10×10^6 tế bào) được cấy dưới da vào hông chuột CB17-SCID cái. Các con chuột được dùng qua đường miệng liều đơn hợp chất 1 (10% etanol, 5% TWEEN-80, 85% nước muối), và các khối u được lấy vào thời điểm đã định sau khi dùng dùng để phân tích.

ARN được tách bằng cách sử dụng kit tinh chế RiboPure™ ARN (Ambion®) và được sử dụng cho phân tích qPCR. ARN được phiên mã ngược theo hướng dẫn của kit tổng hợp SuperScript® VILO™ ADNc (Invitrogen™), và 0,04μl ADNc được sử dụng cho PCR định lượng (qPCR). qPCR cho ARN tiền thông tin EIF4A1 và ARN thông tin SLC24A19 trưởng thành và việc đánh giá PK được tiến hành như thông báo trên đây (Eskens, F. A. et al. Nghiên cứu dược lý và dược động pha I của chất ức chế phần tử cắt-nối E7107 đầu tiên ở bệnh nhân mắc khối u rắn tiến triển. *Clin Cancer Res.* 19, 6296-6304, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0485 (2013)). Việc nghiên cứu các con chuột được tiến hành theo Hướng dẫn Biomedicine H3 cho việc chăm sóc và sử dụng động vật trong phòng thí nghiệm (H3 Biomedicine Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

Kết quả thể hiện trên FIG. 8 cho thấy hợp chất 1 có đáp ứng PD với liều dung nạp được khi dùng qua đường miệng.

Nghiên cứu dược lý (PK) của hợp chất 3 trên chuột

Hợp chất 3 được dùng liều 5,964 mg/kg IV hoặc 13,307 mg/kg PO cho chuột CD-1. Sau khi dùng, máu mẫu được lấy vào thời điểm đã định từ năm con chuột bằng cách lấy mẫu theo dây từ tĩnh mạch đuôi. Máu được lấy vào thời điểm 0,083 (chỉ 0,167 giờ với PO), 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, và 24 giờ sau khi dùng. Các mẫu máu được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút để lấy huyết tương trong thời gian 30 phút sau khi lấy máu. Sau khi chiết, các mẫu được thử nghiệm bằng cách sử dụng LCMS. Các thông số PK được tính bằng cách sử dụng phân tích không ngăn trong WinNonlin v6.3.

Các dữ liệu cho thấy hợp chất 3 có độ sinh khả dụng qua đường miệng và có các đặc tính dược lý thuận lợi trên mô hình chuột (FIG. 9, Bảng 6).

Bảng 6

Đặc tính dược lý	Liều	
	5,964mg/kg IV	13,307mg/kg PO
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	NA	1,567
$t_{\max}$ (h)	NA	2,000
$t_{1/2}$ (h)	3,660	3,322
AUC_{finite} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr}$)	6,210	8,136
$AUC_{0-\text{inf}}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr}$)	6,245	8,188
$AUC_{0-\text{inf}/D}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr/D}$)	1,047	0,615
V_{ss} (mL/kg)	2975,561	NA
CL_{tot} (mL/hr/kg)	954,975	NA
BA (%)	NA	58,758

Nghiên cứu dược lý (PK) của hợp chất 4 trên chuột

Hợp chất 4 được dùng liều 5mg/kg IV hoặc 10 mg/kg PO cho chuột CD-1. Sau khi dùng, máu mẫu được lấy vào thời điểm đã định từ năm con chuột bằng cách lấy mẫu theo dây từ tĩnh mạch đuôi. Máu được lấy vào thời điểm 0,083 (chỉ 0,167 giờ với PO), 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, và 24 giờ sau khi dùng. Các mẫu máu được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút để lấy huyết tương trong thời gian 30 phút sau khi lấy

máu. Sau khi chiết, các mẫu được thử nghiệm bằng cách sử dụng LCMS. Các thông số PK được tính bằng cách sử dụng phân tích không ngăn trong WinNonlin v6.3.

Các dữ liệu cho thấy hợp chất **4** có độ sinh khả dụng qua đường miệng và có các đặc tính dược lý thuận lợi trên mô hình chuột (FIG. 10, Bảng 7).

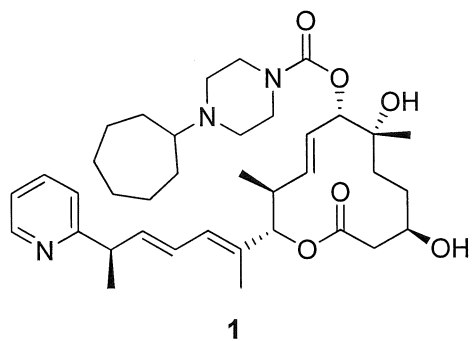
Bảng 7

Đặc tính dược lý	Liều	
	5mg/kg IV	10mg/kg PO
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	NA	1,252
$t_{\max}$ (h)	NA	2,000
$t_{1/2}$ (h)	3,013	2,975
AUC_{0-t} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr}$)	6,610	7,911
$\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr}$)	6,623	7,951
$\text{AUC}_{0-\text{inf}}/D$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr}/D$)	1,325	0,795
V_{ss} (mL/kg)	1893,683	NA
CL_{tot} (mL/hr/kg)	754,924	NA
BA (%)	NA	60,024

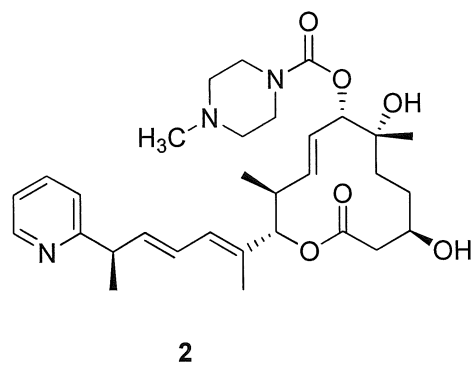
Kết quả thể hiện trên đây chứng minh mỗi hợp chất 1, 2, 3 và 4 đều có độ sinh khả dụng qua đường miệng và đặc tính dược lý thuận lợi. Đây là điểm tiến bộ hơn E7107, mà đã được dùng cho bệnh nhân để truyền trong tĩnh mạch do độ sinh khả dụng qua đường miệng không đủ của nó (Hong et al. (2014), Invest New Drugs 32, 436–444).

YÊU CẦU BẢO HỘ

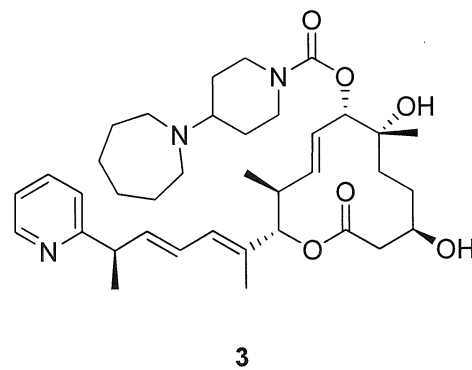
1. Hợp chất được chọn từ hợp chất có công thức 1:



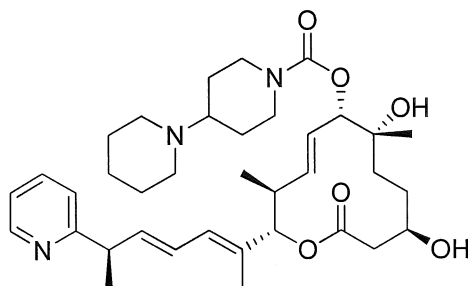
hợp chất có công thức 2:



hợp chất có công thức 3:



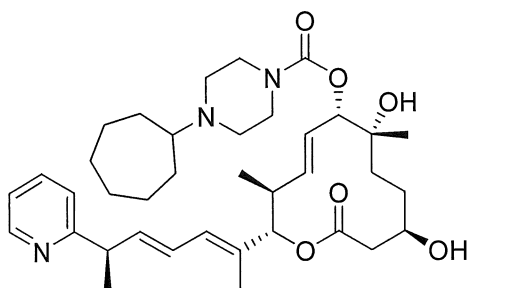
hợp chất có công thức 4:



4

và muối được dụng của nó.

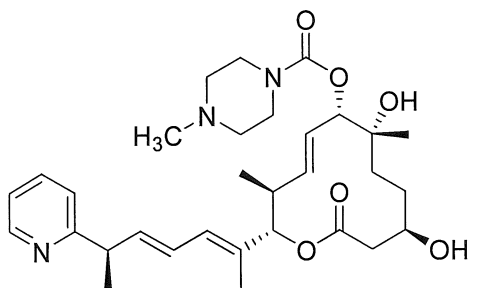
2. Hợp chất theo điểm 1 được chọn từ hợp chất có công thức 1:



1

và muối được dụng của nó.

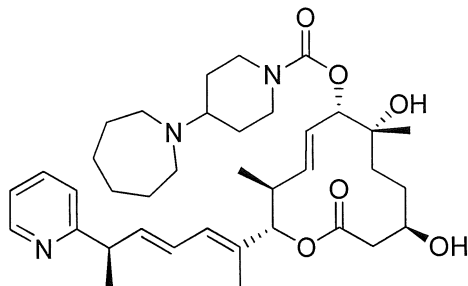
3. Hợp chất theo điểm 1 được chọn từ hợp chất có công thức 2:



2

và muối được dụng của nó.

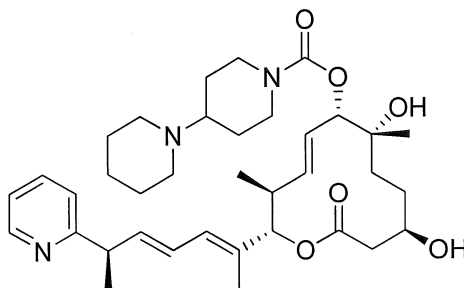
4. Hợp chất theo điểm 1 được chọn từ hợp chất có công thức 3:



3

và muối được dụng của nó.

5. Hợp chất theo điểm 1 được chọn từ hợp chất có công thức 4:



4

và muối được dụng của nó.

6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó hợp chất này là tinh khiết về mặt đồng phân lập thể, hoặc muối được dụng của nó.

7. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó hợp chất này chứa một chất đồng phân lập thể của hợp chất này với lượng lớn hơn khoảng 97% khối lượng và một chất đồng phân lập thể khác của hợp chất này với lượng ít hơn khoảng 3% khối lượng, hoặc muối được dụng của nó.

8. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc muối được dụng của nó.

9. Dược phẩm theo điểm 8, trong đó dược phẩm này được bào chế để dùng trong tĩnh mạch, qua đường miệng, dưới da, hoặc trong bắp.

10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này được bào chế để dùng qua đường miệng.

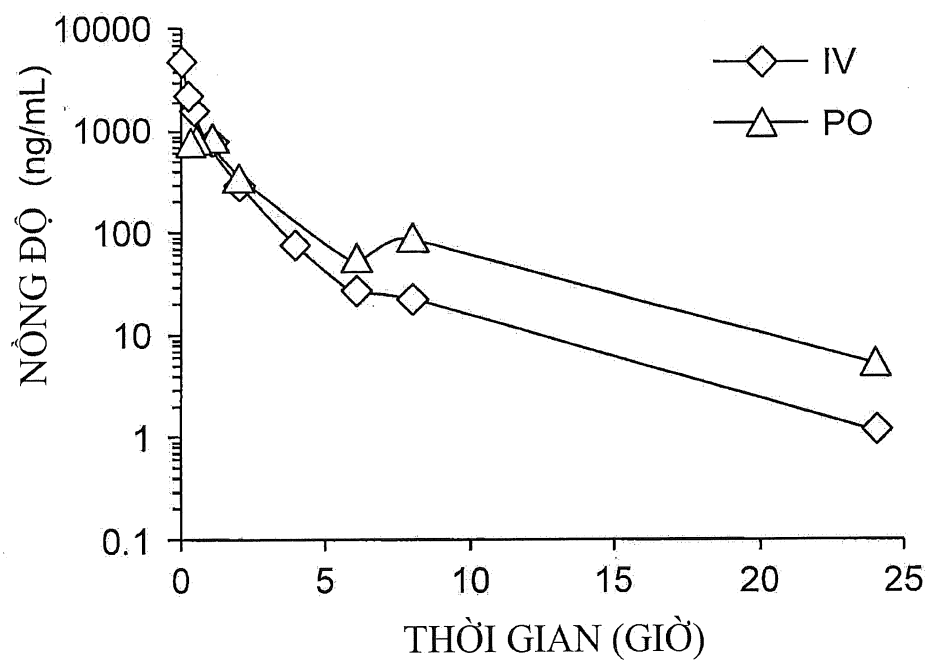


FIG. 1

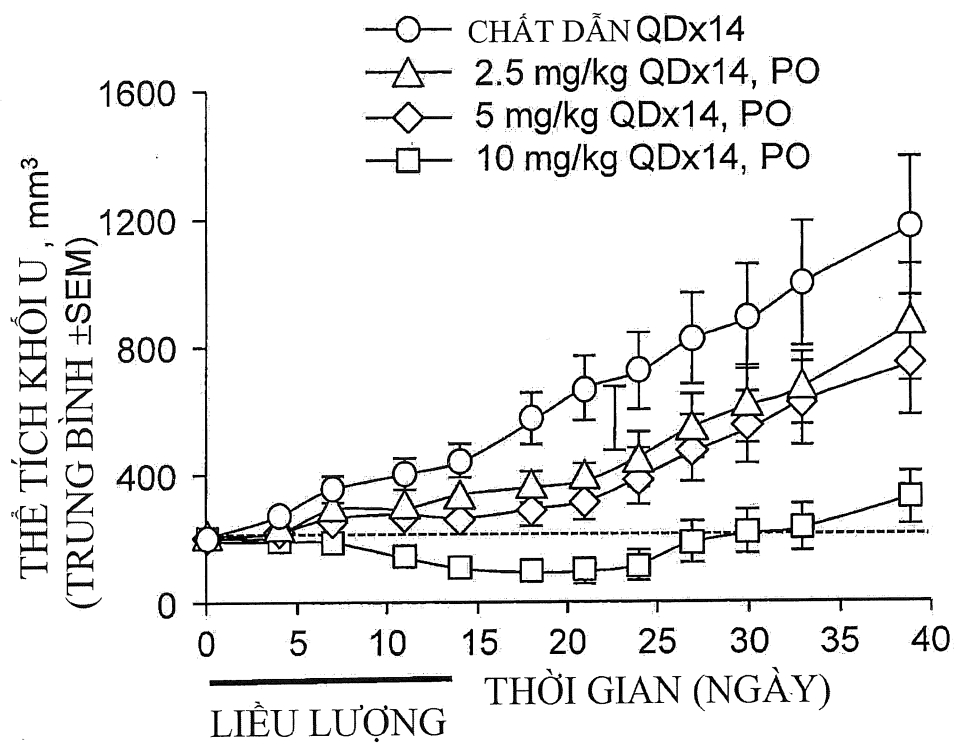


FIG. 2

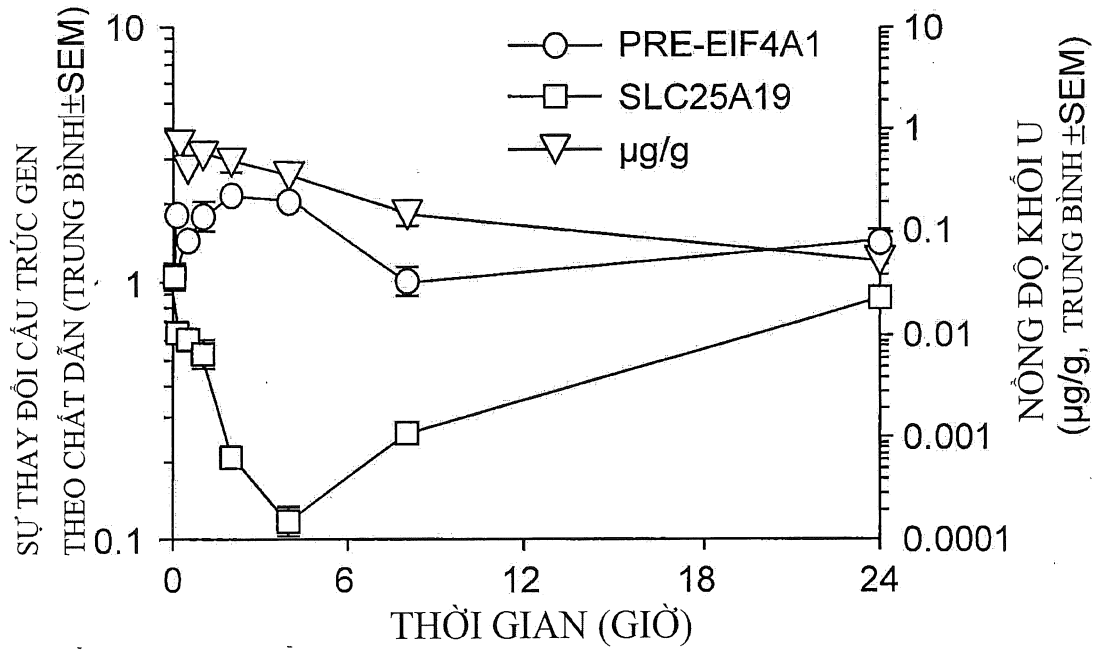


FIG. 3

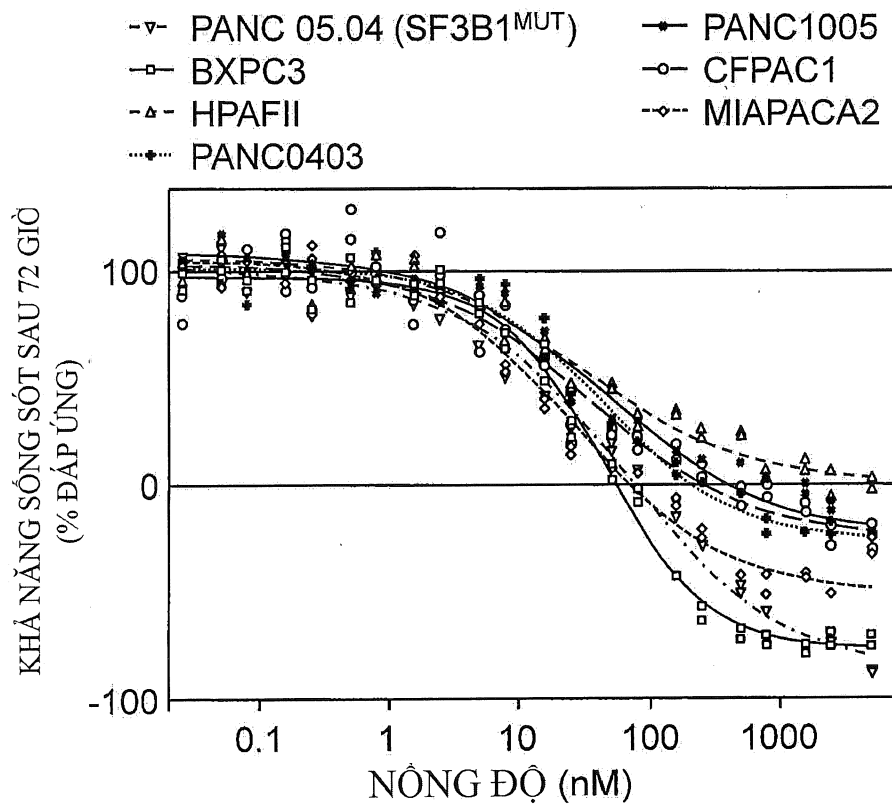


FIG. 4

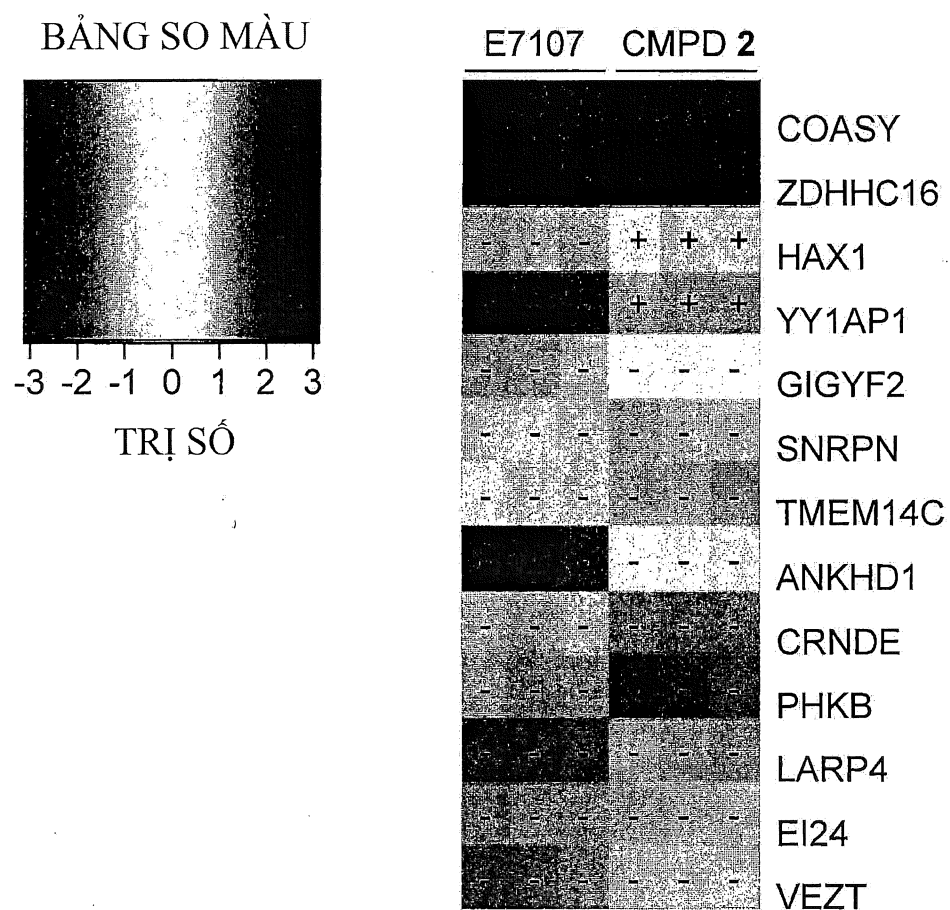


FIG. 5

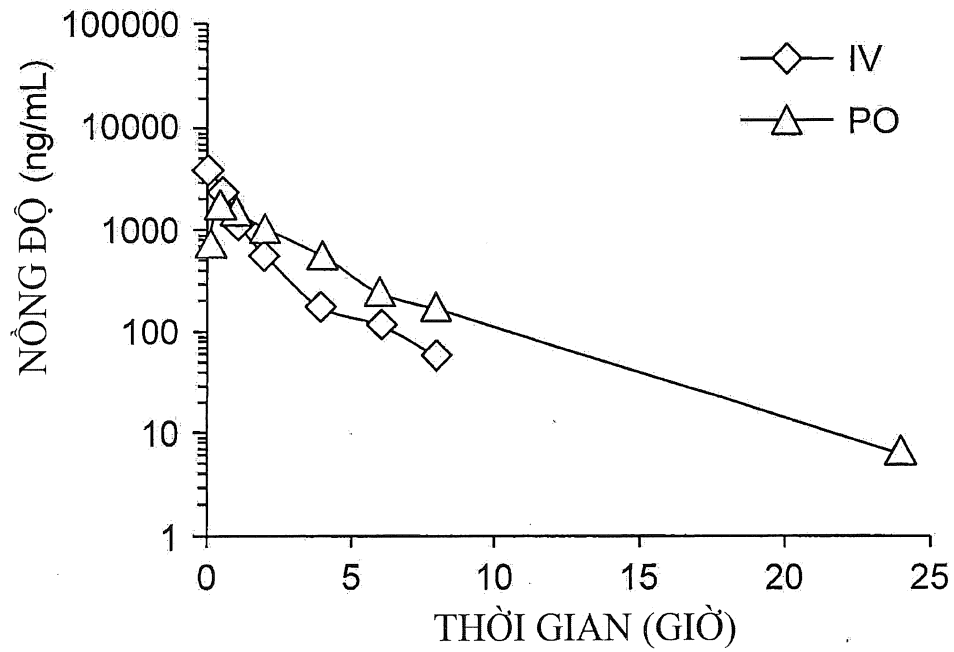


FIG. 6

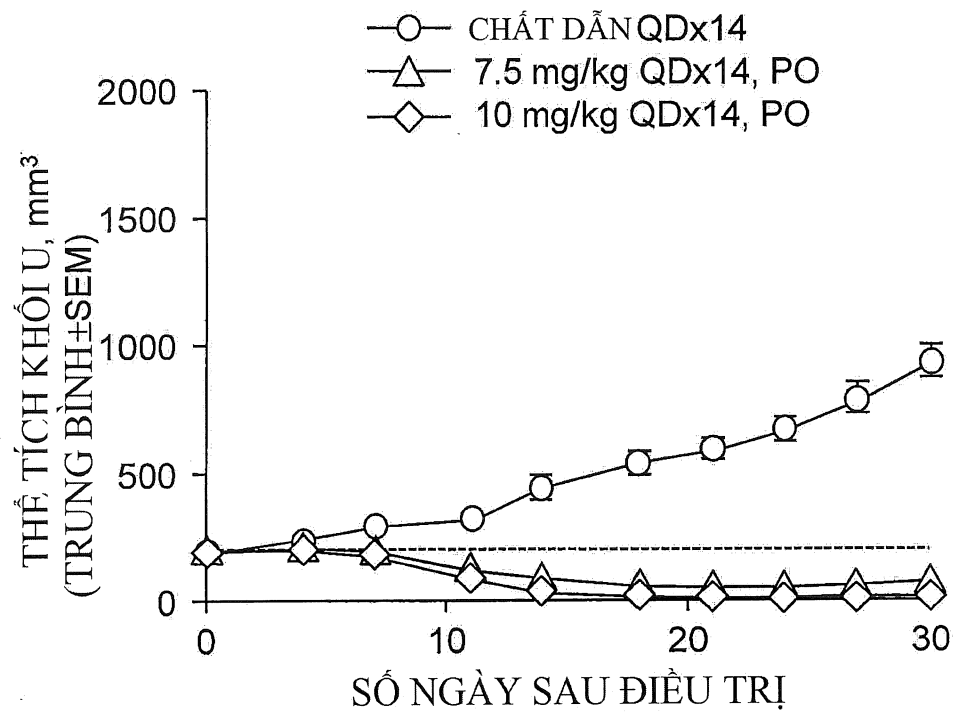


FIG. 7

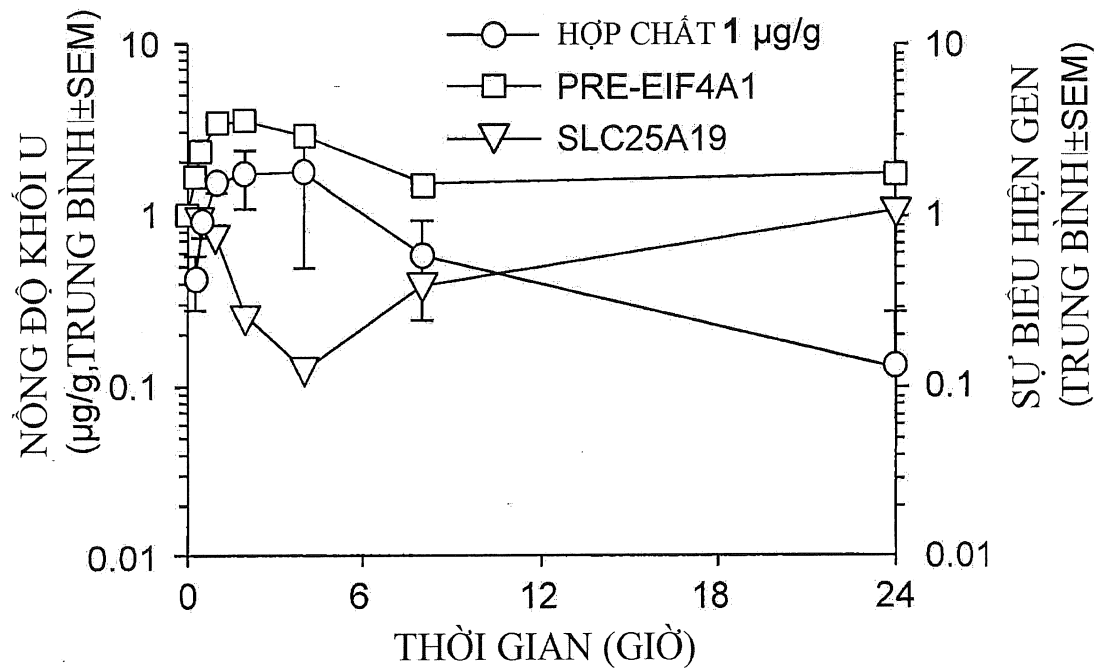


FIG. 8

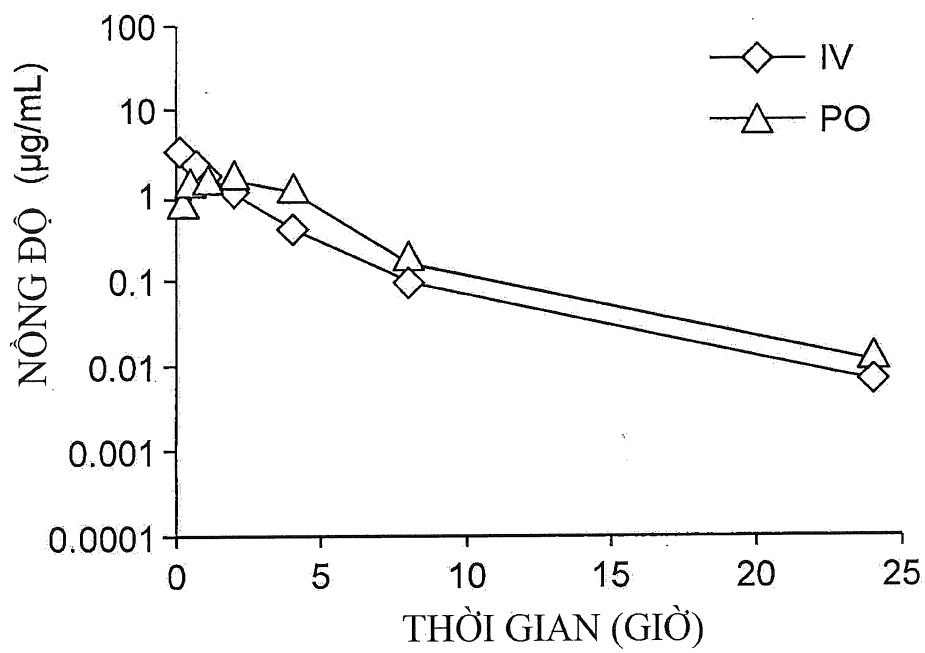
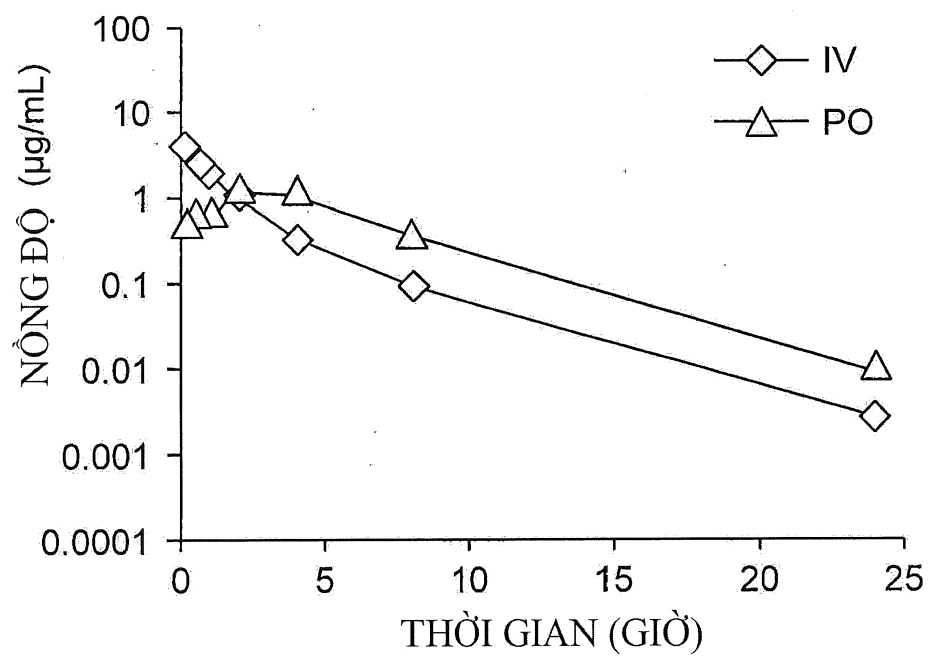


FIG. 9

*FIG. 10*