



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0032942

(51)⁷ C07D 401/04; A61K 31/47; A61P 35/00 (13) B

-
- (21) 1-2017-01966 (22) 26/10/2015
(86) PCT/IB2015/002438 26/10/2015 (87) WO 2016/067112 06/05/2016
(30) 62/073,325 31/10/2014 US
(45) 25/08/2022 413 (43) 27/11/2017 356A
(73) GENOSCIENCE PHARMA (FR)
10, rue d'Iena, 13006 Marseille, France
(72) BASSISSI, Firas (FR); BERET, Antoine (FR); BRUN, Sonia (FR);
COURCAMBECK, Jérôme (FR); DUBRAY, Clarisse (FR); NICOLAS, Gregory
(FR); HALFON, Philippe (FR).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) HỢP CHẤT 2-AMINO BẬC MỘT-4-AMINO BẬC HAI-QUINOLIN VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến dẫn xuất 2-amino bậc một-4-amino bậc hai-quinolin, phương pháp tổng hợp chúng, dược phẩm chứa chúng và ứng dụng chúng làm thuốc. Hợp chất có hoạt tính theo sáng chế hữu ích để điều trị và ngăn ngừa các bệnh u tân sinh và không phải u tân sinh tăng sinh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dẫn xuất 2-amino bậc một-4-amino bậc hai-quinolin, phương pháp tổng hợp chúng, được phẩm chứa chúng và ứng dụng chúng làm thuốc. Hợp chất có hoạt tính theo sáng chế hữu ích cho việc điều trị và ngăn ngừa các bệnh u tân sinh và không phải u tân sinh tăng sinh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc phát hiện ra thuốc chứa các chất chống ung thư mới gần đây đã chuyển từ phương pháp thử nghiệm dựa trên tế bào sang phương pháp tiếp cận *in vitro* tập trung nhiều hơn vào các protein biểu hiện có đặc tính tốt, được phân lập và hỗ trợ chuyển nhiễm của các đích có thể điều trị được bằng thuốc. Mô hình phát hiện thuốc hướng đích của (các) protein này đã được mô tả rõ trong lĩnh vực liên quan thông qua các nỗ lực lớn được thực hiện trong lĩnh vực phát hiện thuốc chứa các chất ức chế kinaza ở người có thiết kế hợp lý cho phép nghiên cứu kinome ở người. Thực vậy, kinaza ở người có thể bị đột biến và việc điều hòa giảm kinaza thường diễn ra trong quá trình chuyển đổi ác tính, tăng trưởng và di căn giai đoạn cuối của bệnh ung thư ở người. Mỗi liên hệ này giữa kinaza trong quá trình phát triển và tăng sinh của bệnh ung thư đã được biết rõ, ví dụ bệnh bạch cầu, u limphô, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, u hắc sắc tố, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan... Ngày nay, mặc dù có nhiều nỗ lực tập trung vào các rối loạn chức năng kinaza ở người trong một số bệnh ung thư, nhưng kết quả đột phá về mặt lâm sàng khi sử dụng chất ức chế kinaza trong liệu pháp chống ung thư không có mối liên hệ rõ ràng với việc chữa trị hoặc sự thuyên giảm bệnh, và một số bệnh ung thư dường như vẫn còn tính kháng tự nhiên đối với các chất ức chế kinaza được sử dụng trong lâm sàng (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan). Ngoài ra, các chất ức chế kinaza có thể chọn lọc *in vivo* một số chủng đột biến và kháng thuốc hoặc các tế bào được biến nạp có thể tìm thấy các con đường bù tương đương nhau. Trong hoàn cảnh này, các tác giả đã quyết định đến các ngăn của toàn bộ tế bào và môi trường nuôi cấy tế bào cùng với việc triển khai các thử

nghiệm sàng lọc tế bào theo kiểu hình khách quan. Ngoài ra, sự hiểu biết về phân tử và mô tả ở cấp độ phân tử về sự biến nạp tế bào, sự phát triển của bệnh ung thư và sự tiến hóa di căn vẫn luôn phát triển không ngừng, ví dụ như mô tả gần đây về khái niệm tế bào gốc ung thư (cancer stem cell - CSC) hoặc tế bào khởi phát khối u (tumor initiating cell - TIC). Các tác dụng bất ngờ trong quá trình sàng lọc tế bào có thể gợi ý các đích khác hoặc các tương tác cụ thể để phát hiện ra một đích điều trị bằng thuốc mới. Do đó, việc phát triển các chất chống ung thư mới vẫn còn gặp một thách thức duy nhất với kết quả không thể đoán trước và là nơi cho việc phát hiện các hợp chất mới và cải tiến.

Các tác giả đã điều chế ra một loạt các hợp chất mới khác nhau nằm trong thư viện của các hợp chất 2-amino bậc một-2-amino bậc hai-arylquinolin được sàng lọc dựa trên bảng phân loại các dòng tế bào ung thư ở người (MOLM14, KG-1, MV4-11, A375, HCT116, HepG2, huh-7, MDA-MB-231, CAKI-1, 786-O) và tế bào nguyên phát ung thư có nguồn gốc từ bệnh nhân cho phép phát hiện ra các chất chống ung thư mới. Ngoài ra, nhóm các hợp chất này có hoạt tính bổ sung tương tự chống lại các tế bào gốc ung thư ở người (CSC), vốn được coi là nghiêm trọng trong việc tái phát và tái phát ung thư sau liệu pháp chống ung thư. Việc mô tả kỹ thuật nghiệm ALDH trong lĩnh vực kỹ thuật này được sử dụng làm chỉ thị chức năng của tế bào gốc ung thư để mô tả hoạt tính chống lại các CSC (Greve, B. *et al.* Cytometry A 2012 (81) 284-293, Liu, S. *et al.* PLoS One 2013 (25) e81050, Ran, D. *et al.* Exp. Hematol. 2009 (37) 1423-1434, Cheung, A. M. *et al.* Leukemia 2007 (21) 1423-1430, Pearce, D. J. *et al.* Stem Cells 2005 (23) 752-760).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất chất có hoạt tính để ngăn ngừa hoặc ức chế sự tăng sinh của tế bào trong các sinh vật khác nhau, và đề xuất phương pháp để tổng hợp chúng.

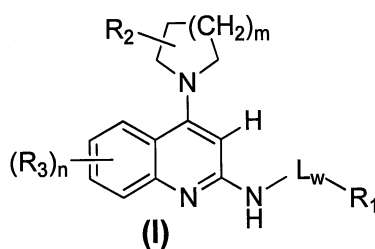
Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa một lượng điều trị hiệu quả của chất có hoạt tính theo sáng chế, một mình hoặc kết hợp với các chất có hoạt tính khác, và chất phụ trợ, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chất có hoạt tính để sử dụng trong trị liệu.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất hợp chất theo sáng chế và/hoặc được phẩm chứa chúng để sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh tăng sinh và/hoặc bệnh u tân sinh.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất hợp chất theo sáng chế và/hoặc được phẩm chứa chúng để sử dụng để ức chế sự tăng trưởng hoặc biệt hóa của tế bào gốc ung thư (CSC), tế bào khởi phát khối u, tế bào giống trung mô có liên quan đến bệnh ung thư, tế bào ung thư trung mô, hoặc tế bào trung mô.

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I)



Trong đó

- R_1 có thể được chọn từ C6-C10 aryl được thế hoặc không được thế bằng R_9 ; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S được thế hoặc không được thế bằng R_9 ; heteroaryl ngưng tụ như được xác định bao gồm từ 8 đến 13 nguyên tử bao gồm 1, 2, 3, 4 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S và bao gồm ít nhất 2 nguyên tử cacbon được thế hoặc không được thế bằng R_9 ;
- L_w có thể được chọn từ nhóm bao gồm: (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C1-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế bằng R_4 ; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; C=O; SO; SO₂; (C=O)-NR₈; (C=O)-O; (C=O)-O-(C1-C4)alkyl; SO₂-NR₈; NR₈; trong đó R_4 có thể được chọn từ H; (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; (C6-C10) aryl tùy ý được thế; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh hoặc heteroaryl ngưng tụ như được xác định bao gồm từ 8 đến 13 nguyên tử bao gồm 1, 2, 3, 4 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S và bao gồm ít nhất 2 nguyên tử cacbon được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nhóm thế độc lập được chọn từ hydro, nguyên tử halogen, (C1-C10) alkyl được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C1-C10)

alkoxy, hydroxyl, xyano, nitro, carboxy, $\text{NR}_8\text{R}_8'$, vòng có 4 đến 9 cạnh no hoặc không no bao gồm 1, 2 hoặc cho đến 3 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ O, N và S;

- R_2 được chọn từ NR_5R_6 ;
- R_3 có thể được chọn từ nguyên tử hydro; nguyên tử halogen; (C1-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, hydroxyl, alkoxy, $-\text{NR}_5\text{R}_6$; (C2-C10) alkenyl; (C2-C10) alkynyl; (C3-C10) xycloalkyl; (C5-C10) xycloalkenyl; (C8-C10) xycloalkynyl; (C1-C10) alkoxy; hydroxyl; nitro; xyano; NR_5R_6 ; $\text{O}-(\text{R}_7)$; $(\text{CO})-\text{R}_7$; $(\text{CO})-\text{O}-\text{R}_7$; $(\text{CO})-\text{NR}_5\text{R}_6$; $\text{O}-(\text{CO})-\text{R}_7$; $\text{O}-(\text{CO})-\text{NR}_5\text{R}_6$; $\text{NR}_5-(\text{CO})-\text{R}_7$; $\text{NR}_5-(\text{CO})-\text{OR}_7$; $\text{NR}_5-(\text{CO})-\text{NR}_5\text{R}_6$; $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-)_m-\text{OR}_{11}$; $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-)_m-\text{NR}_{11}\text{R}_{11}'$; SO_2-R_7 ; $\text{NR}_5-\text{SO}_2-\text{R}_7$; $\text{SO}_2-\text{NR}_5\text{R}_6$; $\text{NR}_5-(\text{C}2-\text{C}6)\text{-alkyl}-\text{NR}_5\text{R}_6$; aryl tùy ý được thế; benzyl tùy ý được thế; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh tùy ý được thế bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S; heteroaryl tùy ý được thế ngưng tụ như được xác định bao gồm từ 8 đến 13 nguyên tử bao gồm 1, 2, 3, 4 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S và bao gồm ít nhất 2 nguyên tử cacbon; vòng heteroxyclyl có 4 đến 9 cạnh tùy ý được thế no hoặc không no bao gồm 1, 2 hoặc cho đến 3 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ O, N và S;
- R_5 và R_6 có thể độc lập được chọn từ hydro; (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; $(\text{CO})-\text{R}_7$, $(\text{CO})-\text{O}-\text{R}_7$; $(\text{CO})-\text{NR}_8\text{R}_8'$; SO_2-R_7 ; $\text{SO}_2-\text{NR}_8\text{R}_8'$; (C1-C10) alkyl được thế bằng $\text{NR}_8\text{R}_8'$; (C3-C10) xycloalkyl được thế bằng $\text{NR}_8\text{R}_8'$; aryl tùy ý được thế; benzyl tùy ý được thế; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh tùy ý được thế bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S; vòng heteroxyclyl có 4 đến 9 cạnh tùy ý được thế no hoặc không no bao gồm 1, 2 hoặc cho đến 3 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ O, N và S; hoặc R_5 và R_6 có thể cùng liên kết với nguyên tử nitơ mà chúng liên kết cộng hóa trị để tạo ra nhóm heteroxyclyl tạo thành vòng có 4 đến 9 cạnh mà có thể bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại bổ sung được chọn từ O, N và S;
- R_7 và R_7' có thể độc lập được chọn từ hydro; (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh C1-C10 được thế bằng $\text{NR}_8\text{R}_8'$; (C6-C10) aryl

tùy ý được thế; benzyl tùy ý được thế; vòng có 5 đến 8 cạnh dị vòng thơm tùy ý được thế bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S;

- R_8 và $R_{8'}$ có thể độc lập được chọn từ hydro; (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; hoặc R_8 và $R_{8'}$ có thể cùng liên kết với nguyên tử nitơ mà chúng liên kết cộng hóa trị để tạo ra nhóm heteroxyclyl tạo thành vòng có 4 đến 9 cạnh mà có thể bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại bổ sung được chọn từ O, N và S;

- R_9 có thể độc lập được chọn từ hydro; nguyên tử halogen; (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C1-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, hydroxyl, alkoxy; (C2-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C2-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; (C1-C10) alkoxy tùy ý được thế; hydroxyl; nitro; xyano; NR_5R_6 ; (CO)- R_7 ; (CO)-O- R_7 ; (CO)- NR_5R_6 ; O-(CO)- R_7 ; O-(CO)- NR_5R_6 ; NR_5 -(CO)- R_7 ; NR_5 -(CO)-O- R_7 ; NR_5 -(CO)- NR_5R_6 ; SO_2 - R_7 ; NR_5 - SO_2 - R_7 ; SO_2 - NR_5R_6 ; (C1-C10) alkyl được thế bằng NR_5R_6 ; NR_5 -(C2-C10)-alkyl- NR_5R_6 ; -(O-CH₂CH₂-)_m-O- R_{11} ; -(O-CH₂CH₂-)_m- $NR_{11}R_{11'}$; (C6-C10) aryl tùy ý được thế; benzyl tùy ý được thế; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh tùy ý được thế bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S; nhóm heteroxyclyl tùy ý được thế tạo thành vòng có 4 đến 9 cạnh mà có thể bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S; - NR_5R_{10} ; -O- R_{10} ;

- R_{10} có thể độc lập được chọn từ hydro; (C6-C12)-aryl được thế hoặc không được thế bằng R_{12} ; benzyl được thế hoặc không được thế bằng R_{12} ; heteroaryl từ vòng có 5 đến 8 cạnh bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S được thế hoặc không được thế bằng R_{12} ; heteroaryl ngưng tụ được xác định bao gồm từ 8 đến 13 nguyên tử bao gồm 1, 2, 3, 4 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S và bao gồm ít nhất 2 nguyên tử cacbon được thế hoặc không được thế bằng R_{12} ; heteroxyclyl tạo thành vòng có 4 đến 9 cạnh mà có thể chứa 0, 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S được thế hoặc không được thế bằng R_{12} ;

- R_{11} và $R_{11'}$ có thể độc lập được chọn từ nguyên tử hydro; (C2-C10) alkyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10)

xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; (C2-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen; hoặc R_{11} và $R_{11'}$ có thể cùng liên kết với nguyên tử nitơ mà chúng liên kết cộng hóa trị để tạo ra nhóm heteroxyclyl tạo thành vòng no hoặc không no có 4 đến 9 cạnh mà có thể bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại bổ sung được chọn từ O, N và S;

- R_{12} có thể được chọn từ nguyên tử hydro; nguyên tử halogen; (C1-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, hydroxyl, alkoxy, $NR_{11}R_{11'}$; (C2-C10) alkenyl; (C2-C10) alkynyl; (C3-C10) xycloalkyl; (C5-C10) xycloalkenyl; (C8-C10) xycloalkynyl; (C1-C10) alkoxy; hydroxyl; nitro; xyano; $NR_{11}R_{11'}$; O-(R₇); (CO)-R₇; (CO)-O-R₇; (CO)- $NR_{11}R_{11'}$; O-(CO)-R₇; O-(CO)- $NR_{11}R_{11'}$; NR_{11} -(CO)-R₇; NR_{11} -(CO)-OR_{11'}; NR_{11} -(CO)- $NR_{11}R_{11'}$; - (O-CH₂CH₂-)_m-OR₁₁; -(O-CH₂CH₂-)_m- $NR_{11}R_{11'}$; SO₂-R₇; NR₅-SO₂-R₇; SO₂- $NR_{11}R_{11'}$; NR_{11} -(C2-C6)-alkyl- $NR_{11}R_{11'}$; aryl tùy ý được thế; benzyl tùy ý được thế; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh tùy ý được thế bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S; heteroaryl tùy ý được thế ngưng tụ như được xác định bao gồm từ 8 đến 13 nguyên tử bao gồm 1, 2, 3, 4 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S và bao gồm ít nhất 2 nguyên tử cacbon; vòng heteroxyclyl có 4 đến 9 cạnh tùy ý được thế no hoặc không no bao gồm 1, 2 hoặc cho đến 3 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ O, N và S;

- n có thể là số nguyên bằng nhau có thể có giá trị bất kỳ trong số các giá trị 0, 1, 2, 3 hoặc 4;

- m có thể là số nguyên bằng nhau có thể có giá trị bất kỳ trong số các giá trị 1, 2 hoặc 3;

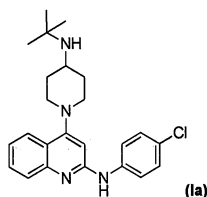
- w có thể là số nguyên bằng nhau có thể có giá trị bất kỳ trong số các giá trị 0 hoặc 1;

Trong đó thuật ngữ “tùy ý được thế” có nghĩa là tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ nguyên tử halogen, (C1-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C2-C10) alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C2-C10) alkynyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được

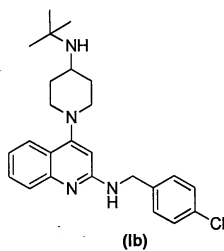
thể hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C3-C10) xycloalkyl được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C5-C10) xycloalkenyl được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C8-C10) xycloalkynyl được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C1-C10) alkoxy, hydroxyl, xyano, nitro, $\text{NR}_8\text{R}_8'$ (với R_8 và R_8' như được mô tả ở trên);

và muối được dụng, solvat, chất đồng phân, chất đồng phân lập thể bất kỳ hoặc hỗn hợp của chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền chất thuốc của nó.

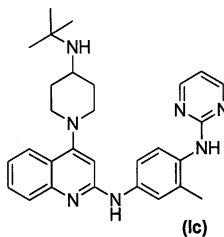
Theo một số phương án cụ thể, sáng chế đề xuất hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm: 2-(4-clophenylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin có công thức (Ia) (1-5)



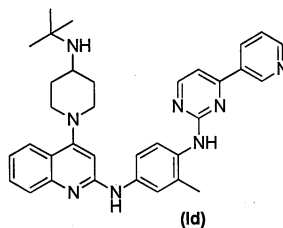
2-(4-clobenzylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin có công thức (Ib) (2-2)



2-[3-metyl-4-(pyrimidin-2-ylamino)phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (3-4) có công thức (Ic)



2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-metyl-phenylamino}-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (4-2) có công thức (Id)



hoặc muối được dụng, solvat hoặc tiền chất thuốc của nó.

Theo một số phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm: muối 2-(4-clophenylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (1-6), muối 2-(4-clobenzylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (2-3), muối 2-[3-metyl-4-(pyrimidin-2-ylamino)phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (3-5), muối 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-metyl-phenylamino}-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (4-3).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm có thể chứa một lượng điều trị hiệu quả của hợp chất được mô tả ở trên, hoặc muối được dụng, solvat hoặc tiền chất thuốc của nó, và chất phù trợ, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Theo một số phương án cụ thể, được phẩm theo sáng chế còn có thể chứa một hoặc nhiều chất chống khối u.

Theo một số phương án cụ thể, được phẩm được mô tả ở trên có thể chứa một lượng điều trị hiệu quả của hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế hoặc được bào chế đồng thời dưới dạng hạt nano.

Theo một số phương án cụ thể về được phẩm theo sáng chế, hạt nano có thể bao gồm chế phẩm lisosom có thể phân hủy sinh học.

Theo một số phương án cụ thể về được phẩm theo sáng chế, hạt nano có thể bao gồm polyme hoặc copolyme tương hợp sinh học.

Theo một số phương án cụ thể về được phẩm theo sáng chế, hạt nano có thể được kết hợp cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với polyetylen glycol (PEG).

Theo một số phương án cụ thể về được phẩm theo sáng chế, hạt nano có thể có cỡ trung bình nằm trong khoảng từ 80 đến 600 nm.

Theo một số phương án cụ thể về được phẩm theo sáng chế, hạt nano có thể là hạt nano hướng đích bao gồm mô-tip truyền tín hiệu.

Theo một số phương án cụ thể, hạt nano có thể bao gồm chế phẩm polyme có thể phân hủy sinh học.

Theo một số phương án cụ thể, polyme có thể dựa trên Poly (axit DL-Lactic-co-glycolic) có thể có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 7 đến 240 kDa; hoặc copolyme của axit polylactic (PLA) và axit polyglycolic (PGA) trong đó tỷ lệ phân tử nằm trong khoảng từ 95:5 đến 50:50.

Theo một số phương án cụ thể về dược phẩm theo sáng chế, hạt nano có thể bao gồm thành phần được chọn từ các hạt nano PLGA, hạt nano PLGA-PEG (AB, BA, ABA hoặc BAB dạng khối, trong đó A = PLGA và B = PEG) và hạt nano hướng đích.

Theo một số phương án cụ thể về dược phẩm theo sáng chế, hạt nano có thể bao gồm thành phần được chọn từ liposom.

Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế có thể thích hợp để giải phóng chậm hoặc giải phóng kéo dài.

Theo một số phương án cụ thể, dược phẩm theo sáng chế có thể thích hợp để sử dụng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, qua mắt, qua da, qua mũi, hoặc dùng để hít.

Theo một số phương án cụ thể về dược phẩm theo sáng chế, hợp chất có hoạt tính theo sáng chế có thể được kết hợp với ít nhất một chất chống ung thư có hoạt tính trị liệu.

Theo một vài phương án cụ thể, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế ở lượng điều trị hiệu quả và một hoặc nhiều chất chống khối u ở lượng điều trị hiệu quả, trong đó thành phần cấu thành hỗn hợp nêu trên có thể được sử dụng đồng thời, riêng rẽ hoặc tuần tự trong điều trị bệnh ung thư.

Theo các phương án cụ thể về dược phẩm theo sáng chế, chất chống khối u có thể được chọn từ nhóm bao gồm everolimus, cloquin, hydroxycloquin, trabectedin, abraxan, TLK 286, AV-299, DN-101, pazopanib, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244 (ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, enzastaurin, vandetanib, ARQ-197, MK-0457, MLN8054, PHA-739358, R-763, AT-9263, pemetrexed, erlotinib, dasatanib, nilotinib, decatanib, panitumumab, amrubixin, oregovomab, Lep-etu, nolatrexed, azd2171, batabulin, ofatumumab, zanolimumab, edotecarin, tetrandrine, rubitecan, tesmilifen, oblimersen, ticilimumab, ipilimumab,

gosypol, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, xilengitit, gimatecan, IL13-PE38QQR, TNO 1001, IPdR1 KRX-0402, lucanthone, LY 317615, neuradiab, vitespan, Rta 744, Sdx 102, talampanel, atrasentan, Xr 311, romidepsin, ADS-100380, sunitinib, 5-flouraxil, vorinostat, etoposide, gemcitabine, doxorubicin, irinotecan, doxorubicin liposome, 5'-deoxy-5-flouridin, vincristine, temozolomide, ZK-304709, seliciclib, PD0325901, AZD-6244, capexitabine, axit L-Glutamic, heptahydrate của muối N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoyl]-dinatri, camptothecin, Irinotecan được đánh dấu PEG, tamoxifen, toremifene xitrat, anastrozole, exemestane, letrozole, DES(diethylstilbestrol), estradiol, estrogen, estrogen được tiếp hợp, bevacizumab, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(methylsulfonylpiperidinmethyl)-indolyl]-quinolone, vatalanib, AG-013736, AVE-0005, muối axetat của [D-Ser(But)₆, Azgly₁₀](pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂) axetat, goserelin axetat, leuprolide axetat, triptorelin pamoate, medroxyprogesterone axetat, hydroxyprogesterone caproate, megestrol axetat, raloxifen, bicalutamide, flutamide, nilutamide, megestrol axetat, CP-724714; TAK-165, HKI-272, erlotinib, lapatanib, canertinib, kháng thể ABX-EGF, erbitux, EKB-569, PKI-166, GW-572016, lonafamib, BMS-214662, tipifarnib; amifostine, NVP-LAQ824, axit suberoyl analit hydroxamic, axit valproic, trichostatin A, FK-228, SU11248, sorafenib, KR951, aminoglutethimide, arnsacrin, anagrelide, L-asparaginase, vắc-xin Bacillus Calmette-Guerin (BCG), bleomycin, buserelin, busulfan, carboplatin, carmustine, clorambucil, cisplatin, cladribine, clodronate, xyproterone, xytarabine, dacarbazine, dactinomycin, daunorubicin, diethylstilbestrol, epirubicin, fludarabine, fludrocortisone, fluoxymesterone, flutamide, gemcitabine, gleevec, hydroxyurea, idarubicin, ifosfamide, imatinib, leuprolide, levamisole, lomustine, mecloethamine, melphalan, 6-mercaptopurine, mesna, methotrexate, mitomycin, mitotan, mitoxantrone, nilutamide, octreotide, oxaliplatin, pamidronate, pentostatin, plicamycin, porfimer, procarbazine, raltitrexed, rituximab, streptozocin, teniposide, testosterone, thalidomide, thioguanine, thiotepa, tretinoin, vindesine, axit 13-cis-retinoic, phenylalanine hạt cải, uracil hạt cải, estramustine, altretamine, floxuridine, 5-deoxyuridine, xytosine arabinoside, 6-mercaptopurine, deoxycytidine, calixtriol, valrubicin, mitramycin, vinblastine, vinorelbine, topotecan, razoxin, marimastat, COL-3, neovastat, BMS-275291, squalamine, endostatin, SU5416, SU6668, EMD121974,

interleukin-12, 1M862, angiostatin, vitaxin, droloxifen, idoxyfen, spironolacton, finasterit, ximitidin, trastuzumab, denileukin diftitox, gefitinib, bortezimib, paclitaxel, irinotecan, topotecan, doxorubixin, docetaxel, vinorelbin, bevacizumab (kháng thể đơn dòng) và erbitux, paclitaxel không chứa cremophor, epithilon B, BMS-247550, BMS-310705, droloxifen, 4-hydroxytamoxifen, pipendoxifen, ERA-923, arzoxifen, fulvestrant, acolbifen, lasofoxifen, idoxifen, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK 222584, VX-745, PD 184352, rapamycin, 40-O-(2-hydroxyetyl)-rapamycin, temsirolimus, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, wortmannin, ZM336372, L-779,450, PEG-filgrastim, darbepoetin, erythropoietin, yếu tố kích thích quần thể bạch cầu hạt, zolendronat, prednison, cetuximab, yếu tố kích thích quần thể bạch cầu hạt đại thực bào, histrelin, interferon alfa-2a được PEG hóa, interferon alfa- 2a, interferon alfa-2b được PEG hóa, interferon alfa-2b, azacitidin, PEG-L-asparaginaza, lenalidomit, gemtuzumab, hydrocortison, interleukin-11, dexrazoxan, alemtuzumab, axit all-transretinoic, ketoconazol, interleukin-2, megestrol, hạt cải nitơ, methylprednisolon, ibritgumomab tiuxetan, androgen, dexitabin, hexametylmelamin, bexaroten, tositumomab, arsenic trioxit, cortison, editronat, mitotan, cyclosporin, daunorubixin liposom, Edwina-asparaginaza, stronti 89, casopitant, netupitant, chất đối kháng thụ thể NK-1, palonosetron, aprepitant, diphenhydramin, hydroxyzin, metoclopramit, lorazepam, alprazolam, haloperidol, droperidol, dronabinol, dexamethason, methylprednisolon, procloperazin, granisetron, ondansetron, dolasetron, tropisetron, pegfilgrastim, epoetin alfa và darbepoetin alfa, ipilimumab, vemurafenib, chất ức chế FLT-3, chất ức chế VEGFR, chất ức chế EGFR TK, chất ức chế aurora kinaza, chất điều biến PIK-1, chất ức chế Bcl-2, chất ức chế HDAC, chất ức chế c-MET, chất ức chế PARP, chất ức chế Cdk, chất ức chế EGFR TK, chất ức chế IGFR-TK, kháng thể kháng HGF, chất ức chế PI3 kinaza, chất ức chế mTOR, chất ức chế AKT, chất ức chế JAK/STAT, chất ức chế điểm kiểm tra-1 hoặc 2, chất ức chế kinaza bám dính trung tâm, chất ức chế Map kinaza (MEK), kháng thể bất VEGF, và hỗn hợp của chúng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế và/hoặc được phẩm chứa chúng để sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh tăng sinh và/hoặc bệnh u tân sinh.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế và/hoặc được phẩm chứa chúng để sử dụng để ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh của tế bào gốc ung thư (CSC), tế bào khởi phát khối u, tế bào giống trung mô có liên quan đến bệnh ung thư, tế bào ung thư trung mô, hoặc tế bào trung mô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh tăng sinh và/hoặc bệnh u tân sinh.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất để ức chế sự sinh trưởng hoặc sự biệt hóa của các tế bào gốc ung thư (CSC), tế bào khởi phát khối u, tế bào giống trung mô có liên quan đến bệnh ung thư, tế bào ung thư trung mô, hoặc tế bào trung mô.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các đặc tính và ưu điểm nêu trên và các đặc tính và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn thông qua các ví dụ sau đây, và bằng cách viện dẫn đến các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig. 1 thể hiện sự giảm của các tế bào tập hợp ALDH⁺ trong các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị CRC (CPP19, CPP30 và CPP45) khi được điều trị bằng hợp chất 2-3 (thử nghiệm AldefluorTM).

Fig. 2 thể hiện sự ức chế, bằng hợp chất 2-3, sự hình thành khối u hình cầu của các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị bệnh ung thư ruột kết (CRC) di căn vào gan;

Fig. 3 thể hiện phổ ¹H NMR của hợp chất 1-6 trong DMSO-*d*₆.

Fig. 4 thể hiện phổ ¹H NMR của hợp chất 2-3 trong DMSO-*d*₆.

Fig. 5 thể hiện phổ ¹H NMR của hợp chất 3-5 trong DMSO-*d*₆.

Fig. 6 thể hiện phổ ¹H NMR của hợp chất 4-3 trong DMSO-*d*₆.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong bản mô tả sáng chế, thuật ngữ "alkyl", một mình hoặc kết hợp với các nhóm khác, dùng để chỉ gốc hydrocarbon béo no hóa trị một mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ một đến hai mươi nguyên tử cacbon, tốt hơn là từ một đến mười sáu nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là từ một đến mười nguyên tử cacbon.

Thuật ngữ "alkyl bậc thấp", một mình hoặc kết hợp, dùng để chỉ nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon ("C₁-C₆-alkyl"), tốt hơn là nhóm

alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 5 nguyên tử cacbon ("C₁-C₅-alkyl"), và được ưu tiên đặc biệt là nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 3 nguyên tử cacbon ("C₁-C₃-alkyl"). Các ví dụ về các nhóm alkyl bậc thấp mạch thẳng hoặc mạch nhánh là metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, *tert*-butyl, pentyl đồng phân, hexyl đồng phân, tốt hơn là metyl và etyl và propyl và isopropyl và tốt nhất là metyl.

Thuật ngữ "alkoxy bậc thấp" dùng để chỉ nhóm R'-O-, trong đó R' là alkyl bậc thấp và thuật ngữ "alkyl bậc thấp" có nghĩa đã nêu ở phần trên. Các ví dụ về các nhóm alkoxy bậc thấp là metoxy, etoxy, n-propoxy, isopropoxy, n-butoxy, isobutoxy, *sec*-butoxy và *tert*-butoxy, tốt hơn là metoxy và etoxy và isopropoxy và *tert*-butoxy, tốt nhất là metoxy và etoxy.

Thuật ngữ "alkenyl bậc thấp" dùng để chỉ gốc hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh bao gồm liên kết olefinic và từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon ("C₂-C₆-alkenyl"), tốt hơn là từ 2 đến 5 nguyên tử cacbon ("C₂-C₅-alkenyl"), được ưu tiên đặc biệt là từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon ("C₂-C₄-alkenyl"). Các ví dụ về các nhóm alkenyl bậc thấp là ethenyl, 1-propenyl, 2-propenyl, isopropenyl, 1-butenyl, 2-butenyl, isobutenyl, 1-pentenyl, 2-pentenyl, 3-pentenyl, isopentenyl. Ví dụ được ưu tiên là 2-propenyl, 2-butenyl và isopentenyl.

Thuật ngữ "alkynyl bậc thấp" dùng để chỉ gốc hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh bao gồm liên kết alkyn và từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon ("C₂-C₆-alkynyl"), tốt hơn là từ 2 đến 5 nguyên tử cacbon ("C₂-C₅-alkynyl"), được ưu tiên đặc biệt là từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon ("C₂-C₄-alkynyl"). Các ví dụ về các nhóm alkynyl là ethynyl, 1-propynyl, 2-propynyl, 1-butylnyl, 3-butylnyl, 4-butylnyl, 1-but-2-yn, 1-pentynyl, pent-2-yn-1-yl, pent-3-yn-1-yl, pent-4-yn-1-yl, pent-2-yn-3-yl. Các ví dụ được ưu tiên là propyn-1-yl, propyn-3-yl, butyn-1-yl, butyn-3-yl, butyn-4-yl, but-2-yn-1-yl.

Thuật ngữ "halogen" dùng để chỉ flo, clo, brom và iot, với flo, clo và brom được ưu tiên.

Thuật ngữ "xycloalkyl" dùng để chỉ nhóm vòng cacbon no chứa từ 3 đến 7 nguyên tử cacbon ("C₃-C₇-xycloalkyl"), như xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl hoặc xycloheptyl. Xycloalkyl được ưu tiên là xyclopropyl, xyclopentyl và xyclohexyl.

Thuật ngữ "nhóm dị vòng" dùng để chỉ nhóm no hoàn toàn hoặc không no nhưng không hoàn toàn là không no, ví dụ nhóm vòng đơn có 3 đến 7 cạnh hoặc hệ vòng hai

vòng ngưng tụ có 7 đến 11 cạnh có ít nhất một nguyên tử khác loại được chọn từ nguyên tử oxy, nguyên tử nitơ hoặc nguyên tử lưu huỳnh. Mỗi vòng trong nhóm dị vòng có thể có ít nhất một nguyên tử khác loại được chọn từ nguyên tử nitơ, nguyên tử oxy và/hoặc nguyên tử lưu huỳnh. Các nhóm dị vòng được ưu tiên là pyrrolidin, piperidin, piperazin, tetrahydrofuran, bis-tetrahydrofuran và morpholin.

Thuật ngữ "carboxyl" dùng để chỉ nhóm -COOH.

Thuật ngữ "heteroaryl" nói chung dùng để chỉ vòng thơm có 5 hoặc 11 cạnh bao gồm ít nhất một nguyên tử khác loại và ngoài ra có thể bao gồm một, hai, ba hoặc bốn nguyên tử được chọn từ nitơ, oxy và/hoặc lưu huỳnh, như pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, pyridazinyl, 2-oxo-1,2-dihydropyridinyl, oxadiazolyl, isoxazolyl, thiadiazolyl, triazolyl, tetrazolyl, pyrazolyl, imidazolyl, thiophenyl, furanyl, oxazolyl, isothiazolyl, và thiazolyl. Thuật ngữ "heteroaryl" còn dùng để chỉ các nhóm thơm hai vòng hoặc không no một phần bao gồm hai vòng có 5 hoặc 6 cạnh, trong đó một hoặc hai vòng có thể chứa một, hai, ba hoặc bốn nguyên tử được chọn từ nitơ, oxy hoặc lưu huỳnh, như quinolinyl, isoquinolinyl, cinnolinyl, pyrazolyl, imidazolyl, thiazolyl, thiophenyl, furanyl, oxazolyl, isothiazolyl, pyrazolo[1,5-*a*]pyridyl, imidazo[1,2-*a*]pyridyl, quinoxalinyl, quinazolyl, benzothiazolyl, benzotriazolyl, 1H-benzo[*d*]imidazol, benzo[*d*]isoxazolyl, benzo[*d*]isothiazolyl, benzo[*c*]isoxazolyl, benzo[*c*]isothiazolyl, indolyl, isoindolinyl, 6,7-dihydro-5H-pyrido[3,4-*b*]pyridinyl, 2,3-dihydro-1H-pyrido[3,4-*c*]pyridinyl, 6,7-dihydro-5H-pyrido[3,4-*d*]pyrimidinyl, purinyl, indazolyl, indolizinyl, imidazo[1,2-*a*]pyridinyl, imidazo[1,5-*a*]pyridinyl, imidazo[1,5-*a*]pyrazinyl, imidazo[1,2-*a*]pyrazinyl, 1H-imidazo[4,5-*b*]pyrazinyl, pyrazolo[1,5-*a*]pyridinyl, pyrolo[1,2-*a*]pyrimidinyl, pyrolo[1,2-*a*]pyrazinyl, pyrolo[1,2-*c*]pyrimidinyl, oxazolo[4,5-*b*]pyridinyl, oxazolo[4,5-*c*]pyridinyl, oxazolo[5,4-*c*]pyridinyl, oxazolo[5,4-*b*]pyridinyl, thiazolo[4,5-*b*]pyridinyl, thiazolo[4,5-*c*]pyridinyl, thiazolo[5,4-*c*]pyridinyl, thiazolo[5,4-*b*]pyridinyl, oxazolo[5,4-*d*]pyrimidinyl, oxazolo[4,5-*d*]pyrimidinyl, thiazolo[5,4-*d*]pyrimidinyl, thiazolo[4,5-*d*]pyrimidinyl, oxazolo[4,5-*b*]pyrazinyl, thiazolo[4,5-*b*]pyrazinyl, isoxazolo[4,5-*b*]pyrazinyl, isothiazolo[4,5-*b*]pyrazinyl, isoxazolo[4,5-*d*]pyrimidinyl, isothiazolo[4,5-*d*]pyrimidinyl, isoxazolo[5,4-*d*]pyrimidinyl, isothiazolo[5,4-*d*]pyrimidinyl, isoxazolo[5,4-*b*]pyridinyl, isothiazolo[5,4-*c*]pyrimidinyl, isoxazolo[5,4-*c*]pyridinyl,

isothiazolo[4,5-*c*]pyridinyl, isoxazolo[4,5-*c*]pyridinyl, isoxazolo[4,5-*b*]pyridinyl, isoxazolo[4,3-*d*]pyrimidinyl, isthiazolo[4,3-*d*]pyrimidinyl, isoxazolo[3,4-*d*]pyrimidinyl, isothiazolo[3,4-*d*]pyrimidinyl, pyrido[2,3-*d*]pyrimidinyl, pyrido[3,4-*d*]pyrimidinyl, pyrido[4,3-*d*]pyrimidinyl, pyrido[3,2-*d*]pyrimidinyl, pyrido[2,3-*b*]pyrazinyl, pyrido[3,4-*b*]pyrazinyl, [1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridinyl, [1,2,3]triazolo[4,5-*c*]pyridinyl, 3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pyrimidinyl. Các nhóm heteroaryl được ưu tiên là pyridyl, thiozoly, isothiazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, quinozolyl, và pyrazinyl.

Thuật ngữ "muối được dụng" dùng để chỉ các muối mà giữ lại hiệu quả và đặc tính sinh học của bazơ tự do hoặc axit tự do, không có nguồn gốc sinh học hoặc nói cách khác là không mong muốn. Các muối được tạo thành bằng các axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric và các axit tương tự, tốt hơn là axit clohydric, và các axit hữu cơ như axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit pyruvic, axit oxylic, axit maleic, axit malonic, axit salixylic, axit succinic, axit fumaric, axit tartaric, axit xitric, axit benzoic, axit glutaric, axit xinnamic, axit mandelic, axit malic, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit p-toluensulfonic, axit benzensulfonic, N-axetylcystein và các axit tương tự. Ngoài ra, các muối này có thể được điều chế bằng cách bổ sung bazơ vô cơ hoặc bazơ hữu cơ vào axit tự do. Các muối thu được từ bazơ vô cơ gồm, nhưng không giới hạn ở, các muối natri, kali, lithi, amoni, canxi, magie và các muối tương tự. Các muối thu được từ các bazơ hữu cơ gồm, nhưng không giới hạn ở, các muối của amin bậc một, bậc hai, và bậc ba, các amin được thể bao gồm amin được thể có trong tự nhiên, amin vòng và nhựa trao đổi ion bazơ, như nhựa isopropylamin, trimetylamin, dietylamin, trietylamin, tripropylamin, etanolamin, lysin, arginin, N-etylpiiperidin, piperidin, polyamin và các loại nhựa tương tự. Hợp chất có công thức I cũng có thể có mặt dưới dạng ion lưỡng tính.

Được ưu tiên đặc biệt theo sáng chế là muối được dụng của các hợp chất có công thức I là các muối hydroclorua.

Hợp chất có công thức I cũng có thể được solvat hóa, ví dụ, được hydrat hóa. Phản ứng solvat hóa có thể được thực hiện trong toàn bộ quy trình sản xuất hoặc có thể diễn ra ví dụ do hậu quả của đặc tính hút ẩm của hợp chất có công thức I hoặc II khan ban đầu (sự hydrat hóa). Thuật ngữ "muối được dụng" cũng bao gồm solvat được dụng.

"Chất đồng phân" là các hợp chất có công thức phân tử giống nhau nhưng về bản chất là khác nhau hoặc trình tự liên kết các nguyên tử của chúng hoặc trong cách bố trí các nguyên tử của chúng trong không gian. Các chất đồng phân khác nhau về cách bố trí các nguyên tử của chúng trong không gian được gọi là "chất đồng phân lập thể". Chất đồng phân lập thể không phải là các ảnh gương của nhau được gọi là "chất đồng phân không đối quang", và chất đồng phân lập thể là các ảnh gương không thể chồng khít lên nhau được gọi là "chất đồng phân đối ảnh", hoặc đôi khi được gọi là chất đồng phân quang học.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" hoặc "bệnh nhân" được sử dụng thay thế cho nhau. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" và "các đối tượng" dùng để chỉ động vật (ví dụ, chim, loài bò sát, và động vật có vú), tốt hơn là động vật có vú bao gồm động vật không phải động vật linh trưởng (ví dụ, lạc đà, lừa, ngựa vằn, bò, lợn, ngựa, dê, cừu, mèo, chó, chuột thường, và chuột nhắt) và động vật linh trưởng (ví dụ, khỉ, tinh tinh, và người), và tốt nhất là người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "các liệu pháp" và "liệu pháp" có thể dùng để chỉ (các) quy trình chuẩn, (các) phương pháp, chế phẩm, dạng bào chế, và/hoặc (các) chất bất kỳ có thể được sử dụng để ngăn ngừa, điều trị, kiểm soát, hoặc cải thiện bệnh, bao gồm các bệnh nhiễm virus hoặc vi khuẩn hoặc các triệu chứng có liên quan, bệnh ung thư, v.v.. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ "các liệu pháp" và "liệu pháp" dùng để chỉ liệu pháp sinh học, liệu pháp hỗ trợ, và/hoặc các liệu pháp khác hữu ích trong điều trị, kiểm soát, ngăn ngừa, hoặc cải thiện các bệnh khác nhau đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan.

Thuật ngữ "lượng điều trị hiệu quả" của hợp chất có nghĩa là lượng hợp chất là hữu hiệu để ngăn ngừa, làm nhẹ bớt hoặc cải thiện các triệu chứng của bệnh hoặc kéo dài sự sống của đối tượng được điều trị. Việc xác định lượng điều trị hiệu quả nằm trong hiểu biết về lĩnh vực kỹ thuật này. Lượng điều trị hiệu quả hoặc liều lượng của hợp chất theo sáng chế có thể thay đổi trong giới hạn rộng và có thể được xác định theo cách đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Liều lượng này sẽ được điều chỉnh tùy theo yêu cầu của mỗi cá nhân trong từng trường hợp cụ thể bao gồm (các) hợp chất cụ thể được dùng, đường dùng, tình trạng bệnh lý được điều trị, cũng như bệnh nhân được điều trị. Nhìn chung, trong trường hợp dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa cho người

trưởng thành có cân nặng xấp xỉ 70 kg, liều lượng hàng ngày nằm trong khoảng từ 0,1 mg đến 5 g, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 mg đến 1 g, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 mg đến 500 mg, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ khoảng 1 mg đến 300 mg, nên là thích hợp, mặc dù giới hạn trên có thể bị vượt quá khi được chỉ rõ. Liều lượng hàng ngày có thể được dùng dưới dạng liều đơn hoặc liều phân chia, hoặc để dùng ngoài đường tiêu hóa, có thể được dùng dưới dạng truyền liên tục.

Thuật ngữ "chất mang dược dụng" được dùng ở đây bao gồm vật liệu bất kỳ và tất cả các vật liệu có thể tương thích với việc sử dụng trong y học bao gồm dung môi, môi trường phân tán, lớp phủ, chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất trì hoãn sự hấp thụ và đẳng trương, và các vật liệu và hợp chất khác có thể tương thích với việc sử dụng trong y học. Ngoại trừ trong phạm vi là môi trường hoặc chất thông thường bất kỳ không tương thích với hợp chất có hoạt tính, thì ứng dụng của chúng trong các chế phẩm theo sáng chế cũng được dự tính. Các hợp chất có hoạt tính bổ sung cũng có thể được kết hợp vào các chế phẩm. Các chế phẩm này có thể được điều chế bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật như được mô tả trong tài liệu *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Xuất bản lần thứ mười) 2014, được chỉnh lý bởi Loyd Allen, Howard C. Ansel, được công bố bởi Wolters Kluwer Health and Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (Xuất bản lần thứ 22) 2012, được chỉnh lý bởi Loyd V. Allen, được công bố bởi Pharmaceutical Press, mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "điều trị," "việc điều trị," và "đang điều trị" đề cập đến trong ngữ cảnh sử dụng (các) liệu pháp cho đối tượng để điều trị bệnh nhiễm virus, dùng để chỉ một, hai, ba, bốn, năm hoặc nhiều hơn các tác dụng sau đây do sử dụng một liệu pháp hoặc kết hợp của các liệu pháp: (i) làm giảm hoặc cải thiện tính nghiêm trọng của bệnh và/hoặc triệu chứng có liên quan; (ii) làm giảm khoảng thời gian bị bệnh và/hoặc triệu chứng có liên quan; (iii) sự thoái lui bệnh và/hoặc triệu chứng có liên quan; (iv) làm giảm hiệu giá của mầm bệnh; (v) làm giảm suy cơ quan liên quan đến bệnh; (vi) làm giảm tỷ lệ nhập viện của đối tượng; (vii) làm giảm thời gian nằm viện; (viii) làm tăng khả năng sống của đối tượng; (ix) loại trừ bệnh lây nhiễm; (x) ức chế sự tiến triển của bệnh lây nhiễm và/hoặc triệu chứng liên quan đến bệnh; (xi) ngăn

chặn sự lây lan của virus từ tế bào, mô hoặc đối tượng sang tế bào, mô hoặc đối tượng khác; và/hoặc (xii) tăng cường hoặc cải thiện tác dụng điều trị bệnh của liệu pháp khác.

"Tiền chất thuốc" dùng để chỉ hợp chất trải qua sự biến đổi thành hợp chất theo sáng chế trong hệ thống sinh học. Tiền chất thuốc là dẫn xuất hóa học không có hoạt tính hoặc có hoạt tính ít hơn so với chính thuốc đó. Sau khi sử dụng và khuếch tán trong cơ thể, dẫn xuất của tiền chất thuốc trải qua một hoặc nhiều quy trình chuyển hóa mà giải phóng thuốc có hoạt tính. Sự chuyển hóa của tiền chất thuốc thành thuốc thường được thực hiện trong điều kiện kiểm soát các quy trình enzym (thường bằng các phương pháp chuyển hóa, ví dụ thủy phân, khử hoặc oxy hóa) và ít thường xuyên hơn bằng các phản ứng hóa học cổ điển trong khi khuếch tán nó trong cơ thể. Mỗi liên kết giữa chất mang và thuốc có thể, nhưng không giới hạn ở, este, amit, cacbonat, carbamat, imin, axetal, ete (ví dụ, sự tiếp hợp glucoro), chức năng có thể oxy hóa và hệ phân tử, chức năng có thể khử và hệ phân tử có thể khử, chức năng được quang hoạt và hệ phân tử được quang hoạt. Ví dụ, tiền chất thuốc este của hợp chất chứa nhóm hydroxyl có thể chuyển hóa bằng phản ứng thủy phân *in vivo* thành phân tử gốc. Các este thích hợp của hợp chất theo sáng chế chứa nhóm hydroxyl, ví dụ là axetat, xitrat, lactat, tartrat, malonat, oxalat, salixylat, propionat, succinat, fumarat, maleat, metylen-bis- β -hydroxynaphtoat, gestisat, isethionat, di-p-toluoyltartrat, metansulphonat, etansulphonat, benzensulphonat, p-toluensulphonat, xyclohexylsulphamat và quinat. Một ví dụ khác về tiền chất thuốc este của hợp chất theo sáng chế chứa nhóm carboxy có thể chuyển hóa bằng sự thủy phân *in vivo* thành phân tử gốc (Các ví dụ về tiền chất thuốc este được mô tả bởi F.J. Leinweber, Drug Metab. Res.1987, (18) pp379, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Tương tự, tiền chất thuốc axyl của hợp chất chứa nhóm amin có thể chuyển hóa bằng sự thủy phân *in vivo* thành phân tử gốc (các ví dụ về tiền chất thuốc dùng cho các nhóm chức này và các nhóm chức khác, bao gồm amin, rượu được mô tả trong tài liệu *Prodrugs: Challenges and Rewards* (Phần 1 và 2); Ed V. Stella, R. Borchardt *et al.*, Springer, 2007, và *Prodrugs and Targeted Delivery: Towards Better ADME Properties* Ed. J. Rautio, Seies Ed. R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers. Wiley-VCH 2011, mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Hệ chất mang tiền chất thuốc thường được sử dụng để làm tăng độ hòa tan của nước hoặc lipit, làm giảm độc tính, làm tăng độ ổn định hóa học và sinh học của hợp

chất nhay, làm tăng thời gian tuần hoàn trong cơ thể ($T_{1/2}$), làm tăng sự phơi nhiễm thuốc tổng số (AUC) và sự phân bố trong cơ quan (định hình PK-PD) và sự hướng đích đặc hiệu vị trí.

Vật liệu và phương pháp liên quan đến các ví dụ 1, 2, 3 và 4

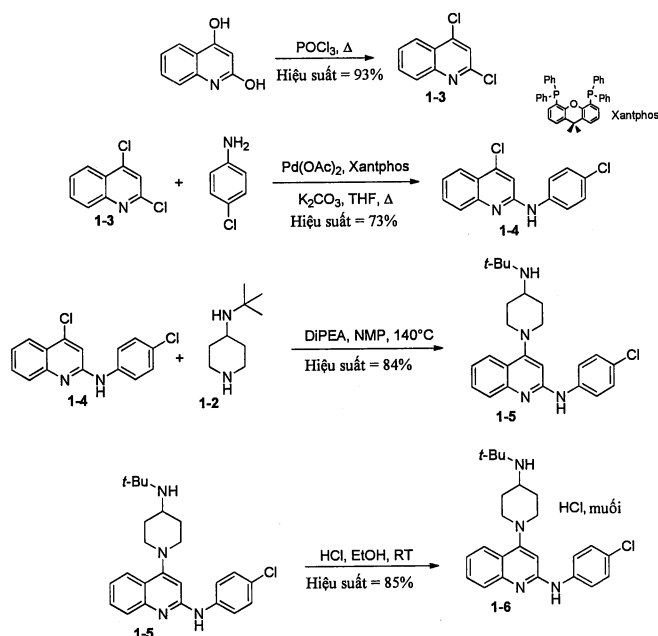
Các chất thử và dung môi thu được từ các nhà cung cấp thương mại và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. Metylen clorua khô được làm khô và được chưng cất trên CaCl_2 và được bảo quản trên các sàng phân tử 4Å dưới khí argon. Tetrahydrofuran được làm khô trên natri/benzophenon ketyl dưới khí argon và được chưng cất trước khi sử dụng. Các phương pháp tinh chế bằng sắc ký nhanh được tiến hành trên silicagel Merck (40-63 μM hoặc 15-40 μM) làm pha tĩnh.

Phổ NMR được ghi lại trên Bruker Avance 300 MHz. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu suất cao siêu phân tích – phân tích khối lượng (UHPLC-MS): UPLC Waters Acquity, UV DAD, được kết hợp với Waters Quattro Premier XE phổ khối bộ đôi tứ cực.

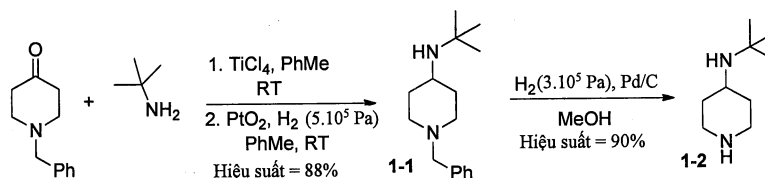
Cột Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm) 1,7 μm , pha động: A: H_2O + 0,1% TFA, B : MeCN + 0,1% TFA. Điều kiện rửa giải bao gồm gradien tuyến tính (phút/%B): 0/5% B, 4/98% B, tốc độ dòng 0,4 ml/phút.

Ví dụ thực hiện sáng chế

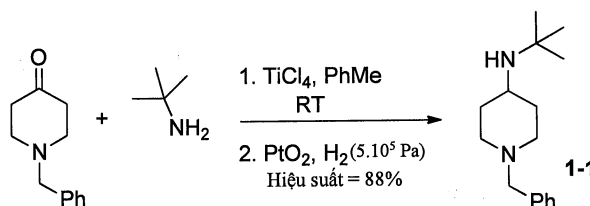
1. Ví dụ 1: Điều chế muối 2-(4-clophenylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (1-6)



Điều chế hợp chất trung gian 4-*tert*-butylaminopiperidin (1-2):



1.1. Tổng hợp 1-benzyl-4-*tert*-butylaminopiperidin (1-1)



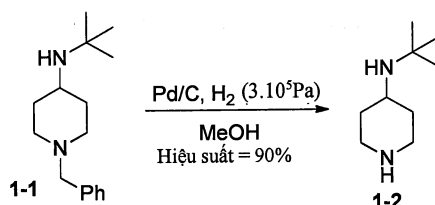
Bổ sung từng giọt *tert*-butylamin (135 ml, 1280 mmol) vào dung dịch chứa N-benzyl-4-piperidinon (60,0 g, 314 mmol) trong 500 ml toluen khô ở nhiệt độ $T < 15^{\circ}\text{C}$, dung dịch chứa titan tetrachlorua (23,0 ml, 210 mmol) trong 250 ml toluen khô. Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở RT trong thời gian 20 giờ và sau đó được lọc qua đệm Celite®. Dung dịch toluen được chuyển vào bình phản ứng hydro hóa áp suất cao và chất xúc tác platin dioxit (160 mg, 0,70 mmol) được bổ sung vào. Hydro được đưa vào bình phản ứng ở áp suất bằng 5 bar ($5 \cdot 10^5$ Pa) và phản ứng được tiến hành ở RT trong thời gian 2 ngày. Sau đó, hỗn hợp tạo thành được pha loãng bằng dung dịch NaOH 2M trong nước (400 ml) và được lọc qua đệm Celite®. Các lớp được tách riêng và lớp chứa nước được chiết bằng toluen. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na_2SO_4 được lọc và cô dưới

áp suất giảm để tạo ra 68,05 g (hiệu suất 88%) dầu màu cam tương ứng với 1-benzyl-4-*tert*-butylaminopiperidin.

Khối lượng: (ES+) $C_{16}H_{26}N_2$ được yêu cầu 246; tìm thấy 247 [M+H]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)

1.2. Tổng hợp 4-*tert*-butylaminopiperidin (1-2)

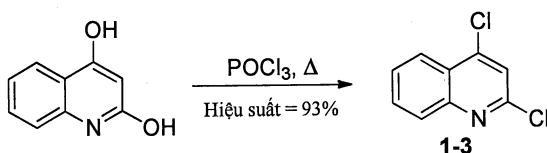


Paladi trên bột cacbon 10% trọng lượng, độ ẩm 50% (29,40 g, 13,81 mmol, 5 mol%) được bổ sung dưới khí nitơ trong bình phản ứng hóa học hydro và vào dung dịch được khử khí nitơ chứa 1-benzyl-4-*tert*-butylaminopiperidin (68,05 g, 276 mmol) trong 700 ml methanol. Hydro được đưa vào bình phản ứng ở áp suất bằng 3 bar ($3 \cdot 10^5 Pa$) và phản ứng được tiến hành ở RT trong thời gian 2 ngày. Tiếp theo, hỗn hợp tạo thành được lọc qua đệm Celite® và phân lọc được cô dưới áp suất giảm tạo ra 38,86 g (hiệu suất 90%) chất rắn màu vàng tương ứng với 4-*tert*-butylaminopiperidin.

Khối lượng: (ES+) $C_9H_{20}N_2$ được yêu cầu 156; tìm thấy 157 [M+H]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)

1.3. Tổng hợp 2,4-dicloquinolin (1-3)

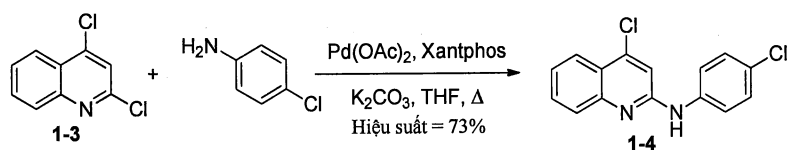


Phosphoryl clorua (250 ml, 2682 mmol) được bổ sung từng giọt vào quinolin-2,4-diol (50,0 g, 310 mmol) ở nhiệt độ $0^\circ C$. Hỗn hợp tạo thành được khuấy và gia nhiệt dưới nhiệt độ hồi lưu qua đêm. Sau đó, hỗn hợp này được làm mát, được cô dưới áp suất giảm và được làm bay hơi đồng thời hai lần bằng 500 ml toluen. Cặn sau đó được hấp thụ bằng DCM (500 ml) và được rửa bằng nước lạnh. Lớp chứa nước được chiết bằng DCM và các lớp hữu cơ liên kết được kết hợp và được làm khô trên $MgSO_4$, được lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra chất rắn màu nâu (57,0 g, hiệu suất 93%) tương ứng với 2,4-dicloquinolin.

Khối lượng: (ES+) $C_9H_5Cl_2N$ được yêu cầu 197; tìm thấy 198 [M+H]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)

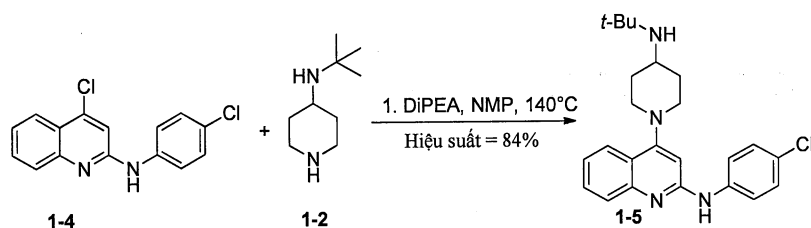
1.4. Tổng hợp 2-(4-clophenylamin)-4-cloquinolin (1-4)



Bổ sung 4-cloanilin (1,45 g, 11,1 mmol) và K_2CO_3 (3,91 g, 28,3 mmol) vào dung dịch, dưới khí nitơ, chứa 2,4-dicloquinolin (2,00 g, 10,1 mmol) trong THF khô (20 ml). Hỗn hợp tạo thành được khử khí 5 phút bằng nitơ, sau đó Xantphos (590 mg, 1,01 mmol) và $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (120 mg, 0,5 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được gia nhiệt dưới nhiệt độ hồi lưu trong thời gian 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng sau đó được làm mát đến RT và được cô dưới áp suất giảm. Cặn được phân chia giữa nước và AcOEt và lớp chứa nước được chiết bằng AcOEt. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra dầu màu vàng. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (gradient xyclohexan/AcOEt từ 7/3 đến 0/10) tạo ra 2,13 g (hiệu suất 73%) chất rắn màu vàng tương ứng với 2-(4-clophenylamin)-4-cloquinolin. Khối lượng: (ES+) $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2$ được yêu cầu 288; tìm thấy 289 $[\text{M}+\text{H}]$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)

1.5. Tổng hợp 2-(4-clophenylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (1-5)



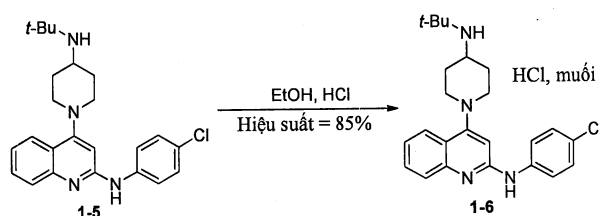
Bổ sung N,N-diisopropyletylamin (0,947 ml, 5,47 mmol) vào dung dịch chứa 2-(4-clophenylamin)-4-cloquinolin (1,00 g, 3,46 mmol) và 4-(*tert*-butylamino)-piperidin (684 mg, 4,38 mmol) trong 5 ml NMP và hỗn hợp này được gia nhiệt trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 140°C . Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm mát, được pha loãng bằng dung dịch NaOH 1N trong nước và hỗn hợp tạo thành được chiết bằng AcOEt. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm tạo ra chất lỏng màu nâu. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (gradient xyclohexan/AcOEt từ 8/2 đến 2/8) tạo ra chất rắn màu vàng nhạt. Chất rắn này được kết

ting lại từ MeCN tạo ra 1,19 g (hiệu suất 84%) chất rắn màu trắng tương ứng với 2-(4-clophenylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin.

HPLC-MS: t_r = 1,24 phút, (ES+) $C_{24}H_{29}ClN_4$ được yêu cầu 408; tìm thấy 409 [M+H], 353 [M-*t*Bu+H]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)

1.6. Tổng hợp muối 2-(4-clophenylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (1-6)



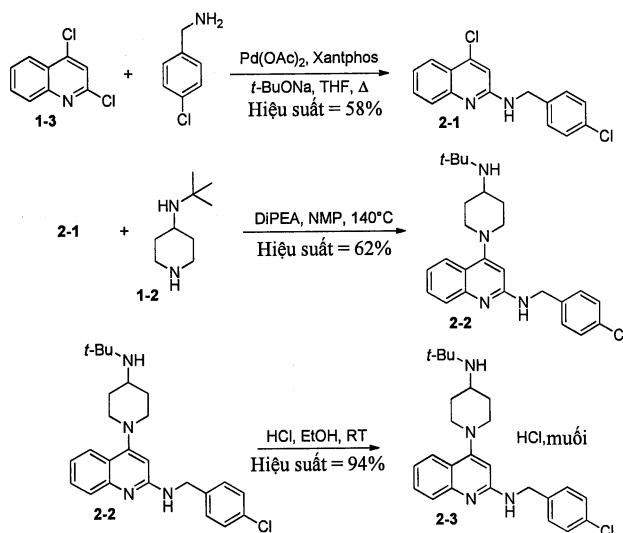
Bổ sung từng giọt 371 μ L dung dịch HCl 7,25M trong EtOH vào huyền phù chứa 2-(4-clophenylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (440 mg, 1,1 mmol) trong 4 ml EtOH. Chất rắn được hòa tan và hỗn hợp được khuấy 20 phút ở RT. Sau đó, dung dịch tạo thành được cô đến khoảng một nửa thể tích dưới áp suất giảm và 6 ml ete được bổ sung vào. Hỗn hợp tạo thành được khuấy 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng để thu được chất rắn màu trắng, chất rắn này được lọc ra, được rửa với ete và được làm khô dưới chân không ở nhiệt độ 45°C tạo ra 401 mg (hiệu suất 85%) chất rắn màu trắng tương ứng với muối 2-(4-clophenylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua.

HPLC-MS: t_r = 1,21 phút, (ES+) $C_{24}H_{29}ClN_4$ được yêu cầu 408; tìm thấy 409 [M+H], 353 [M-*t*Bu+H]

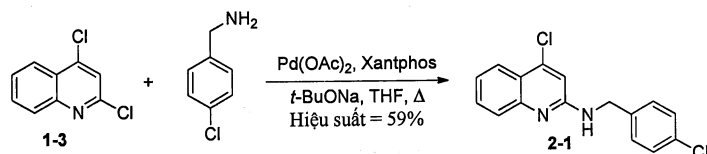
1H NMR (300 MHz, CD_3OD)

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD)

2. Ví dụ 2: Điều chế muối 2-(4-clobenzylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (2-3)



2.1. Tổng hợp 2-(4-clobenzylamin)-4-cloquinolin (2-1)

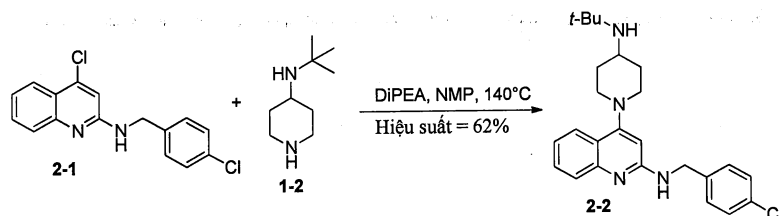


Bổ sung 4-clobenzylamin (1,46 g, 10,1 mmol) và $t\text{-BuONa}$ (1,36 g, 14,1 mmol) vào dung dịch dưới khí nitơ chứa 2,4-dicloquinolin (1,00 g, 5,05 mmol) trong THF khô (10 ml). Hỗn hợp tạo thành được khử khí 5 phút bằng khí nitơ, sau đó Xantphos (295 mg, 0,51 mmol) và $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (58 mg, 0,25 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được gia nhiệt dưới nhiệt độ hồi lưu trong thời gian 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm mát đến RT và được cô dưới áp suất giảm. Cặn được phân chia giữa nước muối và AcOEt và lớp chứa nước được chiết bằng AcOEt. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra dầu màu nâu. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (gradient xyclohexan/DCM từ 5/5 đến 0/10) tạo ra 897 mg (hiệu suất 59%) chất rắn màu nâu tương ứng với 2-(4-clobenzylamin)-4-cloquinolin.

Khối lượng: (ES+) $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2$ được yêu cầu 302; tìm thấy 303 $[\text{M}+\text{H}]$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)

2.2. Tổng hợp 2-(4-clobenzylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (2-2)

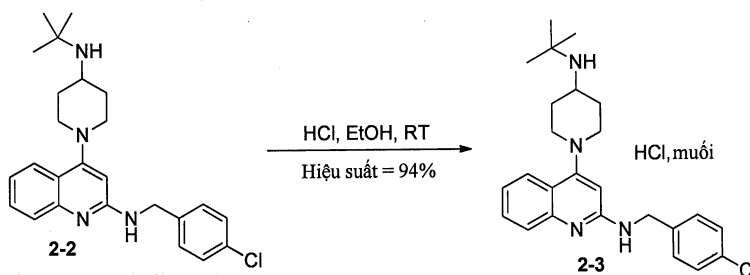


Bổ sung N,N-diisopropyletylamin (0,947 ml, 5,47 mmol) vào dung dịch chứa 2-(4-clobenzylamin)-4-cloquinolin (1,05 g, 3,46 mmol) và 4-(*tert*-butylamino)-piperidin (0,684 g, 4,38 mmol) trong 5 ml NMP và hỗn hợp này được gia nhiệt trong thời gian 22 giờ ở nhiệt độ 140°C. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm mát, được pha loãng bằng dung dịch NaOH 1N trong nước và hỗn hợp tạo thành được chiết bằng AcOEt. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra dầu màu vàng. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (gradient xyclohexan/AcOEt từ 8/2 đến 0/10) tạo ra chất rắn màu vàng. Chất rắn này được kết tinh lại từ MeCN tạo ra 904 mg (hiệu suất 62%) chất rắn màu trắng tương ứng với 2-(4-clobenzylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin.

HPLC-MS: t_r = 1,30 phút, (ES+) C₂₅H₃₁ClN₄ được yêu cầu 422; tìm thấy 423 [M + H], 368 [M-*t*Bu+H]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

2.3. Tổng hợp muối 2-(4-clobenzylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (2-3)

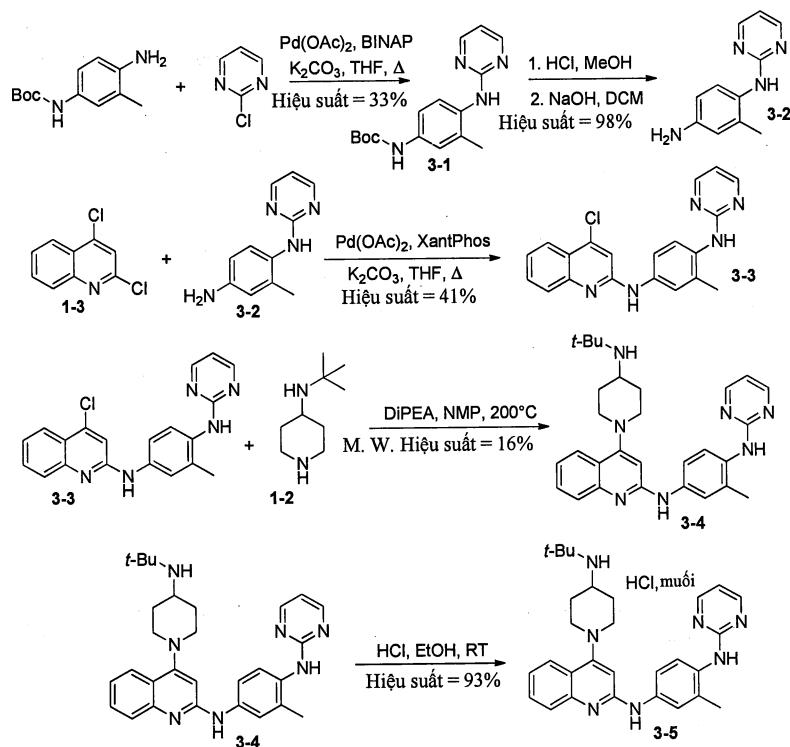


Bổ sung từng giọt 400 μ L dung dịch HCl 7M trong EtOH vào huyền phù chứa 2-(4-clobenzylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (450 mg, 1,06 mmol) trong 2,5 ml EtOH. Chất rắn được hòa tan và hỗn hợp được khuấy 3 giờ ở RT. Sau đó, dung dịch tạo thành được cô dưới áp suất giảm và ete được bổ sung vào. Hỗn hợp tạo thành được khuấy và được nghiền nhỏ ở nhiệt độ trong phòng để thu được chất rắn màu vàng nhạt, chất rắn này được lọc ra, được rửa với ete và được làm khô dưới chân không. Chất rắn màu vàng nhạt được hòa tan trong nước tinh khiết và sau đó được sấy thăng hoa để tạo ra 401 mg (hiệu suất 94%) chất rắn màu trắng tương ứng với muối 2-(4-clobenzylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua.

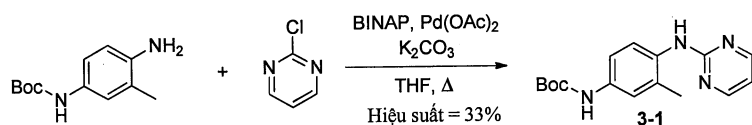
HPLC-MS: t_r = 1,31 phút, (ES+) C₂₅H₃₁ClN₄ được yêu cầu 422; tìm thấy 423 [M + H], 369 [M-*t*Bu+H]

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6)

3. Ví dụ 3: Điều chế muối 2-[3-metyl-4-(pyrimidin-2-ylamino)phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (3-5)



2.4. Tổng hợp 2-metyl- N^1 -(pyrimidin-2-yl)- N^4 -(*tert*-butyloxycarbonyl)-benzen-1,4-diamin (3-1)



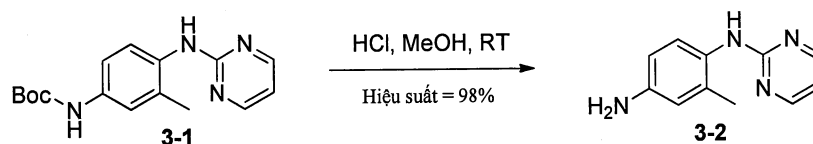
Dung dịch chứa 2-metyl- N^4 -(*tert*-butyloxycarbonyl)-benzen-1,4-diamin (2,40 g, 10,8 mmol), 2-clopyrimidin (0,78 g, 6,5 mmol) và K_2CO_3 (2,24 g, 16,2 mmol) trong THF khô (48ml) được khử khí bằng khí nitơ trong thời gian 15 phút. Sau đó, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (58 mg, 0,26 mmol) và phối tử BINAP (320 mg, 0,52 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khử khí lần thứ hai trong thời gian 20 phút. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt lần cuối dưới nhiệt độ hồi lưu trong thời gian 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm mát đến RT và được cô dưới áp suất giảm. Cặn được phân chia giữa nước và AcOEt và lớp chứa nước được chiết bằng AcOEt. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (gradient xyclohexan/AcOEt từ 10/0 đến 7/3) tạo ra 650 mg (hiệu suất

33%) chất rắn màu nâu tương ứng với 2-metyl-*N*¹-(pyrimidin-2-yl)-*N*⁴-(*tert*-butyloxycarbonyl)-benzen-1,4-diamin.

HPLC-MS: $t_r = 2,06$ phút, (ES⁺) $C_{16}H_{20}N_4O_2$ được yêu cầu 300; tìm thấy 301 [M+H]

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD)

2.5. Tổng hợp 2-metyl-*N*¹-(pyrimidin-2-yl)-benzen-1,4-diamin (3-2)

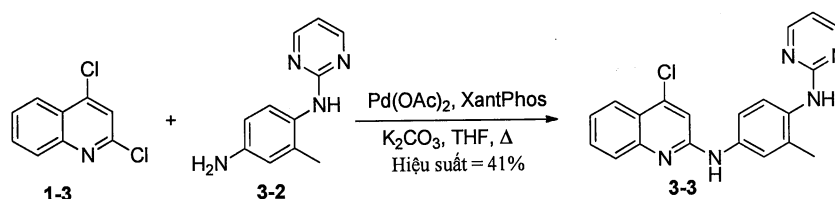


Bổ sung từng giọt dung dịch HCl 3M trong methanol (15 ml) vào 2-metyl-*N*¹-(pyrimidin-2-yl)-*N*⁴-(*tert*-butyloxycarbonyl)-benzen-1,4-diamin (1,18 g, 3,93 mmol) ở RT. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được khuấy trong thời gian 1 giờ ở RT. Hỗn hợp phản ứng sau đó được cô dưới áp suất giảm và cặn được phân chia giữa DCM và dung dịch NaOH 1M trong nước và lớp chứa nước được chiết bằng DCM. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra 787mg (hiệu suất 98%) dầu màu vàng tương ứng với 2-metyl-*N*¹-(pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin.

Khối lượng: (ES⁺) $C_{11}H_{12}N_4$ được yêu cầu 200; tìm thấy 201 [M+H]

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD)

2.6. Tổng hợp 2-[4-(2-pyrimidinylamino)-3-metyl-phenylamino]-4-cloquinolin (3-3)

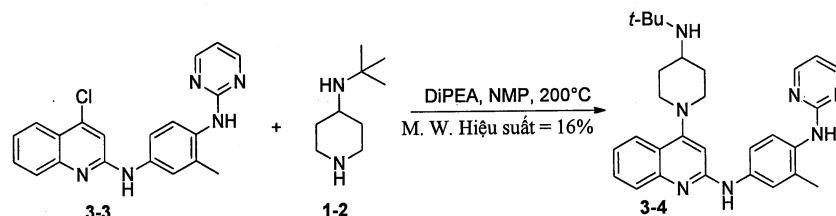


Dung dịch chứa 2-metyl-*N*¹-(pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin (771 mg, 3,85 mmol), 2,4-dicloquinolin (693 mg, 3,5 mmol) và K₂CO₃ (1,35 g, 9,80 mmol) trong THF khô (7 ml) được khử khí bằng khí nitơ trong thời gian 20 phút. Sau đó, Pd(OAc)₂ (47 mg, 0,21 mmol) và phối tử XantPhos (61 mg, 0,10 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khử khí lần thứ hai trong thời gian 20 phút. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt lần cuối dưới nhiệt độ hồi lưu trong thời gian 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm mát đến RT và được cô dưới áp suất giảm. Cặn được phân chia giữa nước và AcOEt và lớp chứa nước được chiết bằng AcOEt. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc

ký nhanh (gradien xyclohexan/AcOEt từ 10/0 đến 5/5) tạo ra 520 mg (hiệu suất 41%) chất rắn màu vàng tương ứng với 2-[4-(2-pyrimidinylamino)-3-metyl-phenylamino]-4-cloquinolin.

Khối lượng: (ES+) $C_{20}H_{16}ClN_5$ được yêu cầu 361; tìm thấy 362 [M+H]

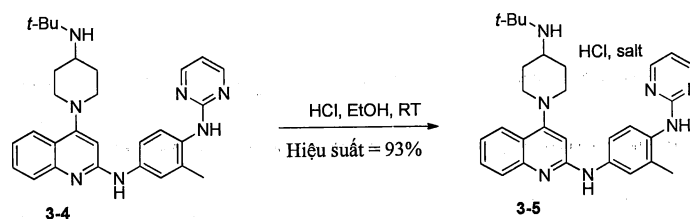
2.7. Tổng hợp 2-[4-(2-pyrimidinylamino)-3-metyl-phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (3-4)



Bổ sung 4-*tert*-butylaminopiperidin (760 mg, 4,80 mmol) vào dung dịch chứa 2-[4-(2-pyrimidinylamino)-3-metyl-phenylamino]-4-cloquinolin (350 mg, 0,97 mmol) trong NMP (1,5 ml). Dung dịch tạo thành được gia nhiệt trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 200°C trong lò vi sóng của phòng thí nghiệm. Sau đó, hỗn hợp tạo thành được làm mát và được phân chia giữa nước và AcOEt và lớp chứa nước được chiết bằng AcOEt. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (gradien xyclohexan/AcOEt từ 10/0 đến 5/5) tạo ra 75 mg (hiệu suất 16%) chất rắn màu nâu tương ứng với 2-[4-(2-pyrimidinylamino)-3-metyl-phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin.

HPLC-MS: $t_r = 1,15$ phút, (ES+) $C_{29}H_{35}N_7$ được yêu cầu 481; tìm thấy 482 [M+H], 426 [M-*t*Bu+H]

2.8. Tổng hợp muối 2-[4-(2-pyrimidinylamino)-3-metyl-phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (3-5)



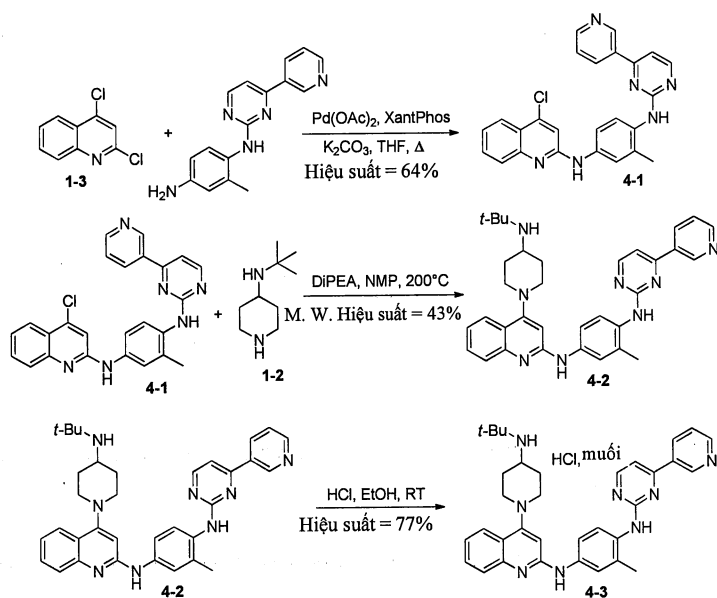
Dung dịch HCl 3,0M trong EtOH (290 μ L) được bổ sung từng giọt vào 2-[4-(2-pyrimidinylamino)-3-metyl-phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (75 mg, 0,16 mmol). Hỗn hợp tạo thành được lọc và làm bay hơi dưới áp suất

giảm tạo ra 80 mg (hiệu suất 93%) chất rắn màu vàng nhạt tương ứng với muối 2-[4-(2-pyrimidinylamino)-3-metyl-phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua.

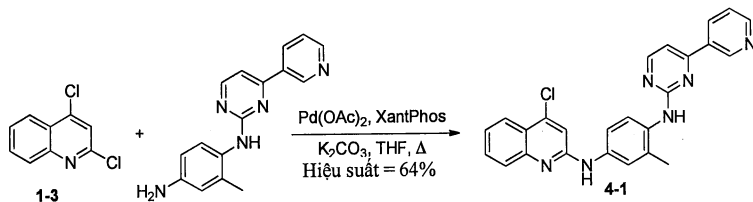
HPLC-MS: $t_r = 1,15$ phút, (ES+) $C_{29}H_{35}N_7$ được yêu cầu 481; tìm thấy 482 [M+H], 426 [M-*t*Bu+H]

1H NMR (300 MHz, CD_3OD + một vài giọt $DMSO-d_6$)

3. Ví dụ 4: Điều chế muối 2-[3-metyl-4-(pyrimidin-2-ylamino)phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (4-3)



3.1. Tổng hợp 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-metyl-phenylamino}-4-cloquinolin (4-1)



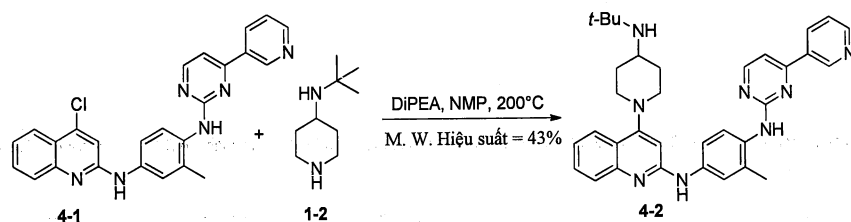
Dung dịch chứa 2-metyl- N^1 -[4-(pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-yl]benzen-1,4-diamin (1,18 g, 4,26 mmol), 2,4-dicloquinolin (767 mg, 3,87 mmol) trong THF khô (11,9 ml) được bổ sung K_2CO_3 (2,7 g, 19,0 mmol) và hỗn hợp phản ứng được khử khí bằng khí nitơ trong khoảng thời gian 15 phút. Sau đó, phối tử XantPhos (226 mg, 0,387 mmol) và $Pd(OAc)_2$ (44 mg, 0,19 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khử khí lần thứ hai trong khoảng thời gian 15 phút. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt lần cuối dưới nhiệt độ hồi lưu qua đêm. Hỗn hợp phản ứng sau đó được làm mát đến RT và được

cô dưới áp suất giảm. Cặn được phân chia giữa nước và AcOEt và lớp chứa nước được chiết bằng AcOEt. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (gradient xyclohexan/AcOEt từ 10/0 đến 0/10) tạo ra 1,08 g (hiệu suất 64%) chất rắn màu nâu tương ứng với 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-metyl-phenylamino}-4-cloquinolin.

Khối lượng: (ES+) $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{ClN}_6$ được yêu cầu 438; tìm thấy 439 [M+H]

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD)

3.2. Tổng hợp 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-metyl-phenylamino}-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (4-2)

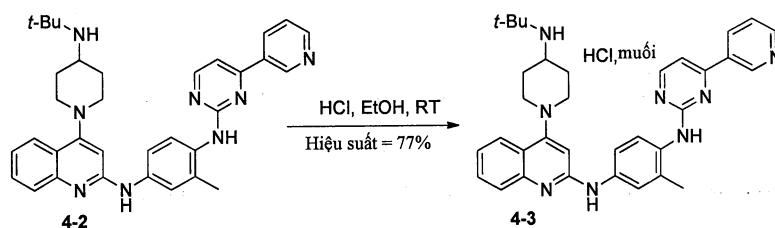


Bổ sung 4-*tert*-butylaminopiperidin (1,8 g, 11,0 mmol) vào dung dịch chứa 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-metyl-phenylamino}-4-cloquinolin (1,0 g, 2,28 mmol) trong NMP (10 ml). Dung dịch tạo thành được gia nhiệt trong thời gian 90 phút ở nhiệt độ 200°C trong lò vi sóng của phòng thí nghiệm. Hỗn hợp tạo thành được phân chia giữa nước và AcOEt và lớp chứa nước được chiết bằng AcOEt. Lớp hữu cơ liên kết được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (từ AcOEt/DCM 3/2 đến DCM/MeOH 9/1) tạo ra 1,01 g chất rắn màu vàng được kết tinh lại từ EtOH tạo ra 550 mg (hiệu suất 43%) chất rắn màu trắng tương ứng với 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-metyl-phenylamino}-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin.

HPLC-MS: $t_r = 1,20$ phút, (ES+) $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_8$ được yêu cầu 558; tìm thấy 559 [M+H], 503 [M-*t*Bu+H]

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

3.3. Tổng hợp muối 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-metyl-phenylamino}-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (4-3)



Bổ sung từng giọt dung dịch HCl 3,0 M trong EtOH (4 ml) vào huyền phù chứa 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-methyl-phenylamino}-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin trong EtOH (5,5 ml). Chất rắn màu vàng tạo thành được lọc ra và sau đó được nghiền nhỏ bằng xyclohexan. Huyền phù được lọc để tạo ra 505 mg (hiệu suất 77%) chất rắn màu trắng tương ứng với muối 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-methyl-phenylamino}-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua.

HPLC-MS: $t_r = 1,22$ phút, (ES⁺) C₃₄H₃₈N₈ được yêu cầu 558; tìm thấy 559 [M+H], 503 [M-*t*Bu+H]

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD + một vài giọt DMSO-*d*₆) ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD)

4. Ví dụ 5: Dữ liệu hoạt động của các hợp chất 1-6, 2-3, 3-5 và 4-3 trong các dòng tế bào MOLM-14, KG-1, MV4-11, A375, HCT-116, HepG2, Huh-7, MRC-5, MDA-MB-231, ARPE-19 và tế bào PBMC

Môi trường nuôi cấy tế bào: Tất cả các dòng tế bào được duy trì trong môi trường chứa penixilin-streptomycin 1% (Dutscher, P06-07100) và huyết thanh bào thai bò 10% (Gibco, W3387L) ngoại trừ 20% đối với dòng tế bào KG-1 và PBMC, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C với CO₂ 5%.

Các dòng tế bào HepG2, Huh7, HCT-116, MDA-MB-231 và A375 được nuôi cấy trong môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco (Dutscher, L0103).

Dòng tế bào KG-1 và MV4-11 được duy trì trong môi trường Dulbecco được cải biến của Iscove (Dutscher, L0190).

Dòng tế bào MOLM-14 được duy trì trong môi trường MEM alpha (Gibco, 22561-021).

PBMC được duy trì trong môi trường RPMI 1640 (Dutscher, L0498).

Dòng tế bào MRC-5 được duy trì trong MEM (Dutscher, L0416).

Dòng tế bào ARPE-19 được nuôi cấy trong môi trường DMEM:F12 (Dutscher, L0093).

Thử nghiệm khả năng sống của tế bào: Khả năng sống của tế bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm phát quang CellTiter-Glo® về khả năng sống của tế bào như được mô tả bởi nhà sản xuất (Promega, Ref G7571) bằng cách sử dụng quang kế Infinite F200Pro (Tecan). Tóm lại, đối với các tế bào bám dính, các tế bào được dàn lên trên đĩa 96-lỗ (màu trắng với đáy trong) trong 90 μ L môi trường trên mỗi lỗ và được để cho phát triển qua đêm trước khi thử nghiệm. Đối với các tế bào phát triển trong huyền phù, các tế bào được dàn lên trên các đĩa 96 lỗ ngay trước khi thử nghiệm. Số lượng các tế bào được gieo vào mỗi lỗ được chỉ ra trong bảng 1 dưới đây:

Bảng 1: Số lượng các tế bào được gieo vào mỗi lỗ đối với thử nghiệm về khả năng sống của tế bào

Mục	Dòng tế bào	Số lượng tế bào trên mỗi lỗ
1	HCT-116	2.000
2	A375	800
3	Huh7	10.000
4	HepG2	7.500
5	MOLM-14	10.000
6	KG-1	20.000
7	MV4-11	20.000
8	PBMC	10.000
9	MRC-5	5.000
10	ARPE-19	5.000
11	MDA-MB-231	10.000

Các hợp chất được bổ sung ở các nồng độ khác nhau vào mỗi lỗ, và môi trường nuôi cấy tế bào được ủ trong thời gian 72 giờ. Chất dẫn thuốc (H_2O) được sử dụng làm đối chứng, và tất cả các hợp chất được thử nghiệm theo tỷ lệ phần trăm không đổi của H_2O . Sau khi bổ sung 100 μ L CellTiter-Glo®, độ phát quang được đo bằng cách sử dụng Infinite F200Pro (Tecan). Trị số EC_{50} được xác định là liều lượng của hợp chất cần thiết để làm giảm các trị số phát quang đến 50% tín hiệu thu được đối với các môi trường nuôi cấy tế bào không được xử lý. Dữ liệu thử nghiệm được phân tích bằng cách sử dụng chương trình máy tính, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA).

Tất cả các thử nghiệm ít nhất được tiến hành theo hai lần lặp và được lặp lại hai lần độc lập.

Bảng 2: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng của dòng tế bào MOLM-14 với sự có mặt của hợp chất 1-6, 2-3, 3-5, 4-3

Hợp chất	% Khả năng sống của tế bào của dòng tế bào MOLM-14	
Nồng độ	10 μ M	4 μ M
1-6	12,1	71,8
2-3	0,3	31,8
3-5	8,7	78,7
4-3	0,2	0,5

Bảng 3: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng của các dòng tế bào MOLM-14, KG-1, MV4-11 và PBMC với sự có mặt của hợp chất 2-3

Tế bào	MOLM-14	KG-1	MV4-11	PBMC
Mô tả	Bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính Dị hợp tử FLT3-ITD +/-	Bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính Các thể dung hợp FLT3-ITD WT -/-FGFR1	Bệnh bạch cầu đơn nhân tủy B kiểu hình kép Đồng hợp tử FLT3-ITD +/+	Tế bào đơn nhân máu ngoại vi
EC ₅₀ (μ M)	2,2	5,1	2,3	1,9

Bảng 4: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng của các dòng tế bào A375, HCT-116, HepG2 và Huh-7 với sự có mặt của hợp chất 2-3

Dòng tế bào	A375	HCT-116	HepG2	Huh-7
Mô tả	U hắc sắc tố ác tính	Bệnh ung thư biểu mô kết tràng	Bệnh ung thư biểu mô tế bào gan	Bệnh ung thư biểu mô tế bào gan
EC ₅₀ (μ M)	1,0	1,6	0,9	1,7

Bảng 5: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng của các dòng tế bào MRC-5, MDA-MB-231 và ARPE-19 với sự có mặt của hợp chất 2-3

Dòng tế bào	MRC-5	MDA-MB-231	ARPE-19
Mô tả	Nguyên bào sợi phổi người	Ung thư biểu mô tuyến vú	Biểu mô sắc tố võng mạc ở người
EC ₅₀ (μ M)	$\approx$ 3,4	2,0	$\approx$ 6,9

Bảng 6: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng của các dòng tế bào MOLM-14, A375, HCT-116 và HepG2 với sự có mặt của hợp chất 4-3

Dòng tế bào	MOLM-14	A375	HCT-116	HepG2
Mô tả	Bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính	U hắc sắc tố ác tính	Bệnh ung thư biểu mô kết tràng	Bệnh ung thư biểu mô tế bào gan
EC ₅₀ (μM)	2,3	1,4	1,8	6,3

5. Ví dụ 6: Phân tích ngăn ALDH⁺ trong dòng tế bào MOLM-14

Dòng tế bào MOLM-14 được nuôi cấy trong môi trường MEM alpha có bổ sung 10% thể tích/thể tích huyết thanh bào thai bò, Penixilin-Streptomycin 1% và được duy trì ở nhiệt độ 37°C với CO₂ 5%. 10.000 tế bào được dàn lên trên các đĩa 96-lỗ ngay trước khi thử nghiệm.

Mỗi hợp chất được bổ sung ở các nồng độ khác nhau (hỗn hợp của sáu nồng độ) vào mỗi lỗ, và các môi trường nuôi cấy tế bào được ủ trong thời gian 72 giờ. Chất dẫn thuốc (H₂O) được sử dụng làm đối chứng, và tất cả các hợp chất được thử nghiệm theo tỷ lệ phần trăm không đổi của chất dẫn thuốc. Sự phát triển quá nhanh của tế bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm phát quang CellTiter-Glo® về khả năng sống của tế bào như được mô tả bởi nhà sản xuất (Promega, Ref G7571 Madison, WI, USA) bằng cách sử dụng máy đọc đĩa Centro (Berthold, France).

Trong mỗi thử nghiệm, mỗi điểm thể hiện số trung bình của ba lần lặp trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Dữ liệu thử nghiệm được phân tích bằng cách sử dụng chương trình máy tính, trị số Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) và trị số EC₅₀ được xác định là liều lượng của hợp chất cần thiết để làm giảm trị số hấp thụ đến 50% tín hiệu thu được đối với môi trường nuôi cấy tế bào được xử lý bằng chất dẫn thuốc.

Phân tích ngăn aldehyt dehydrogenaza (ALDH) và mức hoạt tính cao của hoạt tính aldehyt dehydrogenaza (ALDH⁺) được sử dụng để phát hiện tập hợp các tế bào khởi phát khối u (tế bào gốc ung thư, CSC). Thử nghiệm kit Aldefluor™ (StemCell Technologies, 01700) cho phép đánh giá hoạt tính của các loại thuốc trên các tế bào CSC giống như trong tập hợp dòng tế bào bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính MOLM-14 (tham khảo: Storms, R. W., Trujillo, A. P., Springer, J. B., Shah, L., Colvin, O. M., Ludeman, S. M., & Smith, C. (1999). Isolation primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16), 9118–9123). Thử nghiệm kit Aldefluor™ được

sử dụng theo quy trình được mô tả bởi nhà sản xuất. Tóm lại, dòng tế bào MOLM-14 được nuôi cấy trong môi trường MEM alpha có bổ sung huyết thanh bào thai bò 10% thể tích/thể tích, Penixilin-Streptomycin 1% và được giữ ở nhiệt độ 37°C với CO₂ 5%. 5.10⁵ tế bào được sử dụng trong thử nghiệm này. Mỗi hợp chất được bổ sung ở các nồng độ khác nhau (xem bảng 8), và các môi trường nuôi cấy tế bào được ủ trong thời gian 72 giờ. Chất dẫn thuốc (H₂O) được sử dụng làm đối chứng, và tất cả các hợp chất được thử nghiệm theo tỷ lệ phần trăm không đổi của chất dẫn thuốc. Các tế bào được thu từ môi trường nuôi cấy tế bào được ủ trong thời gian 45 phút ở nhiệt độ 37°C với dung dịch đệm thử nghiệm Aldefluor™ chứa Bodipy™-aminoaxetaldehyt, cơ chất ALDH aldehyt huỳnh quang. ALDH biến đổi cơ chất huỳnh quang BAAA thành axit Bodipy™-aminoaxetic (BAA) được giữ lại trong tế bào. Chất ức chế sự thoát dòng hoạt hóa có trong dung dịch đệm thử nghiệm Adelfluor™ để tránh sự thoát dòng hoạt hóa từ tế bào của BAA được biến đổi phụ thuộc sản phẩm cơ chất ALDH. Tín hiệu huỳnh quang trực tiếp tương xứng với hoạt tính của ALDH trong các tế bào và được đo bằng máy đếm tế bào theo dòng. Đối chứng âm được sử dụng để đo mức huỳnh quang cơ sở. Đối với mục đích này, 4-(N,N-diethylamino)-benzaldehyt (DEAB) được sử dụng làm chất ức chế ALDH chọn lọc. Phương pháp đếm tế bào sống được tiến hành bằng cách sử dụng kit nhuộm tế bào chết LIVE/DEAD® Fixable Far Red (LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit) (Invitrogen). Dữ liệu thử nghiệm được phân tích bằng cách sử dụng chương trình máy tính, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) và các trị số EC₅₀ được xác định là liều lượng của hợp chất cần thiết để làm giảm trị số hấp thụ đến 50% tín hiệu thu được đối với các môi trường nuôi cấy tế bào được xử lý chất dẫn thuốc.

Bảng 7: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng của dòng tế bào MOLM-14 với sự có mặt của Cytarabin và hợp chất 2-3

Hợp chất	Cytarabin	2-3 ^a
EC ₅₀ (μM)	0,290	2,2

^a: EC₅₀ được thu từ phương pháp được mô tả trong ví dụ 5 xem bảng 3

Bảng 8: Tập hợp ALDH giảm trong dòng tế bào MOLM-14 bằng hợp chất 2-3 sử dụng thử nghiệm kit Aldefluor™

Hợp chất	Đối chứng	Cytarabin		2-3		
		1 μ M	3 μ M	2,5 μ M	5,0 μ M	7,5 μ M
CSC dương tính với ALdefluor™ (%)	100	130	116	100	80	20

7. Ví dụ 7: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng (EC_{50} , μ M) của dòng tế bào Hep3B-Luc với sự có mặt của hợp chất 2-3

Trước khi xử lý hợp chất, hợp chất được hòa tan trong H_2O để tạo thành dung dịch gốc 10 mM. Dung dịch làm việc (nồng độ cuối cùng gấp 5 lần) sau đó được pha bằng môi trường MEM (Gibco, 1128319) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (Gibco, 10099141).

Khi tiến hành thử nghiệm, thử nghiệm đáp ứng liều lượng của Doxorubicin đối với các dòng tế bào BEL-7402 (bệnh ung thư biểu mô tế bào gan nguyên phát ở người) sẽ được sử dụng làm đối chứng nội trong mỗi đĩa thử nghiệm để thử nghiệm. Môi trường MEM có bổ sung H_2O 5% (5 lần) sẽ được bổ sung vào các tế bào dưới dạng đối chứng âm. Nồng độ H_2O cuối cùng trong mỗi lỗ là 1%.

Dòng tế bào Hep3B-Luc (dòng tế bào ung thư biểu mô gan ở người được chuyển nhiễm luciferaza đối với mô hình khối u đúng vị trí) được nuôi cấy trong môi trường MEM có bổ sung huyết thanh bào thai bò (FBS) 10% thể tích/thể tích, Penixilin-Streptomycin 1% và được duy trì ở nhiệt độ $37^{\circ}C$ với CO_2 5%. 800 tế bào được dàn trên đĩa màu trắng đáy trong phẳng có 384-lỗ (Corning, 3707).

Quy trình thử nghiệm: Các tế bào trong pha log được thu và được đếm. Huyền phù tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 384 lỗ ở mật độ 800 tế bào mỗi lỗ (tổng thể tích là 40 μ L). Các lỗ biên được đổ đầy bằng dung dịch đệm PBS. Hợp chất thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau được bổ sung theo hai lần lặp (bổ sung 10 μ L dung dịch hợp chất 5 lần vào đĩa). Đĩa thử nghiệm được ủ trong thời gian 72 giờ trong tủ ủ $37^{\circ}C/CO_2$ 5%. Khả năng sống của tế bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm phát quang CellTiter-Glo® về khả năng sống của tế bào như được mô tả bởi nhà sản xuất (Promega, Ref G7571). Sau khi bổ sung 100 μ L dung dịch phản ứng CellTiter-Glo®, độ phát quang

được đo bằng cách sử dụng quang kế PHERAstar Plus. Dữ liệu được ghi lại bằng PHERAstar Plus, việc thu và phân tích dữ liệu được tiến hành bằng cách sử dụng chương trình Microsoft Excel và phần mềm GraphPad Prism v.6.

Bảng 9 : Thử nghiệm ức chế sinh trưởng của dòng tế bào Hep3B-Luc với sự có mặt của hợp chất 2-3

Hợp chất	Doxorubixin	2-3
Dòng tế bào	BEL-7402	Hep3B-Luc
EC ₅₀ (μM)	0,15	1,1

8. Ví dụ 8: Thử nghiệm ức chế sự phát triển (EC₅₀, μM) của dòng tế bào CAKI-1 và 786-O với sự có mặt của hợp chất 2-3

Môi trường nuôi cấy tế bào: dòng tế bào CAKI-1 và 786-O được duy trì trong môi trường RPMI 1640 (Dutscher, L0498) chứa Penixilin-Streptomycin 1% (Dutscher, P06-07100) và huyết thanh bào thai bò 10% (Gibco, W3387L) và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C với CO₂ 5%.

Phép đo khả năng sống của tế bào: Khả năng sống của tế bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm phát quang CellTiter-Glo® về khả năng sống của tế bào như được mô tả bởi nhà sản xuất (Promega, Ref G7571) bằng cách sử dụng quang kế Infinite F200Pro (Tecan). Tóm lại, các lỗ được dàn trên các đĩa 96 lỗ (màu trắng với đáy trong) trong 90 μL môi trường trên mỗi lỗ và được để cho phát triển qua đêm trước khi thử nghiệm. Số lượng các tế bào được gieo vào mỗi lỗ được thể hiện trong bảng dưới đây:

Bảng 10: Số lượng tế bào được gieo trên mỗi lỗ đối với thử nghiệm về khả năng sống của tế bào CAKI-1 và 786-O

	Số lượng tế bào trên mỗi lỗ
CAKI-1	2250
786-O	1250

Hợp chất 2-3 và hai hợp chất tham chiếu (Sorafenib và Sunitinib) được bổ sung ở các nồng độ khác nhau vào mỗi lỗ, và môi trường nuôi cấy tế bào được ủ trong thời gian 72 giờ. Đối với phép phân tích hợp chất 2-3, H₂O được sử dụng làm đối chứng âm (= không được xử lý) và tất cả các nồng độ được thử nghiệm theo tỷ lệ phần trăm không đổi của H₂O. Đối với phép phân tích Sorafenib và Sunitinib, DMSO được sử dụng làm đối chứng âm (= không được xử lý) và tất cả các nồng độ được thử nghiệm theo tỷ lệ

phần trăm không đổi của DMSO. 72 giờ sau khi ủ các hợp chất, 100 μ L CellTiter-Glo® được bổ sung vào mỗi lỗ và độ phát quang được đo bằng cách sử dụng Infinite F200Pro (Tecan). Trị số EC₅₀ được xác định là liều lượng của hợp chất cần thiết để làm giảm trị số phát quang đến 50% tín hiệu thu được đối với môi trường nuôi cấy tế bào không được xử lý. Dữ liệu thử nghiệm được phân tích bằng cách sử dụng chương trình máy tính, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA). Tất cả các thử nghiệm ít nhất được tiến hành theo ba lần lặp và được lặp lại ít nhất ba lần độc lập.

Bảng 11: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng của dòng tế bào CAKI-1 với sự có mặt của hợp chất 2-3 và Sorafenib, Sunitinib làm đối chứng

Hợp chất	EC ₅₀ (μ M)	SD
2-3	1,4	0,1
Sorafenib	4,5	1,5
Sunitinib	1,7	0,7

Bảng 12: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng của dòng tế bào 786-O với sự có mặt của hợp chất 2-3 và Sorafenib, Sunitinib làm đối chứng

Hợp chất	EC ₅₀ (μ M)	SD
2-3	2,1	0,2
Sorafenib	6,8	1,7
Sunitinib	6,0	1,1

9. Ví dụ 9: Tác dụng *in vitro* của hợp chất 2-3 đối với các tế bào ung thư ruột kết di căn vào gan và tập hợp con của các tế bào gốc ung thư ruột kết

Mục đích của nghiên cứu này là để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của hợp chất 2-3 đối với các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị bệnh ung thư ruột kết di căn vào gan được phân lập mới từ các bệnh nhân và cụ thể hơn là trên tập hợp con của CSC. Một vài phương pháp hiện nay đang có sẵn để phát hiện dấu hiệu của CSC *in vitro*. Ví dụ, hoạt tính aldehyt dehydrogenaza (ALDH) có thể được sử dụng làm chỉ thị để nhận biết các tế bào gốc ở người bị ung thư trong bệnh ung thư ruột kết. Ngoài ra, CSC có thể được làm giàu bằng cách nuôi cấy các tế bào trong huyền phù vào môi trường không chứa huyết thanh có bổ sung các yếu tố phát triển. Trong các điều kiện này, chỉ các CSC được phát triển thành các dòng vô tính ba chiều đa bào được gọi là “khối u hình cầu”. Bằng cách đưa ra ưu điểm về khả năng tạo thành khối u hình cầu, các tác giả

sau đó có thể ước tính lượng của các CSC trong mẫu và do đó đánh giá tác dụng của phân tử đã cho đối với khả năng tự khôi phục lại của các CSC.

Môi trường nuôi cấy tế bào khối u có nguồn gốc từ bệnh nhân

Các tế bào di căn vào gan có nguồn gốc từ bệnh nhân (CPP19, 30, 36 và CPP45 xem bảng 1 để mô tả lâm sàng) được duy trì trong DMEM (Gibco) đầy đủ với FBS 10%. Các tế bào được thu từ sinh thiết được cung cấp bởi CHU-Carémeau (Nîmes, France) theo quy trình chuẩn được chấp nhận. Văn bản chấp thuận đã ký được thu từ các bệnh nhân trước khi thu mẫu phù hợp với tất cả các khía cạnh đạo đức và luật pháp. Các khối u được rửa, được cắt nhỏ thành các mảnh ($<2\text{mm}^3$) và được làm tiêu bằng liberaza H (0,26U/mL, Roche) được tạo huyền phù lại trong Accumax (Sigma-Aldrich). Sau thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 37°C , huyền phù tế bào được lọc qua mắt lưới $40\ \mu\text{m}$ để thu được huyền phù tế bào đơn và được dàn trên môi trường DMEM, có bổ sung FBS, Glutamin, thuốc kháng sinh và các axit amin không thiết yếu. Khi lớp đơn chứa các tế bào khối u có nguồn gốc từ bệnh nhân được tạo thành, các tế bào được tách ra bằng cách sử dụng trypsin/EDTA và được tạo huyền phù lại trong DMEM với FBS 10% (đối với các tế bào bám dính) hoặc môi trường M11 xác định (đối với sự tạo thành hình cầu). Các tế bào được nuôi cấy trong không khí ẩm ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5%.

Thử nghiệm độc tính *in vitro*

Các tế bào được dàn ở mật độ 10^4 tế bào trên mỗi lỗ trên đĩa P96 lỗ trong DMEM với FBS 10%. Sau thời gian 24 giờ, các tế bào được xử lý bằng hợp chất 2-3 và khả năng sống của tế bào được đánh giá 72 giờ sau điều trị bằng thử nghiệm phát quang CellTiter-Glo® về khả năng sống của tế bào bằng (Promega). EC_{50} được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism Software v6 (Graphpad Software, Inc La Jolla, CA).

Thử nghiệm Aldefluor™ và phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS)

Thử nghiệm Aldefluor™ (Stem Cell Technologies, 01700) được tiến hành theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất (Stem Cell Technologies). Các tế bào ALDH^{đương tính} được nhận biết bằng cách so sánh mẫu giống nhau và không có chất ức chế ALDH, diethylaminobenzaldehyt (DEAB). FACS tạo ra hoạt tính ALDH được thiết lập ở 0,1% khi có mặt DEAB. Các tế bào được phân tích bằng cách sử dụng MacsQuant và dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Cyflogic. Các tế bào CPP36 không được

sử dụng trong các phép phân tích này do dữ liệu tự phát huỳnh quang cao trong tế bào của chúng.

Các thử nghiệm tạo hình cầu

Đánh giá tế bào tạo thành hình cầu được xác định sau khi dàn 500 tế bào/lỗ 200 μL trong môi trường M11 trong các lỗ P96 trong các đĩa gắn siêu thấp (Corning). M11 là môi trường DMEM/F12 (1:1) (Gibco), có bổ sung N_2 , Glutamin 3 mM, Glucoza 0,6%, insulin 4 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich), hBasic-FGF 10 ng/ml (R&D Systems), và hEGF 20 ng/ml (R&D Systems). Kích thước hình cầu vượt quá 50 μm được tính sau thời gian 10 ngày và được thể hiện ở số lượng các hình cầu trên mỗi trường hình ảnh. Các tế bào CPP45 không được sử dụng trong các phép phân tích này do khả năng không thể tạo ra các khối u hình cầu của chúng.

Phân tích thống kê

Đối với mỗi thử nghiệm, dữ liệu được thể hiện dưới dạng S.E.M trung bình của ba thử nghiệm độc lập. Phần mềm GraphPad Prism Software v6 (Graphpad Software, Inc La Jolla, CA). được sử dụng để phân tích dữ liệu, tức là kiểm định student t.

Bảng 13: Các đặc tính lâm sàng của bệnh nhân bị bệnh ung thư ruột kết

	CPP19	CPP30	CPP36	CPP45
Giới tính	M	M	M	M
Độ tuổi	65	69	81	80
Đột biến	KRAS	<i>Không có</i>	KRAS	KRAS
Phân loại TNM	T3N2aM1	TxNxM1	T4N2bM1	T3N1cM1
Xạ trị	<i>Không</i>	<i>Không</i>	<i>Không</i>	<i>Không</i>
Hóa trị	Bevacizumab, folfiri	Bevacizumab, Folfiri, Xelox	Bevacizumab & folfiri	<i>Không</i>

- Đánh giá *in vitro* tính gây độc tế bào của hợp chất 2-3 đối với các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị bệnh ung thư ruột kết (CRC) di căn vào gan

Thử nghiệm phát quang CellTiter-Glo® về khả năng sống của tế bào, như được mô tả bởi nhà sản xuất (Promega, Ref G7571), được sử dụng để xác định tính gây độc tế bào của hợp chất 2-3 trong các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị CRC di căn vào gan. Khả năng sống của tế bào từ các tế bào đối chứng không được xử lý được thiết lập ở 100%. Các tế bào đầu tiên được dàn ở mật độ 10.000 tế bào/100 μL trên mỗi lỗ trong đĩa P96 và được ủ trong không khí ẩm với CO_2 5% ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24

giờ. Các tế bào sau đó được ủ bằng dung môi (DMSO 0,1%, tế bào đối chứng không được xử lý) hoặc nồng độ tăng cao của hợp chất 2-3. Sau thời gian 72 giờ ủ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 30 μM , hợp chất 2-3 chứng minh hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc liều lượng đối với bốn tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị CRC khác nhau được thiết lập từ sinh thiết di căn gan còn mới (Bảng 14).

Bảng 14: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng đối với các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị CRC di căn vào gan với sự có mặt của hợp chất 2-3

CRC ID	CPP19	CPP30	CPP36	CPP45
EC ₅₀ (μM)	1,88	1,22	1,45	1,12

- Đánh giá *in vitro* của hợp chất 2-3 đối với các tế bào dương tính với AldefluorTM từ các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị CRC di căn vào gan

Các tế bào đầu tiên được dàn ở mật độ 250.000 tế bào/1000 μL trên mỗi lỗ trong các đĩa P96 và được ủ trong không khí ẩm với CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Các tế bào sau đó được ủ bằng dung môi (DMSO 0,1%) hoặc nồng độ tăng cao của hợp chất 2-3 trong thời gian 72 giờ. Các tế bào được trypsin hóa, được thu, và được rửa. Các hạt không có tế bào và các tế bào chết được loại bỏ dựa trên sự tán xạ ánh sáng thấp và dương tính với sự nhuộm tế bào chết Sytox Blue (Life Technologies) bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng MACSQuant (Miltenyi biotec). Tỷ lệ phần trăm của các tế bào ALDH^{sáng} sau đó được định lượng bằng cách sử dụng thử nghiệm AldefluorTM (Stemcell Technologies, 01700). Chất ức chế ALDH, diethylaminobenzaldehyt (DEAB), được bổ sung vào để đảm bảo nhận biết chính xác các tế bào dương tính với ALDH. Khi chất ức chế ALDH, DEAB được ứng dụng, sự phát quang giảm đi (được dịch chuyển sang bên trái) và cổng được vẽ để mô tả giới hạn trên của các tế bào này. Cổng này được sử dụng để lựa chọn tập hợp con bắt màu mạnh với ALDH. Như được thể hiện, sau thời gian 72 giờ ủ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 3 μM , hợp chất 2-3 chứng minh hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc liều lượng và có ý nghĩa ($p < 0,001$) đối với tập hợp con các tế bào dương tính với AldefluorTM trong ba tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị CRC khác nhau được thiết lập từ sinh thiết di căn gan mới (Fig.1).

- Hợp chất 2-3 phong bế sự hình thành khối u hình cầu của các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị CRC di căn vào gan

Sự hình thành khối u hình cầu *in vitro* được sử dụng rộng rãi để nhận biết sự có mặt của tế bào gốc ung thư (CSC) trong các khối u rắn hoặc tập hợp tế bào không đồng nhất, do các tế bào này chỉ có khả năng tự hồi phục lại. Các tác giả đã sử dụng thử nghiệm này làm phép đo chức năng cho tần suất và khả năng sống của CSC, và đánh giá khả năng của các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị di căn vào gan để tạo ra các khối u hình cầu sau khi xử lý bằng hợp chất 2-3. Để đạt được mục đích này, các tế bào ban đầu được cho phát triển trong bình tam giác chứa canh trường mô với môi trường hoàn chỉnh DMEM có huyết thanh bào thai bò (FBS) làm lớp đơn cho đến khi chúng đạt đến gần độ nhập dòng. Các tế bào được trypsin hóa, được thu, rửa để loại bỏ FBS và được chuyển qua lưới lọc tế bào có mắt lưới cỡ 40 μm . Huyền phù tế bào đơn sau đó được nuôi cấy bằng môi trường CSC (tức là, môi trường M11) bao gồm DMEM-F12 có bổ sung 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF và chất bổ sung N2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) trong đĩa gắn siêu thấp lỗ P96 (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA). Các tế bào được dàn ở mật độ 500 tế bào/100 μL trên mỗi lỗ và được ủ trong không khí ẩm với CO_2 5% ở nhiệt độ 37°C. Để xác định tác dụng của hợp chất 2-3 đối với hiệu quả và kích thước hình cầu tạo thành khối u hình cầu, hợp chất 2-3 được bổ sung ở hai nồng độ (0,3 μM hoặc 3 μM) 24 giờ sau khi cấy ở thể tích cuối cùng bằng 200 μL của M11. Mười ngày sau đó, các đĩa được kiểm tra sự hình thành của khối u hình cầu (>50 μm) bằng cách sử dụng kính hiển vi đảo ngược. Các ảnh tương phản pha được chụp và kích thước và số lượng hình cầu được đo và đếm bằng tay từ các ảnh sử dụng ImageJ. Như được thể hiện trên Fig. 2, hợp chất 2-3 gây ra sự giảm mạnh mẽ và phụ thuộc liều lượng khi hình thành khối u hình cầu trong ba tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị CRC được thử nghiệm, các tế bào này được phân lập từ các phần di căn trong gan (CPP19, CPP30 và CPP36). Thực vậy, hiệu quả tạo thành khối u hình cầu phần lớn bị ức chế bởi 3 μM hợp chất 2-3. Ngược lại, cỡ của khối u hình cầu không bị giảm về mặt thống kê khi điều trị, ngoại trừ 3 μM trên các tế bào CPP19 ($p=0,02$).

Ví dụ 10: Thử nghiệm ức chế sinh trưởng (EC_{50} , μM) của tế bào thu được từ bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) với sự có mặt của hợp chất 2-3

Các tế bào ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) có nguồn gốc từ bệnh nhân được lấy sau khi có sự đồng ý bằng văn bản dưới với sự chấp thuận của hội đồng đánh giá

của tổ chức CrownBio và dưới sự tuân thủ nghiêm ngặt của tuyên bố Helsinki về nghiên cứu y tế liên quan đến con người.

Các tế bào ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) có nguồn gốc từ bệnh nhân được duy trì trong môi trường tương ứng được mô tả trong bảng 15 chứa Penixilin-Streptomycin 1% (Life Technologies, 15070-063), với các chất bổ sung đối với môi trường nuôi cấy tế bào nguyên phát (PCS) chứa hydrocortison (50 nM), yếu tố phát triển biểu bì (20 ng/ml), yếu tố phát triển nguyên bào sợi β (10 ng/ml), chất bổ sung trong môi trường lỏng Heparin (2 μ g/ml) ITS (1X) và axit amin không thiết yếu (NEAA, 0,01 mM, 1X). Tế bào nguyên phát được nuôi cấy trong không khí ẩm (độ ẩm tương đối 95%) với CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C.

Bảng 15: Môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy đối với các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC)

Mục	Tế bào nguyên phát	Môi trường nuôi cấy	Điều kiện nuôi cấy
1	LI0050	DMEM/F12 + FBS 10% + PCS	37°C, CO ₂ 5%, độ ẩm tương đối 95%
2	LI0574	DMEM/F12 + FBS 10% + PCS	37°C, CO ₂ 5%, độ ẩm tương đối 95%
3	LI0612	DMEM/F12 + FBS 10% + PCS	37°C, CO ₂ 5%, độ ẩm tương đối 95%
4	LI0752	DMEM/F12 + FBS 10% + PCS	37°C, CO ₂ 5%, độ ẩm tương đối 95%
5	LI0801	DMEM/F12 + FBS 10% + PCS	37°C, CO ₂ 5%, độ ẩm tương đối 95%
6	LI1005	DMEM/F12 + FBS 10% + PCS	37°C, CO ₂ 5%, độ ẩm tương đối 95%
7	LI1098	DMEM/F12 + FBS 10% + PCS	37°C, CO ₂ 5%, độ ẩm tương đối 95%
8	LI1646	DMEM/F12 + FBS 10% + PCS	37°C, CO ₂ 5%, độ ẩm tương đối 95%

Thử nghiệm ức chế sinh trưởng của tế bào được tiến hành như được mô tả ở phần trên trong ví dụ 5 bằng cách sử dụng thử nghiệm phát quang CellTiter-Glo® về khả năng sống của tế bào như được mô tả bởi nhà sản xuất (Promega, Ref G7571). Số lượng các tế bào được gieo trên mỗi lỗ (trong vi đĩa được xử lý TC Polystyren màu đen đáy trong phẳng 96-lỗ, Cat# 3340, Corning®) được mô tả trong bảng 16. Nhãn dính màu đen dán

sau (Cat# 6005189, Perkin Elmer) được dàn lên đáy của mỗi đĩa trước khi ghi lại độ phát quang CellTiter-Glo®.

Bảng 16: Số lượng các tế bào được gieo vào mỗi lỗ đối với thử nghiệm khả năng sống của tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị HCC

Mục	Các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị HCC	Số lượng tế bào trên mỗi lỗ
1	LI0050	2.500
2	LI0574	3.000
3	LI0612	4.000
4	LI0752	3.500
5	LI0801	2.500
6	LI1005	2.500
7	LI1098	2.000
8	LI1646	2.000

Dữ liệu thử nghiệm được phân tích bằng cách sử dụng chương trình máy tính, Graphpad Prism V 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) và các trị số EC₅₀ được xác định là liều lượng của hợp chất cần thiết để làm giảm trị số hấp thụ đến 50% tín hiệu thu được đối với môi trường nuôi cấy tế bào được xử lý chất dẫn thuốc và là số trung bình của ít nhất ba thử nghiệm độc lập.

Sau 72 giờ ủ, hợp chất 2-3 chứng minh các hoạt tính gây độc đáp ứng liều lượng đối với các tế bào thu được từ tám bệnh nhân bị HCC khác nhau (xem bảng 17).

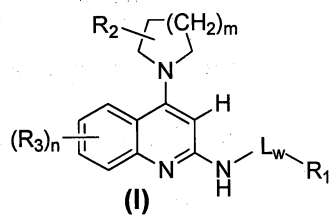
Bảng 17: Thử nghiệm ức chế sự sinh trưởng đối với các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) khi có mặt hợp chất 2-3, Sorafenib và

Cisplatin

Mục	Các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân bị HCC	EC ₅₀ (μM)		
		2-3	Sorafenib	Cisplatin
1	LI0050	3,5	9,1	1,3
2	LI0574	2,4	8,7	3,6
3	LI0612	6,9	17,9	16,3
4	LI0752	0,5	6,3	2,6
5	LI0801	2,1	5,7	1,5
6	LI1005	3,2	14,5	5,9
7	LI1098	7,0	10,9	5,1
8	LI1646	1,4	10,3	10,0

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I)



trong đó

- R_1 được chọn từ C6-C10 aryl được thế hoặc không được thế bằng R_9 ; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S được thế hoặc không được thế bằng R_9 ; heteroaryl ngưng tụ như được xác định bao gồm từ 8 đến 13 nguyên tử bao gồm 1, 2, 3, 4 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S và bao gồm ít nhất 2 nguyên tử cacbon được thế hoặc không được thế bằng R_9 ;
- L_w được chọn từ (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C1-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế bằng R_4 ; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; C=O; SO; SO₂; (C=O)-NR₈; (C=O)-O; (C=O)-O-(C1-C4)alkyl; SO₂-NR₈; NR₈; trong đó R_4 được chọn từ H; (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; (C6-C10) aryl tùy ý được thế; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh hoặc heteroaryl ngưng tụ như được xác định bao gồm từ 8 đến 13 nguyên tử bao gồm 1, 2, 3, 4 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S và bao gồm ít nhất 2 nguyên tử cacbon được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nhóm thế độc lập được chọn từ nguyên tử hydro, halogen, (C1-C10) alkyl được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C1-C10) alkoxy, hydroxyl, xyano, nitro, carboxy, NR₈R₈', vòng có 4 đến 9 cạnh no hoặc không no bao gồm 1, 2 hoặc cho đến 3 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ O, N và S;
- R_2 được chọn từ NR₅R₆;
- R_3 được chọn từ nguyên tử hydro; nguyên tử halogen; (C1-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, hydroxyl, alkoxy, -NR₅R₆; (C2-C10) alkenyl; (C2-C10) alkynyl; (C3-C10) xycloalkyl; (C5-C10) xycloalkenyl; (C8-C10) xycloalkynyl; (C1-C10) alkoxy;

hydroxyl; nitro; xyano; NR_5R_6 ; $\text{O}-(\text{R}_7)$; $(\text{CO})-\text{R}_7$; $(\text{CO})-\text{O}-\text{R}_7$; $(\text{CO})-\text{NR}_5\text{R}_6$; $\text{O}-(\text{CO})-\text{R}_7$; $\text{O}-(\text{CO})-\text{NR}_5\text{R}_6$; $\text{NR}_5-(\text{CO})-\text{R}_7$; $\text{NR}_5-(\text{CO})-\text{OR}_7$; $\text{NR}_5-(\text{CO})-\text{NR}_5\text{R}_6$; $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-)_m-\text{OR}_{11}$; $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-)_m-\text{NR}_{11}\text{R}_{11}'$; SO_2-R_7 ; $\text{NR}_5-\text{SO}_2-\text{R}_7$; $\text{SO}_2-\text{NR}_5\text{R}_6$; $\text{NR}_5-(\text{C}2-\text{C}6)\text{-alkyl}-\text{NR}_5\text{R}_6$; aryl tùy ý được thế; benzyl tùy ý được thế; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh tùy ý được thế bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S; heteroaryl ngưng tụ tùy ý được thế như được xác định bao gồm từ 8 đến 13 nguyên tử bao gồm 1, 2, 3, 4 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S và bao gồm ít nhất 2 nguyên tử cacbon; vòng heteroxyclyl có 4 đến 9 cạnh tùy ý được thế no hoặc không no bao gồm 1, 2 hoặc cho đến 3 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ O, N và S;

- R_5 và R_6 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro; (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; xycloalkynyl (C8-C10) tùy ý được thế; $(\text{CO})-\text{R}_7$; $(\text{CO})-\text{O}-\text{R}_7$; $(\text{CO})-\text{NR}_8\text{R}_8'$; SO_2-R_7 ; $\text{SO}_2-\text{NR}_8\text{R}_8'$; (C1-C10) alkyl được thế bằng $\text{NR}_8\text{R}_8'$; (C3-C10) xycloalkyl được thế bằng $\text{NR}_8\text{R}_8'$; aryl tùy ý được thế; benzyl tùy ý được thế; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh tùy ý được thế bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S; vòng heteroxyclyl có 4 đến 9 cạnh tùy ý được thế no hoặc không no bao gồm 1, 2 hoặc cho đến 3 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ O, N và S; hoặc R_5 và R_6 cùng liên kết với nguyên tử nitơ mà chúng liên kết cộng hóa trị để tạo ra nhóm heteroxyclyl tạo thành vòng có 4 đến 9 cạnh mà có thể bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại bổ sung được chọn từ O, N và S;

- R_7 và R_7' độc lập được chọn từ hydro; (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; C1-C10 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế bằng $\text{NR}_8\text{R}_8'$; (C6-C10) aryl tùy ý được thế, benzyl tùy ý được thế, vòng có 5 đến 8 cạnh dị vòng thơm tùy ý được thế bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S;

- R_8 và R_8' độc lập được chọn từ hydro; (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; hoặc R_8 và R_8' cùng liên kết với nguyên tử nitơ mà chúng liên kết cộng hóa trị để tạo ra

nhóm heteroxyclyl tạo thành vòng có 4 đến 9 cạnh mà có thể bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại bổ sung được chọn từ O, N và S;

- R_9 độc lập được chọn từ hydro; nguyên tử halogen; (C1-C10) alkyl tùy ý được thế; (C1-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, hydroxyl, alkoxy; (C2-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C2-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; (C1-C10) alkoxy tùy ý được thế; hydroxyl; nitro; xiano; NR_5R_6 , (CO)- R_7 ; (CO)-O- R_7 ; (CO)- NR_5R_6 ; O-(CO)- R_7 ; O-(CO)- NR_5R_6 ; NR_5 -(CO)- R_7 ; NR_5 -(CO)-OR $_7$; NR_5 -(CO)- NR_5R_6 ; SO_2 - R_7 ; NR_5 - SO_2 - R_7 ; SO_2 - NR_5R_6 ; (C1-C10) alkyl được thế bằng NR_5R_6 ; NR_5 -(C2-C10)-alkyl- NR_5R_6 ; $-(O-CH_2CH_2-)_m$ -OR $_{11}$; $-(O-CH_2CH_2-)_m$ - $NR_{11}R_{11'}$; (C6-C10) aryl tùy ý được thế; benzyl tùy ý được thế; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh tùy ý được thế bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S; nhóm heteroxyclyl tùy ý được thế tạo thành vòng có 4 đến 9 cạnh mà có thể bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S; $-NR_5R_{10}$; $-O-R_{10}$;
- R_{10} độc lập được chọn từ hydro; (C6-C12)-aryl được thế hoặc không được thế bằng R_{12} ; benzyl được thế hoặc không được thế bằng R_{12} ; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S được thế hoặc không được thế bằng R_{12} ; heteroaryl ngưng tụ được xác định là bao gồm từ 8 đến 13 nguyên tử bao gồm 1, 2, 3, 4 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S và bao gồm ít nhất 2 nguyên tử cacbon được thế hoặc không được thế bằng R_{12} ; heteroxyclyl tạo thành vòng có 4 đến 9 cạnh có thể chứa 0, 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S được thế hoặc không được thế bằng R_{12} ;
- R_{11} và $R_{11'}$ độc lập được chọn từ nguyên tử hydro; (C2-C10) alkyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkenyl tùy ý được thế; (C3-C10) alkynyl tùy ý được thế; (C3-C10) xycloalkyl tùy ý được thế; (C5-C10) xycloalkenyl tùy ý được thế; (C8-C10) xycloalkynyl tùy ý được thế; (C2-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen; hoặc R_{11} và $R_{11'}$ cùng liên kết với nguyên tử nitơ mà chúng liên kết cộng hóa trị để tạo ra nhóm heteroxyclyl tạo thành vòng no hoặc không no có 4 đến 9 cạnh có thể bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại bổ sung được chọn từ O, N và S;

• R_{12} được chọn từ nguyên tử hydro; nguyên tử halogen; (C1-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, hydroxyl, alkoxy, $NR_{11}R_{11'}$; (C2-C10) alkenyl; (C2-C10) alkynyl; (C3-C10) xycloalkyl; (C5-C10) xycloalkenyl; (C8-C10) xycloalkynyl; (C1-C10) alkoxy; hydroxyl; nitro; xyano; $NR_{11}R_{11'}$; O-(R₇); (CO)-R₇; (CO)-O-R₇; (CO)- $NR_{11}R_{11'}$; O-(CO)-R₇; O-(CO)- $NR_{11}R_{11'}$; NR_{11} -(CO)-R₇; NR_{11} -(CO)-OR_{11'}; NR_{11} -(CO)- $NR_{11}R_{11'}$; -(O-CH₂CH₂)_m-OR₁₁; -(O-CH₂CH₂)_m- $NR_{11}R_{11'}$; SO₂-R₇; NR₅-SO₂-R₇; SO₂- $NR_{11}R_{11'}$; NR_{11} -(C2-C6)-alkyl- $NR_{11}R_{11'}$; aryl tùy ý được thế; benzyl tùy ý được thế; vòng heteroaryl có 5 đến 8 cạnh tùy ý được thế bao gồm 1, 2, hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S; heteroaryl ngưng tụ tùy ý được thế như được xác định bao gồm từ 8 đến 13 nguyên tử bao gồm 1, 2, 3, 4 nguyên tử khác loại được chọn từ O, N và S và bao gồm ít nhất 2 nguyên tử cacbon; vòng heteroxyclyl có 4 đến 9 cạnh tùy ý được thế no hoặc không no bao gồm 1, 2 hoặc cho đến 3 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ O, N và S;

• n có thể là số nguyên bằng nhau có thể có giá trị bất kỳ trong số các giá trị 0, 1, 2, 3 hoặc 4;

• m có thể là số nguyên bằng nhau có thể có giá trị bất kỳ trong số các giá trị 1, 2 hoặc 3;

• w có thể là số nguyên bằng nhau có thể có giá trị bất kỳ trong số các giá trị 0 hoặc 1;

trong đó thuật ngữ “tùy ý được thế” có nghĩa là tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ nguyên tử halogen, (C1-C10) alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C2-C10) alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C2-C10) alkynyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C3-C10) xycloalkyl được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C5-C10) xycloalkenyl được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C8-C10) xycloalkynyl được thế hoặc không được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, (C1-C10) alkoxy, hydroxyl, xyano, nitro, NR_8R_8' (với R_8 và R_8' như được mô tả ở trên);

và muối được dùng bất kỳ, solvat, chất đồng phân, chất đồng phân lập thể hoặc hỗn hợp của chất đồng phân lập thể, hoặc solvat của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1 được chọn từ 2-(4-clophenylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (1-5); 2-(4-clobenzylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (2-2); 2-[3-metyl-4-(pyrimidin-2-ylamino)phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (3-4); 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-metyl-phenylamino}-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin (4-2) hoặc muối được dùng, hoặc solvat của nó.

3. Hợp chất theo điểm 1 được chọn từ muối 2-(4-clophenylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (1-6); muối 2-(4-clobenzylamin)-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (2-3); muối 2-[3-metyl-4-(pyrimidin-2-ylamino)phenylamino]-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (3-5); muối 2-{4-[4-(pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamino]-3-metyl-phenylamino}-4-(4-*tert*-butylaminopiperidin-1-yl)-quinolin hydroclorua (4-3) hoặc solvat được dùng của nó.

4. Dược phẩm chứa một lượng điều trị hiệu quả của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, hoặc muối được dùng, hoặc solvat của nó, và chất phụ trợ, chất pha loãng hoặc chất mang được dùng.

5. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó dược phẩm này còn chứa hỗn hợp của một hoặc nhiều chất chống khối u.

6. Dược phẩm theo điểm 4 và 5, trong đó lượng điều trị hiệu quả của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 được bào chế hoặc được bào chế đồng thời dưới dạng hạt nano.

7. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó các hạt nano bao gồm chế phẩm polyme có thể phân hủy sinh học.

8. Dược phẩm theo điểm 7, trong đó polyme nêu trên là polyme trên cơ sở Poly (axit DL-Lactic-co-glycolic) có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 7 đến 240 kDa; hoặc copolyme của axit polylactic (PLA) và axit polyglycolic (PGA) trong đó tỷ lệ phân tử nằm trong khoảng từ 95:5 đến 50:50.

9. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó hạt nano bao gồm chế phẩm lisosom có thể phân hủy sinh học.

10. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó hạt nano bao gồm polyme hoặc copolyme tương hợp sinh học.
11. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó hạt nano bao gồm chế phẩm liposom.
12. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 11, trong đó hạt nano được liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với polyetylen glycol (PEG).
13. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 12, trong đó hạt nano có cỡ trung bình nằm trong khoảng từ 80 đến 600 nm.
14. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 13, trong đó hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 được kết hợp với ít nhất một chất chống ung thư có tác dụng điều trị bệnh.
15. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 14 có thể thích hợp để sử dụng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, qua mắt, qua da, qua mũi hoặc dùng để hít.
16. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó hạt nano bao gồm thành phần được chọn từ hạt nano PLGA, hạt nano PLGA-PEG (AB, BA, ABA hoặc BAB dạng khối, trong đó A = PLGA và B = PEG) và hạt nano hướng đích.
17. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó hạt nano là hạt nano hướng đích bao gồm mô-típ truyền tín hiệu.
18. Dược phẩm chứa hỗn hợp của một lượng điều trị hiệu quả của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 và một lượng điều trị hiệu quả của một hoặc nhiều chất chống khối u, trong đó thành phần cấu thành nên hỗn hợp nêu trên được sử dụng đồng thời, riêng rẽ hoặc tuần tự trong điều trị bệnh ung thư.
19. Dược phẩm theo điểm 5 hoặc điểm 18, trong đó chất chống khối u được chọn từ nhóm bao gồm everolimus, cloquin, hydroxycloquin, trabectedin, abraxan, TLK 286, AV-299, DN-101, pazopanib, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244 (ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, enzastaurin, vandetanib, ARQ-197, MK-0457, MLN8054, PHA-739358, R-763, AT-9263, pemetrexed, erlotinib, dasatanib, nilotinib, decatanib, panitumumab, amrubixin, oregovomab, Lep-etu, nolatrexed, azd2171, batabulin, ofatumumab, zanolimumab, edotecarin, tetrandrine, rubitecan, tesmilifen, oblimersen, ticilimumab, ipilimumab, gosypol, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, xilengitin, gimatecan.

IL13-PE38QQR, TNO 1001, IPdR1 KRX-0402, lucanthone, LY 317615, neurabin, vitespan, Rta 744, Sdx 102, talampanel, atrasentan, Xr 311, romidepsin, ADS-100380, sunitinib, 5-fluoraxil, vorinostat, etoposide, gemcitabine, doxorubicin, irinotecan, liposomal doxorubicin, 5'-deoxy-5-fluoridine, vincristine, temozolomide, ZK-304709, seliciclib, PD0325901, AZD-6244, capecitabine, axit L-Glutamic, heptahydrate của muối N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoyl]-dinatri, camptothecin, irinotecan được đánh dấu PEG, tamoxifen, toremifene xitrat, anastrozole, exemestane, letrozole, DES(diethylstilbestrol), estradiol, estrogen, estrogen được tiếp hợp, bevacizumab, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(methylsulfonylpiperidinmethyl)-indolyl]-quinolone, vatalanib, AG-013736, AVE-0005, muối axetat của [D-Ser(But)₆, Azgly₁₀](pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂) axetat, goserelin axetat, leuprolide axetat, triptorelin pamoate, medroxyprogesterone axetat, hydroxyprogesterone caproate, megestrol axetat, raloxifen, bicalutamide, flutamide, nilutamide, megestrol axetat, CP-724714; TAK-165, HKI-272, erlotinib, lapatanib, canertinib, kháng thể ABX-EGF, erbitux, EKB-569, PKI-166, GW-572016, lonafamib, BMS-214662, tipifarnib; amifostine, NVP-LAQ824, axit suberoyl anilide hydroxamic, axit valproic, trichostatin A, FK-228, SU11248, sorafenib, KRN951, aminoglutethimide, arnsacrine, anagrelide, L-asparaginase, vacxin Bacillus Calmette-Guerin (BCG), bleomycin, busulfan, carboplatin, carmustine, clorambucil, cisplatin, cladribine, clodronate, xyproterone, xytarabine, dacarbazine, dactinomycin, daunorubicin, diethylstilbestrol, epirubicin, fludarabine, fludrocortisone, fluoxymesterone, flutamide, gemcitabine, gleevec, hydroxyurea, idarubicin, ifosfamide, imatinib, leuprolide, levamisole, lomustine, mecloethamine, melphalan, 6-mercaptopurine, mesna, methotrexate, mitomycin, mitotane, mitoxantrone, nilutamide, octreotide, oxaliplatin, pamidronate, pentostatin, plicamycin, porfimer, procarbazine, raltitrexed, rituximab, streptozocin, teniposide, testosterone, thalidomide, thioguanine, thiotepa, tretinoin, vindesine, axit 13-cis-retinoic, phenylalanine hạt cải, uraxil hạt cải, estramustine, altretamine, floxuridine, 5-deoxyuridine, xytosine arabinoside, 6-mercaptopurine, deoxycytidine, calxitriol, valrubicin, mitramycin, vinblastine, vinorelbine, topotecan, razoxin, marimastat, COL-3, neovastat, BMS-275291, squalamine, endostatin, SU5416, SU6668, EMD121974, interleukin-12, 1M862, angiostatin, vitaxin, droloxifen, idoxifen, spironolactone,

finasterit, ximitidin, trastuzumab, denileukin diftitox, gefitinib, bortezimib, paclitaxel, irinotecan, topotecan, doxorubixin, docetaxel, vinorelbin, bevacizumab (kháng thể đơn dòng) và erbitux, paclitaxel không chứa cremophor, epithilon B, BMS-247550, BMS-310705, droloxifen, 4-hydroxytamoxifen, pipendoxifen, ERA-923, arzoxifen, fulvestrant, acolbifen, lasofoxifen, idoxifen, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK 222584, VX-745, PD 184352, rapamycin, 40-O-(2-hydroxyetyl)-rapamycin, temsirolimus, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, wortmannin, ZM336372, L-779,450, PEG-filgrastim, darbepoetin, erythropoietin, yếu tố kích thích quần thể bạch cầu hạt, zolendronat, prednison, cetuximab, yếu tố kích thích quần thể bạch cầu hạt đại thực bào, histrelin, interferon alfa-2a được PEG hóa, interferon alfa-2a, interferon alfa-2b được PEG hóa, interferon alfa-2b, azacitidin, PEG-L-asparaginaza, lenalidomit, gemtuzumab, hydrocortison, interleukin-11, dexrazoxan, alemtuzumab, axit all-transretinoic, ketoconazol, interleukin-2, megestrol, hạt cải nitơ, methylprednisolon, ibritumomab tiuxetan, androgen, dexitabin, hexametylmelamin, bexaroten, tositumomab, arsenic trioxit, cortison, editronat, mitotan, cyclosporin, daunorubixin liposom, Edwina-asparaginaza, stronti 89, casopitant, netupitant, chất đối kháng thụ thể NK-1, palonosetron, aprepitant, diphenhydramin, hydroxyzin, metoclopramid, lorazepam, alprazolam, haloperidol, droperidol, dronabinol, dexamethason, methylprednisolon, procloperazin, granisetron, ondansetron, dolasetron, tropisetron, pegfilgrastim, epoetin alfa và darbepoetin alfa, ipilimumab, vemurafenib, chất ức chế FLT-3, chất ức chế VEGFR, chất ức chế EGFR TK, chất ức chế aurora kinaza, chất điều biến PIK-1, chất ức chế Bcl-2, chất ức chế HDAC, chất ức chế c-MET, chất ức chế PARP, chất ức chế Cdk, chất ức chế EGFR TK, chất ức chế IGFR-TK, kháng thể kháng HGF, chất ức chế PI3 kinaza, chất ức chế mTOR, chất ức chế AKT, chất ức chế JAK/STAT, chất ức chế điểm kiểm tra-1 hoặc 2, chất ức chế kinaza kết dính cục bộ, chất ức chế Map kinaza (MEK), kháng thể bất VEGF, và hỗn hợp của chúng.

20. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 19, trong đó dược phẩm này có thể thích hợp để giải phóng chậm hoặc giải phóng kéo dài.

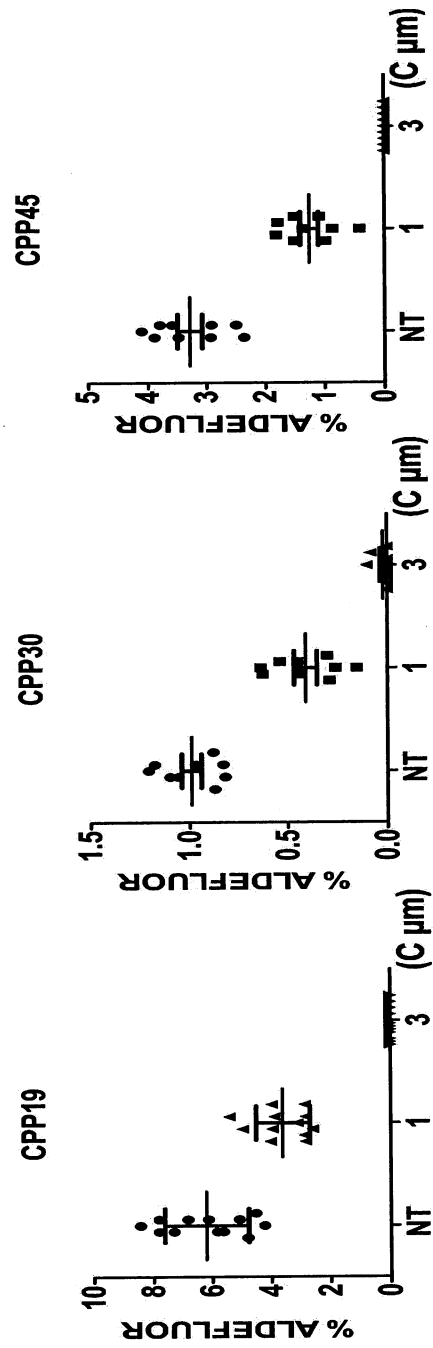


Fig. 1

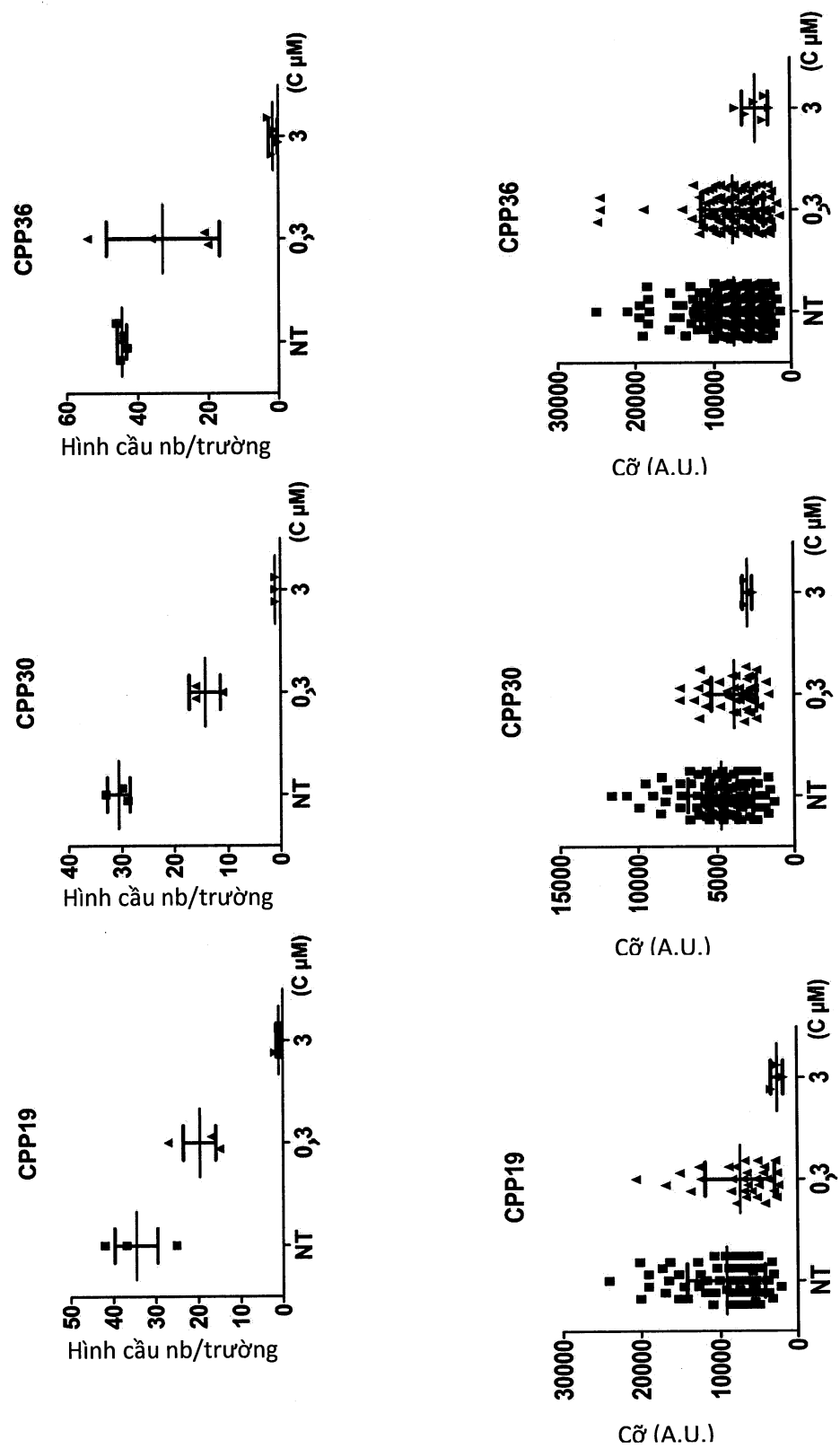


Fig. 2

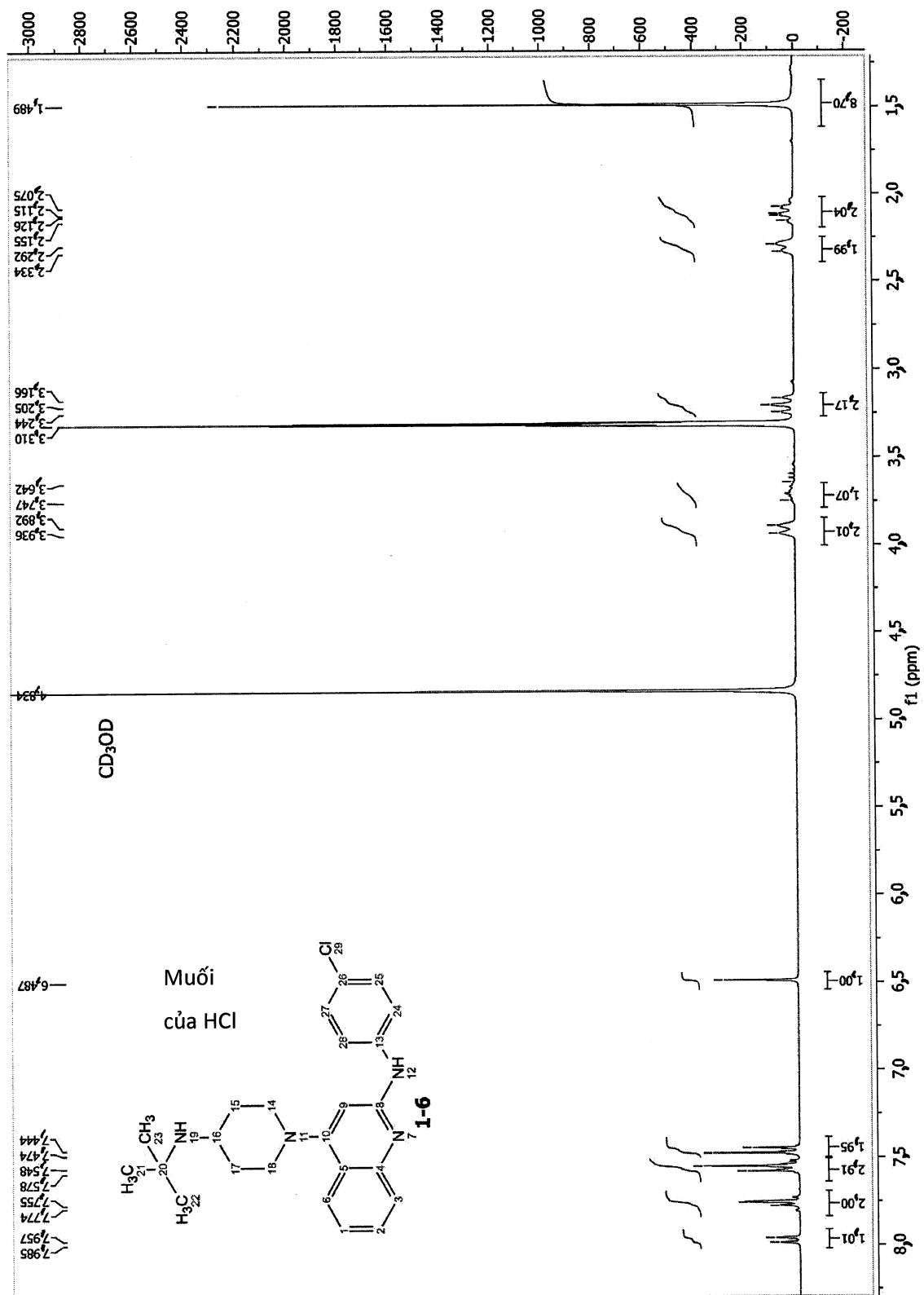


Fig. 3

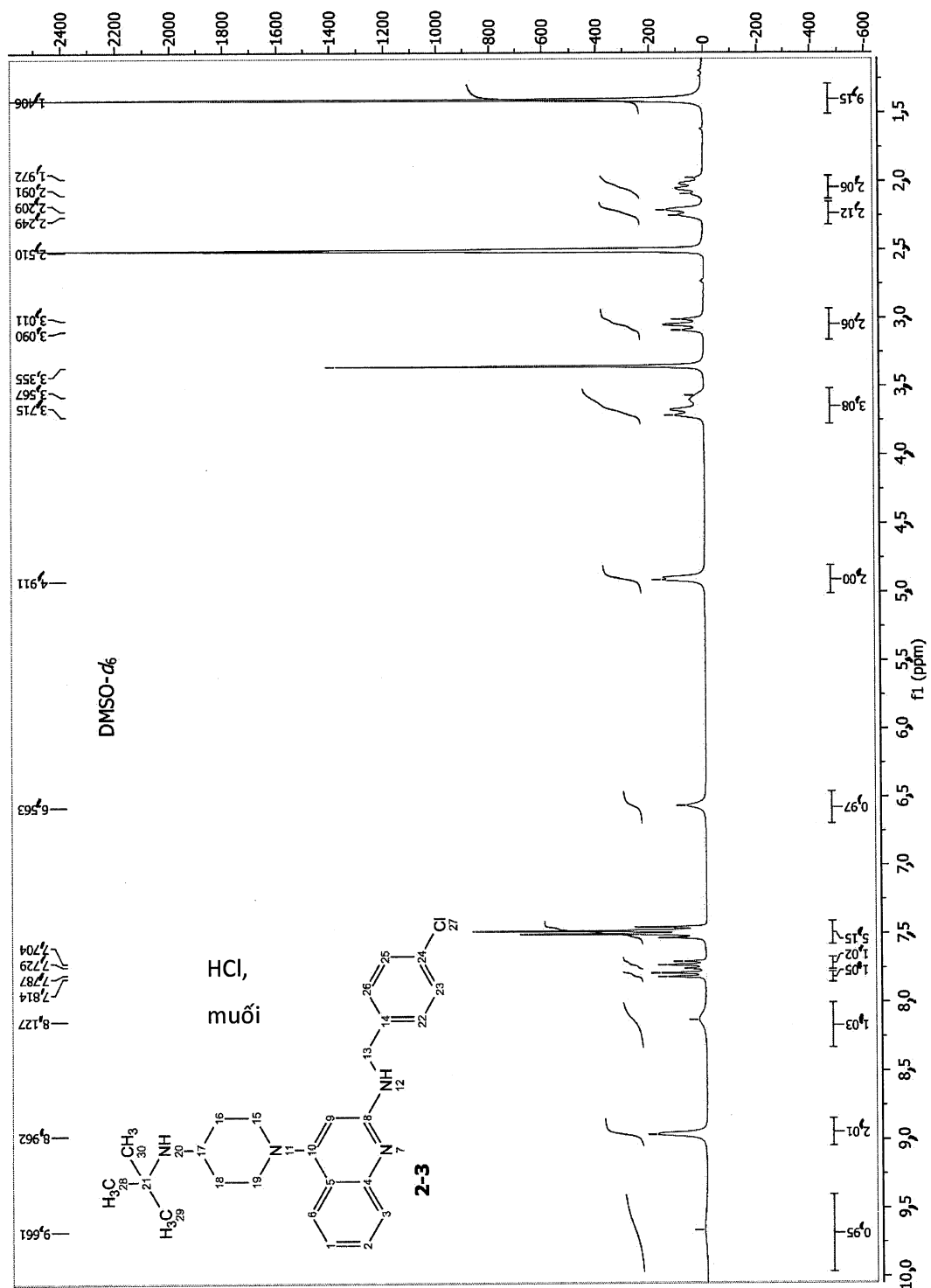


Fig. 4

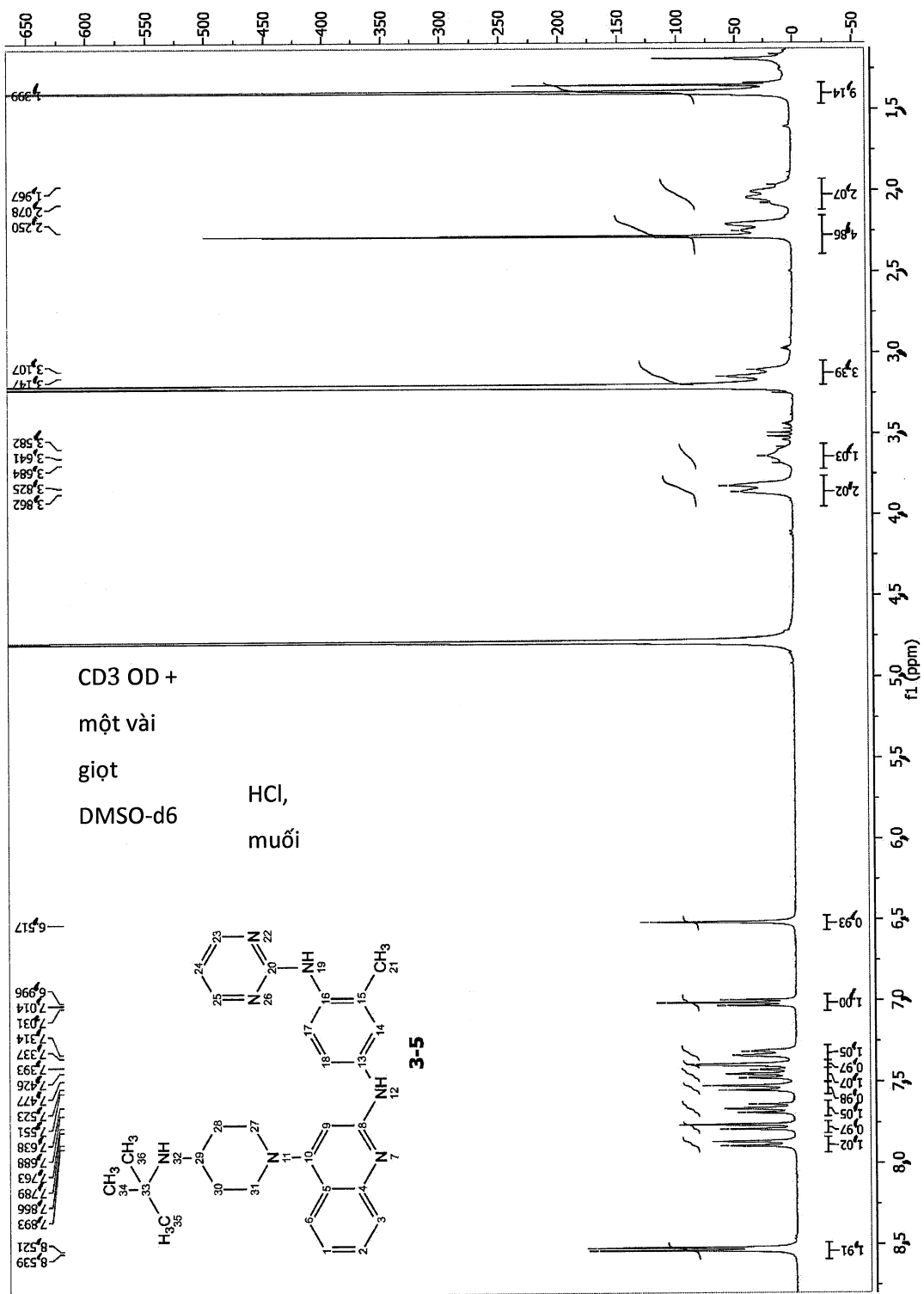


Fig. 5

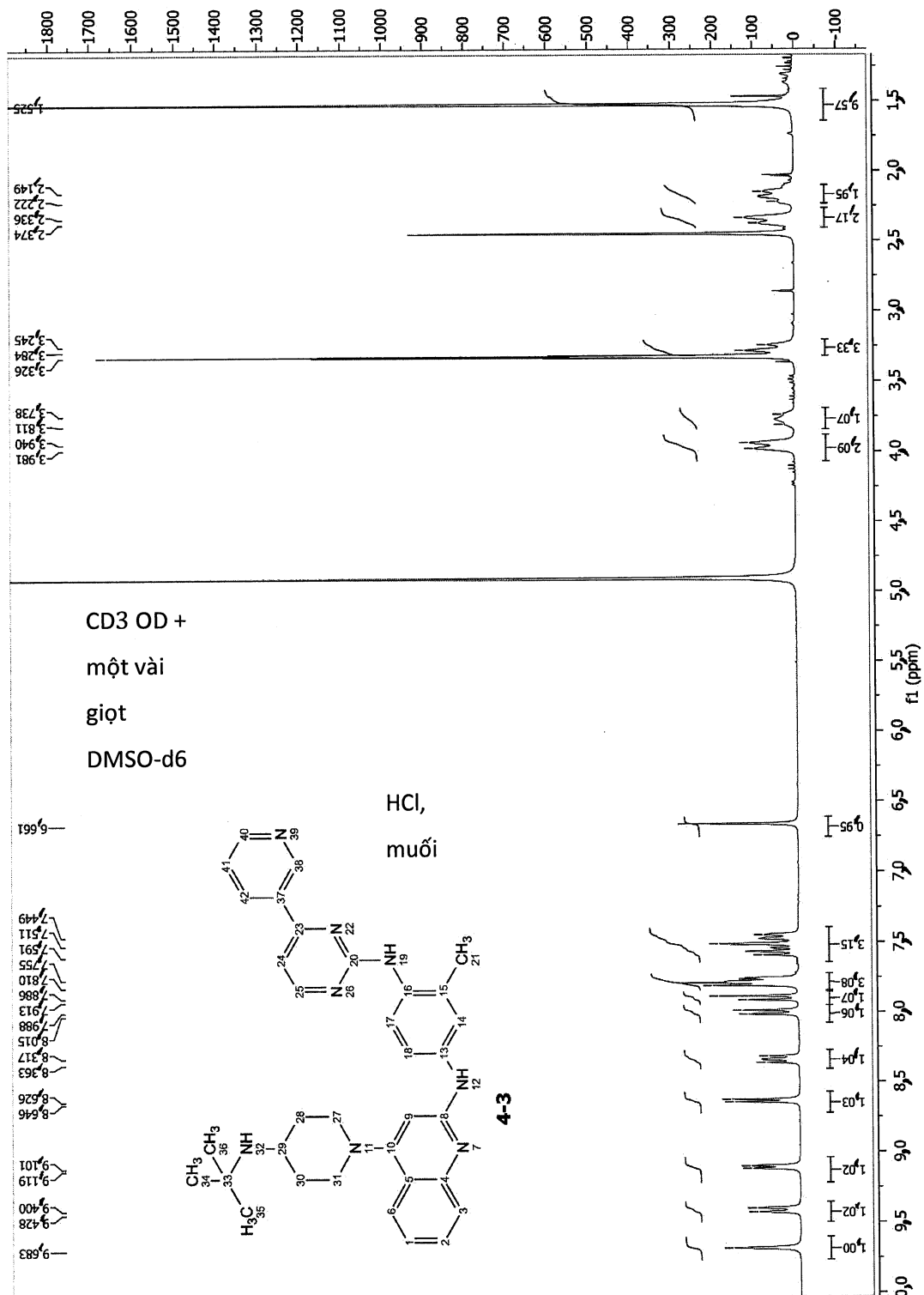


Fig. 6