



- (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
(51)⁷ C07D 498/04; A61K 31/553; A61P 35/00 (13) B

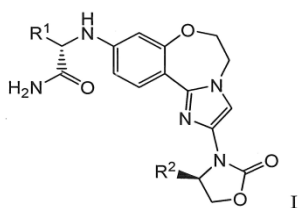


1-0033267

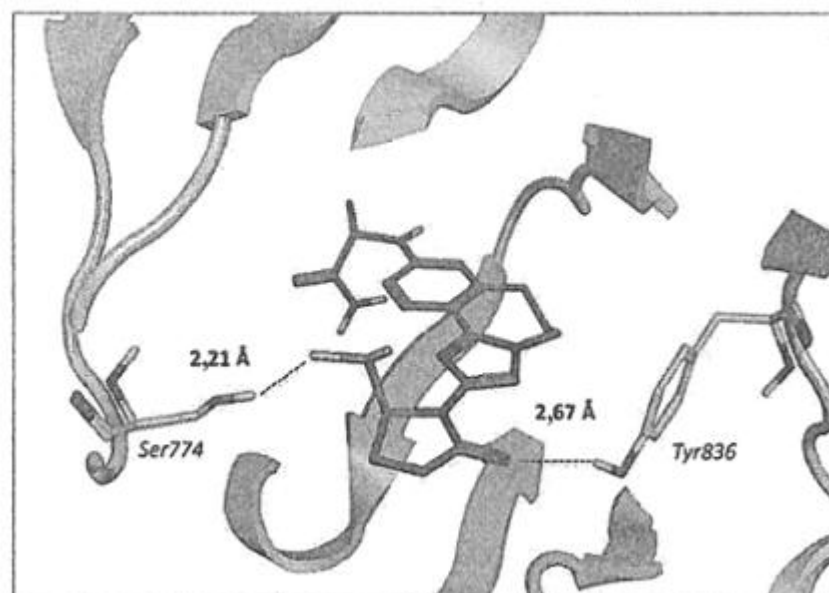
- (21) 1-2018-00011 (22) 01/07/2016
(86) PCT/EP2016/065455 01/07/2016 (87) WO 2017/001645 05/01/2017
(30) 62/188,029 02/07/2015 US
(45) 25/09/2022 414 (43) 25/05/2018 362A
(73) F. Hoffmann-La Roche AG (CH)
Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland
(72) BRAUN, Marie-Gabrielle (FR); ELLIOTT, Richard (GB); HANAN, Emily (US);
HEALD, Robert Andrew (GB); MACLEOD, Calum (GB); STABEN, Steven T.
(US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT BENZOXAZEPIN OXAZOLIDINON, DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY, QUY TRÌNH BẢO CHẾ DƯỢC PHẨM NÀY VÀ KIT DÙNG ĐỂ TRỊ LIỆU

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất benzoxazepin oxazolidinon có hoạt tính hoặc chức năng điều biến phosphoinositit-3 kinaza (PI3K) có công thức cấu tạo của hợp chất có công thức I:



hoặc các chất đồng phân lập thể, chất hỗn hợp, hoặc muối dược dụng của nó, và với các phân tử thể và đặc điểm cấu trúc được mô tả ở đây. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và thuốc chứa hợp chất có công thức I, một mình và kết hợp với các chất trị liệu khác, để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được điều tiết hoặc phụ thuộc vào sự rối loạn điều hòa PI3K.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến hợp chất benzoxazepin oxazolidinon có hoạt tính kháng rối loạn tăng sinh như bệnh ung thư. Sáng chế còn đề cập đến hợp chất này được dùng để chẩn đoán hoặc điều trị *in vitro*, *in situ*, và *in vivo* tế bào động vật có vú, hoặc các tình trạng bệnh lý liên quan.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện tượng điều hòa tăng con đường truyền tín hiệu phosphoinositit-3 kinaza (PI3K)/Akt là đặc điểm chung trong hầu hết các bệnh ung thư (Yuan and Cantley (2008) Oncogene 27:5497-510). Độ lệch di truyền trong con đường này đã được phát hiện ra trong nhiều bệnh ung thư ở người (Osaka et al (2004) Apoptosis 9:667-76) và ban đầu tác động để kích thích sự tăng sinh, di trú và sống sót của tế bào. Việc hoạt hóa con đường này xảy ra sau khi hoạt hóa đột biến điểm hoặc khuếch đại gen *PIK3CA* mã hóa các dạng đồng phân p110 α (alpha) PI3K (Hennessy et al (2005) Nat. Rev. Drug Discov. 4:988-1004). Đột biến khuyết gen hoặc mất chức năng trong chất ức chế khối u PTEN, phosphatase có chức năng ngược với PI3K, cũng gia tăng sự truyền tín hiệu của con đường PI3K (Zhang and Yu (2010) Clin. Cancer Res. 16:4325-30. Các sai lệch này dẫn đến việc gia tăng sự truyền tín hiệu xuôi qua kinaza như Akt và mTOR và sự gia tăng hoạt tính của con đường PI3K được đề xuất là dấu hiệu phân biệt tính kháng đối với việc điều trị bệnh ung thư (Opel et al (2007) Cancer Res. 67:735-45; Razis et al (2011) Breast Cancer Res. Treat. 128:447-56).

Phosphatidylinositol 3-Kinaza (PI3K) là nút truyền tín hiệu chính đối với tín hiệu sống sót và sinh trưởng chủ chốt đối với u lympho và được đối ngược bởi hoạt tính của phosphatase PTEN. Con đường truyền tín hiệu kinaza phụ thuộc phosphoinositit 3 (PI3K) là con đường bị rối loạn điều hòa nhất trong bệnh ung thư vú dương tính với thụ thể hormon (HR+ BC). Con đường PI3K cũng bị rối loạn điều hòa trong các dạng xâm chiếm của u lympho (Abubaker (2007) Leukemia 21:2368-2370). Tám phần trăm ung thư DLBCL (u lympho tế bào B lớn lan tỏa) có đột biến sai nghĩa PI3CA (đơn vị con

alpha xúc tác phosphatidylinositol-3 kinaza) và 37% âm tính với PTEN bởi thử nghiệm hóa mô miễn dịch.

Phosphatidylinositol là một trong một số phospholipit được tìm thấy trong màng tế bào, và tham gia vào quá trình tải nạp tín hiệu nội bào. Việc truyền tín hiệu tế bào thông qua phosphoinositit được 3'-phosphoryl hóa liên quan đến các quy trình tế bào khác nhau, ví dụ, biến nạp ác tính, truyền tín hiệu yếu tố sinh trưởng, viêm, và miễn dịch (Rameh et al (1999) J. Biol Chem. 274:8347-8350). Enzym chịu trách nhiệm tạo ra các sản phẩm truyền tín hiệu được phosphoryl hóa này, phosphatidylinositol 3-kinaza (còn được gọi là PI 3-kinaza hoặc PI3K), ban đầu được biết đến là hoạt tính liên quan đến oncoprotein virus và tyrosin kinaza của thụ thể yếu tố sinh trưởng mà phosphoryl hóa phosphatidylinositol (PI) và các dẫn xuất được phosphoryl hóa của nó ở gốc 3'-hydroxyl của vòng inositol (Panayotou et al (1992) Trends Cell Biol 2:358-60). Phosphoinositit 3-kinaza (PI3K) là lipit kinaza mà phosphoryl hóa lipit ở gốc 3-hydroxyl của vòng inositol (Whitman et al (1988) Nature, 332:664). Phospholipit được 3-phosphoryl hóa (PIP3) được tạo ra bởi PI3-kinaza tác động như chất truyền thông tin thứ hai tuyển chọn kinaza với miền gắn kết lipit (bao gồm vùng tương đồng plekstrin (PH)), như Akt và PDK1, kinaza-1 phụ thuộc phosphoinositit (Vivanco et al (2002) Nature Rev. Cancer 2:489; Phillips et al (1998) Cancer 83:41).

Họ PI3 kinaza bao gồm ít nhất 15 enzym khác nhau được phân loại nhỏ hơn bởi sự tương đồng cấu trúc và được chia thành 3 lớp dựa trên sự tương đồng trình tự và sản phẩm được tạo ra bằng xúc tác enzym. Lớp I PI3 kinaza gồm có 2 đơn vị con: đơn vị con xúc tác 110kd và đơn vị con điều hòa 85kd. Đơn vị con điều hòa chứa miền SH2 và gắn kết với gốc tyrosin được phosphoryl hóa bởi thụ thể yếu tố sinh trưởng có hoạt tính tyrosin kinaza hoặc sản phẩm gen gây ung thư, từ đó cảm ứng hoạt tính PI3K của đơn vị con xúc tác p110 mà phosphoryl hóa cơ chất lipit của nó. Lớp I PI3 kinaza liên quan đến các sự kiện tải nạp tín hiệu quan trọng xuôi của xytokin, integrin, yếu tố sinh trưởng và thụ thể miễn dịch, đề xuất rằng việc kiểm soát con đường này có thể tạo ra các tác dụng trị liệu quan trọng như điều biến sự tăng sinh tế bào và gây ung thư. Lớp I PI3K có thể phosphoryl hóa phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol-4-phosphat, và phosphatidylinositol-4,5-biphosphat (PIP2) để lần lượt tạo ra phosphatidylinositol-3-phosphat (PIP), phosphatidylinositol-3,4-biphosphat, và phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat. Lớp II PI3K phosphoryl hóa PI và phosphatidylinositol-4-phosphat. Lớp III

PI3K chỉ có thể phosphoryl hóa PI. Dạng đồng phân PI3-kinaza chủ chốt trong ung thư là lớp I PI3-kinaza, p110 α như được chỉ định bởi các đột biến gây ung thư tái phát trong p110 α (Samuels et al (2004) Science 304:554; US 5824492; US 5846824; US 6274327). Các dạng đồng phân khác có thể quan trọng trong ung thư và cũng liên quan đến bệnh tim mạch và viêm miễn dịch (Workman P (2004) Biochem Soc Trans 32:393-396; Patel et al (2004) Proc. Am. Assoc. of Cancer Res. (Abstract LB-247) 95th Annual Meeting, March 27-31, Orlando, Florida, USA; Ahmadi K and Waterfield MD (2004) "Phosphoinositide 3-Kinase: Function and Mechanisms" Encyclopedia of Biological Chemistry (Lennarz W J, Lane M D eds) Elsevier/Academic Press), các đột biến gây ung thư của p110 α (alpha) được tìm thấy ở tần suất đáng kể trong khối u rắn ở ruột kết, vú, não, gan, buồng trứng, dạ dày, phổi, và đầu và cổ. Khoảng 35-40% khối u ung thư vú dương tính với thụ thể hormon (HR+) mang đột biến *PIK3CA*. Các bất thường PTEN được phát hiện trong u nguyên bào đệm, u melanin, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, niêm mạc tử cung, buồng trứng, vú, phổi, đầu và cổ, tế bào gan, và tuyến giáp.

PI3 kinaza (PI3K) là heterodime bao gồm đơn vị con p85 và p110 (Otsu et al (1991) Cell 65:91-104; Hiles et al (1992) Cell 70:419-29). Bốn lớp I PI3K riêng biệt đã được nhận biết, được ký hiệu là PI3K α (alpha), β (beta), δ (delta), và γ (gama), mỗi lớp bao gồm một đơn vị con xúc tác 110 kDa riêng biệt và một đơn vị con điều hòa. Ba trong số các đơn vị con xúc tác, tức là, p110 alpha, p110 beta và p110 delta, mỗi đơn vị con này tương tác với cùng một đơn vị con điều hòa, p85; trong khi đó p110 gama tương tác với đơn vị con điều hòa riêng biệt, p101. Các mô hình biểu hiện của mỗi một trong các PI3K này trong tế bào và mô của người là riêng biệt. Trong mỗi kiểu phụ trong số các kiểu phụ PI3K alpha, beta, và delta, đơn vị con p85 tác động để định vị PI3 kinaza đến màng huyết tương bởi tương tác giữa miền SH2 của nó với gốc tyrosin được phosphoryl hóa (có trong ngữ cảnh trình tự thích hợp) trong protein đích (Rameh et al (1995) Cell, 83:821-30; Volinia et al (1992) Oncogene, 7:789-93).

Con đường PI3 kinaza/Akt/PTEN là đích hấp dẫn để phát triển thuốc ung thư do các chất này được mong đợi là ức chế sự tăng sinh của tế bào, ngăn chặn các tín hiệu từ tế bào cơ chất mà tạo ra khả năng sống sót và kháng hóa chất của tế bào ung thư, đảo ngược sự ngăn chặn chết tế bào theo chương trình và khắc phục tính kháng bên trong của tế bào ung thư đối với chất gây độc tế bào. PI3K được hoạt hóa thông qua sự truyền tín hiệu thụ thể tyrosin kinaza cũng như các đột biến hoạt hóa trong đơn vị con xúc tác

p110 của PI3K, làm mất chất ức chế khối u PTEN, hoặc thông qua các đột biến hoạt hóa hiếm trong AKT.

Taselisib (GDC-0032, Roche RG7604, CAS Reg. No. 1282512-48-4, Genentech Inc.), có tên là 2-(4-(2-(1-isopropyl-3-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-2-methylpropanamit, có hoạt tính PI3K có hoạt lực (Ndubaku, C. O. et al (2013) J. Med. Chem. 56:4597–4610; WO 2011/036280; US 8242104; US 8343955) và đang được nghiên cứu ở bệnh nhân có khối u tiến triển cục bộ hoặc khối u rắn di căn. Taselisib (GDC-0032) là chất ức chế dự trữ dạng đồng phân beta của đơn vị con xúc tác PI3K, có tính chọn lọc đối với đơn vị con alpha cao hơn gấp 31 lần so với beta. Taselisib biểu hiện độ chọn lọc lớn hơn đối với dạng đồng phân PI3K α đột biến so với PI3K α loại dại (Olivero AG et al, AACR 2013. Abstract DDT02-01). Taselisib hiện được nghiên cứu dưới dạng thuốc điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư vú dương tính với thụ thể oestrogen (ER), di căn âm tính với HER2 (mBC) và bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC). Trong nghiên cứu pha Ia với duy nhất chất taselisib, quan sát được các đáp ứng một phần (PR) trong 6/34 bệnh nhân trong danh sách. Quan sát thấy có tất cả 6 đáp ứng ở bệnh nhân có khối u đột biến *PIK3CA* (Juric D. et al. AACR 2013), chỉ ra nhu cầu xác định trạng thái đột biến *PIK3CA* từ bệnh nhân được điều trị bằng taselisib.

Dữ liệu lâm sàng gần đây với chất ức chế PI3K ngụ ý hoạt tính PI3K delta là nguồn độc tố dạ dày-ruột (Akinleye et al Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics” Journal of Hematology & Oncology 2013, 6:88-104; C. Saura et al “Phase Ib Study of the PI3K Inhibitor Taselisib (GDC-0032) in Combination with Letrozole in Patients with Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer” San Antonio Breast Cancer Symposium - December 12, 2014, PD5-2; Lopez et al “Taselisib, a selective inhibitor of PIK3CA, is highly effective on PIK3CA-mutated and HER2/neu amplified uterine serous carcinoma *in vitro* and *in vivo*” (2014) Gynecologic Oncology).

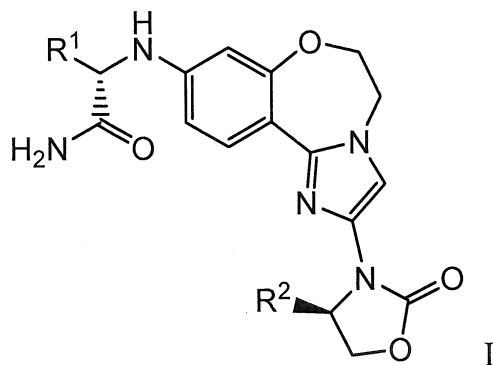
Idelalisib (GS-1101, CAL-101, ZYDELIG®, Gilead Sciences Inc., CAS Reg. No. 870281-82-6, 5-fluoro-3-phenyl-2-[(1S)-1-(7H-purin-6-ylamino)propyl]-4(3H)-quinazolinon) là chất ức chế PI3K δ (delta) chọn lọc và được phê chuẩn để điều trị bệnh bạch cầu lympho mạn tính, CLL (Somoza, J.R. et al (2015) J. Biol. Chem. 290:8439-8446; US 6800620; US 6949535; US 8138195; US 8492389; US 8637533; US 8865730;

US 8980901; RE44599; RE44638). Chứng tiêu chảy và viêm ruột kết là hai trong số các sự kiện có hại phổ biến nhất được báo cáo sau khi điều trị bằng idelalisib (Brown et al “Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110d, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia” (2014) Blood 123(22):3390-3397; Zydellig® Prescribing Information 2014; Zydellig® REMS Fact Sheet). Độc tố GI đáng kể quan sát được sau khi điều trị bằng idelalisib phù hợp với giả thiết là việc ức chế PI3K δ (delta) là nguồn độc tố dạ dày-ruột. Các tác dụng phụ nghiêm trọng khác được phát hiện trong các thử nghiệm lâm sàng của idelalisib (Zydellig®) kết hợp với các liệu pháp khác. Các sự kiện bất lợi, bao gồm tử vong do liên quan đến sự lây nhiễm như viêm phổi. Vào tháng 3 năm 2016, Ủy ban Đánh giá Rủi ro Cảnh giác được của EMA (Pharmacovigilance Risk Assessment Committee - PRAC) đưa ra cảnh báo tạm thời và khuyến cáo các bệnh nhân nhận điều trị đồng thời cả kháng sinh và được theo dõi thường xuyên về sự lây nhiễm khi uống Zydellig (idelalisib). Vào tháng 3 năm 2016, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ đưa ra cảnh báo rằng “sáu thử nghiệm lâm sàng nghiên cứu idelalisib (Zydellig®) kết hợp với các liệu pháp khác đã tạm dừng do các báo cáo về tốc độ gia tăng các sự kiện bất lợi, bao gồm tử vong”.

Có nhu cầu về các chất điều biến bổ sung của PI3K α mà hữu ích để điều trị bệnh ung thư, cụ thể là chất ức chế PI3K α chọn lọc đối với khối u biểu hiện PI3K α đột biến so với các tế bào biểu hiện PI3K α không đột biến. Đặc biệt có nhu cầu về chất mà ức chế chọn lọc dạng đồng phân PI3K α so với dạng đồng phân PI3K β , PI3K δ , và PI3K γ , có thể được mong đợi là tạo ra cửa sổ trị liệu tăng cường.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế hướng đến hợp chất benzoxazepin oxazolidinon có hoạt tính chọn lọc trong điều biến các dạng đột biến của dạng đồng phân PI3K α (alpha), và có công thức cấu tạo của hợp chất có công thức I:



và chất đồng phân lập thể, chất đồng phân hình học, chất hỗn biến, và muối được dùng của chúng. Các phân tử thể khác nhau được xác định trong bản mô tả.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất benzoxazepin oxazolidinon có công thức I, và chất mang, chất gây trượt, chất pha loãng, hoặc tá dược được dùng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bộ kit dùng để điều trị bệnh ung thư vú, bao gồm:

- a) hợp chất benzoxazepin oxazolidinon có công thức I; và
- b) các hướng dẫn sử dụng trong điều trị bệnh ung thư vú.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện cấu trúc đồng tinh thể tia x của PI3K α với: A) taselisib (GDC-0032), B) Hợp chất 529 của US 8242104, C) Hợp chất 101, và D) Hợp chất 103.

Fig.2 thể hiện cấu trúc đồng tinh thể tia x của PI3K α với: A) taselisib (GDC-0032), và B) Hợp chất 101.

Fig.3A thể hiện số liệu thẩm tách Western thể hiện nồng độ p110 α (p110a, p110 alpha) sau 24 giờ xử lý bằng Hợp chất 101, Hợp chất 103 và Hợp chất 436 của US 8242104 trong tế bào HCC-1954 (H1047R đột biến PI3K α).

Fig.3B thể hiện số liệu thẩm tách Western thể hiện nồng độ p110 α (p110a, p110 alpha) sau 24 giờ xử lý bằng Hợp chất 101, Hợp chất 103 và Hợp chất 436 của US 8242104 trong tế bào HDQ-P1 (PI3K α loại đại).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây sẽ mô tả chi tiết một số phương án nhất định của sáng chế, các ví dụ về chúng được minh họa trong các cấu trúc và công thức đi kèm. Trong khi sáng chế được mô tả kết hợp với các phương án được liệt kê, nên hiểu rằng các phương án này không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế ở các phương án đó. Trái lại, sáng chế được dự định bao gồm tất cả các thay thế, cải biến, và các phương án tương đương mà có thể nằm trong phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng nhiều phương pháp và nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả này, có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế. Sáng chế không bị giới hạn ở các phương pháp và nguyên liệu được mô tả. Trong trường hợp mà một hoặc nhiều tài liệu, patent được kết hợp, và các nguyên liệu tương tự khác với hoặc trái ngược với đơn này, bao gồm nhưng không giới hạn ở các thuật ngữ được định nghĩa, cách sử dụng thuật ngữ, các kỹ thuật được mô tả, hoặc dạng tương tự, đơn này kiểm soát. Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về. Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và nguyên liệu thích hợp được mô tả dưới đây. Tất cả các công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế, patent, và các tài liệu tham khảo khác được nêu ở đây được kết hợp toàn bộ bằng cách viện dẫn. Danh pháp được sử dụng trong đơn này là dựa trên hệ thống danh pháp IUPAC, trừ khi có quy định khác.

Định nghĩa

Khi nêu số lượng phần tử thế, thuật ngữ “một hoặc nhiều” dùng để chỉ khoảng từ một phần tử thế đến số lượng thế cao nhất có thể có, tức là thay thế một hydro lên đến thay thế tất cả các hydro bằng phần tử thế. Thuật ngữ “phần tử thế” chỉ nguyên tử hoặc nhóm các nguyên tử thay thế nguyên tử hydro trên phân tử ban đầu. Thuật ngữ “được thế” chỉ ra rằng nhóm cụ thể mang một hoặc nhiều phần tử thế. Khi nhóm bất kỳ có thể mang nhiều phần tử thế và các phần tử thế có thể có khác nhau được nêu, phần tử thế độc lập được chọn và không cần phải giống nhau. Thuật ngữ “không được thế” có nghĩa là nhóm cụ thể không mang phần tử thế. Thuật ngữ “tùy ý được thế” có nghĩa là nhóm

cụ thể không được thế hoặc được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các phần tử thế có thể có. Khi nêu số lượng phần tử thế, thuật ngữ “một hoặc nhiều” có nghĩa là từ một phần tử thế đến số lượng thế có thể có cao nhất, tức là thay thế một hydro lên đến thay thế tất cả các hydro bằng các phần tử thế.

Thuật ngữ “alkyl” như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ gốc hydrocarbon no hóa trị một mạch thẳng hoặc mạch nhánh có một đến mười hai nguyên tử cacbon (C_1-C_{12}), trong đó gốc alkyl có thể tùy ý được thế độc lập bằng một hoặc nhiều phần tử thế được mô tả dưới đây. Theo một phương án khác, gốc alkyl có một đến tám nguyên tử cacbon (C_1-C_8), hoặc một đến sáu nguyên tử cacbon (C_1-C_6). Các ví dụ về nhóm alkyl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, methyl (Me, $-CH_3$), ethyl (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propyl (n-Pr, n-propyl, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-propyl (i-Pr, i-propyl, $-CH(CH_3)_2$), 1-butyl (n-Bu, n-butyl, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-methyl-1-propyl (i-Bu, i-butyl, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butyl (s-Bu, s-butyl, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-methyl-2-propyl (t-Bu, t-butyl, $-C(CH_3)_3$), 1-pentyl (n-pentyl, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-pentyl ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-pentyl ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-methyl-2-butyl ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-methyl-2-butyl ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-methyl-1-butyl ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-methyl-1-butyl ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-hexyl ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-hexyl ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-hexyl ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-methyl-2-pentyl ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3-methyl-2-pentyl ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-methyl-2-pentyl ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3-methyl-3-pentyl ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-methyl-3-pentyl ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3-dimethyl-2-butyl ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3-dimethyl-2-butyl ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$), 1-heptyl, 1-octyl, và nhóm tương tự.

Thuật ngữ “vòng cacbon”, “carboxyclyl”, “vòng dạng vòng cacbon” và “xycloalkyl” dùng để chỉ vòng no hoặc không no một phần hóa trị một không thơm có 3 đến 12 nguyên tử cacbon (C_3-C_{12}) dưới dạng vòng một vòng hoặc 7 đến 12 nguyên tử cacbon dưới dạng vòng hai vòng. Vòng cacbon hai vòng có 7 đến 12 nguyên tử có thể được sắp xếp, ví dụ, dưới dạng hệ hai vòng [4,5], [5,5], [5,6] hoặc [6,6], và vòng cacbon hai vòng có 9 hoặc 10 nguyên tử vòng có thể được sắp xếp dưới dạng hệ hai vòng [5,6] hoặc [6,6], hoặc dưới dạng hệ bắc cầu như hai vòng [2.2.1]heptan, hai vòng [2.2.2]octan và hai vòng [3.2.2]nonan. Gốc carboxyclyl xoắn cũng được bao gồm trong phạm vi của định nghĩa này. Các ví dụ về gốc carboxyclyl xoắn bao gồm [2.2]pentanyl, [2.3]hexanyl, và [2.4]heptanyl. Các ví dụ về vòng cacbon một vòng bao gồm, nhưng không giới hạn

ở, xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, 1-xyclopent-1-enyl, 1-xyclopent-2-enyl, 1-xyclopent-3-enyl, xyclohexyl, 1-xyclohex-1-enyl, 1-xyclohex-2-enyl, 1-xyclohex-3-enyl, xyclohexadienyl, xycloheptyl, xyclooctyl, xyclononyl, xyclodexyl, xycloundexyl, xyclododexyl, và gốc tương tự. Nhóm carboxycylt tùy ý được thể độc lập bằng một hoặc nhiều phần tử thể được mô tả ở đây.

“Aryl” có nghĩa là gốc hydrocarbon thơm hóa trị một có 6 đến 20 nguyên tử cacbon (C_6-C_{20}) được tạo ra bằng cách loại bỏ một nguyên tử hydro ra khỏi một nguyên tử cacbon đơn lẻ của hệ vòng thơm ban đầu. Một số nhóm aryl được thể hiện dưới dạng các cấu trúc minh họa là “Ar”. Aryl bao gồm gốc hai vòng bao gồm vòng thơm được dung hợp với vòng cacbon no, không no một phần, hoặc vòng thơm. Các nhóm aryl điển hình bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các gốc thu được từ benzen (phenyl), benzen được thể, naphtalen, anthraxen, biphenyl, indenyl, indanyl, 1,2-dihydronaphtalen, 1,2,3,4-tetrahydronaphtyl, và gốc tương tự. Nhóm aryl tùy ý được thể độc lập bằng một hoặc nhiều phần tử thể được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “dị vòng”, “heteroxycylt” và “vòng dị vòng” được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả và dùng để chỉ gốc vòng cacbon no hoặc không no một phần (tức là, có một hoặc nhiều liên kết đôi và/hoặc liên kết ba trong vòng) có 3 đến khoảng 20 nguyên tử vòng trong đó ít nhất một nguyên tử vòng là nguyên tử khác loại được chọn từ nitơ, oxy, phospho và lưu huỳnh, nguyên tử vòng còn lại là C, khi một hoặc nhiều nguyên tử vòng tùy ý được thể độc lập bằng một hoặc nhiều phần tử thể được mô tả dưới đây. Dị vòng có thể là một vòng có 3 đến 7 thành phần tạo vòng (2 đến 6 nguyên tử cacbon và 1 đến 4 nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, P, và S) hoặc hai vòng có 7 đến 10 thành phần tạo vòng (4 đến 9 nguyên tử cacbon và 1 đến 6 nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, P, và S), ví dụ: hệ hai vòng [4,5], [5,5], [5,6], hoặc [6,6]. Dị vòng được mô tả trong Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W.A. Benjamin, New York, 1968), cụ thể là các chương 1, 3, 4, 6, 7, và 9; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950 đến nay), cụ thể là Tập 13, 14, 16, 19, và 28; và J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. “Heteroxycylt” cũng bao gồm các gốc mà gốc dị vòng được dung hợp với vòng cacbon dạng vòng no, không no một phần, hoặc thơm hoặc vòng dị vòng. Các ví dụ về vòng dị vòng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, morpholin-4-yl, piperidin-1-yl, piperazinyl, piperazin-4-yl-2-on, piperazin-4-yl-3-on, pyrrolidin-1-yl,

thiomorpholin-4-yl, S-dioxothiomorpholin-4-yl, azocan-1-yl, azetidin-1-yl, octahydropyrido[1,2-a]pyrazin-2-yl, [1,4]diazepan-1-yl, pyrrolidinyl, tetrahydrofuranyl, dihydrofuranyl, tetrahydrothienyl, tetrahydropyranyl, dihydropyranyl, tetrahydrothiopyranyl, piperidino, morpholino, thiomorpholino, thioxanyl, piperazinyl, homopiperazinyl, azetidiny, oxetanyl, thietanyl, homopiperidinyl, oxepanyl, thiepanyl, oxazepiny, diazepiny, thiazepiny, 2-pyrroliny, 3-pyrroliny, indoliny, 2H-pyranyl, 4H-pyranyl, dioxanyl, 1,3-dioxolanyl, pyrazoliny, dithianyl, dithiolanyl, dihydropyranyl, dihydrothienyl, dihydrofuranyl, pyrazolidinylimidazoliny, imidazolidiny, 3-azabixyclo[3.1.0]hexanyl, 3-azabixyclo[4.1.0]heptanyl, azabixyclo[2.2.2]hexanyl, 3H-indolyl quinoliziny và N-pyridyl ure. Gốc heteroxyclyl xoắn cũng được bao gồm trong phạm vi của định nghĩa này. Các ví dụ về gốc heteroxyclyl xoắn bao gồm azaspiro[2.5]octanyl và azaspiro[2.4]heptanyl. Các ví dụ về nhóm dị vòng trong đó 2 nguyên tử vòng được thế bằng gốc oxo (=O) là pyrimidinonyl và 1,1-dioxo-thiomorpholinyl.

Thuật ngữ “heteroaryl” dùng để chỉ gốc thơm hóa trị một của vòng có 5, 6, hoặc 7 cạnh, và bao gồm hệ vòng dung hợp (ít nhất một trong số đó là thơm) có 5 đến 20 nguyên tử, chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nitơ, oxy, và lưu huỳnh. Các ví dụ về nhóm heteroaryl là pyridiny (bao gồm, ví dụ, 2-hydroxypyridiny), imidazolyl, imidazopyridiny, pyrimidinyl (bao gồm, ví dụ, 4-hydroxypyrimidinyl), pyrazolyl, triazolyl, pyraziny, tetrazolyl, furyl, thienyl, isoxazolyl, thiazolyl, oxadiazolyl, oxazolyl, isothiazolyl, pyroryl, quinoliny, isoquinoliny, tetrahydroisoquinoliny, indolyl, benzimidazolyl, benzofuranyl, xinnoliny, indazolyl, indoliziny, phtalaziny, pyridaziny, triaziny, isoindolyl, pteridinyl, puriny, oxadiazolyl, triazolyl, thiadiazolyl, thiadiazolyl, furazanyl, benzofurazanyl, benzothiophenyl, benzothiazolyl, benzoxazolyl, quinazoliny, quinoxaliny, naphthyridiny, và furopyridiny.

Thuật ngữ “điều trị” dùng để chỉ điều trị chữa bệnh, trong đó mục đích là để làm chậm (làm giảm) thay đổi hoặc rối loạn sinh lý không mong muốn, như sự phát triển hoặc lan rộng của chứng viêm khớp hoặc bệnh ung thư. Nhằm các mục đích theo sáng chế này, các kết quả lâm sàng có lợi hoặc được mong đợi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, làm giảm các triệu chứng, làm giảm mức độ của bệnh, làm ổn định trạng thái của bệnh (tức là, không xấu đi), trì hoãn hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc

làm giảm tình trạng bệnh, và làm thuyên giảm (một phần hoặc toàn bộ), phát hiện ra được hoặc không phát hiện ra được. “Điều trị” cũng có thể có nghĩa là kéo dài sự sống so với sự sống mong muốn nếu không nhận điều trị. Đối tượng cần điều trị bao gồm các đối tượng có tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn.

Cụm từ “lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị” có nghĩa là lượng hợp chất theo sáng chế mà (i) điều trị được bệnh, tình trạng bệnh lý, hoặc rối loạn cụ thể, (ii) làm yếu, cải thiện, hoặc loại bỏ một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh, tình trạng bệnh lý, hoặc rối loạn cụ thể, hoặc (iii) ngăn ngừa hoặc trì hoãn sự khởi phát của một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh, tình trạng bệnh lý, hoặc rối loạn cụ thể được mô tả ở đây. Trong trường hợp bệnh ung thư, lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị của thuốc có thể làm giảm số lượng tế bào ung thư; làm giảm kích thước khối u; ức chế (tức là, làm chậm đến một mức độ nào đó và tốt hơn là ngừng) sự xâm nhập tế bào ung thư vào các cơ quan ngoại biên; ức chế (tức là, làm chậm đến một mức độ nào đó và tốt hơn là ngừng) sự di căn khối u; ức chế, đến một mức độ nào đó, sự phát triển khối u; và/hoặc làm giảm đến một mức độ nào đó một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh ung thư. Đến mức độ thuốc có thể ngăn chặn sự sinh trưởng và/hoặc tiêu diệt các tế bào ung thư đang tồn tại, nó có thể là kìm tế bào và/hoặc gây độc tế bào. Đối với liệu pháp ung thư, độ hiệu nghiệm có thể được đo, ví dụ, bằng cách đánh giá thời gian tiến triển bệnh (TTP) và/hoặc xác định tỷ lệ đáp ứng (RR).

Thuật ngữ “bệnh ung thư” dùng để chỉ hoặc mô tả tình trạng sinh lý ở động vật có vú thường đặc trưng bởi sự sinh trưởng tế bào không điều hòa được. “Khối u” bao gồm một hoặc nhiều tế bào ung thư. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không giới hạn ở, caxinom, u lympho, u nguyên bào, sarcom, và bệnh bạch cầu hoặc các bệnh lympho ác tính. Các ví dụ cụ thể hơn về các bệnh ung thư như vậy bao gồm bệnh ung thư tế bào vảy (ví dụ, bệnh ung thư tế bào vảy biểu mô), bệnh ung thư phổi bao gồm bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ (“NSCLC”), caxinom tuyến ở phổi và caxinom vảy ở phổi, bệnh ung thư màng bụng, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư dạ dày hoặc bụng bao gồm bệnh ung thư dạ dày-ruột, bệnh ung thư tuyến tụy, u nguyên bào đệm, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, ung thư gan, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom niêm mạc tử cung hoặc tử cung, caxinom tuyến nước bọt, bệnh ung thư thận hoặc cắt, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh

ung thư âm hộ, bệnh ung thư tuyến giáp, caxinom gan, caxinom hậu môn, caxinom dương vật, cũng như bệnh ung thư đầu và cổ.

"Bệnh máu ác tính-Hematological malignancies" (Người Anh viết là "Haematological" malignancies) là loại bệnh ung thư mà ảnh hưởng đến máu, tủy xương, và hạch bạch huyết. Do máu, tủy xương và hạch bạch huyết liên kết mật thiết với nhau thông qua hệ miễn dịch, bệnh ảnh hưởng đến một trong ba yếu tố đó thường ảnh hưởng đến cả các yếu tố còn lại: mặc dù u lympho là bệnh của hạch bạch huyết, nó thường lan rộng đến tủy xương, ảnh hưởng đến máu. Bệnh máu ác tính là ung thư ác tính ("bệnh ung thư"), và các bệnh này thường được điều trị bởi các chuyên gia ngành huyết học và/hoặc ung bướu. Ở một số trung tâm, "huyết học/ung bướu" là một lĩnh vực riêng trong chuyên khoa nội trong khi ở các trung tâm khác chúng được coi là các khoa riêng rẽ (cũng có bác sĩ chuyên khoa ung bướu phẫu thuật và chiếu xạ). Không phải tất cả các rối loạn huyết học đều là ác tính ("ung thư"); các tình trạng bệnh máu khác này cũng có thể được quản lý bởi bác sĩ chuyên khoa huyết học. Bệnh máu ác tính có thể có nguồn gốc từ một trong hai dòng tế bào chính chính: dòng tế bào dòng tủy và dòng tế bào lympho. Dòng tế bào dòng tủy thường sản sinh ra bạch cầu hạt, hồng cầu, tiểu cầu, đại thực bào và dưỡng bào; dòng tế bào lympho sản sinh ra tế bào B, T, NK và tế bào huyết tương. U lympho, bệnh bạch cầu tế bào lympho, và u tủy là từ dòng lympho, trong khi bệnh bạch cầu cấp và mạn tính do tủy xương tạo ra, hội chứng loạn sản tủy và bệnh tăng sinh tủy xương có nguồn gốc từ dòng tủy. Bệnh bạch cầu bao gồm bệnh bạch cầu tăng tế bào lympho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu cấp tính do tủy xương tạo ra (AML), bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu mạn tính do tủy xương tạo ra (CML), bệnh bạch cầu đơn bào cấp tính (AMOL) và u lympho tế bào lympho nhỏ (SLL). U lympho bao gồm u lympho Hodgkin (tất cả bốn kiểu phụ) và u lympho không phải Hodgkin (NHL, tất cả các kiểu phụ).

“Chất hóa trị” là hợp chất hóa học hữu dụng trong điều trị bệnh ung thư, bất kể cơ chế tác động. Các nhóm chất hóa trị bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất alkyl hóa, chất chống chuyển hóa, alkaloit thực vật chứa chất gây độc thoi, kháng sinh gây độc tế bào/chống u, chất ức chế topoisomeraza, kháng thể, chất nhạy quang, và chất ức chế kinaza. Chất hóa trị bao gồm các hợp chất được sử dụng trong “liệu pháp đích” và liệu pháp hóa học thông thường. Các ví dụ về chất hóa trị bao gồm: ibrutinib (IMBRUVICA™, APCI-32765, Pharmacyclics Inc./Janssen Biotech Inc.; CAS Reg. No.

936563-96-1, US 7514444), idelalisib (trước đây là CAL-101, GS 1101, GS-1101, Gilead Sciences Inc.; CAS Reg. No. 1146702-54-6), erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (florouracil, 5-florouracil, CAS Reg. No. 51-21-8), gemxitabin (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, Pfizer), xisplatin (Platinol®, (SP-4-2)-diamindicloplatin(II), xis-diamin, dicloplatin(II), CAS No. 15663-27-1), carboplatin (CAS No. 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Prinxeon, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomit (4-metyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabixyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trien- 9-carboxamit, CAS No. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifen ((Z)-2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy]-N,N-dimetyletanamin, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), và doxorubixin (ADRIAMYCIN®, CAS No. 23214-92-8), Akti-1/2, HPPD, và rapamyxin.

Chất hóa trị bao gồm chất ức chế các đích thụ thể tế bào B như chất ức chế BTK, Bcl-2 và JAK.

Các ví dụ khác về chất hóa trị bao gồm: oxaliplatin (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), imatinib mesylat (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (chất ức chế Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (chất ức chế Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (chất ức chế PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (chất ức chế PI3K, Novartis), XL-147 (chất ức chế PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorin (axit folinic), rapamycin (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (không chứa Cremophor), chế phẩm hạt nano được xử lý kỹ thuật bằng albumin chứa paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Il), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambuxil, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamid (TELCYTA®, Telik), thiotepa và xyclophosphamid (CYTOXAN®, NEOSAR®); alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa,

và uredopa; etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, trietylenlithiophosphoramit và trimetylomelamin; axetogenin (đặc biệt là bulataxin và bulataxinon); camptothecin (bao gồm chất tương tự tổng hợp topotecan); bryostatin; calystatin; CC-1065 (bao gồm chất tương tự tổng hợp adozelesin, carzelesin và bizelesin của nó); cryptophycin (cụ thể là cryptophycin 1 và cryptophycin 8); dolastatin; duocarmyxin (bao gồm các chất tương tự tổng hợp, KW-2189 và CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; hơi cay nitơ như clorambuxil, clornaphazin, clophosphamid, estramustin, ifosfamid, mecloretamin, mecloretamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, hơi cay uraxil; nitrosoure như carmustin, clozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, và ranimnustin; kháng sinh như kháng sinh enediyn (ví dụ, calicheamixin, calicheamixin gammaII, calicheamixin omegaII (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dynemixin, dynemixin A; bisphosphonat, như clodronat; esperamixin; cũng như nhóm mang màu neocarzinostatin và các nhóm mang màu kháng sinh enediyn protein màu liên quan), aclaxinomycin, actinomycin, anthramycin, azaserin, bleomycin, cactinomycin, carabixin, carminomycin, carzinophilin, chromomycin, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, morpholino-doxorubicin, xyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrolino-doxorubicin và deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, nemorubicin, marxelomycin, mitomycin như mitomycin C, axit mycophenolic, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, porfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozoxin, tuberxidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; chất chống chuyển hóa như metotrexat và 5-fluorouracil (5-FU); chất tương tự axit folic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; chất tương tự pyrimidin như anxitabin, azaxitidin, 6-azauridin, carmofur, xytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin; androgen như calusteron, dromostanolon propionat, epitioctanol, mepitioctan, testolacton; kháng adrenal như aminoglutethimide, mitotan, trilostan; chất điều chỉnh axit folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamid glycosit; axit aminolevulinic; eniluraxil; amsacrin; bestabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolxin; diaziqun; elfornithin; eliptinium axetat; epothilon; etoglucid; gali nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidainin; maytansinoid như maytansin và ansamitoxin; mitoguazon; mitoxantron; mopidanmol; nitraerin; pentostatin; phenamet; pirarubicin;

losoxantron; axit podophylinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; phức chất polysacarit PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxan; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; axit tenuazonic; triaziquon; 2,2',2''-trichlorotrietylamin; trichothexen (đặc biệt là độc tố T-2, veracurin A, roridin A và anguidin); uretan; vindesin; dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosit (“Ara-C”); xyclophosphamit; thiotepa; 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; chất tương tự platin như xisplatin và carboplatin; vinblastin; etoposit (VP-16); ifosfamit; mitoxantron; vincristin; vinorelbin (NAVELBINE®); novantron; teniposit; edatrexat; daunomyxin; aminopterin; capexitabin (XELODA®, Roche); ibandronat; CPT-11; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylornithin (DMFO); retinoit như axit retinoic; và muối được dùng, các axit và dẫn xuất của hợp chất bất kỳ nêu trên.

Cũng được bao gồm trong định nghĩa về “chất hóa trị” là: (i) chất kháng hormon tác động để điều hòa hoặc ức chế tác động hormon đến khối u như kháng estrogen và chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERM), bao gồm, ví dụ, tamoxifen (bao gồm NOLVADEX®; tamoxifen xitrat), raloxifen, droloxifen, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và FARESTON® (toremifin xitrat) và chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERD) như fulvestrant (FASLODEX®, Astra Zeneca); (ii) chất ức chế aromataza ức chế enzym aromataza, điều hòa sự sản sinh estrogen trong tuyến thượng thận, như, ví dụ, 4(5)-imidazol, aminoglutethimit, MEGASE® (megestrol axetat), AROMASIN® (exemestan; Pfizer), formestanie, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis), và ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) kháng androgen như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolit, và goserelin; cũng như troxaxitabin (chất tương tự 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); (iv) chất ức chế protein kinaza như chất ức chế Mek, như cobimetinib (WO 2007/044515); (v) chất ức chế lipid kinaza, như taselisib (GDC-0032, Genentech Inc.); (vi) oligonucleotit đối nghĩa, cụ thể là các oligonucleotit ức chế sự biểu hiện của gen trong con đường truyền tín hiệu liên quan đến sự tăng sinh tế bào bất thường, ví dụ, PKC-alpha, Raf và H-Ras, như oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozym như chất ức chế biểu hiện VEGF (ví dụ, ANGIOZYME®) và chất ức chế biểu hiện HER2; (viii) vắc xin như vắc xin liệu pháp gen, ví dụ, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, và VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; chất ức chế topoisomeraza 1 như LURTOTECAN®;

ABARELIX® rmRH; (ix) chất chống tạo mạch như bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); và các muối dược dụng, axit và dẫn xuất của các dẫn xuất bất kỳ nêu trên.

Cũng được bao gồm trong định nghĩa về “chất hóa trị” là các kháng thể trị liệu như alemtuzumab (Campath), bevaxizumab (AVASTIN®, Genentech); xetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (PERJETA™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), trastuzumab emtansin (KADCYLA®, Genentech Inc.), và tositumomab (BEXXAR, Corixa).

“Chất chuyển hóa” là sản phẩm tạo ra nhờ quá trình chuyển hóa trong cơ thể của hợp chất cụ thể hoặc muối của nó. Chất chuyển hóa của hợp chất có thể được nhận biết bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực này và các hoạt tính của chúng được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm như các thử nghiệm được mô tả ở đây. Các sản phẩm như vậy có thể thu được từ, ví dụ, quá trình oxy hóa, khử, thủy phân, amit hóa, khử amit hóa, este hóa, khử este hóa, phân tách enzym, và quá trình tương tự, của hợp chất được sử dụng. Do đó, sáng chế bao gồm chất chuyển hóa của hợp chất theo sáng chế, bao gồm hợp chất được điều chế bằng quy trình bao gồm bước cho hợp chất có công thức I theo sáng chế này tiếp xúc với động vật có vú trong một khoảng thời gian đủ để tạo ra sản phẩm chuyển hóa của chúng.

Thuật ngữ “tờ rời kèm theo bao gói” được sử dụng để chỉ các chỉ dẫn thường được bao gồm trong bao gói sản phẩm trị liệu bán trên thị trường, chứa thông tin về chỉ định, cách sử dụng, liều lượng, cách dùng, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo về việc sử dụng các sản phẩm trị liệu đó.

Thuật ngữ “bất đối xứng” dùng để chỉ phân tử có tính chất không chồng khít của ảnh đi kèm trong gương, trong khi thuật ngữ “đối xứng” dùng để chỉ phân tử có thể chồng khít cặp ảnh gương của chúng.

Thuật ngữ “chất đồng phân lập thể” dùng để chỉ hợp chất có cấu trúc hóa học giống hệt, nhưng khác về sự bố trí các nguyên tử hoặc nhóm trong không gian.

“Chất đồng phân không đối quang” dùng để chỉ chất đồng phân lập thể có hai hoặc nhiều tâm bất đối xứng và có phân tử không phải là ảnh trong gương của một phân tử khác. Chất đồng phân không đối quang có các tính chất vật lý khác nhau, ví dụ, điểm nóng chảy, điểm sôi, tính chất quang phổ, và khả năng phản ứng. Hỗn hợp của các chất

đồng phân không đối quang có thể tách ra trong quy trình phân tích độ phân giải cao như điện di và sắc ký.

“Chất đồng phân đối ảnh” dùng để chỉ hai chất đồng phân lập thể của hợp chất là hình ảnh gương không chồng khít nhau.

Các định nghĩa và quy ước hóa học lập thể được sử dụng trong bản mô tả thường tuân theo S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; và Eliel, E. and Wilen, S., “Stereochemistry of Organic Compounds”, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Hợp chất theo sáng chế có thể chứa các tâm không đối xứng hoặc bất đối xứng, và do đó tồn tại ở các dạng đồng phân lập thể khác nhau. Được dự định là tất cả các dạng đồng phân lập thể của hợp chất theo sáng chế, bao gồm nhưng không giới hạn ở, chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân atrop, cũng như các hỗn hợp của chúng như hỗn hợp triệt quang, tạo ra một phần của sáng chế. Nhiều hợp chất hữu cơ tồn tại ở dạng quang hoạt, tức là, chúng có khả năng xoay trong mặt phẳng của ánh sáng phân cực phẳng. Khi mô tả hợp chất quang hoạt, tiền tố D và L, hoặc R và S, được sử dụng để chỉ cấu hình tuyệt đối của phân tử quanh (các) tâm bất đối xứng của nó. Tiền tố d và l hoặc (+) và (-) được sử dụng để ký hiệu dấu hiệu xoay của ánh sáng phân cực phẳng bởi hợp chất, với (-) hoặc l nghĩa là hợp chất này xoay sang trái. Hợp chất có tiền tố (+) hoặc d là xoay sang phải. Đối với cấu trúc hóa học được nêu, các chất đồng phân lập thể này giống hệt nhau ngoại trừ là chúng là ảnh trong gương của một chất khác. Chất đồng phân lập thể cụ thể cũng có thể được đề cập đến là chất đồng phân đối ảnh, và hỗn hợp của các chất đồng phân này thường được gọi là hỗn hợp đồng phân đối ảnh. Hỗn hợp tỷ lệ 50:50 của các chất đồng phân đối ảnh được đề cập đến là hỗn hợp triệt quang hoặc raxemat, có thể xuất hiện khi không có sự chọn lọc lập thể hoặc tính cố định lập thể trong phản ứng hóa học hoặc quy trình hóa học. Thuật ngữ “hỗn hợp triệt quang” và “raxemat” dùng để chỉ hỗn hợp đẳng mol của hai loại chất đồng phân đối ảnh, không có hoạt tính quang học. Chất đồng phân đối ảnh có thể được tách khỏi hỗn hợp triệt quang theo phương pháp tách bất đối xứng, như sắc ký lỏng siêu tới hạn (SFC). Việc sắp xếp cấu hình ở các tâm bất đối xứng trong các chất đồng phân đối ảnh đã được tách có thể là tạm thời, và được thể hiện trong các cấu trúc trong Bảng 1 nhằm mục đích minh họa, trong khi tính hóa học lập thể được thiết lập rõ ràng, như từ số liệu tinh thể học tia x.

Thuật ngữ “chất hồ biến” hoặc “dạng hồ biến” dùng để chỉ chất đồng phân cấu trúc có năng lượng khác nhau mà có thể chuyển đổi qua lại thông qua màng ngăn năng lượng thấp. Ví dụ, chất hồ biến proton (còn được biết đến là chất hồ biến nguyên dưỡng) có sự chuyển đổi qua lại thông qua sự dịch chuyển proton, như sự đồng phân hóa keto-enol và imin-enamin. Chất hồ biến hóa trị có sự chuyển đổi qua lại nhờ sự sắp xếp lại một số electron liên kết.

Thuật ngữ “muối được dụng” chỉ muối không thuộc lĩnh vực sinh học hoặc nếu không thì không mong muốn. Muối được dụng bao gồm cả muối cộng axit và muối cộng bazơ. Cụm từ “được dụng” chỉ ra rằng chất hoặc chế phẩm phải tương thích về mặt hóa học và/hoặc độc tính học, với các thành phần khác bao gồm chế phẩm, và/hoặc động vật có vú được điều trị bằng chế phẩm đó.

Thuật ngữ “muối cộng axit được dụng” chỉ các muối được dụng được tạo ra với axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit carbonic, axit phosphoric, và axit hữu cơ được chọn từ axit béo, vòng béo, thơm, aryl-béo, dị vòng, vòng cacbon, và nhóm sulfonic của axit hữu cơ như axit formic, axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit gluconic, axit lactic, axit pyruvic, axit oxalic, axit malic, axit maleic, axit malonic, axit suxinic, axit fumaric, axit tartric, axit xitric, axit aspartic, axit ascorbic, axit glutamic, axit anthranilic, axit benzoic, axit xinnamic, axit mandelic, axit embonic, axit phenylaxetic, axit metansulfonic “mesylat”, axit etansulfonic, axit p-toluensulfonic, và axit salixylic.

Thuật ngữ “muối cộng bazơ được dụng” chỉ các muối được dụng được tạo ra với bazơ hữu cơ hoặc vô cơ. Các ví dụ về bazơ vô cơ chấp nhận được bao gồm muối natri, kali, amoni, canxi, magie, sắt, kẽm, đồng, mangan, và nhôm. Các muối thu được từ bazơ hữu cơ không độc được dụng bao gồm các muối của amin bậc một, bậc hai, và bậc ba, 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, 2-diethylaminoethanol, trimetamin, dicyclohexylamin, lysin, arginin, histidin, cafein, procain, hydrabamin, cholin, betain, etylendiamin, glucosamin, metylglucamin, theobromin, purin, piperazin, piperidin, N-etylpiperidin, và polyamin.

“Solvat” dùng để chỉ tổ hợp hoặc phức chất của một hoặc nhiều phân tử dung môi và hợp chất theo sáng chế. Các ví dụ về dung môi tạo ra solvat bao gồm, nhưng

không giới hạn ở, nước, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, etylaxetat, axit axetic, và etanolamin.

Thuật ngữ “EC₅₀” là nồng độ hữu hiệu bán tối đa” và chỉ nồng độ trong huyết tương của hợp chất cụ thể cần có để tạo ra 50% giá trị tối đa của hiệu quả cụ thể *in vivo*.

Thuật ngữ “Ki” là hằng số ức chế và chỉ ái lực gắn kết tuyệt đối của chất ức chế cụ thể đối với thụ thể. Hằng số này được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết cạnh tranh và bằng với nồng độ mà chất ức chế cụ thể sẽ chiếm 50% các thụ thể nếu không có mặt phối tử cạnh tranh (ví dụ, phối tử phóng xạ). Giá trị Ki có thể được biến đổi theo logarit thành giá trị pKi (-log Ki), trong đó giá trị cao hơn chỉ hoạt lực lớn hơn theo cấp số mũ.

Thuật ngữ “IC₅₀” là nồng độ ức chế bán tối đa và chỉ nồng độ của hợp chất cụ thể cần có để tạo ra 50% ức chế quá trình sinh học *in vitro*. Giá trị IC₅₀ có thể được biến đổi theo logarit thành giá trị pIC₅₀ (-log IC₅₀), trong đó giá trị cao hơn chỉ hoạt lực lớn hơn theo cấp số mũ. Giá trị IC₅₀ không phải là giá trị tuyệt đối mà phụ thuộc vào các điều kiện thử nghiệm, ví dụ, nồng độ được sử dụng, và có thể được biến đổi thành hằng số ức chế (Ki) tuyệt đối bằng cách sử dụng đẳng thức Cheng-Prusoff (Biochem. Pharmacol. (1973) 22:3099). Các thông số phần trăm ức chế khác, như IC₇₀, IC₉₀, v.v., có thể được tính.

Thuật ngữ “hợp chất theo sáng chế này,” và “hợp chất theo sáng chế” và “hợp chất có công thức I” bao gồm các hợp chất có công thức I và các chất đồng phân lập thể, chất đồng phân hình học, chất đồng phân, solvat, chất chuyển hóa, và muối được dùng và các tiền dược chất của chúng.

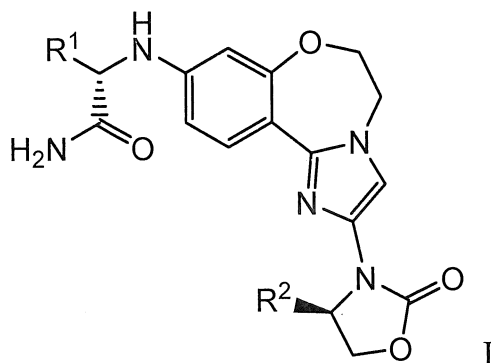
Công thức hoặc cấu trúc bất kỳ được nêu trong bản mô tả, bao gồm hợp chất có công thức I, cũng được dự định là tượng trưng cho hydrat, solvat, và chất đa hình của hợp chất này, và các hỗn hợp của nó.

Công thức hoặc cấu trúc bất kỳ được nêu trong bản mô tả, bao gồm hợp chất có công thức I, cũng được dự định là tượng trưng cho các dạng không được đánh dấu cũng như dạng được đánh dấu đồng vị của hợp chất. Hợp chất được đánh dấu đồng vị có cấu trúc được thể hiện bằng các công thức nêu trong bản mô tả ngoại trừ một hoặc nhiều nguyên tử được thay thế bằng nguyên tử có nguyên tử khối hoặc số khối được chọn. Các ví dụ về chất đồng vị mà có thể được kết hợp vào hợp chất theo sáng chế bao gồm chất

đồng vị của hydro, cacbon, nitơ, oxy, phospho, flo, và clo, như, nhưng không giới hạn ở ^2H (đơteri, D), ^3H (triti), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , và ^{125}I . Các hợp chất được đánh dấu đồng vị khác nhau theo sáng chế, ví dụ các hợp chất mà chất đồng vị hoạt tính phóng xạ như ^3H , ^{13}C , và ^{14}C được kết hợp vào đó. Các hợp chất được đánh dấu đồng vị này có thể hữu ích trong các nghiên cứu chuyển hóa, nghiên cứu động học phản ứng, kỹ thuật phát hiện hoặc chụp hình, như chụp xạ hình cắt lớp positron (positron emission tomography-PET) hoặc chụp xạ hình máy cắt lớp đơn photon (single-photon emission computed tomography-SPECT) bao gồm thử nghiệm phân bố trong mô của dược chất hoặc cơ chất, hoặc trong điều trị hoạt tính phóng xạ cho bệnh nhân. Hợp chất trị liệu được đánh dấu đơteri hoặc được thế đơteri theo sáng chế có thể có tính chất DMPK (chuyển hóa dược chất và dược động học) cải thiện liên quan đến sự phân bố, chuyển hóa, và bài tiết (ADME). Việc thế bằng chất đồng vị nặng hơn như đơteri có thể đạt được một số lợi ích trị liệu nhất định do tính ổn định chuyển hóa lớn hơn, ví dụ, gia tăng thời gian bán rã *in vivo* hoặc giảm nhu cầu liều lượng. Hợp chất đánh dấu ^{18}F có thể hữu ích cho nghiên cứu PET hoặc SPECT. Hợp chất được đánh dấu đồng vị theo sáng chế này và các tiền dược chất của nó thường có thể được điều chế bằng cách thực hiện các quy trình được bộc lộ trong các sơ đồ hoặc trong các ví dụ và cách điều chế được mô tả dưới đây bằng cách thế chất phản ứng được đánh dấu đồng vị đã có sẵn cho chất phản ứng không được đánh dấu đồng vị. Hơn nữa, việc thế bằng chất đồng vị nặng hơn, cụ thể là đơteri (tức là, ^2H hoặc D) có thể đạt được một số lợi ích trị liệu nhất định do tính ổn định chuyển hóa lớn hơn, ví dụ, gia tăng thời gian bán rã *in vivo* hoặc giảm nhu cầu liều lượng hoặc cải thiện chỉ số trị liệu. Hiểu được rằng đơteri trong ngữ cảnh này được coi là phần tử thế trong hợp chất có công thức (I). Nồng độ của chất đồng vị nặng hơn như vậy, cụ thể là đơteri, có thể được xác định bằng yếu tố làm giàu đồng vị. Trong hợp chất theo sáng chế này, nguyên tử bất kỳ không được ký hiệu cụ thể làm chất đồng vị cụ thể có nghĩa là tượng trưng cho chất đồng vị ổn định bất kỳ của nguyên tử đó. Trừ khi có quy định khác, khi một vị trí được ký hiệu cụ thể là "H" hoặc "hydro", vị trí đó được hiểu là có hydro ở chế phẩm đồng vị phổ biến trong tự nhiên của nó. Do đó, trong hợp chất theo sáng chế này, nguyên tử bất kỳ được ký hiệu cụ thể là đơteri (D) có nghĩa là tượng trưng cho đơteri.

Hợp chất benzoxazepin oxazolidinon

Sáng chế đề cập đến hợp chất benzoxazepin oxazolidinon có công thức I, và được phẩm chứa hợp chất này, có thể hữu ích trong điều trị bệnh ung thư, có cấu trúc:



và chất đồng phân lập thể, chất đồng phân hình học, chất hỗn biến, và muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, xyclopropyl, và xyclobutyl;

R^2 được chọn từ $-\text{CH}_3$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, và $-\text{CF}_3$.

Các phương án minh họa về hợp chất có công thức I bao gồm trong đó R^1 là xyclopropyl.

Các phương án minh họa về hợp chất có công thức I bao gồm trong đó R^1 là CH_3 hoặc xyclopropyl.

Các phương án minh họa về hợp chất có công thức I bao gồm trong đó R^1 là CH_3 .

Các phương án minh họa về hợp chất có công thức I bao gồm trong đó R^2 là $-\text{CHF}_2$.

Các phương án minh họa về hợp chất có công thức I bao gồm trong đó R^2 là $-\text{CH}_2\text{F}$.

Các phương án minh họa về hợp chất có công thức I bao gồm trong đó R^1 là xyclopropyl và R^2 là $-\text{CHF}_2$.

Các phương án minh họa về hợp chất có công thức I bao gồm trong đó R^1 là xyclopropyl và R^2 là $-\text{CH}_2\text{F}$.

Các phương án minh họa về hợp chất có công thức I bao gồm trong đó R^1 là CH_3 và R^2 là $-\text{CHF}_2$.

Các phương án minh họa về hợp chất có công thức I bao gồm các hợp chất trong Bảng 1.

Hợp chất có công thức I theo sáng chế có thể chứa tâm không đối xứng hoặc bất đối xứng, và do đó tồn tại ở các dạng đồng phân lập thể khác nhau. Được dự định rằng tất cả các dạng đồng phân lập thể của hợp chất theo sáng chế, bao gồm nhưng không giới hạn ở, chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân atrop, cũng như các hỗn hợp của chúng như hỗn hợp triệt quang, tạo ra một phần của sáng chế. Trong một số trường hợp, tính hóa học lập thể không được xác định hoặc được quy định tạm thời.

Ngoài ra, sáng chế bao gồm tất cả các chất đồng phân không đối quang, bao gồm chất đồng phân *cis-trans* (hình học) và chất đồng phân cấu dạng. Ví dụ, nếu hợp chất có công thức I kết hợp một liên kết đôi hoặc vòng dung hợp, dạng *cis* và *trans*, cũng như hỗn hợp của chúng, nằm trong phạm vi của sáng chế.

Trong các cấu trúc được thể hiện trong bản mô tả, khi tính hóa học lập thể của nguyên tử bất đối xứng cụ thể bất kỳ không được định rõ, thì tất cả các chất đồng phân lập thể được dự định và được bao gồm làm hợp chất theo sáng chế. Khi tính hóa học lập thể được định rõ bởi hình chêm đặc hoặc đường nét đứt tượng trưng cho cấu hình cụ thể, thì chất đồng phân lập thể được định rõ và được xác định.

Hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại ở dạng không được solvat hóa cũng như dạng được solvat hóa với dung môi được dụng như nước, etanol, và dung môi tương tự, và được dự định rằng sáng chế bao gồm cả dạng được solvat hóa và dạng không được solvat hóa.

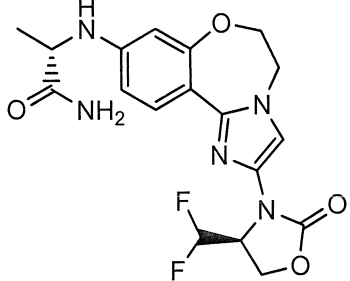
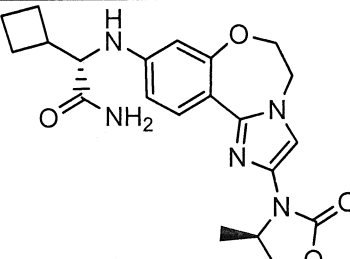
Hợp chất theo sáng chế cũng có thể tồn tại ở các dạng hỗn biến khác nhau, và tất cả các dạng như vậy nằm trong phạm vi của sáng chế. Thuật ngữ “chất hỗn biến” hoặc “dạng hỗn biến” dùng để chỉ chất đồng phân cấu trúc có năng lượng khác nhau mà có thể chuyển đổi qua lại thông qua hàng rào năng lượng thấp. Ví dụ, chất hỗn biến proton (còn được biết đến là chất hỗn biến nguyên dưỡng) có sự chuyển đổi qua lại thông qua sự dịch chuyển proton, như sự đồng phân hóa keto-enol và imin-enamin. Chất hỗn biến hóa trị có sự chuyển đổi qua lại bởi sự sắp xếp lại của một số electron liên kết.

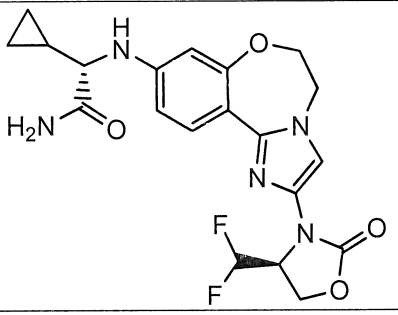
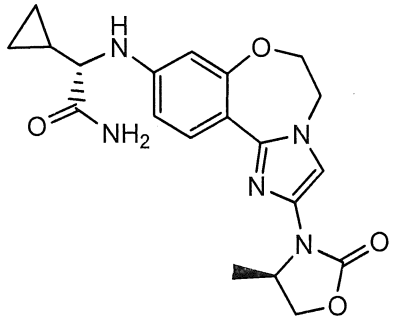
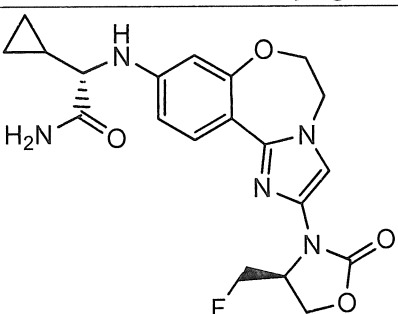
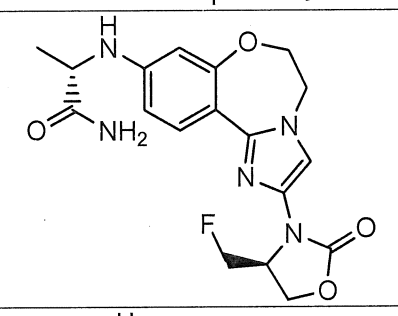
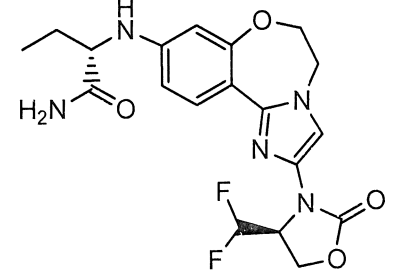
Đánh giá sinh học

Độ hiệu nghiệm tương đối của hợp chất có công thức I dưới dạng chất ức chế hoạt tính enzym (hoặc hoạt tính sinh học khác) có thể được thiết lập bằng cách xác định nồng độ mà tại đó mỗi hợp chất ức chế hoạt tính đến một mức độ được xác định trước và sau đó so sánh các kết quả. Thông thường, việc xác định được ưu tiên là nồng độ mà ức chế 50% hoạt tính trong thử nghiệm hóa sinh, tức là, nồng độ ức chế 50% hoặc “IC₅₀”. Việc xác định giá trị IC₅₀ có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Nhìn chung, IC₅₀ có thể được xác định bằng cách đo hoạt tính của enzym cho trước khi có mặt khoảng nồng độ chất ức chế trong nghiên cứu. Các giá trị hoạt tính enzym thu được thông qua thử nghiệm sau đó được vẽ biểu đồ dựa trên các nồng độ chất ức chế được sử dụng. Nồng độ chất ức chế mà thể hiện 50% hoạt tính enzym (so với hoạt tính khi không có chất ức chế bất kỳ) được lấy làm giá trị IC₅₀. Tương tự, các nồng độ ức chế khác có thể được xác định thông qua sự xác định thích hợp của hoạt tính. Ví dụ, trong một số thiết lập, có thể mong đợi đạt được nồng độ ức chế là 90%, tức là, IC₉₀, v.v.

Các hợp chất có công thức I lấy làm ví dụ trong Bảng 1 được tạo ra, được đặc trưng, và được thử nghiệm về khả năng gắn kết với các dạng đồng phân và dạng đột biến khác nhau của PI3K theo phương pháp theo sáng chế này, và có các cấu trúc sau, các tên tương ứng (ChemBioDraw, Phiên bản 12.0.2, CambridgeSoft Corp., Cambridge MA), và hoạt tính sinh học. Khi nhiều hơn một tên liên quan đến hợp chất có công thức I hoặc hợp chất trung gian, cấu trúc hóa học sẽ xác định hợp chất đó.

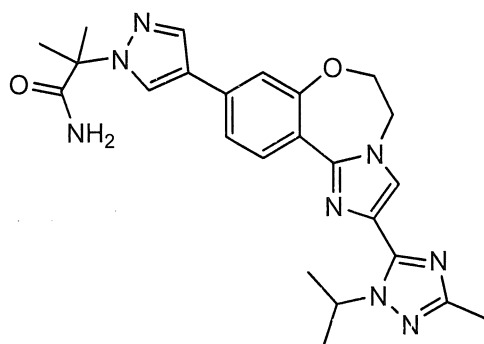
Bảng 1. Hợp chất có công thức I

Số	Cấu trúc	Tên hợp chất
101		(<i>S</i>)-2-((2-((<i>S</i>)-4-(difluoromethyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[<i>f</i>]imidazo[1,2- <i>d</i>][1,4]oxazepin-9-yl)amino)propanamit
102		(<i>S</i>)-2-xylobutyl-2-((2-((<i>R</i>)-4-methyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[<i>f</i>]imidazo[1,2- <i>d</i>][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit

103		(<i>S</i>)-2-xyclopropyl-2-((2-((<i>S</i>)-4-(difluorometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[<i>f</i>]imidazo[1,2- <i>d</i>][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit
104		(<i>S</i>)-2-xyclopropyl-2-((2-((<i>R</i>)-4-metyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[<i>f</i>]imidazo[1,2- <i>d</i>][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit
105		(<i>S</i>)-2-xyclopropyl-2-((2-((<i>S</i>)-4-(flometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[<i>f</i>]imidazo[1,2- <i>d</i>][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit
106		(<i>S</i>)-2-((2-((<i>S</i>)-4-(flometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[<i>f</i>]imidazo[1,2- <i>d</i>][1,4]oxazepin-9-yl)amino)propanamit
107		(<i>S</i>)-2-((2-((<i>S</i>)-4-(difluorometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[<i>f</i>]imidazo[1,2- <i>d</i>][1,4]oxazepin-9-yl)amino)butanamit

TASELISIB

Hợp chất được biết đến là tasisib, GDC-0032, và Roche RG7604 (CAS Reg. No. 1282512-48-4, Genentech Inc.), có tên theo IUPAC: 2-(4-(2-(1-isopropyl-3-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-2-metylpropanamit, và cấu trúc:



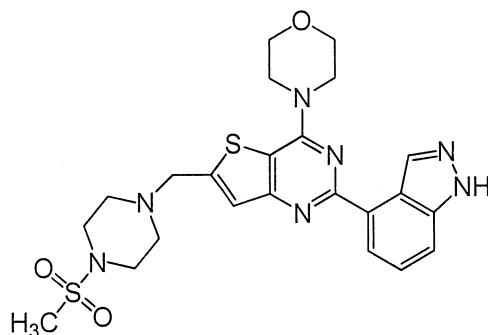
taselisib

bao gồm các chất đồng phân lập thể, chất đồng phân hình học, chất hỗn biến, và muối được dụng của chúng.

Taselesib có thể được điều chế và được đặc trưng như được mô tả trong WO 2011/036280, US 8242104, và US 8343955.

PICTILISIB

Hợp chất được biết đến là pictilisib, GDC-0941, Roche, RG-7321, và pictrelisib, (CAS Reg. No. 957054-30-7, Genentech Inc.,) là chất ức chế lớp I (pan) có hoạt lực và được hướng nhiều đích của dạng đồng phân PI3K. GDC-0941 hiện có trong thử nghiệm lâm sàng pha II để điều trị khối u rắn tiến triển. GDC-0941 được đặt tên là 4-(2-(1H-indazol-4-yl)-6-((4-(metylsulfonyl)piperazin-1-yl)metyl)thieno[3,2-d] pyrimidin-4-yl)morpholin (US 7781433; US 7750002; Folkes et al (2008) Jour. of Med. Chem. 51(18):5522-5532), và có cấu trúc:



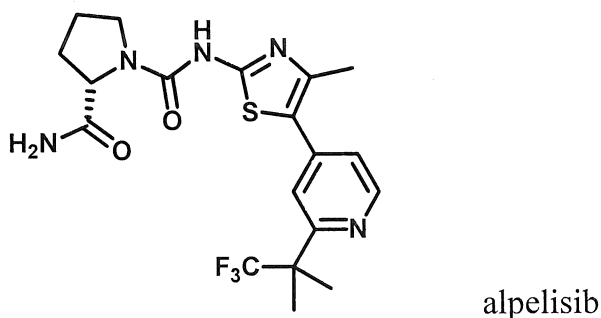
pictilisib

bao gồm các chất đồng phân lập thể, chất đồng phân hình học, chất hỗn biến, và muối được dụng của chúng.

ALPELISIB

Hợp chất được biết đến là alpelisib (BYL719, Novartis, CAS#: 1217486-61-7) là chất ức chế chọn lọc dùng qua đường miệng của dạng đồng phân PI3K alpha, và có trong thử nghiệm lâm sàng để điều trị hiệu quả các kiểu khối u khác nhau, bao gồm

ngiên cứu pha III kết hợp với fulvestrant đối với bệnh ung thư vú di căn tiến triển HER2, dương tính với thụ thể hormon dòng thứ hai (Furet, P. et al (2013) Bioorg. Med. Chem. Lett. 23:3741-3748; US 8227462; US 8476268; US 8710085). Alpelisib được đặt tên là (S)-N1-(4-metyl-5-(2-(1,1,1-triflo-2-metylpropan-2-yl)pyridin-4-yl)thiazol-2-yl)pyrrolidin-1,2-dicarboxamit) và có cấu trúc:



Ức chế hóa sinh các dạng đồng phân PI3K

Khả năng của hợp chất theo sáng chế hoạt động như chất ức chế PI3K α có độ chọn lọc cao hơn PI3K β , PI3K δ , và PI3K γ được xác định bằng cách sử dụng phương pháp trong Ví dụ 901. Giá trị Ki được thể hiện trong Bảng 2A và 2B tượng trưng cho giá trị trung bình hình học của tối thiểu ba thử nghiệm độc lập trừ khi có quy định khác.

Bảng 2A thể hiện sự ức chế hóa sinh của bốn dạng đồng phân PI3K bởi hợp chất có công thức I trong Bảng 1. Ngoài ra, hai hợp chất PI3K được thử nghiệm lâm sàng, taselisib và pictilisib được bao gồm làm chất so sánh. Hợp chất tiêu biểu theo sáng chế có hoạt tính mạnh kháng PI3K α , và có độ chọn lọc được tăng cường đáng kể so với các dạng đồng phân khác PI3K β , PI3K δ , và PI3K γ khi so sánh với taselisib (GDC-0032) và pictilisib (GDC-0941). Cụ thể, tỷ lệ chọn lọc trong cột thứ hai từ cột bên phải của Bảng 2A cho thấy rằng mỗi hợp chất có công thức I **101-107** có tỷ lệ chọn lọc giữa PI3K alpha và delta cao hơn nhiều so với taselisib hoặc pictilisib. Trên thực tế, cả taselisib và pictilisib đều có hoạt tính kháng PI3K delta mạnh hơn so với kháng PI3K alpha, tức là tỷ lệ chọn lọc của chúng thấp hơn 1. Tỷ lệ chọn lọc của hợp chất có công thức I **101-107** nằm trong khoảng từ 301 lần đến 634 lần.

Bảng 2B thể hiện sự ức chế hóa sinh của hai dạng đồng phân PI3K, alpha và delta và tỷ lệ chọn lọc giữa PI3K alpha và delta đối với một số hợp chất so sánh nhất định của US 8242104, và hợp chất mang nhóm dimetyloxazolidin-2-on từ US 8263633 (Hợp chất 356, cột 149). Các hợp chất so sánh được thể hiện trong Bảng 2B ở đây là các ví dụ từ

những loại được mô tả trong mỗi US 8242104 và US 8263633. Cả US 8242104 và US 8263633 đều không bộc lộ hợp chất nằm trong phạm vi của hợp chất có công thức I theo sáng chế. Trong khi ví dụ về chất so sánh tiêu biểu trong US 8242104 như được mô tả trong Bảng 2B cho thấy tỷ lệ chọn lọc PI3K α (alpha) với PI3K δ (delta) > 1, tỷ lệ chọn lọc lớn nhất quan sát được là 46,9 lần. Do đó, hợp chất có công thức I 101-107 đạt được tỷ lệ chọn lọc cao hơn đáng kể so với các ví dụ trong US 8242104. Không có chỉ dẫn trong US 8242104 hoặc US 8263633 về việc chọn lọc các thành phần cấu trúc của hợp chất có công thức I để đạt được tính chất là độ chọn lọc PI3K alpha cao so với PI3K delta. Tính chất độ chọn lọc PI3K alpha lớn hơn gấp 300 lần ngoài mong đợi này được bảo toàn qua toàn bộ phổ của hợp chất được lấy làm ví dụ trong Bảng 1.

Chất ức chế PI3K hiện có trong các thử nghiệm lâm sàng, như taselisib (WO 2011/036280; US 8242104; US 8343955), và các ví dụ tiêu biểu khác trong US 8242104 cho thấy hoạt tính đáng kể kháng dạng đồng phân PI3K δ (delta). Sự thiếu độ chọn lọc đối với PI3K δ (delta) phù hợp với độc tính GI quan sát được trong lâm sàng đối với taselisib. Có nhu cầu về chất ức chế PI3K α (alpha) chứa các đặc tính ưu tiên tiêu biểu của các ví dụ trong US 8242104 mà cũng thiếu hoạt tính kháng PI3K δ (delta). Sáng chế đề cập đến hợp chất đáp ứng hoạt tính và profin chọn lọc này.

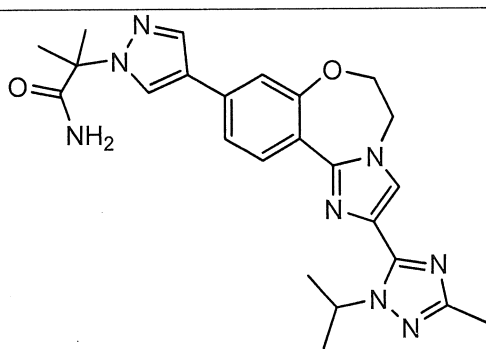
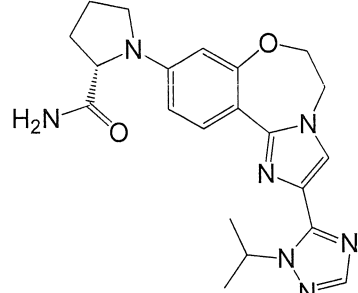
Tính chất ngoài mong đợi của độ chọn lọc PI3K alpha là thuận lợi trong việc loại bỏ độc tố dạ dày-ruột quan sát được trong ứng viên chất ức chế PI3K lâm sàng. Số liệu lâm sàng hiện có với chất ức chế PI3K chỉ ra rằng hoạt tính PI3K delta là nguồn độc tố dạ dày-ruột (Akinleye et al, “Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics” Journal of Hematology & Oncology 2013, 6:88-104). Xem Bảng 2 về chất ức chế PI3K trong thử nghiệm lâm sàng, taselisib và pictilisib.

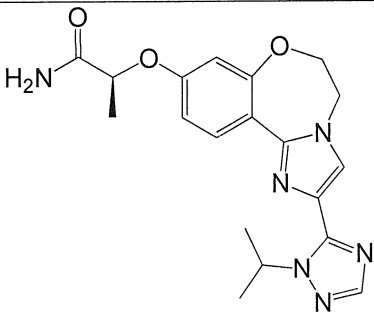
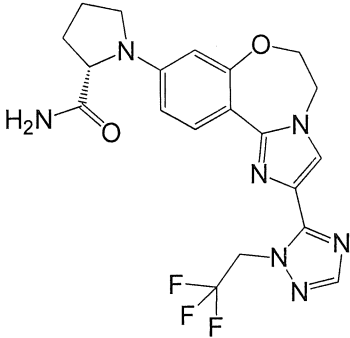
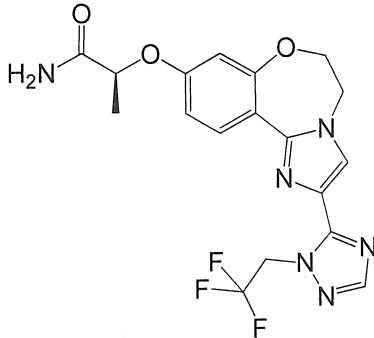
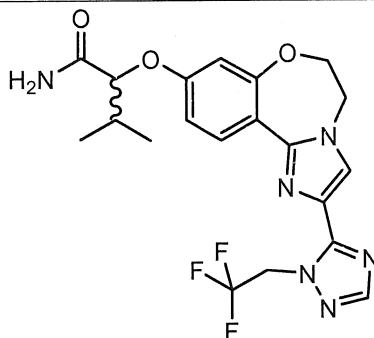
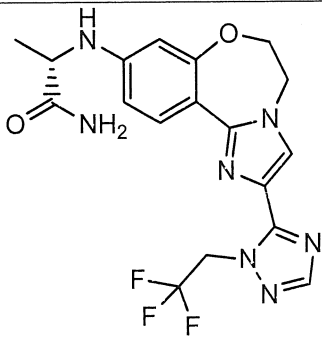
Do có độ chọn lọc cao hơn đáng kể để ức chế PI3K α (alpha) so với ức chế PI3K δ (delta), nên hợp chất có công thức I 101-107 được mong đợi là đạt được lợi ích lớn hơn giữa hoạt tính lâm sàng được điều khiển bởi sự ức chế PI3K α (alpha) so với các độc tố được điều khiển bởi sự ức chế PI3K δ (delta), so với taselisib và pictilisib được thử nghiệm lâm sàng hoặc ví dụ bất kỳ trong số các ví dụ trong US 8242104 hoặc US 8263633. Do đó, hợp chất có công thức I theo sáng chế có thể có tác dụng dùng làm chất trị liệu với profin độc tố giảm so với các chất có sự ức chế các chức năng bình thường của PI3K β , PI3K δ , hoặc PI3K γ lớn hơn.

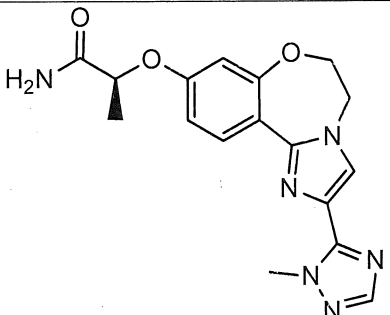
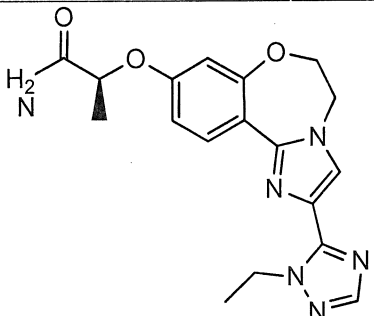
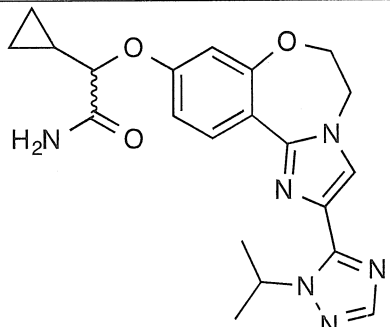
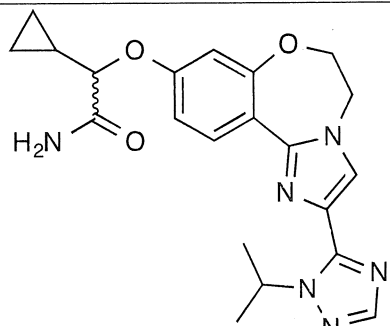
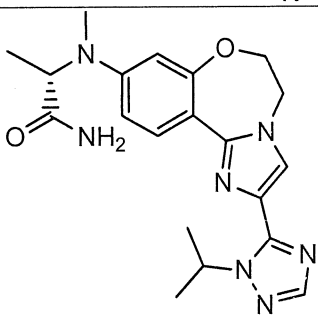
Bảng 2A. Sự ức chế hóa sinh của các dạng đồng phân PI3K bởi hợp chất có công thức I và hợp chất so sánh taselisib và pictilisib

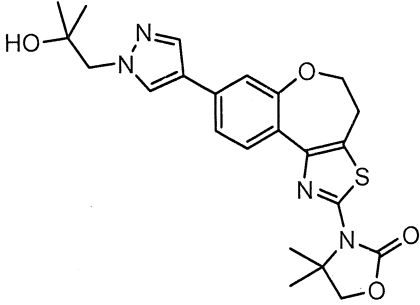
Hợp chất số	PI3K α Ki (nM)	PI3K β Ki (nM)	PI3K δ Ki (nM)	PI3K γ Ki (nM)	Độ chọn lọc đối với PI3K α so với PI3K- β	Độ chọn lọc đối với PI3K α so với PI3K δ	Độ chọn lọc đối với PI3K α so với PI3K γ
taselisib GDC-0032	0,090	53,0	0,079	1,43	591	0,9	16,0
pictilisib GDC-0941	2,56	70,2	1,54	41,8	27,4	0,6	16,3
101	0,034	99,7	12,2	18,2	2944	361	537
102	0,949	>1000	286	708	>1054	301	746
103	0,060	335	37,7	49,0	5640	634	824
104	0,464	813	197	289	1750	425	622
105	0,051	341	30,3	36,4	6718	598	717
106	0,040	122	16,7	17,8	3050	416	444
107	0,048	132	17,5	23,7	2782	368	499

Bảng 2B. Sự ức chế hóa sinh của các dạng đồng phân PI3K bởi hợp chất so sánh

Số (US 8242104)	Cấu trúc	PI3K α Ki (nM)	PI3K δ Ki (nM)	Độ chọn lọc đối với PI3K α so với PI3K δ
196 taselisib GDC-0032		0,090	0,079	0,88
375		0,016	0,417	21,7

436		0,35	6,94	22,3
469		<0,02*	0,39*	19,3
486		0,186**	2,5**	13,4
501		3,56**	21,8**	6,1
529		0,023	1,05	46,9

540		2,72**	24,1**	8,8
544		0,437**	11,3**	25,8
549 (chất đồng phân lập thể được tách 1)		0,56**	9,41**	17,0
549 (chất đồng phân lập thể được tách 2)		5,66**	1,70**	0,30
550		0,107	1,96	19,4

356 (US 8263633)		0,967**	0,92**	0,95
------------------------	---	---------	--------	------

*giá trị Ki tượng trưng cho giá trị trung bình của hai thử nghiệm, **giá trị Ki tượng trưng cho một thử nghiệm

Tương tác giữa hợp chất với PI3K

Cơ sở hợp lý đối với độ chọn lọc PI3K α bởi hợp chất có công thức I có thể nằm trong một số tương tác gắn kết nhất định.

Khả năng của hợp chất theo sáng chế trong việc tương tác đặc hiệu với PI3K α được xác định bằng cách phân giải cấu trúc đồng tinh thể tia x của hợp chất tiêu biểu với PI3K α (alpha) bằng cách sử dụng các phương pháp trong Ví dụ 908. Thiết kế cấu trúc được tối ưu của chất ức chế PI3K có độ chọn lọc đối với dạng đồng phân PI3K α so với các dạng đồng phân khác có thể bao gồm sự định vị và sắp xếp chính xác của các nguyên tử và nhóm chức để tương tác với các gốc đặc hiệu dạng đồng phân trong vị trí gắn kết. Cụ thể, sự thay thế ở vị trí 9 và ở vị trí 2 của hệ vòng 5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin được phát hiện ra là có tác động mang tính quyết định đến hoạt tính đặc hiệu của hợp chất kháng PI3K α .

Fig.1A-D thể hiện cấu trúc đồng tinh thể tia x của taselisib (GDC-0032), hợp chất đối chiếu 529 (US 8242104) và hai hợp chất tiêu biểu theo sáng chế với PI3K α . Như được thể hiện trên Fig.1A, taselisib (GDC-0032) chứa nhóm chức amit bậc một được định vị tiếp xúc gần cả Gln859 và Ser854, dường như mang lại khả năng tương tác liên kết hydro. Gốc Gln859 đặc hiệu đối với dạng đồng phân PI3K α , với gốc khác chiếm vị trí này trong các dạng đồng phân khác (PI3K β = Asp, PI3K δ = Asn, PI3K γ = Lys). Tuy nhiên, mặc dù sự tiếp xúc gần này với gốc đặc hiệu PI3K α , như được xác định trong thử nghiệm hóa sinh GDC-0032 có hoạt tính bằng nhau kháng cả hai dạng đồng phân PI3K α và PI3K δ , và chỉ có hoạt tính giảm nhẹ kháng dạng đồng phân PI3K γ (xem Bảng 2A).

Như được thể hiện trên Fig.1B, hợp chất đối chiếu 529 (US 8242104) chứa nhóm chức amit bậc một ở vị trí tương tự với vị trí của taselisib. Nhóm chức này nằm trong

khoảng cách thích hợp và hình học thích hợp của cả Ser854 và Gln859 để tạo ra tương tác liên kết hydro. Tỷ lệ chọn lọc gấp 46,9 lần đối với PI3K α so với PI3K δ (xem Bảng 2B) có thể được hữu tỉ hóa theo các tương tác này, và biết được rằng PI3K δ không chứa gốc Gln ở vị trí 859 và do đó các tương tác này nên đặc hiệu đối với PI3K α .

Fig.1C và Fig.1D cho thấy rằng amit bậc một của nhóm (S)-2-aminopropanamit của Hợp chất 101 và nhóm (S)-2-amino-2-cyclopropylaxetamit của Hợp chất 103 mỗi amit chiếm vị trí rất giống nhau trong vị trí gắn kết như amit bậc một của GDC-0032 và hợp chất đối chiếu 529 (US 8242104). Nhóm chức amit bậc một này trong mỗi hợp chất tiêu biểu theo sáng chế là nằm trong khoảng cách thích hợp và hình học thích hợp của cả Ser854 và Gln859 để tạo ra tương tác liên kết hydro lý tưởng. Mặc dù có đặc điểm giống nhau rõ ràng ở vị trí và định hướng nhóm chức, các ví dụ tiêu biểu được minh họa trên Fig.1C và Fig.1D, cũng như các hợp chất khác theo sáng chế này có phần tử thể và nhóm chức tương tự, cải thiện khi tương tác với amit bậc một của cả taselisib và hợp chất đối chiếu 529 (US 8242104) sao cho hợp chất theo sáng chế này được quan sát là có độ chọn lọc tăng đáng kể đối với PI3K α so với PI3K δ như được xác định trong thử nghiệm hóa sinh. Hợp chất 101 có độ chọn lọc gấp 361 lần và Hợp chất 103 có độ chọn lọc gấp 634 lần, tăng đáng kể so với hợp chất đối chiếu 529 (US 8242104) mà chỉ có độ chọn lọc gấp 46,9 lần. Xét về tính tương tự của việc định vị của nhóm chức amit bậc một giữa taselisib và các hợp chất khác trong US 8242104 (như được minh họa bởi hợp chất đối chiếu 529), độ chọn lọc tăng đối với PI3K α so với PI3K δ như được thể hiện bởi hợp chất theo sáng chế này là tính chất ngoài mong đợi. Không có hướng dẫn trong US 8242104 về việc chọn lọc các thành phần cấu trúc của hợp chất có công thức I để đạt được tính chất về độ chọn lọc PI3K α cao (> 300 lần). Hợp chất có công thức I theo sáng chế cải thiện khi tương tác với amit bậc một của GDC-0032 sao cho hợp chất theo sáng chế này được thấy là có độ chọn lọc tăng đáng kể đối với PI3K α so với PI3K δ như được xác định trong thử nghiệm hóa sinh so với các hợp chất so sánh (xem Bảng 2A và 2B).

Fig.2A thể hiện cấu trúc tia x của taselisib gắn kết trong vị trí hoạt tính PI3K α (alpha). Nguyên tử N2 của vòng triazol không thể tương tác trực tiếp với chuỗi bên của Tyr836 (khoảng cách là 4,04Å) hoặc Ser774 (khoảng cách là 2,74 và 2,82Å, không có tính phân cực bổ sung giữa phối tử và gốc). Fig.2B thể hiện cấu trúc tia x của Hợp chất

101 gắn kết trong vị trí hoạt tính PI3K α , và cho thấy rằng vòng oxazolidinon có thể tạo ra các tương tác với protein cải tiến so với vòng triazol. Nhóm chức carbonyl gần với chuỗi bên Tyr836 (2,67Å) và có thể tạo ra tương tác phân cực thuận lợi. Nguyên tử flo của phần tử thể oxazolidinon là tiếp xúc gần (2,21Å) với nhóm hydroxyl của Ser774 và phù hợp với tương tác phân cực hoặc liên kết hydro không cổ điển, tương tác thuận lợi được tạo ra bằng cách phân cực liên kết cacbon-flo (Böhm et. al, Fluorine in Medicinal Chemistry, (2004) ChemBioChem, 5:637-643; Zhou et. al, “Fluorine Bonding – How Does it Work In Protein-Ligand Interactions”, (2009) J. Chem. Inf. Model., 49:2344-2355).

Tất cả các hợp chất theo sáng chế chứa vòng oxazolidinon và có thể tạo ra tương tác cải thiện với Tyr836 của PI3K α (alpha). Một số ví dụ theo sáng chế còn chứa phần tử thể được flo hóa trên vòng oxazolidinon và có thể tạo ra tương tác với Ser774 của PI3K α cải thiện. Cả hai tương tác liên kết này có thể góp phần vào độ chọn lọc tăng cường đối với PI3K α quan sát được đối với các ví dụ theo sáng chế so với các ví dụ trong US 8242104. Như được thể hiện trong Bảng 2A và 2B, hợp chất chứa vòng oxazolidinon có độ chọn lọc dạng đồng phân cao hơn so với hợp chất so sánh chứa vòng triazol. Gốc Ser774 và Tyr836 không chỉ liên quan đến dạng đồng phân PI3K α , PI3K δ chứa các gốc giống nhau này ở các vị trí giống nhau, và độ chọn lọc dạng đồng phân tăng cường của chất ức chế oxazolidinon không được dự báo bởi các cấu trúc tinh thể này. Sự khác biệt nhẹ về việc định vị và định hướng của tính đồng nhất gốc như nhau giữa các dạng đồng phân khác nhau có thể là do các thay đổi nhẹ trong cấu trúc protein bậc hai và bậc ba. Sự khác biệt này khó dự đoán và giải thích ngay cả trong bề mặt của cấu trúc tinh thể tia x của cả hai dạng đồng phân protein. Các tính chất gây ngạc nhiên và ngoài mong đợi về sự tương tác phân tử cải thiện và độ chọn lọc dạng đồng phân tăng cường của chất ức chế oxazolidinon được bảo toàn qua toàn bộ phổ của hợp chất được minh họa trong Bảng 1.

Oxazolidinon được biệt hóa về mặt cấu trúc so với triazol ở chỗ oxazolidinon có carbonyl, là nhóm phân cực hơn, và không có đặc tính thơm. Triazol không có nhóm carbonyl, là nhóm ít phân cực hơn, và có đặc tính thơm.

Vòng oxazolidinon có lợi hơn so với vòng triazol về đặc tính sp³ tăng và tổng số vòng thơm giảm. Thường được chấp nhận trong tài liệu rằng số lượng vòng thơm tăng

trương quan với nguy cơ tăng gắn kết lộn xộn. Ngược lại, sự tăng phần sp^3 cacbon (# sp^3 cacbon/# tổng cacbon) liên quan đến tính chất lý hóa cải thiện và khả năng gắn kết lộn xộn giảm, làm giảm nguy cơ độc tố sai đích. Các khái niệm này được mô tả trong các tài liệu tham khảo Lovering et. al, “Escape From Flatland”, (2009) J. Med. Chem., 52:6752-6756 and Ritchie and Macdonald, “Physicochemical Descriptors of Aromatic Character and Their Use in Drug Discovery”, (2014) J. Med. Chem., 57:7206-7215. Sự thay thế vòng thơm triazol như được minh họa bởi các hợp chất tiêu biểu trong US 8242104 với vòng dị vòng no, oxazolidinon có trong mọi ví dụ của sáng chế, tượng trưng cho sự giảm thuận lợi nguy cơ nghiên cứu độc tố sai đích. Toàn bộ hợp chất được lấy làm ví dụ trong US 8242104 bị hợp chất ở đó với vòng thơm lần át hần ở vị trí này, có 4 ví dụ về nhóm chức carboxamit thay thế vòng thơm, và không có ví dụ về hệ vòng no hoặc dị vòng. Do tương tác liên kết khác nhau đáng kể và các yêu cầu trong không gian của dị vòng thơm và dị vòng no, chúng thường không thay thế được cho nhau. Không có ví dụ về hệ dị vòng no ở vị trí 2 của vòng 5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin, US 8242104 không đề xuất hướng dẫn đối với phương pháp thay thế vòng thơm bằng dị vòng no trong khi giữ được hoạt tính kháng PI3K α .

Do đó, hợp chất theo sáng chế chứa phần tử thể được tối ưu hóa và nhóm chức ở cả vị trí 9 và vị trí 2 của 5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin. Các hợp chất được tối ưu này tạo ra lợi ích đáng kể và chưa từng được biết đến về sự tương tác phân tử cải thiện và hoạt tính chọn lọc kháng PI3K α tăng, với hoạt tính kháng PI3K δ giảm. Hợp chất theo sáng chế có thể hữu ích để làm chất trị liệu với cửa sổ điều trị tăng cường so với các chất liên quan như taselisib (GDC-0032).

Ức chế chọn lọc PI3K α đột biến (alpha)

Khả năng của hợp chất theo sáng chế trong việc tác động theo hướng ưu tiên kháng các tế bào chứa PI3K α đột biến được xác định bằng cách đo mức ức chế con đường PI3K trong dòng tế bào đẳng gen SW48: PI3K α loại đại (ban đầu), E545K đột biến miền xoắn, và H1047R đột biến miền kinaza, như được mô tả trong phương pháp trong Ví dụ 902.

Phân tích thống kê: Giá trị EC50 là giá trị trung bình hình học của tối thiểu 4 thử nghiệm độc lập trừ khi có quy định khác. Tất cả các thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm KaleidaGraph (phiên bản 4.1.3). Thử nghiệm t Student được thực

hiện bằng cách sử dụng dữ liệu lẻ cặp với phương sai bằng nhau để so sánh hoạt tính kháng tế bào đột biến và tế bào loại đại. $P < 0,05$ được coi là ý nghĩa.

Bảng 3A thể hiện sự ức chế của P-PRAS40 trong tế bào đẳng gen SW48 bởi hợp chất có công thức I trong Bảng 1. Tất cả các hợp chất này đều biểu hiện hoạt tính kháng tế bào PI3K α đột biến tăng lên so với tế bào PI3K α loại đại. Hợp chất theo sáng chế cho thấy hoạt tính tương tự như taselisib trong tế bào PI3K α đột biến SW48, với độ chọn lọc bằng hoặc lớn hơn so với taselisib so với hoạt tính trong tế bào PI3K α loại đại (xem Bảng 3B).

Bảng 3B thể hiện sự ức chế của P-PRAS40 trong tế bào đẳng gen SW48 bởi một số hợp chất so sánh nhất định trong US 8242104, hợp chất mang nhóm dimetyloxazolidin-2-on từ US 8263633 (Hợp chất 356, cột 149), và pictilisib. Các hợp chất so sánh được thể hiện ở đây trong Bảng 3B là các ví dụ từ các giống được mô tả trong mỗi trong US 8242104 và US 8263633. Cả US 8242104 và US 8263633 đều không bộc lộ hợp chất nằm trong phạm vi của hợp chất có công thức I theo sáng chế. Hợp chất so sánh chứa các ví dụ mà không có hoạt tính tăng đáng kể đối với tế bào PI3K α đột biến so với tế bào PI3K α loại đại (xem hợp chất so sánh 436 và 549, $p > 0,05$). Các hợp chất này rất giống nhau về mặt cấu trúc với hợp chất so sánh mà có hoạt tính tăng đáng kể đối với tế bào PI3K α đột biến so với tế bào PI3K α loại đại (xem hợp chất so sánh 529). Không có thành phần cấu trúc chung trong các hợp chất so sánh mà cung cấp chỉ dẫn để ức chế chọn lọc tế bào PI3K α (alpha) đột biến. Nói rộng hơn, không có chỉ dẫn trong US 8242104 hoặc US 8263633 về cách chọn lọc các thành phần cấu trúc của hợp chất có công thức I để đạt được hoạt tính kháng tế bào PI3K α đột biến tăng hoặc tương đương so với tế bào PI3K α loại đại. Tính chất ngoài mong đợi này được bảo toàn qua toàn bộ phổ của các hợp chất được lấy làm ví dụ trong Bảng 1.

Bảng 3A. Ức chế P-PRAS40 trong tế bào đẳng gen SW48 bởi hợp chất có công thức I

Số	P-PRAS40 SW48(E54 5K) EC50 (μ M)	P-PRAS40 SW48(H10 47R) EC50 (μ M)	P-PRAS40 SW48(ban đầu) EC50 (μ M)	Độ chọn lọc đối với SW48(E545K) gấp số lần so với SW48 (ban đầu)	Độ chọn lọc đối với SW48(H1047R) gấp số lần so với SW48 (ban đầu)
101	0,0027	0,0030	0,0063	2,4 (p<0,001)	2,1 (p=0,002)
102	0,0335	0,0358	0,0849	2,5 (p=0,002)	2,4 (p=0,001)
103	0,0041	0,0038	0,0101	2,5 (p<0,001)	2,6 (p<0,001)
104	0,0200	0,0228	0,0618	3,1 (p=0,007)	2,7 (p=0,009)
105	0,0042	0,0048	0,0125	3,0 (p=0,007)	2,6 (p=0,007)
106	0,0045	0,0044	0,0115	2,5 (p=0,003)	2,6 (p=0,001)
107	0,0053	0,0052	0,0108	2,0 (p=0,003)	2,1 (p=0,003)

Bảng 3B. Ức chế P-PRAS40 trong tế bào đẳng gen SW48 bởi hợp chất so sánh

Hợp chất hoặc số (US 8242104)	P- PRAS40 SW48(E5 45K) EC50 (μ M)	P-PRAS40 SW48(H104 7R) EC50 (μ M)	P- PRAS40 SW48(ba n đầu) EC50 (μ M)	Độ chọn lọc đối với SW48(E545 K) gấp số lần so với SW48 (ban đầu)	Độ chọn lọc đối với SW48(H1047 R) gấp số lần so với SW48(ban đầu)
196 taselisib GDC-0032	0,0034	0,0040	0,0079	2,3 (p<0,001)	2,0 (p<0,001)
pictilisib GDC-0941	0,0284	0,0321	0,0315	1,1 (p=0,7)	1,0 (p=0,9)
436 GDC-0326	0,0095	0,0092	0,0128	1,3 (p=0,26)	1,4 (p=0,22)
529	0,0008	0,0009	0,0016	2,2 (p<0,001)	2,0 (p=0,002)
549 (chất đồng phân lập thể được tách 1)	0,0105*	0,0147*	0,0119*	1,1	0,8

*EC50 là thử nghiệm đơn lẻ

Hoạt tính chống tăng sinh ở tế bào khối u đột biến PI3K

Khả năng của hợp chất theo sáng chế trong việc tác động đến tế bào khối u đột biến PI3K được xác định bằng cách đo khả năng sống của tế bào EC50 trong tế bào HCC1954 (H1047R đột biến PI3K α) và tế bào MCF7 (E545K đột biến PI3K α) bằng cách sử dụng các phương pháp trong Ví dụ 903. Bảng 4 cho thấy rằng hợp chất tiêu biểu có công thức I 101 và 103 theo sáng chế có thể ức chế con đường PI3K và ức chế sự tăng sinh trong tế bào HCC1954 và tế bào MCF7 với mức hoạt lực tương tự như hợp chất so sánh taselisib (hợp chất 196, US 8242104), pictilisib và hợp chất 436 (US 8242104).

Bảng 4. Hoạt tính chống tăng sinh của hợp chất PI3K trong tế bào khối u PI3K-alpha đột biến

Hợp chất hoặc số	HCC1954 chống tăng sinh EC50 (μ M)	MCF7 chống tăng sinh EC50 (μ M)
Taselisib 196 (US 8242104) GDC-0032	0,04	0,02
pictilisib GDC-0941	0,75	0,12
436 (US 8242104)	0,35	0,09
101	0,06	0,03
103	0,07	0,03

Độ hiệu nghiệm *in vivo*

Bảng 5-8 thể hiện dữ liệu từ những nghiên cứu ức chế sự phát triển khối u *in vivo* (TGI) với hợp chất PI3K. Thay đổi thể tích khối u được đo trong 20 ngày hoặc lâu hơn trong thuần tập gồm chuột nhắt suy giảm miễn dịch mang mảnh ghép ngoại lai ung thư vú, được định liều hằng ngày bằng cách dùng PO (qua đường miệng) với chất dẫn thuốc và hợp chất PI3K (Ví dụ 904).

Bảng 5 cho thấy rằng ở liều dung nạp tối đa (MTD), GDC-0032 (taselisib), mỗi Hợp chất 103 và Hợp chất 101 đều hiệu quả hơn so với alpelisib (BYL-719) trong mô hình khối u đột biến PI3K.

Bảng 6 cho thấy rằng ở liều thấp hơn so với liều dung nạp tối đa, (tức là 25mg/kg), Hợp chất 101 hiệu quả hơn so với GDC-0032 trong mô hình khối u đột biến PI3K. Có khả năng có chỉ số trị liệu (TI) lớn hơn với Hợp chất 101 do đạt được độ hiệu nghiệm tối đa trước khi dung nạp tối đa.

Bảng 7 cho thấy rằng ở liều dung nạp tối đa, các đáp ứng tăng (PR và CR) được

phát hiện với Hợp chất 101 so với GDC-0032 trong mô hình khối u đột biến PI3K. Tương tự, ở liều dung nạp tối đa, GDC-0032 và BYL-719 hiệu quả như nhau.

Bảng 8 cho thấy rằng ở liều dung nạp tối đa, GDC-0032 và Hợp chất 101 hiệu quả hơn so với BYL-719, và Hợp chất 101 gần như hiệu quả bằng GDC-0032 trong mô hình khối u đột biến PI3K.

Bảng 5. So sánh các liều dung nạp tối đa (MTD) của hợp chất PI3K trong mô hình ghép ngoại lai ở vú HCC-1954x1 (ER-, PI3KH1047R)

Hợp chất PI3K	%TGI	PR	CR
BYL-719, 40mg/kg QD, PO	80	1	1
GDC-0032, 15mg/kg QD, PO	118	4	0
Hợp chất 103, 100mg/kg QD, PO	120	4	3
Hợp chất 101, 50mg/kg QD, PO	129	10	0

Bảng 6. Nghiên cứu khoảng liều lượng của Hợp chất 101 trong mô hình ghép ngoại lai ở vú HCC-1954x1 (ER-, PI3KH1047R)

Hợp chất PI3K	%TGI	PR	CR
Hợp chất 101, 0,5mg/kg PO, QD	19	0	0
Hợp chất 101, 1mg/kg PO, QD	60	2	0
Hợp chất 101, 2,5mg/kg PO, QD	68	1	0
Hợp chất 101, 5mg/kg PO, QD	84	0	0
Hợp chất 101, 25mg/kg PO, QD	140	7	0
Hợp chất 101, 50mg/kg PO, QD	149	6	0
GDC-0032, 15mg/kg PO, QD	111	2	0

Bảng 7. Nghiên cứu khoảng liều lượng của Hợp chất 101 trong mô hình ghép ngoại lai ở vú KPL-4 (ER-, PI3KH1047R)

Hợp chất PI3K	%TGI	PR	CR
Hợp chất 101, 1mg/kg PO, QD	28	0	0
Hợp chất 101, 2,5mg/kg PO, QD	86	1	0
Hợp chất 101, 5mg/kg PO, QD	93	1	0
Hợp chất 101, 15mg/kg PO, QD	125	5	0
Hợp chất 101, 25mg/kg PO, QD	135	9	0
Hợp chất 101, 50mg/kg PO, QD	153	9	1
GDC-0032 15mg/kg PO, QD	113	3	0

Bảng 8. So sánh GDC-0032, Hợp chất 101, và BYL-719 trong mô hình ghép ngoại lai PDX ở vú HCI-003 (ER+, PI3KH1047R)

Hợp chất PI3K	%TGI	PR	CR
BYL-719, 40mg/kg PO, QD	114	2	0
GDC-0032, 15mg/kg PO, QD	162	6	1
Hợp chất 101, 50mg/kg PO, QD	175	5	2

Ức chế con đường trong tế bào B được phân lập

Khả năng của hợp chất theo sáng chế trong việc ức chế con đường PI3K trong tế bào B được đánh giá bằng ảnh hưởng của hợp chất đó đến nồng độ CD69 sau khi điều trị a-IgM chủ vận bằng cách sử dụng các phương pháp trong Ví dụ 906. Sự biểu hiện của CD69 trong tế bào B do điều trị a-IgM được tin là được điều khiển bởi sự truyền tín hiệu thông qua PI3K δ (delta). Bảng 9 thể hiện hợp chất có công thức I tiêu biểu là chất ức chế chọn lọc hơn của con đường truyền tín hiệu trong dòng đột biến PI3K (SW48

(H1047R)) với tế bào B (cột 3) so với taselisib, pictilisib, alpelisib, hợp chất 436 (US8242104) và idelalisib.

Bảng 9. Ức chế sự biểu hiện CD69 trong tế bào B bởi hợp chất chọn lọc.

Số	IC ₅₀ (μM) biểu hiện CD69 khi điều trị a-IgM trong tế bào B, gắn kết huyết tương-protein được hiệu chuẩn*	[IC ₅₀ biểu hiện CD69 khi điều trị a-IgM trong tế bào B, gắn kết huyết tương-protein được hiệu chuẩn*]/[p-PRAS40 SW48(H1047R) EC ₅₀]
101	0,047	16
103	0,076	20
taselisib	0,00031	0,077
pictilisib	0,006	0,19
alpelisib	0,048	0,79
Hợp chất 436 (US8242104)	0,020	2,2
idelalisib	0,048	< 0,048

*IC₅₀ biểu hiện CD69 được đo trong máu toàn phần của người và được hiệu chuẩn bằng cách nhân với fu người đo được từ thử nghiệm gắn kết huyết tương protein.

Ức chế con đường trong tế bào khối u đột biến PI3K và tế bào khối u loại đại

Khả năng của hợp chất theo sáng chế trong việc ức chế sự truyền tín hiệu qua con đường PI3K trong tế bào khối u được đánh giá bằng cách đo nồng độ p-PRAS40 trong dòng HCC1954 (H1047R đột biến PI3K α) và HDQ-P1 (PI3K α loại đại), sử dụng phương pháp trong Ví dụ 907. Bảng 10 thể hiện hợp chất có công thức I tiêu biểu 101, 103 và 105 có thể ức chế con đường PI3K một cách chọn lọc trong PI3K α đột biến (HCC1954, H1047R đột biến PI3K α) với tế bào khối u loại đại PI3K α (HDQ-P1, PI3K α loại đại). Hợp chất 101, 103 và 105 có đột biến lớn hơn trên độ chọn lọc loại đại so với hợp chất so sánh taselisib, pictilisib, alpelisib và hợp chất 436 (US8242104).

Bảng 10. Ước chế p-PRAS40 trong dòng HCC1954 và HDQ-P1 bởi hợp chất chọn lọc.

Số	P-PRAS40 HCC1954 MSD EC50 (μ M)	P-PRAS40 HDQ-P1 MSD EC50 (μ M)	Độ chọn lọc đối với HCC1954 gấp số lần so với HDQ-P1
101	0,019	0,084	4,4
103	0,028	0,155	5,5
105	0,027	0,179	6,6
taselisib	0,023	0,055	2,4
pictilisib	0,324	0,094	0,3
alpelisib	0,483	0,311	0,6
Hợp chất 436 (US8242104)	0,089	0,122	1,4

Biến tính p110 α trong tế bào khối u đột biến PI3K

Khả năng của hợp chất theo sáng chế trong việc làm giảm nồng độ p110 α được xác định trong các thử nghiệm với dòng HCC1954 (H1047R đột biến PI3K α) và HDQ-P1 (PI3K α loại dại), sử dụng các phương pháp trong Ví dụ 905. Fig.3A và 3B thể hiện hợp chất có công thức I tiêu biểu 101 và 103 có thể thúc đẩy việc làm giảm nồng độ p110 α một cách chọn lọc trong tế bào khối u đột biến PI3K (HCC1954, H1047R đột biến PI3K α) với tế bào khối u PI3K α loại dại (HDQ-P1, PI3K α loại dại) theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Fig.3A thể hiện số liệu thẩm tách Western thể hiện nồng độ p110 α (p110 α , p110 alpha) sau 24 giờ xử lý bằng Hợp chất **101**, Hợp chất **103** và Hợp chất 436 trong US 8242104 trong tế bào HCC-1954 (H1047R đột biến PI3K α). Fig.3B thể hiện số liệu thẩm tách Western thể hiện nồng độ p110 α (p110 α , p110 alpha) sau 24 giờ xử lý bằng Hợp chất **101**, Hợp chất **103** và Hợp chất 436 trong US 8242104 trong tế bào HDQ-P1 (PI3K α loại dại). Hợp chất **101** và **103** ảnh hưởng mạnh hơn đến nồng độ p110 α so với hợp chất 436 (US8242104).

Định liều dùng qua đường miệng nhiều ngày ở chó

Khả năng của hợp chất theo sáng chế trong việc thúc đẩy chứng viêm dạ dày-ruột và/hoặc viêm toàn thân hoặc gây ra sự tiêu mô bạch huyết được đánh giá thông qua việc đánh giá bệnh lý lâm sàng và đánh giá bệnh lý giải phẫu sau khi định liều nhiều ngày ở chó săn thỏ (từ 7 đến 14 ngày). Hợp chất có công thức I **101** và **103** ở số lần tiếp xúc tự do >5 lần so với TGI60 (ức chế sự phát triển khối u 60% trong nghiên cứu ghép ngoại lai đột biến PI3K) không thúc đẩy dấu hiệu tiền viêm như được xác định bởi đánh giá

bệnh lý lâm sàng hoặc đánh giá bệnh lý giải phẫu (Bảng 11a, 11b). Tương tự, hợp chất **101** và **103** chỉ tạo ra một lượng nhỏ sự tiêu mô bạch huyết ở số lần tiếp xúc cao. Ngược lại, các thử nghiệm với hợp chất so sánh taselisib chỉ ra tác động tiền viêm đáng kể và sự tiêu mô bạch huyết ở $<0,3$ lần tiếp xúc tự do so với TGI60 (Bảng 11c). Hợp chất so sánh alpelisib (BYL-719) và hợp chất 436 (US8242104) cũng gây viêm và tiêu lympho ở số lần tiếp xúc thấp hơn so với Hợp chất có công thức I **101** và **103** (Bảng 11d, 11e). Phạm vi và độ nghiêm trọng của kết quả phù hợp với sự ức chế PI3K δ (delta) tăng lên ở số lần tiếp xúc nhiều hơn IC₅₀ CD69 đối với hợp chất so sánh.

Bảng 11. Định liều nhiều ngày hợp chất có công thức 1 và hợp chất so sánh ở chó.

(a)

Hợp chất 101 Liều lượng mg/kg/ngày QD	Tiếp xúc			Số lần tiếp xúc* (tổng/tự do, AUC)	Số lần tiếp xúc với CD69 IC50** (tổng, C _{min})	Dấu hiệu lâm sàng	Bệnh lý lâm sàng ⁺	Mô bệnh học ⁺
	AUC0- 24 giờ, D14 (μ M giờ, tổng/tự do)	Cmax D14 (μ M, tổng/tự do)	Cmin D14 (μ M, tổng)					
0,05	0,23/0,16	0,033/0,023	0,0046	0,2x/0,6x	0,07x	-	-	-
0,15	0,87/0,60	0,097/0,067	0,012	0,8x/2,3x	0,2x	-	-	-
0,5	2,0/1,38	0,31/0,21	0,017	1,9x/5,3x	0,3x	-	-	-

F_u chó = 0,692; F_u chuột nhắt = 0,252 (F_u = phần không gắn kết trong huyết tương loài)

* Số lần tiếp xúc bằng cách sử dụng TGI60 từ nghiên cứu ghép ngoại lai KPL4 trong 21 ngày; TGI60 @ 2mg/kg, 1,04 μ M giờ tiếp xúc tổng cộng, 0,26 μ M giờ tiếp xúc tự do

**IC₅₀ biểu hiện CD69 được kích thích bởi a-IgM (máu toàn phần) = 67nM

⁺ Các kết quả liên quan đến các cơ quan viêm và cơ quan lympho

(b)

Hợp chất 103 Liều lượng mg/kg/ngày QD	Tiếp xúc			Số lần tiếp xúc* (tổng/tự do, AUC)	Số lần tiếp xúc với CD69 IC50**	Dấu hiệu lâm sàng	Bệnh lý lâm sàng ⁺	Mô bệnh học ⁺
	AUC0- 24 giờ, D14	Cmax D14	Cmin D14					

	(μ M giờ, tổng/tự do)	(μ M, tổng/tự do)	(μ M, tổng)		(tổng, Cmin)			
0,1	0,27/0,14	0,04/0,02	0,0048	0,2x/4,7x	0,03x	-	-	-
0,3	0,9/0,46	0,13/0,066	0,011	0,8x/15x	0,08x	-	-	-
1	2,54/1,29	0,31/0,16	0,034	2,2x/43x	0,2x	Phân bắt thường (mềm/nhảy, 4/4)	↓ tế bào lympho	Sự tiêu mô bạch huyết: tuyến ức

Fu chó = 0,507; Fu chuột nhắt = 0,03 (Fu = phần không gắn kết trong huyết tương loài)

* Số lần tiếp xúc sử dụng TGI60 từ nghiên cứu HCC1954 TGI trong 21 ngày;
TGI60 @ 3mg/kg, 1,13 μ M giờ tiếp xúc tổng, 0,03 μ M giờ tiếp xúc tự do

**IC50 biểu hiện CD69 được kích thích bằng a-IgM (máu toàn phần) = 142nM

+ Các kết quả liên quan đến cơ quan viêm và cơ quan lympho

(c)

taselisib Liều lượng mg/kg/ngày QD	Tiếp xúc			Số lần tiếp xúc* (tổng/tự do, AUC)	Số lần tiếp xúc với CD69 IC50 (tổng, Cmin)	Dấu hiệu lâm sàng	Bệnh lý lâm sàng+	Mô bệnh học+
	AUC0- 24 giờ, D7 (μ M giờ, tổng/tự do)	Cmax D7 (μ M, tổng/tự do)	Cmin D7 (μ M, tổng)					
0,3	0,44/0,12	0,07/0,02	0,002	0,1x/0,3x	0,7x	-	-	Sự tiêu mô bạch huyết: hạch bạch huyết, GALT, lách, tuyến ức Viêm GI: viêm dạ dày, ưa bạch cầu trung tính
1	1,6/0,45	0,18/0,05	0,019	0,4x/1,0x	6,2x	-	-	Sự tiêu mô bạch huyết: hạch bạch huyết, GALT, lách, tuyến ức

								Viêm GI: các vùng màu đỏ sẫm trong dạ dày & trực tràng tương ứng với sự viêm trong dạ dày
3	5,1/1,4	1,09/0,31	0,016	1,2x/3,2x	5,2x	Hao hút BW (7,9% với tiền nghiên cứu; ban đầu 1 con chó) gầy, dễ chạm (tai); phân bất thường; nôn	↓ tế bào lympho ↑ tế bào ưa bạch cầu trung tính ↑ đơn bào ↑ globulin ↓ tỷ lệ A:G ↑ fibrinogen	Sự tiêu mô bạch huyết: hạch bạch huyết, GALT, lách, tuyến ức Viêm GI: các vùng màu đỏ sẫm trong dạ dày & trực tràng tương ứng với viêm ở dạ dày, trực tràng, manh tràng Viêm toàn thân: tế bào ưa

								bạch cầu trung tính xâm nhập vào trong hạch bạch huyết, lách, tuyến ức, gan, phổi, thận
--	--	--	--	--	--	--	--	---

Fu chó = 0,28; Fu chuột nhắt = 0,10 (Fu = phần không gắn kết trong huyết tương các loài)

* Số lần tiếp xúc sử dụng TGI60 từ nghiên cứu ghép ngoại lai KPL4 trong 21 ngày; TGI60 @ 4,3uM giờ (tổng) hoặc 0,44uM giờ tiếp xúc tự do

** IC50 biểu hiện CD69 được kích thích bằng a-IgM (máu toàn phần) = 3,1nM

+ Các kết quả liên quan đến cơ quan viêm và cơ quan lympho

(d)

Hợp chất 436 (US8242104) Liều lượng mg/kg/ngày QD	Tiếp xúc			Số lần tiếp xúc* (tổng/tự do, AUC)	Số lần tiếp xúc với CD69 IC50** (tổng, Cmin)	Dấu hiệu lâm sàng	Bệnh lý lâm sàng+	Mô bệnh học+
	AUC0- 24 giờ, D7 (μ M giờ, tổng/tự do)	Cmax D7 (μ M, tổng/tự do)	Cmin D7 (μ M, tổng tổng)					
0,5	3,4/2,3	0,68/0,46	0,016	1,2x/2,3x	0,4x	-	-	Sự tiêu mô bạch huyết: tuyến ức, hạch bạch huyết
2	15/10,2	2,5/1,7	0,059	5,4x/10,2x	1,3x	-	↑ fibrinogen ↑ globulin	Sự tiêu mô bạch huyết: tuyến ức, hạch bạch huyết, lách, GALT

						Hao hút BW (10% với, tiền nghiên cứu) giảm hoạt tính, tiết quá nhiều nước bọt, nôn nhiều và phân bất thường	↓ tế bào lympho ↑ tế bào ưa bạch cầu trung tính ↑ fibrinogen ↑ globulin	Sự tiêu mô bạch huyết: tuyến ức, hạch bạch huyết, lách, GALT Viêm GI: thực quản, dạ dày, ruột kết, manh tràng Viêm toàn thân: tim, động mạch chủ, màng não
6	56/38	6,8/4,6	0,408	20x/38x	9,1x			

Fu chó = 0,68; Fu chuột nhắt = 0,36 (Fu = phần không gắn kết trong huyết tương loài)

* Số lần tiếp xúc sử dụng TGI60 từ nghiên cứu ghép ngoại lai KPL4 trong 21 ngày; TGI60 @ 2,8uM giờ tiếp xúc tổng, 1,0uM giờ tiếp xúc tự do

**IC50 biểu hiện CD69 được kích thích bằng a-IgM (máu toàn phần) = 45nM

+ Các kết quả liên quan đến cơ quan viêm và cơ quan lympho

(e)

alpelisib (BYL-719) Liều lượng mg/kg/ngày QD	Tiếp xúc			Số lần tiếp xúc* (tổng/tự do, AUC)	Số lần tiếp xúc với CD69 IC50** (tổng, Cmin)	Dấu hiệu lâm sàng	Bệnh lý lâm sàng+	Mô bệnh học+
	AUC0- 24 giờ, D7 (uM giờ, tổng/tự do)	Cmax D7 (uM, tổng/tự do)	Cmin D7 (uM, tổng)					
3	14/1,0	1,97/0,14	0,20	0,2x/0,2x	0,3x	-	-	-
10	31,7/2,3	3,58/0,26	0,62	0,4x/0,4x	1,0x	-	↑ fibrinogen	Viêm GI: tế bào ưa bạch cầu trung tính xâm nhập vào, ruột già
30	160/11,5	20,6/1,5	1,25	2,2x/2,0x	2,0x	↓ appetit, ~10% ↓	↑ tế bào ưa bạch cầu trung tính	Sự tiêu mô bạch huyết: tuyến ức, hạch

						BW	↑ đơn bào ↑ globulin ↑ fibrinogen	bạch huyết, GALT Viêm GI: ura bạch cầu trung tính xâm nhập vào ruột già và ruột non; loét trực tràng
--	--	--	--	--	--	----	--	---

F_u chó = 0,072; F_u chuột nhắt = 0,082 (F_u = phần không gắn kết trong huyết tương loài)

* Số lần tiếp xúc sử dụng TGI60 từ nghiên cứu ghép ngoại lai KPL4 trong 21 ngày;
TGI60 @ 72uM giờ (tổng), 5,9uM giờ (tự do)

**IC₅₀ biểu hiện CD69 được kích thích bằng α-IgM (máu toàn phần) = 613nM

+ Các kết quả liên quan đến cơ quan viêm và cơ quan lympho

Dùng hợp chất có công thức I

Hợp chất theo sáng chế có thể được dùng bằng đường bất kỳ thích hợp với tình trạng bệnh lý cần điều trị. Các đường thích hợp bao gồm đường miệng, ngoài đường tiêu hóa (bao gồm dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong da, trong não tủy và gây tê ngoài màng cứng), áp da, trực tràng, mũi, tại chỗ (bao gồm má và dưới lưỡi), âm đạo, trong màng bụng, trong phổi và trong mũi. Để điều trị ức chế miễn dịch cục bộ, hợp chất có thể được dùng bằng cách dùng trong thương tổn, bao gồm truyền dịch hoặc cho miếng ghép tiếp xúc với chất ức chế trước khi cấy ghép. Hiểu được rằng đường được ưu tiên có thể thay đổi theo, ví dụ, tình trạng bệnh lý của đối tượng nhận. Khi hợp chất được dùng qua đường miệng, nó có thể được phối trộn dưới dạng viên tròn, viên nang, viên nén, v.v. với chất mang hoặc tá dược được dùng. Khi hợp chất được

dùng ngoài đường tiêu hóa, nó có thể được phối trộn với chất dẫn thuốc được dùng dùng ngoài đường tiêu hóa và ở dạng đơn vị liều lượng tiêm, như được mô tả chi tiết dưới đây.

Liều lượng để điều trị cho người bệnh có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1mg đến khoảng 1000mg hợp chất có công thức I. Liều lượng điển hình có thể nằm trong khoảng từ khoảng 10mg đến khoảng 300mg hợp chất. Liều lượng có thể được dùng một lần mỗi ngày (QID), hai lần mỗi ngày (BID), hoặc thường xuyên hơn, tùy thuộc vào tính chất dược động học và dược lực học, bao gồm hấp thụ, phân bố, chuyển hóa, và bài tiết của hợp chất cụ thể. Ngoài ra, yếu tố độc tính có thể ảnh hưởng đến liều lượng và chế độ dùng. Khi được dùng qua đường miệng, viên tròn, viên nang, hoặc viên nén có thể được nuốt vào bụng hằng ngày hoặc ít thường xuyên hơn trong một khoảng thời gian cụ thể. Chế độ này có thể lặp lại trong một số chu kỳ trị liệu.

Phương pháp điều trị bằng hợp chất có công thức I

Hợp chất có công thức I theo sáng chế hữu ích để điều trị cho bệnh nhân là người hoặc động vật mắc bệnh hoặc rối loạn bắt nguồn từ sự sinh trưởng tế bào, chức năng hoặc hoạt động của tế bào bất thường liên quan đến PI3K như bệnh ung thư, vì vậy có thể được điều trị theo phương pháp bao gồm bước dùng hợp chất theo sáng chế như được xác định trên đây. Bệnh nhân là người hoặc động vật mắc bệnh ung thư cũng có thể được điều trị theo phương pháp bao gồm bước dùng hợp chất theo sáng chế như được xác định trên đây. Nhờ đó tình trạng bệnh lý của bệnh nhân có thể được cải thiện hoặc tốt lên.

Phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước điều trị bệnh ung thư được chọn từ bệnh ung thư vú, buồng trứng, cổ tử cung, tuyến tiền liệt, tinh hoàn, đường sinh dục niệu, thực quản, thanh quản, u nguyên bào đệm, u nguyên bào thần kinh, ung thư dạ dày, da, u gai sừng, phổi, caxinom dạng biểu bì, caxinom tế bào lớn, caxinom phổi không tế bào nhỏ (NSCLC), caxinom phổi tế bào nhỏ, caxinom tuyến phổi, ung thư xương, ruột kết, u tuyến, tuyến tụy, caxinom tuyến, tuyến giáp, caxinom có nang, caxinom không biệt hóa, caxinom hình nhú, u tinh, u melanin, sarcom, caxinom bàng quang, caxinom gan và đường mật, caxinom thận, tuyến tụy, rối loạn dòng tủy, u lympho, tế bào lông, khoang miệng, mũi-họng, hầu, môi, lưỡi, miệng, ruột non, ruột kết-trực tràng, ruột già, trực tràng, não và hệ thần kinh trung ương, bệnh Hodgkin, bệnh bạch cầu, phế quản,

tuyến giáp, gan và ống mật trong gan, tế bào gan, dạ dày, u thần kinh đệm/u nguyên bào đệm, niêm mạc tử cung, u melanin, thận và bể thận, bong đái, thân tử cung, cổ tử cung, đa u tử, bệnh bạch cầu cấp tính do tủy xương tạo ra, bệnh bạch cầu mạn tính do tủy xương tạo ra, bệnh bạch cầu tế bào lympho, bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu dòng tủy, khoang miệng và hậu, u lympho không phải Hodgkin, u melanin, và u tuyến ruột kết có lông tơ.

Dựa trên phân tích sự biểu hiện, phân tích hóa mô miễn dịch và dựa trên việc tạo profin dòng tế bào, các bệnh ác tính ở ruột kết, vú, cổ tử cung, dạ dày, phổi, và đa u tử là có thể đáp ứng nhiều nhất với chất điều biến hoặc chất ức chế PI3K.

Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất như được mô tả trên đây để điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân.

Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất như được mô tả trên đây để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân.

Sáng chế đề cập đến hợp chất như được mô tả trên đây để sử dụng để điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân.

Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất như được mô tả trên đây để điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân, trong đó bệnh ung thư này được chọn từ bệnh ung thư vú và bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất như được mô tả trên đây để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân, trong đó bệnh ung thư này được chọn từ bệnh ung thư vú và bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Sáng chế đề cập đến hợp chất như được mô tả trên đây để sử dụng để điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân, trong đó bệnh ung thư này được chọn từ bệnh ung thư vú và bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Sáng chế như được mô tả trên đây.

Dược phẩm

Để sử dụng hợp chất theo sáng chế này để điều trị chữa bệnh cho động vật có vú bao gồm người, nó thường được phối trộn theo thực tiễn dược lý tiêu chuẩn làm dược phẩm. Theo khía cạnh này của sáng chế, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hợp chất theo sáng chế này kết hợp với chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Dược phẩm thông thường được bào chế bằng cách trộn hợp chất theo sáng chế và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược. Các chất mang, chất pha loãng và tá dược thích hợp đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này và bao gồm các nguyên liệu như hydrat cacbon, sáp, polyme tan trong nước và/hoặc trương nở trong nước, nguyên liệu ưa nước hoặc kỵ nước, gelatin, dầu, dung môi, nước và nguyên liệu tương tự. Chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược cụ thể được sử dụng sẽ phụ thuộc vào ý nghĩa và mục đích mà hợp chất theo sáng chế được áp dụng. Dung môi thường được chọn dựa trên các dung môi được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này nhận thấy là an toàn (GRAS) để được dùng cho động vật có vú. Nhìn chung, các dung môi an toàn là dung môi chứa nước không độc như nước và các dung môi không độc khác tan được hoặc trộn lẫn được trong nước. Các dung môi chứa nước thích hợp bao gồm nước, etanol, propylen glycol, polyetylen glycol (ví dụ, PEG 400, PEG 300), v.v. và các hỗn hợp của chúng. Dược phẩm này cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất đệm, chất ổn định, chất hoạt động bề mặt, chất thấm ướt, chất bôi trơn, chất nhũ hóa, chất tạo hỗn dịch, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, chất làm đục, chất gây trượt, chất hỗ trợ xử lý, chất tạo màu, chất làm ngọt, chất thơm, chất tạo hương vị và các chất phụ gia đã biết khác để cho thuốc có bề ngoài bắt mắt (tức là, hợp chất theo sáng chế hoặc dược phẩm của chúng) hoặc hỗ trợ sản xuất sản phẩm dược (tức là, thuốc).

Dược phẩm có thể được bào chế bằng cách sử dụng quy trình hòa tan và trộn thông thường. Ví dụ, dược chất đóng khối (tức là, hợp chất theo sáng chế hoặc dạng được làm ổn định của hợp chất (ví dụ, phức chất với dẫn xuất cyclodextrin hoặc chất tạo phức đã biết khác) được hòa tan trong dung môi thích hợp khi có mặt một hoặc nhiều tá dược được mô tả trên đây. Hợp chất theo sáng chế thường được phối trộn thành dạng liều lượng được để tạo ra liều lượng dễ kiểm soát được của thuốc và khiến bệnh nhân có thể tuân thủ chế độ được kê.

Dược phẩm (hoặc chế phẩm) để ứng dụng có thể được đóng gói theo cách khác nhau tùy thuộc vào phương pháp được sử dụng để dùng thuốc. Nhìn chung, vật phẩm để phân bố bao gồm vật chứa có dược phẩm ở trong đó ở dạng thích hợp. Các vật chứa thích hợp là đã biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này và bao gồm các nguyên liệu như chai (chất dẻo và thủy tinh), gói nhỏ, ống thuốc tiêm, túi nhựa, xi lanh kim loại, và nguyên liệu tương tự. Vật chứa này cũng có thể bao gồm bộ lắp ráp chống xâm nhập để ngăn chặn sự xâm nhập vô ý đến các thành phần trong bao gói.

Ngoài ra, vật chứa có nhãn dán trên đó mô tả các thành phần của vật chứa. Nhãn dán cũng có thể bao gồm các cảnh báo thích hợp.

Dược phẩm chứa hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế cho các đường dùng và kiểu dùng khác nhau. Ví dụ, hợp chất có công thức I có độ tinh khiết mong muốn có thể tùy ý được trộn với chất pha loãng, chất mang, tá dược hoặc chất ổn định được dụng (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.), dưới dạng chế phẩm được làm khô lạnh, bột được nghiền, hoặc dung dịch chứa nước. Việc phối trộn có thể được thực hiện bằng cách trộn ở nhiệt độ môi trường ở độ pH thích hợp, và ở độ tinh khiết mong muốn, với chất mang sinh lý dụng, tức là, chất mang không độc cho đối tượng nhận ở liều và nồng độ được sử dụng. Độ pH của dược phẩm chủ yếu phụ thuộc vào việc sử dụng và nồng độ cụ thể của hợp chất, nhưng có thể nằm trong khoảng từ khoảng 3 đến khoảng 8. Dược phẩm trong chất đệm axetat ở độ pH = 5 là phương án thích hợp.

Hợp chất thường có thể được bảo quản dưới dạng chế phẩm rắn, chế phẩm được làm khô lạnh hoặc dưới dạng dung dịch chứa nước.

Dược phẩm theo sáng chế được phối trộn, định liều và được dùng theo cách, tức là, lượng, nồng độ, lịch trình, chu trình, chất dẫn thuốc và đường dùng, phù hợp với thực tiễn y học tốt. Các yếu tố cần cân nhắc trong ngữ cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng lâm sàng của bệnh nhân cụ thể, nguyên nhân gây rối loạn, vị trí phân bố chất, phương pháp dùng, lịch trình dùng, và các yếu tố khác đã biết đối với bác sĩ. "Lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị" của hợp chất được dùng sẽ bị chi phối bởi các yếu tố cần cân nhắc như vậy, và là lượng tối thiểu cần để cải thiện, hoặc điều trị rối loạn tăng sinh.

Là một đề xuất tổng quát, lượng hữu hiệu về mặt dược phẩm ban đầu của chất ức chế được dùng ngoài đường tiêu hóa trong mỗi liều lượng sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 đến 100mg/kg, cụ thể là từ khoảng 0,1 đến 20mg/kg trọng lượng cơ thể bệnh nhân mỗi ngày, với khoảng ban đầu điển hình của hợp chất được sử dụng là từ 0,3 đến 15mg/kg/ngày.

Chất pha loãng, chất mang, tá dược và chất ổn định chấp nhận được là không độc cho đối tượng nhận ở các liều lượng và nồng độ được sử dụng, và bao gồm chất đệm như phosphat, xitrat và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic

và methionin; chất bảo quản (như octadexyldimethylbenzyl amoni clorua; hexameton clorua; benzalkoni clorua, benzetoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc dextrin; chất chelat hóa như EDTA; đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; ion trái dấu tạo muối như natri; phức chất kim loại (ví dụ, phức chất Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như TWEEN™, PLURONICS™ hoặc polyetylen glycol (PEG). Các thành phần hoạt dược cũng có thể được bao trong viên vi nang được bào chế, ví dụ, bằng kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng cách polyme hóa bề mặt chung, ví dụ, hydroxymetylxenluloza hoặc viên vi nang gelatin và viên vi nang poly-(metylmetylacrylat), một cách tương ứng, trong hệ phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt cỡ nano và viên nang cỡ nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Dược phẩm giải phóng kéo dài chứa hợp chất có công thức I có thể được bào chế. Các ví dụ thích hợp về dược phẩm giải phóng kéo dài này bao gồm cơ chất bán thấm của các polyme rắn kỵ nước chứa hợp chất có công thức I, cơ chất này ở dạng vật phẩm được tạo hình, ví dụ, màng, hoặc viên vi nang. Các ví dụ về cơ chất giải phóng kéo dài bao gồm polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyetyl-metylacrylat), hoặc poly(rượu vinylic)), polylactit (US 3773919), copolyme của axit L-glutamic và gama-etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không biến tính, copolyme axit lactic-axit glycolic biến tính như LUPRON DEPOT™ (vi cầu tiêm gồm có copolyme axit lactic-axit glycolic và leuprolit axetat) và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric.

Dược phẩm chứa các thành phần thích hợp cho các đường dùng được nêu chi tiết trong bản mô tả. Dược phẩm có thể thuận lợi có mặt ở dạng đơn vị liều lượng và có thể được điều chế theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực dược phẩm. Các kỹ thuật và dược phẩm thường được tìm thấy trong tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Co., Easton, PA). Các phương pháp như vậy bao gồm bước kết hợp thành phần hoạt tính với chất mang mà cấu thành một hoặc nhiều thành phần phụ. Nhìn chung, dược phẩm được bào chế bằng cách kết

hợp đồng đều và kỹ lưỡng thành phần hoạt tính với chất mang lỏng hoặc chất mang rắn đã được chia đều hoặc cả hai, và sau đó, nếu cần, tạo hình sản phẩm.

Dược phẩm chứa hợp chất có công thức I thích hợp để dùng qua đường miệng có thể được bào chế dưới dạng đơn vị riêng biệt như viên tròn, viên nang, viên nhện hoặc viên nén, mỗi viên này chứa lượng được xác định trước của hợp chất có công thức I. Viên nén được ép có thể được điều chế bằng cách ép trong máy thích hợp, thành phần hoạt tính ở dạng chảy tự do như bột hoặc hạt, tùy ý được trộn với chất liên kết, chất bôi trơn, chất pha loãng trợ, chất bảo quản, chất có hoạt tính bề mặt hoặc chất phân tán. Viên nén được đúc có thể được tạo ra bằng cách đúc, trong máy thích hợp, hỗn hợp của thành phần hoạt tính dạng bột được làm ẩm với chất pha loãng lỏng trợ. Viên nén có thể tùy ý được bao hoặc tạo khía và tùy ý được phối trộn để có được sự giải phóng chậm hoặc giải phóng có kiểm soát của thành phần hoạt tính từ đó. Viên nén, viên dẹt, viên ngậm, hỗn dịch chứa nước hoặc dầu, bột dễ phân tán hoặc hạt dễ phân tán, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, ví dụ, viên nang gelatin, siro hoặc cồn ngọt có thể được điều chế để dùng qua đường miệng. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức I được dự định để dùng qua đường miệng có thể được điều chế theo phương pháp bất kỳ đã biết đối với lĩnh vực này để bào chế dược phẩm và dược phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều chất bao gồm chất làm ngọt, chất tạo hương vị, chất tạo màu và chất bảo quản, để tạo ra dược phẩm dễ được chấp nhận. Viên nén chứa thành phần hoạt tính trong hỗn hợp với tá dược được dùng không độc thích hợp để sản xuất viên nén là chấp nhận được. Các tá dược này có thể là, ví dụ, chất pha loãng trợ, như canxi hoặc natri cacbonat, lactoza, canxi hoặc natri phosphat; chất tạo hạt và chất phân tán, như tinh bột ngô, hoặc axit alginic; chất liên kết, như tinh bột, gelatin hoặc acacia; và chất bôi trơn, như magie stearat, axit stearic hoặc bột talc. Viên nén có thể không được bao hoặc có thể được bao bằng các kỹ thuật đã biết bao gồm tạo vi nang để làm chậm sự phân tán và hấp thụ trong dải dạ dày-ruột và từ đó tạo ra tác động duy trì trong thời gian lâu hơn. Ví dụ, nguyên liệu trì hoãn thời gian như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat một mình hoặc với sáp có thể được sử dụng.

Để điều trị cho mắt hoặc các mô ngoài khác, ví dụ, miệng và da, dược phẩm tốt hơn là được áp dụng dưới dạng thuốc mỡ hoặc kem dùng tại chỗ chứa (các) thành phần hoạt tính với lượng nằm trong khoảng từ, ví dụ, 0,075 đến 20% trọng lượng/trọng lượng. Khi được phối trộn trong thuốc mỡ, các thành phần hoạt tính có thể được sử dụng với

nền thuốc mỡ trong parafin hoặc trộn lẫn được trong nước. Theo một cách khác, các thành phần hoạt tính có thể được phối trộn trong kem với nền kem dầu trong nước. Nếu muốn, pha nước của nền kem có thể bao gồm rượu polyhydric, tức là, rượu có hai hoặc nhiều nhóm hydroxyl như propylen glycol, butan 1,3-diol, manitol, sorbitol, glyxerol và polyetylen glycol (bao gồm PEG 400) và các hỗn hợp của chúng. Dược phẩm dùng tại chỗ có thể mong muốn là chứa hợp chất làm tăng cường sự hấp thụ hoặc thẩm thấu của thành phần hoạt tính qua da hoặc các vùng bị ảnh hưởng khác. Các ví dụ về chất tăng cường thẩm thấu qua da như vậy bao gồm dimetyl sulfoxit và các chất tương tự liên quan. Pha dầu của nhũ tương theo sáng chế này có thể được cấu thành từ các thành phần đã biết theo cách đã biết. Trong khi pha này có thể chỉ bao gồm chất nhũ hóa, mong muốn là bao gồm hỗn hợp của ít nhất một chất nhũ hóa với chất béo hoặc dầu hoặc với cả chất béo và dầu. Tốt hơn là, chất nhũ hóa ưa nước được bao gồm cùng với chất nhũ hóa ưa mỡ mà tác động như chất ổn định. Cũng được ưu tiên là bao gồm cả dầu và chất béo. Cùng với đó, (các) chất nhũ hóa cùng với hoặc không cùng với (các) chất ổn định tạo nên sáp gọi là sáp nhũ hóa, và sáp này cùng với dầu và chất béo tạo nên nền thuốc mỡ gọi là nền thuốc mỡ nhũ hóa tạo ra pha được phân tán trong dầu của dược phẩm dạng kem. Chất nhũ hóa và chất ổn định nhũ tương thích hợp để sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm Tween® 60, Span® 80, rượu xetostearylic, rượu benzylic, rượu myristylic, glyxeryl mono-stearat và natri lauryl sulfat.

Hỗn dịch chứa nước của hợp chất có công thức I chứa nguyên liệu hoạt tính kết hợp với các tá dược thích hợp để sản xuất hỗn dịch chứa nước. Các tá dược như vậy bao gồm chất tạo hỗn dịch, như natri carboxymetylxenluloza, croscarmeloza, povidon, metyloxenluloza, hydroxypropyl metyloxenluloza, natri alginat, polyvinylpyrrolidon, gồm tragacanth và gồm acacia, và chất phân tán hoặc chất thấm ướt như phosphatit có trong tự nhiên (ví dụ, lecithin), sản phẩm ngưng tụ của alkylen oxit với axit béo (ví dụ, polyoxyetylen stearat), sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với rượu béo mạch dài (ví dụ, heptadecaetylenoxycetanol), sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với este một phần thu được từ axit béo và hexitol anhydrit (ví dụ, polyoxyetylen sorbitan monooleat). Hỗn dịch chứa nước cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản như etyl hoặc n-propyl p-hydroxybenzoat, một hoặc nhiều chất tạo màu, một hoặc nhiều chất tạo hương vị và một hoặc nhiều chất làm ngọt, như sucroza hoặc sacarin.

Dược phẩm chứa hợp chất có công thức I có thể ở dạng chế phẩm thuốc tiêm vô trùng, như hỗn dịch chứa nước hoặc chứa dầu tiêm vô trùng. Hỗn dịch này có thể được phối trộn theo tình trạng kỹ thuật đã biết bằng cách sử dụng các chất phân tán hoặc chất thấm ướt thích hợp và chất tạo hỗn dịch đã được đề cập ở trên. Chế phẩm thuốc tiêm vô trùng cũng có thể là dung dịch hoặc hỗn dịch tiêm vô trùng trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc dùng ngoài đường tiêu hóa chấp nhận được, như dung dịch trong 1,3-butandiol hoặc được điều chế dưới dạng bột được làm khô lạnh. Trong số các chất dẫn thuốc và dung môi chấp nhận được mà có thể được sử dụng là nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, dầu không bay hơi vô trùng có thể thường được sử dụng làm dung môi hoặc môi trường tạo hỗn dịch. Nhằm mục đích này, dầu không bay hơi dịu nhẹ bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm mono- hoặc diglyxerit tổng hợp. Ngoài ra, axit béo như axit oleic cũng có thể được sử dụng trong bào chế dược phẩm tiêm.

Lượng thành phần hoạt tính có thể được kết hợp với nguyên liệu mang để tạo ra dạng liều lượng đơn lẻ thay đổi tùy thuộc vào vật chủ được điều trị và cách dùng cụ thể. Ví dụ, dược phẩm giải phóng theo thời gian được dự định để dùng qua đường miệng cho người có thể chứa khoảng từ 1 đến 1000mg nguyên liệu hoạt tính kết hợp với lượng thích hợp và thuận tiện của nguyên liệu mang mà có thể thay đổi từ khoảng 5 đến khoảng 95% tổng dược phẩm (trọng lượng:trọng lượng). Dược phẩm có thể được bào chế để tạo ra lượng dễ xác định được để dùng. Ví dụ, dung dịch chứa nước được dự định để truyền trong tĩnh mạch có thể chứa từ khoảng 3 đến 500 μ g thành phần hoạt tính trong mỗi mililit dung dịch để có thể diễn ra việc truyền thể tích thích hợp ở tốc độ khoảng 30mL/giờ.

Dược phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch tiêm vô trùng chứa nước và không chứa nước mà có thể chứa chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm khuẩn và chất tan mang lại cho dược phẩm tính đẳng trương với máu của đối tượng nhận được dự định; và hỗn dịch vô trùng chứa nước và không chứa nước có thể bao gồm chất tạo hỗn dịch và chất làm đặc.

Dược phẩm thích hợp để dùng tại chỗ cho mắt cũng bao gồm thuốc nhỏ mắt trong đó thành phần hoạt tính được hòa tan hoặc tạo hỗn dịch trong chất mang thích hợp, đặc biệt là dung môi chứa nước dùng cho thành phần hoạt tính. Thành phần hoạt tính tốt hơn là có mặt trong dược phẩm này ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20% trọng

lượng/trọng lượng, ví dụ, từ khoảng 0,5 đến 10% trọng lượng/trọng lượng, ví dụ, từ khoảng 1,5% trọng lượng/trọng lượng.

Dược phẩm thích hợp để dùng tại chỗ trong miệng bao gồm viên ngậm bao gồm thành phần hoạt tính trong nền được tạo hương vị, thường là sucroza và acaxia hoặc tragacanth; viên ngậm bao gồm thành phần hoạt tính trong nền trợ như gelatin và glyxerin, hoặc sucroza và acaxia; và nước súc miệng bao gồm thành phần hoạt tính trong chất mang lỏng thích hợp.

Dược phẩm để dùng trong trực tràng có thể có mặt dưới dạng thuốc đạn với nền thích hợp bao gồm ví dụ, bơ cacao hoặc salicylat.

Dược phẩm thích hợp để dùng trong phổi hoặc mũi có cỡ hạt ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 500 micron (bao gồm cỡ hạt nằm trong khoảng từ 0,1 đến 500 micron trong số gia micron như 0,5, 1, 30 micron, 35 micron, v.v.), được dùng bằng cách xông hít nhanh qua đường mũi hoặc bằng cách xông hít qua miệng để tiến đến túi phế nang. Dược phẩm thích hợp bao gồm dung dịch chứa nước hoặc chứa dầu chứa thành phần hoạt tính. Dược phẩm thích hợp để dùng ở dạng sol khí hoặc bột khô có thể được bào chế theo phương pháp thông thường và có thể được phân bố với các chất trị liệu khác như hợp chất đến nay được sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn như được mô tả dưới đây.

Dược phẩm thích hợp để dùng trong âm đạo có thể có mặt ở dạng thuốc đặt vào âm đạo, nút bông, kem, gel, hồ nhão, bột hoặc chế phẩm phun chứa, ngoài thành phần hoạt tính, các chất mang như đã biết trong lĩnh vực này là thích hợp.

Dược phẩm có thể được đóng gói trong vật chứa liều đơn vị hoặc vật chứa nhiều liều, ví dụ, ống thuốc tiêm và ống kín, và có thể được bảo quản trong điều kiện đông-khô (được làm khô lạnh) chỉ đòi hỏi phải bổ sung chất mang lỏng vô trùng, ví dụ, nước dùng để tiêm ngay trước khi sử dụng. Dung dịch tiêm và hỗn dịch chế ngay tức thì được điều chế từ bột, hạt vô trùng và viên nén thuộc loại được mô tả trên đây. Dược phẩm dạng đơn vị liều lượng được ưu tiên là dược phẩm chứa liều hằng ngày hoặc liều đơn vị con hằng ngày, như được trích dẫn trên đây, hoặc phần thích hợp của chúng, của thành phần hoạt tính.

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm dùng trong thú y bao gồm ít nhất một thành phần hoạt tính như được xác định trên đây cùng với chất mang dùng trong thú y theo đó.

Chất mang dùng trong thú y là nguyên liệu hữu ích cho mục đích dùng dược phẩm và có thể là nguyên liệu rắn, lỏng hoặc khí mà trợ hoặc chấp nhận được trong lĩnh vực thú y và tương thích với thành phần hoạt tính. Các dược phẩm dùng trong thú y này có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, qua đường miệng hoặc bằng đường mong muốn bất kỳ khác.

Liệu pháp kết hợp

Hợp chất có công thức I có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất trị liệu bổ sung để điều trị bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây, như viêm hoặc rối loạn tăng sinh (ví dụ, bệnh ung thư). Theo một số phương án nhất định, hợp chất có công thức I được kết hợp trong dược phẩm kết hợp, hoặc chế độ định liều làm liệu pháp kết hợp, với hợp chất trị liệu thứ hai bổ sung có tính kháng viêm hoặc chống tăng sinh hoặc hữu ích để điều trị chứng viêm, rối loạn đáp ứng miễn dịch, hoặc rối loạn tăng sinh (ví dụ, bệnh ung thư). Chất trị liệu bổ sung này có thể là chất ức chế Bcl-2, chất ức chế JAK, chất kháng viêm, chất điều biến miễn dịch, chất hóa trị, chất tăng cường chết tế bào theo chương trình, yếu tố hướng thần kinh, chất để điều trị bệnh tim mạch, chất để điều trị bệnh gan, chất kháng virus, chất để điều trị các rối loạn máu, chất để điều trị tiểu đường, và chất để điều trị rối loạn thiếu hụt miễn dịch. Chất trị liệu thứ hai có thể là chất kháng viêm NSAID. Chất trị liệu thứ hai có thể là chất hóa trị. Hợp chất thứ hai của dược phẩm kết hợp hoặc chế độ định liều tốt hơn là có các hoạt tính bổ sung cho hợp chất có công thức I sao cho chúng không ảnh hưởng bất lợi đến nhau. Hợp chất này có mặt một cách thích hợp trong tổ hợp với các lượng hữu hiệu đối với mục đích được dự định. Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế này chứa hợp chất có công thức I, hoặc chất đồng phân lập thể, chất hồ biến, solvat, chất chuyển hóa, hoặc muối được dùng hoặc tiền dược chất của chúng, kết hợp với chất trị liệu như NSAID.

Liệu pháp kết hợp có thể được dùng dưới dạng chế độ đồng thời hoặc tuần tự. Khi được dùng tuần tự, tổ hợp này có thể được dùng trong hai hoặc nhiều lần dùng. Việc dùng kết hợp bao gồm dùng đồng thời, dùng riêng các dược phẩm hoặc dược phẩm duy nhất, và dùng liên tục theo thứ tự, trong đó tốt hơn là có khoảng thời gian trong khi cả hai (hoặc tất cả các) hoạt chất đồng thời tạo ra hoạt tính sinh học của chúng.

Liều lượng thích hợp cho chất dùng đồng thời bất kỳ trong số các chất được dùng đồng thời nêu trên là liều lượng hiện được sử dụng và có thể được giảm đi do tác động

kết hợp (hiệp đồng) của chất vừa được biết đến và các chất trị liệu hoặc chất điều trị khác.

Liệu pháp kết hợp có thể tạo ra "tác dụng hiệp đồng" và thể hiện "tính hiệp đồng", tức là, tác dụng đạt được khi các thành phần hoạt tính được sử dụng cùng nhau lớn hơn so với tổng các tác dụng có được khi sử dụng các hợp chất riêng rẽ. Tác dụng hiệp đồng có thể đạt được khi các thành phần hoạt tính: (1) được phối trộn đồng thời và được dùng hoặc được phân bố đồng thời trong chế phẩm đơn vị liều lượng kết hợp; (2) được phân bố bằng cách thay đổi hoặc dùng song song như các chế phẩm riêng rẽ; hoặc (3) bằng một số chế độ khác. Khi được phân bố trong liệu pháp thay thế, tác dụng hiệp đồng có thể đạt được khi các hợp chất được dùng hoặc được phân bố tuần tự, ví dụ, bằng các lần tiêm khác nhau trong các xi lanh riêng rẽ, các viên tròn hoặc các viên nang riêng rẽ, hoặc dung dịch truyền riêng rẽ. Nhìn chung, trong liệu pháp thay thế, liều lượng hữu hiệu của mỗi thành phần hoạt tính được dùng theo thứ tự, tức là, theo dãy, trong khi đó trong liệu pháp kết hợp, liều lượng hữu hiệu của hai hoặc nhiều thành phần hoạt tính được dùng cùng nhau.

Theo một phương án cụ thể về liệu pháp, hợp chất có công thức I, hoặc chất đồng phân lập thể, chất hỗ biến, solvat, chất chuyển hóa, hoặc muối được dùng hoặc tiền được chất của nó, có thể được kết hợp với chất trị liệu khác, chất hormon hoặc chất kháng thể như các chất được mô tả ở đây, cũng như được kết hợp với liệu pháp phẫu thuật và liệu pháp phóng xạ. Do đó, liệu pháp kết hợp theo sáng chế bao gồm bước dùng ít nhất một hợp chất có công thức I, hoặc chất đồng phân lập thể, chất hỗ biến, solvat, chất chuyển hóa, hoặc muối được dùng hoặc tiền được chất của nó, và sử dụng ít nhất một phương pháp điều trị ung thư khác. Các lượng (các) hợp chất có công thức I và (các) chất trị liệu hoạt động khác và thời điểm dùng thích hợp được chọn để đạt được tác dụng trị liệu kết hợp mong muốn.

Chất trị liệu bổ sung được sử dụng kết hợp với hợp chất có công thức I bao gồm 5-FU, docetaxel, eribulin, gemxitabin, cobimetinib, ipatasertib, paclitaxel, tamoxifen, fulvestrant, GDC-0810, dexametason, palbociclib, bevacizumab, pertuzumab, trastuzumab emtansin, trastuzumab và letrozol.

Chất chuyển hóa của hợp chất có công thức I

Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế này là các sản phẩm chuyển hóa *in vivo* có công thức I được mô tả ở đây. Các sản phẩm này có thể thu được từ, ví dụ, quá trình oxy hóa, khử, thủy phân, amit hóa, khử amit hóa, este hóa, khử este hóa, phân lập enzym, và quá trình tương tự, của hợp chất được sử dụng. Do đó, sáng chế bao gồm các chất chuyển hóa của hợp chất có công thức I, bao gồm các hợp chất được tạo ra bởi quá trình bao gồm bước cho hợp chất theo sáng chế này tiếp xúc với động vật có vú trong một khoảng thời gian đủ để tạo ra sản phẩm chuyển hóa của chúng.

Sản phẩm chuyển hóa thường được nhận biết bằng cách chuẩn bị chất đồng vị được đánh dấu phóng xạ (ví dụ, ^{14}C hoặc ^3H) của hợp chất theo sáng chế, sử dụng nó ngoài đường tiêu hóa ở liều phát hiện được (ví dụ, lớn hơn khoảng 0,5mg/kg) cho động vật như chuột cống, chuột nhắt, chuột lang, khỉ, hoặc cho người, cho phép đủ thời gian để diễn ra chuyển hóa (thường là khoảng từ 30 giây đến 30 giờ) và phân tách các sản phẩm chuyển hóa của nó từ nước tiểu, máu hoặc các mẫu sinh học khác. Các sản phẩm này được phân lập dễ dàng do chúng được đánh dấu (các sản phẩm khác được phân lập bằng cách sử dụng kháng thể có khả năng gắn kết các epitop sống sót trong chất chuyển hóa). Cấu trúc chất chuyển hóa được xác định theo cách thông thường, ví dụ, bằng phân tích MS, LC/MS hoặc NMR. Nhìn chung, việc phân tích chất chuyển hóa được thực hiện theo cách giống như các nghiên cứu chuyển hóa thuốc thông thường đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Các sản phẩm chuyển hóa, miễn là chúng không được phát hiện *in vivo*, đều hữu ích trong thử nghiệm chẩn đoán để định liều trị liệu của hợp chất theo sáng chế.

Vật phẩm

Theo một phương án khác của sáng chế, sáng chế đề xuất vật phẩm, hoặc "bộ kit", chứa nguyên liệu hữu ích cho việc điều trị các bệnh và rối loạn được mô tả trên đây. Theo một phương án, bộ kit bao gồm vật chứa chứa hợp chất có công thức I, hoặc chất đồng phân lập thể, chất hỗ biến, solvat, chất chuyển hóa, hoặc muối được dùng hoặc tiền dược chất của chúng. Bộ kit còn có thể bao gồm nhãn dán hoặc tờ rời kèm theo bao gói ở trên hoặc kết hợp với vật chứa. Thuật ngữ "tờ rời kèm theo bao gói" được sử dụng để chỉ các chỉ dẫn thường được bao gồm trong bao gói chứa sản phẩm trị liệu bán trên thị trường chứa thông tin về chỉ định, sử dụng, liều lượng, dùng, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm trị liệu này. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xi lanh, bao bì xộp, v.v.. Vật chứa có thể được làm từ các

nguyên liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Vật chứa có thể giữ hợp chất có công thức I hoặc chế phẩm của nó mà hữu hiệu để điều trị tình trạng bệnh lý và có thể có cổng vào vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là túi dung dịch dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút đâm xuyên qua được bởi kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong dược phẩm là hợp chất có công thức I. Nhãn dán hoặc tờ rời kèm theo bao gói chỉ ra rằng dược phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý được lựa chọn, như bệnh ung thư. Ngoài ra, nhãn dán hoặc tờ rời kèm theo bao gói có thể chỉ ra rằng bệnh nhân cần điều trị là bệnh nhân có rối loạn như rối loạn tăng sinh, thoái hóa thần kinh, phì đại tim, đau, đau nửa đầu hoặc bệnh hoặc sự kiện sang chấn não. Theo một phương án, nhãn dán hoặc tờ rời kèm theo bao gói chỉ ra rằng dược phẩm chứa hợp chất có công thức I có thể được sử dụng để điều trị rối loạn bắt nguồn từ sự sinh trưởng tế bào bất thường. Nhãn dán hoặc tờ rời kèm theo bao gói cũng có thể chỉ ra rằng dược phẩm có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn khác. Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm còn có thể bao gồm vật chứa thứ hai bao gồm chất đệm dược dụng, như nước kim khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối được đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó còn có thể bao gồm các nguyên liệu khác được mong muốn theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các chất đệm khác, chất pha loãng, chất lọc, kim, và xi lanh.

Bộ kit còn có thể bao gồm các chỉ dẫn về việc sử dụng hợp chất có công thức I và, nếu có, dược phẩm thứ hai. Ví dụ, nếu bộ kit bao gồm dược phẩm thứ nhất chứa hợp chất có công thức I và dược phẩm thứ hai, bộ kit này còn có thể bao gồm các chỉ dẫn về việc dùng đồng thời, tuần tự hoặc riêng rẽ dược phẩm thứ nhất và thứ hai cho bệnh nhân cần điều trị.

Theo một phương án khác, bộ kit này thích hợp để phân phối hợp chất có công thức I ở dạng rắn dùng qua đường miệng, như viên nén hoặc viên nang. Bộ kit này tốt hơn là bao gồm một số đơn vị liều lượng. Bộ kit này có thể bao gồm thẻ có liều lượng được định hướng theo thứ tự sử dụng được dự định của chúng. Một ví dụ về bộ kit này là "bao bì xộp". Bao bì xộp đã được biết rõ trong ngành công nghiệp đóng gói và được sử dụng rộng rãi để đóng gói các dạng đơn vị liều lượng dược phẩm. Nếu muốn, dạng hỗ trợ ghi nhớ có thể được cung cấp, ví dụ, dưới dạng ký tự số, chữ, hoặc các dấu hiệu khác hoặc với lịch rời, chỉ rõ ngày trong lịch trình điều trị trong đó các liều lượng có thể được dùng.

Theo một phương án, bộ kit có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất có hợp chất có công thức I được chứa trong đó; và tùy ý (b) vật chứa thứ hai có được phẩm thứ hai được chứa trong đó, trong đó được phẩm thứ hai này chứa hợp chất thứ hai có hoạt tính chống tăng sinh. Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, bộ kit còn có thể bao gồm vật chứa thứ ba chứa chất đệm được dụng, như nước kim khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối được đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó còn có thể bao gồm các nguyên liệu khác được mong muốn theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các chất đệm khác, chất pha loãng, chất lọc, kim, và xi lanh.

Theo một số phương án khác trong đó bộ kit bao gồm chế phẩm có công thức I và chất trị liệu thứ hai, bộ kit này có thể bao gồm vật chứa để chứa các chế phẩm riêng rẽ như chai được chia nhỏ hoặc gói nhỏ được chia nhỏ, tuy nhiên, các chế phẩm riêng rẽ này cũng có thể được chứa trong vật chứa riêng rẽ, không được chia nhỏ. Thông thường, bộ kit bao gồm các chỉ dẫn về việc sử dụng các thành phần riêng rẽ. Dạng bộ kit đặc biệt có lợi khi các thành phần riêng rẽ tốt hơn là được dùng ở các dạng liều lượng khác nhau (ví dụ, qua đường miệng và ngoài đường tiêu hóa), được dùng ở các khoảng cách liều lượng khác nhau, hoặc khi bác sĩ kê đơn mong muốn chuẩn độ các thành phần riêng rẽ của tổ hợp này.

Điều chế hợp chất có công thức I

Hợp chất có công thức I có thể được tổng hợp bằng các đường tổng hợp bao gồm các quy trình tương tự như các quy trình đã biết rõ trong lĩnh vực hóa học, cụ thể là theo phần mô tả có trong bản mô tả này, và các quy trình về dị vòng khác được mô tả trong: Comprehensive Heterocyclic Chemistry II, Editors Katritzky and Rees, Elsevier, 1997, ví dụ Tập 3; Liebigs Annalen der Chemie, (9):1910-16, (1985); Helvetica Chimica Acta, 41:1052-60, (1958); Arzneimittel-Forschung, 40(12):1328-31, (1990), mỗi tài liệu được kết hợp rõ ràng bằng cách viện dẫn. Các nguyên liệu ban đầu thường sẵn có từ các nguồn thương mại như Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI) hoặc dễ dàng điều chế được bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này (ví dụ, được điều chế bằng các phương pháp thường được mô tả trong Louis F. Fieser and Mary Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, v. 1-23, Wiley, N.Y. (1967-2006 ed.), hoặc *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie*, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlin, bao gồm các tài liệu bổ sung (cũng sẵn có thông qua cơ sở dữ liệu trực tuyến Beilstein).

Các biến đổi hóa học tổng hợp và phương pháp nhóm bảo vệ (bảo vệ và khử bảo vệ) hữu ích trong tổng hợp hợp chất có công thức I và các chất phản ứng cần thiết và hợp chất trung gian là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, các biến đổi và phương pháp được mô tả trong R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley and Sons (1999); và L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995) và các ấn bản sau đó của chúng.

Các Ví dụ nêu các phương pháp lấy làm ví dụ để điều chế hợp chất có công thức I. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các đường tổng hợp khác có thể được sử dụng để tổng hợp hợp chất có công thức I. Mặc dù các nguyên liệu ban đầu và chất phản ứng cụ thể được thể hiện và được mô tả trong các hình vẽ và các Ví dụ, các nguyên liệu ban đầu và chất phản ứng khác có thể dễ dàng được thể để tạo ra các dẫn xuất và/hoặc điều kiện phản ứng khác nhau. Ngoài ra, nhiều hợp chất lấy làm ví dụ được điều chế bằng các phương pháp được mô tả có thể được biến đổi thêm theo sáng chế bằng cách sử dụng hóa học thông thường đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này.

Trong việc điều chế hợp chất có công thức I, việc bảo vệ nhóm chức ở xa (ví dụ, amin bậc một hoặc bậc hai) của hợp chất trung gian có thể là cần thiết. Nhu cầu về việc bảo vệ này thay đổi tùy thuộc vào bản chất của nhóm chức ở xa và điều kiện của phương pháp điều chế. Các nhóm bảo vệ amin thích hợp bao gồm axetyl, trifloaxetyl, t-butoxycarbonyl (BOC), benzyloxycarbonyl (CBz) và 9-fluorenylmetylenoxycarbonyl (Fmoc). Nhu cầu về việc bảo vệ này được xác định dễ dàng bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Để có mô tả chung về các nhóm bảo vệ và cách sử dụng chúng, xem T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

Trong các phương pháp điều chế hợp chất có công thức I, có thể có lợi nếu tách các sản phẩm phản ứng khỏi nhau và/hoặc khỏi nguyên liệu ban đầu. Sản phẩm mong muốn của mỗi bước hoặc loạt các bước được tách ra và/hoặc được tinh chế đến độ đồng nhất mong muốn bằng các kỹ thuật phổ biến trong lĩnh vực này. Thông thường, việc tách này bao gồm việc chiết nhiều pha, kết tinh từ dung môi hoặc dung môi hỗn hợp, chưng cất, thăng hoa, hoặc sắc ký. Sắc ký có thể bao gồm một số phương pháp bất kỳ

bao gồm, ví dụ: pha đảo và pha thường; loại trừ kích cỡ; trao đổi ion; phương pháp và thiết bị sắc ký lỏng cao áp, trung bình và thấp áp; phân tích quy mô nhỏ; mô hình sắc ký giả chuyển động (SMB) và sắc ký lớp mỏng hoặc dày điều chế, cũng như các kỹ thuật sắc ký lớp mỏng quy mô nhỏ và sắc ký nhanh.

Một nhóm các phương pháp tách khác bao gồm xử lý hỗn hợp bằng chất phản ứng được chọn để liên kết với hoặc mang lại tính dễ tách sản phẩm mong muốn, nguyên liệu ban đầu không phản ứng, phản ứng bằng sản phẩm, hoặc dạng tương tự. Các chất phản ứng này bao gồm chất hấp phụ hoặc chất hấp thụ như cacbon hoạt tính, sàng phân tử, môi trường trao đổi ion, hoặc chất tương tự. Theo một cách khác, các chất phản ứng có thể là axit trong trường hợp nguyên liệu bazơ, bazơ trong trường hợp nguyên liệu axit, chất phản ứng liên kết như kháng thể, protein liên kết, chất chelat hóa chọn lọc như vòng hoa ete, chất phản ứng tách chiết ion lỏng/lỏng (LIX), hoặc chất tương tự. Việc chọn lọc phương pháp tách thích hợp phụ thuộc vào bản chất của nguyên liệu được bao gồm, như, điểm sôi và phân tử lượng khi chưng cất và thăng hoa, có hoặc không có nhóm chức phân cực trong sắc ký, độ ổn định của nguyên liệu trong môi trường axit và bazơ trong khi chiết nhiều pha, và yếu tố tương tự.

Hỗn hợp đồng phân không đối quang có thể được tách ra thành các chất đồng phân không đối quang riêng rẽ của chúng trên cơ sở sự khác biệt lý hóa bằng các phương pháp đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, như bằng cách sắc ký và/hoặc kết tinh phân đoạn. Các chất đồng phân đối ảnh có thể được tách bằng cách chuyển hóa hỗn hợp đồng phân đối ảnh thành hỗn hợp đồng phân không đối quang bằng cách cho phản ứng với hợp chất quang hoạt thích hợp (ví dụ, chất hỗ trợ bất đối xứng như rượu bất đối xứng hoặc clorua axit Mosher), tách các chất đồng phân không đối quang và chuyển hóa (ví dụ, thủy phân) chất đồng phân không đối quang riêng rẽ thành chất đồng phân đối ảnh tinh khiết tương ứng. Tương tự, một số hợp chất theo sáng chế có thể là chất đồng phân atrop (ví dụ, biaryl được thế) và được coi là một phần của sáng chế này. Chất đồng phân đối ảnh cũng có thể được tách bằng cách sử dụng cột HPLC bất đối xứng.

Chất đồng phân lập thể đơn lẻ, ví dụ, chất đồng phân đối ảnh, gần như không có chất đồng phân lập thể của nó có thể thu được bằng cách hòa tan hỗn hợp triet quang bằng cách sử dụng phương pháp như tạo ra chất đồng phân không đối quang bằng cách sử dụng chất phân giải quang hoạt (Eliel, E. and Wilen, S. "Stereochemistry of Organic

Compounds,” John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994; Lochmuller, C. H., (1975) *J. Chromatogr.*, 113(3):283-302). Hỗn hợp triệt quang của hợp chất bất đối xứng theo sáng chế có thể được tách và phân tách theo phương pháp thích hợp bất kỳ, bao gồm: (1) tạo muối ion đồng phân không đối quang với hợp chất bất đối xứng và tách theo phương pháp kết tinh phân đoạn hoặc các phương pháp khác, (2) tạo hợp chất đồng phân không đối quang với chất phản ứng dẫn xuất bất đối xứng, tách các chất đồng phân không đối quang, và chuyển hóa thành chất đồng phân lập thể tinh khiết, và (3) tách chất đồng phân lập thể gần như tinh khiết hoặc được làm giàu trực tiếp trong điều kiện bất đối xứng. Xem: “Drug Stereochemistry, Analytical Methods and Pharmacology,” Irving W. Wainer, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1993).

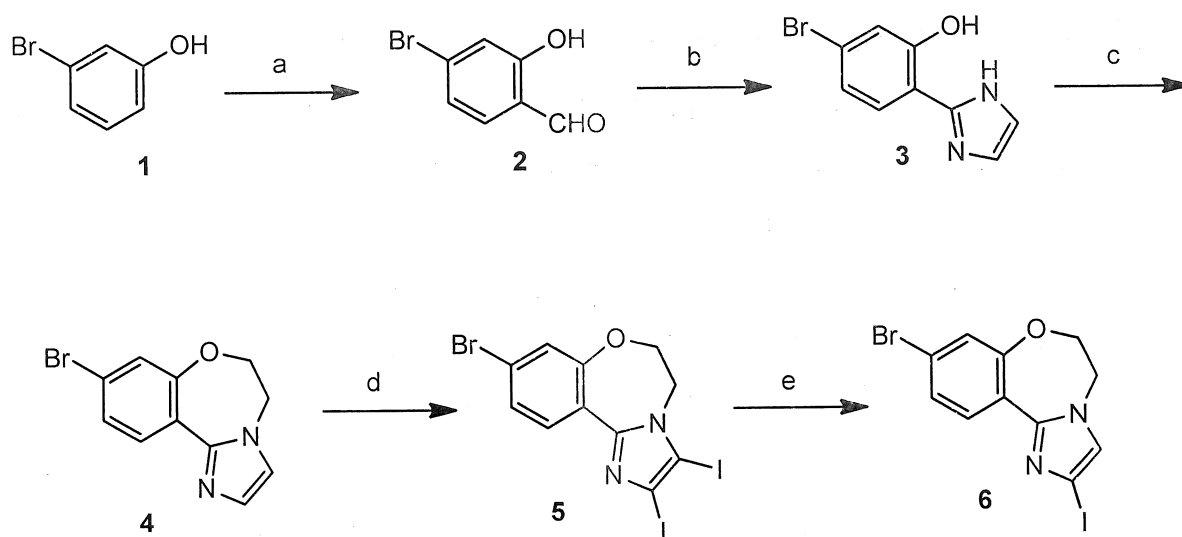
Trong phương pháp (1), muối đồng phân không đối quang có thể được tạo ra nhờ phản ứng của bazơ bất đối xứng tinh khiết đồng phân đối ảnh như bruxin, quinin, ephedrin, strychnin, α -metyl- β -phenyletylamin (amphetamin), và bazơ tương tự với hợp chất không đối xứng mang nhóm chức axit, như axit carboxylic và axit sulfonic. Muối đồng phân không đối quang có thể được cảm ứng để tách bằng cách kết tinh phân đoạn hoặc sắc ký ion. Để tách các chất đồng phân quang học của hợp chất amin, việc bổ sung axit carboxylic hoặc axit sulfonic bất đối xứng, như axit camphorsulfonic, axit tartaric, axit mandelic, hoặc axit lactic có thể dẫn đến việc tạo ra muối đồng phân không đối quang.

Theo một cách khác, theo phương pháp (2), chất nền cần phân giải được cho phản ứng với một chất đồng phân đối ảnh của hợp chất bất đối xứng để tạo ra cặp đồng phân không đối quang (E. and Wilen, S. “Stereochemistry of Organic Compounds”, John Wiley & Sons, Inc., 1994, p. 322). Hợp chất đồng phân không đối quang có thể được tạo ra bằng cách cho hợp chất không đối xứng phản ứng với chất phản ứng dẫn xuất bất đối xứng tinh khiết đồng phân đối ảnh, như dẫn xuất mentyl, sau đó tách các chất đồng phân không đối quang và thủy phân để tạo ra chất đồng phân đối ảnh tinh khiết hoặc được làm giàu. Phương pháp xác định độ tinh khiết quang học bao gồm bước tạo ra este bất đối xứng, như mentyl este, ví dụ, (-) mentyl cloformat khi có mặt bazơ, hoặc Mosher este, α -metoxy- α -(triflometyl)phenyl axetat (Jacob III. *J. Org. Chem.* (1982) 47:4165), của hỗn hợp triệt quang, và phân tích phổ ^1H NMR về sự có mặt của hai chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang đồng phân atrop. Các chất đồng phân không đối quang ổn định của hợp chất đồng phân atrop có thể được tách và phân tách

bằng kỹ thuật sắc ký pha thường và pha đảo theo phương pháp tách naphtyl-isoquinolin đồng phân atrop (WO 96/15111). Theo phương pháp (3), hỗn hợp triệt quang của hai chất đồng phân đối ảnh có thể được tách bằng sắc ký bằng cách sử dụng pha tĩnh bất đối xứng (“Chiral Liquid Chromatography” (1989) W. J. Lough, Ed., Chapman and Hall, New York; Okamoto, J. Chromatogr., (1990) 513:375-378). Chất đồng phân đối ảnh được làm giàu hoặc được tinh chế có thể được phân biệt bằng các phương pháp được sử dụng để phân biệt các phân tử bất đối xứng khác nhau với nguyên tử cacbon không đối xứng, như quay quang và lưỡng sắc tròn.

Hợp chất theo sáng chế được điều chế như được minh họa trong Sơ đồ chung 1 và 2.

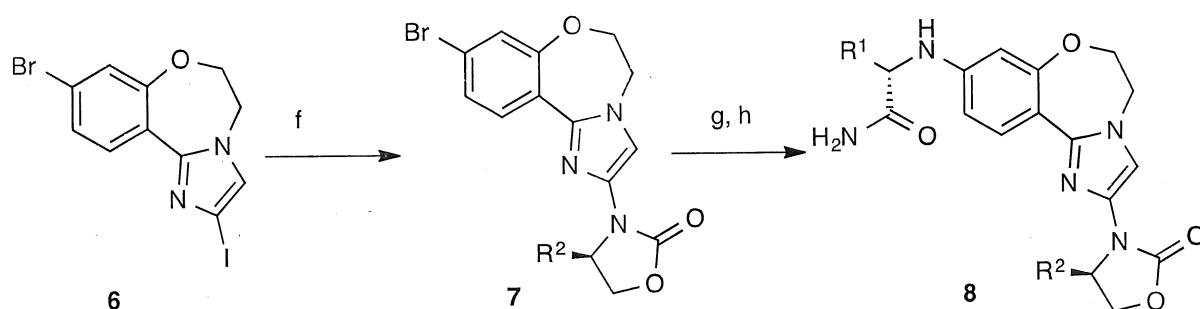
Sơ đồ 1.



a) MgCl_2 , trietylamin, paraformaldehyt, axetonitril, nhiệt; b) oxaldehyt, amoni hydroxit, nhiệt; c) xesi cacbonat, 1,2-dibromoetan, DMF, nhiệt; d) N-iodosuccinimit, DMF, nhiệt; e) i. EtMgBr , THF, -20°C , ii. amoni clorua chứa nước

Như được thể hiện trong Sơ đồ 1, 4-bromo-2-hydroxybenzaldehyt có công thức 2 có thể thu được bằng cách formyl hóa 3-bromophenol bán trên thị trường. Gia nhiệt hợp chất có công thức 2 với oxaldehyt và amoni hydroxit để tạo ra hợp chất có công thức 3. Vòng oxazepin có thể được tạo ra bằng cách gia nhiệt hợp chất có công thức 3 với 1,2-dibromoetan. Bis iot hóa có thể được kích thích bằng cách cho phản ứng với N-iodosuccinimit, và nhóm 3-iodo được loại bỏ một cách chọn lọc thông qua việc xử lý bằng etyl magie bromua ở nhiệt độ giảm, để tạo ra hợp chất có công thức 6.

Sơ đồ 2



f) oxazolidin-2-on được thế ở vị trí 4, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, *trans*-*N,N'*-dimetylxyclohexan-1,2-diamin, kali cacbonat, dioxan, nhiệt; g) $\text{HN}(\text{R}^2)\text{CH}(\text{R}^1)\text{CO}_2\text{H}$, CuI , K_3PO_4 , DMSO, nhiệt; h) amoni clorua, trietylamin, HATU (1-[bis(dimetylamino)metylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridini 3-oxit hexaflorophosphat)

Như được thể hiện trong Sơ đồ 2, hợp chất có công thức 6 có thể được kết hợp với oxazolidin-2-on được thế thích hợp bằng cách sử dụng xúc tác đồng để tạo ra hợp chất có công thức 7. Hợp chất trung gian bromo 7 có thể được kết hợp với axit amin được thế thích hợp trong điều kiện xúc tác đồng, sau đó amit qua trung gian HATU kết hợp với amoni clorua để tạo ra hợp chất có công thức 8.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ký tự viết tắt

DMSO	Dimetyl sulfoxit
ESI	Ion hóa tia điện
HPLC	Sắc ký lỏng cao áp
LCMS	Phép đo phổ khối sắc ký lỏng
min	Phút
N	Bình thường
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân
R_T	Thời gian lưu

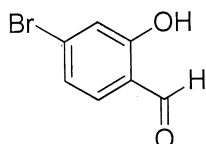
LCMS Phương pháp A: Các thử nghiệm được thực hiện trên phổ khối kế bốn cực Waters Micromass ZQ2000 liên kết với hệ thống Waters Acquity UPLC có thiết bị dò PDA UV. Phổ kế có nguồn tia điện vận hành theo kiểu ion dương và ion âm. Hệ thống

này sử dụng cột Acquity BEH C18 1,7 μ m 100 x 2,1mm, được duy trì ở nhiệt độ 40°C hoặc cột Acquity BEH Shield RP18 1,7 μ m 100 x 2,1mm, được duy trì ở nhiệt độ 40°C và tốc độ dòng chảy 0,4mL/phút. Hệ dung môi ban đầu là 95% nước chứa axit formic 0,1% (dung môi A) và 5% axetonitril chứa axit formic 0,1% (dung môi B) trong 0,4 phút đầu tiên sau đó là gradien lên đến 5% dung môi A và 95% dung môi B trong 5,6 phút tiếp theo. Quá trình này được duy trì trong 0,8 phút trước khi quay trở lại 95% dung môi A và 5% dung môi B trong 0,2 phút tiếp theo. Tổng thời gian vận hành là 8 phút.

LCMS Phương pháp B: Các thử nghiệm được thực hiện trên Agilent 1100 HPLC kết hợp với máy đo phổ khối Agilent MSD bằng cách sử dụng ESI làm nguồn ion hóa. Bước tách LC sử dụng cột Phenomenex XB-C18, 1,7mm, 50 x 2,1mm với tốc độ dòng chảy 0,4 mL/phút. Dung môi A là nước chứa axit formic 0,1% và dung môi B là axetonitril chứa axit formic 0,1%. Gradien phù hợp với 2 - 98% dung môi B trong 7 phút và giữ 97% B trong 1,5 phút sau đó cân bằng trong 1,5 phút. Nhiệt độ cột LC là 40°C. Hấp phụ UV được thu thập ở 220nm và 254nm và phổ khối quét toàn bộ được áp dụng vào tất cả các thử nghiệm.

Ví dụ 101 (S)-2-((2-((S)-4-(diflometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-*a*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)propanamit **101**

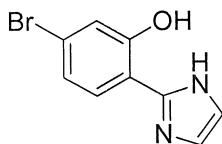
Bước 1: 4-bromo-2-hydroxybenzaldehyt



Cho 3-bromophenol (1300g, 7,51mol), diclomagie (1078g, 11,3mol), trietylamin (3034g, 30,0mol) và axetonitril (7,8 L) vào bình đáy tròn 4 cổ dung tích 20L được thổi khí và duy trì bằng môi trường nitơ trơ. Khuấy hỗn hợp trong 30 phút ở nhiệt độ 40°C. Bổ sung paraformaldehyt (676g, 22,6mol) vào hỗn hợp ở nhiệt độ 80°C. Khuấy dung dịch thu được trong 6 giờ ở nhiệt độ 76°C. Lặp lại phản ứng này 5 lần. Các hỗn hợp phản ứng đã được kết hợp được dừng bằng cách bổ sung 12L hydro clorua chứa nước (4N). Điều chỉnh giá trị pH của dung dịch đến 5 bằng hydro clorua chứa nước đậm đặc (12N). Chiết dung dịch thu được bằng 1 x 20L etyl axetat. Làm bay hơi các chất chiết hữu cơ trong môi trường chân không. Tinh chế phần cặn thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (được rửa giải: 15% etyl axetat trong ete dầu mỏ) để tạo ra sản phẩm thô, sản

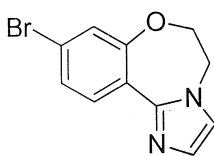
phẩm này được rửa bằng 2,4L methyl *tert*-butyl ete: hexan (1:4). Gom các chất rắn thu được bằng cách lọc để tạo ra 7,0kg (78%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu vàng.

Bước 2: 5-bromo-2-(1*H*-imidazol-2-yl)phenol



Bình đáy tròn 4 cổ dung tích 20L được cho dung dịch chứa 4-bromo-2-hydroxybenzaldehyt (700g, 3,50mol) trong metanol (7,0L) và oxaldehyt (40%) (2540g, 17,5mol), tiếp theo bổ sung từng giọt amoniac chứa nước (25-28%, 3500g) vào trong 4 giờ cùng với khuấy và duy trì nhiệt độ dưới 40°C. Khuấy dung dịch thu được trong 15 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 35°C. Lặp lại phản ứng này 9 lần. Làm bay hơi 9 hỗn hợp phản ứng được kết hợp trong môi trường chân không duy trì nhiệt độ dưới 45°C. Pha loãng phần cặn bằng 100L etyl axetat cùng với khuấy trong 30 phút. Lọc sạch các chất rắn và pha loãng dung dịch thu được bằng nước. Chiết pha nước bằng 35L etyl axetat. Làm bay hơi các chất chiết hữu cơ trong môi trường chân không và tinh chế phần cặn thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradient dung môi: 5-75% etyl axetat trong ete dầu mỏ) để tạo ra 2,4kg (29%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu vàng.

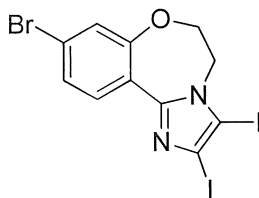
Bước 3: 9-bromo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin



Cho dung dịch chứa 5-bromo-2-(1*H*-imidazol-2-yl)phenol (1,4kg, 5,86mol) trong *N,N*-dimetylformamit (14L) và xesi cacbonat (7,2kg, 22,1mol) vào bình đáy tròn 4 cổ dung tích 20L. Khuấy hỗn hợp trong 20 phút. Bổ sung 1,2-dibromoetan (4,1kg, 21,8mol) vào hỗn hợp phản ứng. Khuấy dung dịch thu được trong khoảng thời gian từ 4 đến 12 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 85 đến 90°C, làm lạnh xuống nhiệt độ 15°C, và lọc. Rửa bánh lọc bằng 3,0L etyl axetat. Pha loãng dịch lọc bằng 14L etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối (4 x 14L), làm khô trên natri sulfat khan, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không để tạo ra 1,1kg (71%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 265$;

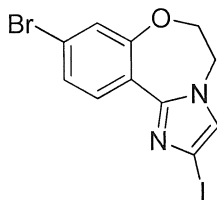
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,32 (d, $J = 8,4$, 1H), 7,35-7,24 (m, 3H), 7,06 (s, 1H), 4,47-4,42 (m, 4H).

Bước 4: 9-bromo-2,3-diiodo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin



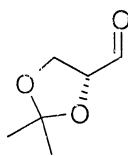
Nạp 9-bromo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin (2,5kg, 9,43mol) và *N,N*-dimetylformamit (12,5L) vào bình đáy tròn 4 cổ dung tích 20L được cho, sau đó là thêm *N*-iodosucinimit (6,0kg, 26,7mol) trong một vài mẻ cùng với khuấy. Khuấy dung dịch thu được trong 12 giờ ở nhiệt độ 60°C, làm lạnh xuống nhiệt độ 15°C bằng bể nước/đá, pha loãng bằng 12,5L nước/đá, và lọc. Kết tinh lại các chất rắn đã được lọc từ ete dầu mỏ để tạo ra 4,0kg (82%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu vàng.

Bước 5: 9-bromo-2-iodo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin



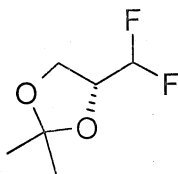
Cho 9-bromo-2,3-diiodo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin (800g, 1,55mol) và tetrahydrofuran (2,4L) vào bình đáy tròn 4 cổ dung tích 20L được thổi khí và được duy trì bằng môi trường nitơ trơ, tiếp theo là bổ sung từng giọt etyl magie bromua (dung dịch 1N trong ete, 1,7L) cùng với khuấy ở nhiệt độ -20°C, trong 3,5 giờ. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 3 giờ duy trì nhiệt độ ở -15°C bằng cách sử dụng bể đá/muối. Làm nguội hỗn hợp thu được bằng cách bổ sung 3,0L amoni clorua chứa nước bão hòa, và được chiết bằng etyl axetat (2 x 8,0L). Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối (2 x 10L), làm khô trên natri sulfat khan, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Nghiền nhỏ phần cặn thô với 8,0L etyl axetat: ete dầu mỏ (1:5), lọc, và rửa bằng ete dầu mỏ để tạo ra 501g (83%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu nâu. LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 391$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,22 (d, $J = 8,7$, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,30-7,25 (m, 2H), 4,45-4,41 (m, 4H).

Bước 6: (*R*)-2,2-dimetyl-[1,3]dioxolan-4-carbaldehyt



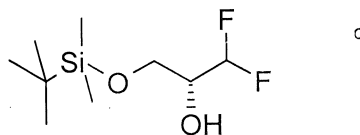
Hòa tan natri periodat (57,0g, 270mmol) trong nước nóng (115mL) và bổ sung silic oxit (200g, mắt lưới 60Å 220-440, cỡ hạt 35-75μm) vào. Khuấy mạnh hỗn hợp cho đến khi thu được bột chảy tự do. Bổ sung bột này vào dung dịch chứa 1,2:5,6-*bis*-*O*-(1-metyletylyliden)-*D*-mannitol (50g, 190mmol) trong diclometan (1,0L) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Lọc hỗn hợp thu được qua tấm Na₂SO₄ và rửa kỹ các chất rắn bằng diclometan. Làm bay hơi các chất chiết hữu cơ đã kết hợp trong môi trường chân không để tạo ra 37,2g (75%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu không màu. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,73 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 4,38 (ddd, *J* = 7,4, 4,7, 1,9 Hz, 1H), 4,18 (dd, *J* = 8,8, 7,4 Hz, 1H), 4,10 (dd, *J* = 8,8, 4,7 Hz, 1H), 1,49 (s, 3H), 1,43 (s, 3H).

Bước 7: (*R*)-4-Diflometyl-2,2-dimetyl-[1,3]dioxolan



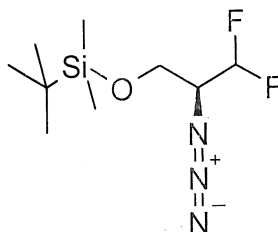
Bổ sung từng giọt dietylaminosulfur triflorua (8,4mL, 62,6mmol) vào dung dịch chứa (*R*)-2,2-dimetyl-[1,3]dioxolan-4-carbaldehyt (7,08g, 54mmol) trong diclometan (50mL) được làm mát trong bể nước và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Bổ sung từng giọt hỗn hợp thu được vào dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa lạnh như đá có khuấy nhanh. Chiết thêm hỗn hợp bằng diclometan. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không để tạo ra 6,58g (79%) hợp chất thô nêu ở đề mục dưới dạng dầu màu cam. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,69 (td, *J* = 55,8, 4,9 Hz, 1H), 4,27 - 4,17 (m, 1H), 4,16 - 4,03 (m, 2H), 1,46 (s, 3H), 1,38 (s, 3H).

Bước 8: (*R*)-3-(*tert*-Butyldimetylsilanyloxy)-1,1-diflopropan-2-ol



Bổ sung HCl trong dioxan (4N, 10,8mL, 43,2mmol) vào dung dịch chứa (*R*)-4-difluoromethyl-2,2-dimethyl[1,3]dioxolan (6,58g, 43,2mmol) trong metanol (40mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Làm bay hơi hỗn hợp thu được trong môi trường chân không và tạo hỗn hợp đẳng phí với axetonitril. Hòa tan phần cặn trong *N,N*-dimetylformamit (10mL) và bổ sung *tert*-butyldimetylsilyl clorua (6,53g, 43,2mmol), trietylamin (9,0mL, 64,9mmol) và 4-(dimetylamino)pyridin (xúc tác) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Rửa hỗn hợp thu được bằng nước và sau đó chiết bằng diclometan. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế phần cặn thô thu được thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradient dung môi: 0-30% etyl axetat trong xyclohexan) để tạo ra 3,43g (35%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu màu vàng. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5,66 (td, $J = 56,4, 4,6$ Hz, 1H), 3,76 - 3,60 (m, 2H), 2,46 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H), 0,81 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

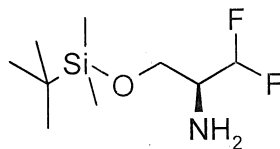
Bước 9: ((*S*)-2-azido-3,3-diflopropoxy)-*tert*-butyldimetylsilan



Bổ sung từng giọt anhydrit triflometansulfonic (2,9mL, 17,4mmol) vào dung dịch chứa (*R*)-3-(*tert*-butyldimetylsilanyloxy)-1,1-diflopropan-2-ol (3,43g, 15,1mmol) và pyridin (2,0mL, 24,2mmol) trong diclometan (50mL) ở nhiệt độ -20°C và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -20°C trong 20 phút và sau đó ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng HCl 0,5N chứa nước và được chiết bằng diclometan. Làm khô các chất chiết hữu cơ đã kết hợp trên magie sulfat và làm bay hơi trong môi trường chân không. Hòa tan phần cặn thô trong *N,N*-dimetylformamit (10mL), bổ sung natri azit (2,96g, 45,5mmol) vào và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng nước và được chiết bằng etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi

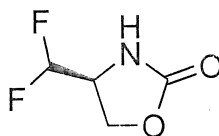
trong môi trường chân không để tạo ra 4,50g hợp chất thô nêu ở đề mục. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5,74 (td, $J = 55,4, 4,4$ Hz, 1H), 3,81 - 3,71 (m, 2H), 3,58 - 3,47 (m, 1H), 0,81 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

Bước 10: (*S*)-1-(*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl)-2,2-difloetylamin



Bổ sung paladi hydroxit trên cacbon (200mg, 20%) vào dung dịch chứa ((*R*)-2-azido-3,3-diflopropoxy)-*tert*-butyldimethylsilyl (4,50g, thô, giả sử ~15,1mmol) trong etyl axetat (20mL) và metanol (2,0mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng bằng bóng bóp hydro trong 16 giờ. Lọc hỗn hợp phản ứng, bổ sung paladi hydroxit sạch trên cacbon (400mg, 20%) vào và khuấy hỗn hợp phản ứng bằng bóng bóp hydro trong 16 giờ. Lọc hỗn hợp thu được và làm bay hơi dịch lọc trong môi trường chân không để tạo ra 3,08g (90%) sản phẩm thô nêu ở đề mục dưới dạng dầu không màu. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5,66 (td, $J = 57,0, 4,7$ Hz, 1H), 3,71 - 3,57 (m, 2H), 3,00 - 2,89 (m, 1H), 1,42 (br s, 2H), 0,82 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

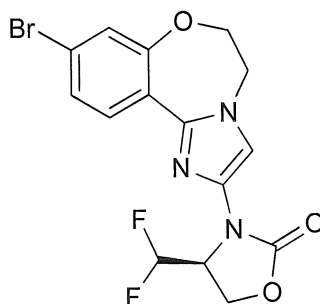
Bước 11: (*S*)-4-diflometyloxazolidin-2-on



Bổ sung HCl trong dioxan (4N, 5,0mL, 20mmol) vào dung dịch chứa (*R*)-1-(*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl)-2,2-difloetylamin (*Org. Lett.*, Vol. 9, No. 1, 2007, 41-44) (2,30g, 10,3mmol) trong metanol (5,0mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Làm bay hơi hỗn hợp trong môi trường chân không và nghiền nhỏ dầu thu được với dietyl ete để tạo ra chất rắn, chất này được làm khô trong môi trường chân không. Hòa tan chất rắn trong hỗn hợp của toluen (20mL) và KOH (2,50g, 44,6mmol trong 20mL nước) ở nhiệt độ 0°C. Bổ sung từng giọt phosgen (16,3mL, 20% trong toluen), loại bỏ bể làm mát và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 1 giờ. Làm bay hơi hỗn hợp trong môi trường chân không, chiết phần cặn thu được bằng cồn công nghiệp nóng được metyl hóa và gom chất rắn bằng cách lọc. Làm bay hơi dịch lọc trong môi trường chân không và tinh chế phần cặn thu được thông qua sắc ký nhanh trên silicagel

(gradien dung môi: 0-100% etyl axetat trong xyclohexan) để tạo ra 830mg (68%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng đục. $[\alpha]_D = +10,1$ ($c = 2,37$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5,96 (br s, 1H), 5,78 (td, $J = 55,3, 4,8$ Hz, 1H), 4,54 (t, $J = 9,2$ Hz, 1H), 4,42 (dd, $J = 9,6, 4,4$ Hz, 1H), 4,17 - 4,06 (m, 1H).

Bước 12: (S)-3-(9-bromo-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-(diflometyl)oxazolidin-2-on



Khử khí hỗn hợp của 9-bromo-2-iodo-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin (250mg, 0,64mmol), (S)-4-diflometyloxazolidin-2-on (88mg, 0,64mmol), *trans*-*N,N'*-dimetyl-1,2-xyclohexan diamin (36mg, 0,26mmol), đồng iodua (24mg, 0,13mmol) và kali cacbonat (177mg, 1,28mmol) trong dioxan (3,0mL) bằng argon trong điều kiện sóng âm. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 100°C trong 5 giờ và sau đó để nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng dung dịch nước amoniac 15% và được chiết bằng etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Nghiền nhỏ phần cặn thu được với metanol và sau đó tinh chế thông qua HPLC điều chế [C18, 60% axetonitril (axit formic 0,1%) trong nước (axit formic 0,1%), 20 phút vận hành] để tạo ra 20mg (8%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng. LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 400/402$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8,19 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,24 - 7,19 (m, 2H), 6,65 (ddd, $J = 57,8, 54,5, 1,0$ Hz, 1H), 4,87 (ddd, $J = 24,0, 9,2, 4,0$ Hz, 1H), 4,73 (dd, $J = 9,5, 4,2$ Hz, 1H), 4,53 (t, $J = 9,2$ Hz, 1H), 4,48 - 4,43 (m, 2H), 4,38 - 4,33 (m, 2H).

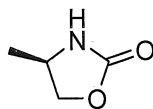
Bước 13: (S)-2-((2-((S)-4-(diflometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)propanamit

(S)-3-(9-bromo-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-(diflometyl)oxazolidin-2-on (600mg, 1,50mmol), *L*-alanin (267mg, 3,00mmol), đồng iodua (57mg, 0,30mmol) và kali phosphat tribazơ (637mg, 3,00mmol) được tạo huyền

phủ trong dimetyl sulfoxit (6,0mL). Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 100°C trong 2 giờ. Khi để nguội xuống nhiệt độ trong phòng, bổ sung dimetyl sulfoxit (4,0mL), amoni clorua (480mg, 9,00mmol), và triethylamin (3,1mL, 22,5mmol) vào. Bổ sung từng phần 1-[bis(dimethylamino)metylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridini 3-oxit hexaflophosphat (5,10g, 13,5mmol) vào huyền phù đã khuấy thu được trong 5 phút. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và sau đó lọc qua Celite®, rửa bằng etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ bằng natri bicacbonat chứa nước bão hòa và được chiết pha nước bằng etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế phần cặn thô thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradient dung môi: 0-5% metanol trong diclometan) và sau đó bằng sắc ký lỏng siêu tới hạn bất đối xứng để tạo ra 294mg (46%) **101** dưới dạng chất rắn màu trắng đục. LCMS (ESI): R_T (phút) = 2,89 $[M+H]^+ = 408$, Phương pháp = A; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,00 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,38 (br s, 1H), 7,18 (s, 1H), 7,00 (br s, 1H), 6,71 (t, $J = 55,9$ Hz, 1H), 6,41 (dd, $J = 8,8, 2,3$ Hz, 1H), 6,16 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 6,09 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 5,02 - 4,89 (m, 1H), 4,63 - 4,52 (m, 2H), 4,39 - 4,30 (m, 4H), 3,76 (quintet, $J = 7,0$ Hz, 1H), 1,30 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Ví dụ 102 (*S*)-2-xyclobutyl-2-((2-((*R*)-4-metyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit **102**

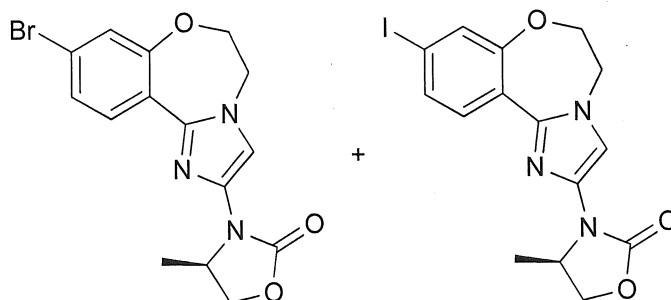
Bước 1: (*R*)-4-metyloxazolidin-2-on



Bổ sung phosgen (72,7mL, 20% trong toluen, 0,14mmol) vào hỗn hợp của *D*-alaninol (8,65g, 0,12mmol) trong toluen và KOH chứa nước (124mL, 12,5% nước, 0,28mmol) ở nhiệt độ 0°C ở tốc độ sao cho nhiệt độ bên trong được duy trì < 5°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 0°C trong 40 phút nữa sau đó làm bay hơi đến khô. Chiết phần cặn thô bằng cồn metylat công nghiệp, lọc huyền phù đặc và làm bay hơi dịch lọc trong môi trường chân không. Tinh chế phần cặn thu được thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradient dung môi: 40-100% etyl axetat trong xyclohexan) để tạo ra 10,4g (90%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

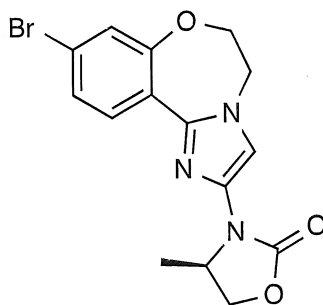
δ 6,00 (br s, 1H), 4,50 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H), 4,07 - 3,97 (m, 1H), 3,95 (dd, $J = 7,8, 6,2$ Hz, 1H), 1,30 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H).

Bước 2: (R)-3-(9-bromo-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-metyloxazolidin-2-on và (R)-3-(9-Iodo-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-metyloxazolidin-2-on



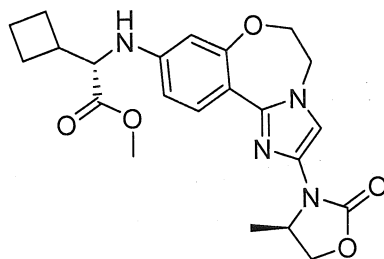
Tạo huyền phù hỗn hợp của 9-bromo-2-iodo-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin (30,0g, 76,7mmol), (R)-4-metyloxazolidin-2-on (7,70g, 76,7mmol), đồng iodua (1,61g, 8,40mmol), *trans*-*N,N'*-dimetyl-1,2-xyclohexan diamin (2,7mL, 16,9mmol) và kali cacbonat (14,9g, 107mmol) trong 1,4-dioxan (200mL) và khử khí hỗn hợp phản ứng bằng argon trong điều kiện sóng âm. Gia nhiệt hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 100°C trong 16 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng dung dịch nước amoniac (~16%) và được chiết bằng etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế phân cận thu được thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradien dung môi: 0-100% etyl axetat trong xyclohexan) để tạo ra 13,4g (~42%) hợp chất nêu ở đề mục (hỗn hợp tỷ lệ ~2:1 của 9-Br:sản phẩm 9-I). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,28 (d, $J = 7,6$ Hz, 0,33H), 8,11 (d, $J = 6,9$ Hz, 0,66H), 7,42 - 7,38 (m, 1H), 7,28 - 7,24 (m, 1,33H), 7,23 - 7,18 (m, 0,66H), 4,77 - 4,68 (m, 1H), 4,58 (t, $J = 8,3$ Hz, 1H), 4,49 - 4,39 (m, 2H), 4,37 - 4,30 (m, 2H), 4,08 (dd, $J = 8,4, 4,5$ Hz, 1H), 1,57 - 1,50 (m, 3H).

Bước 3: (*R*)-3-(9-bromo-5,6-dihydroimidazo[1,2-*d*][1,4]benzoxazepin-2-yl)-4-metyloxazolidin-2-on



Tách riêng 80mg hỗn hợp của (*R*)-3-(9-bromo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-metyloxazolidin-2-on và (*R*)-3-(9-Iodo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-metyloxazolidin-2-on thông qua SFC bất đối xứng, để tạo ra 27,6mg hợp chất nêu ở đề mục. LCMS (ESI): $[M+H]^+ = 364,0/366,0/367,2$; 1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,22 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,31 (dd, $J = 8,7, 2,1$ Hz, 1H), 7,25 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 4,65 – 4,54 (m, 2H), 4,49 - 4,43 (m, 4H), 4,09 - 4,06 (m, 1H), 1,42 (d, $J = 6,0$ Hz).

Bước 4: Metyl (*S*)-2-xyclobutyl-2-((2-((*R*)-4-metyl-2-oxoxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetat



Gia nhiệt hỗn hợp của (4*R*)-3-(9-bromo-5,6-dihydroimidazo[1,2-*d*][1,4]benzoxazepin-2-yl)-4-metyl-oxazolidin-2-on (0,2746mmol, 100mg), đồng ioda (0,084mmol, 16mg), axit (2*S*)-2-amino-2-xyclobutyl-axetic (1,10mmol, 142mg) và kali phosphat tribazơ (1,37mmol, 297mg) trong dimetyl sulfoxit (3mL) trong điều kiện chiếu xạ vi sóng ở nhiệt độ 120°C trong 2 giờ. Làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng, và bổ sung iodometan (1,4mmol, 0,086mL) vào và được chiết hỗn hợp phản ứng bằng diclometan và nước. Kết hợp các chất chiết hữu cơ đã kết hợp, rửa bằng nước muối, và làm khô bằng natri sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế sản phẩm thô thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (24g silic oxit,

gradien dung môi: 5-40% 3:1 isopropyl axetat:metanol trong diclometan) để tạo ra 100mg (85%) hợp chất nêu ở đề mục.

Bước 5: (*S*)-2-xyclobutyl-2-((2-((*R*)-4-metyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit

Bổ sung nước (0,45mL) và lithi hydroxit monohydrat (0,357mmol, 15mg) vào dung dịch chứa metyl (2*S*)-2-xyclobutyl-2-[[2-[(4*R*)-4-metyl-2-oxo-oxazolidin-3-yl]-5,6-dihydroimidazo[1,2-*d*][1,4]benzoxazepin-9-yl]amino]axetat (0,234mmol, 100mg) trong tetrahydrofuran (5mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 6 giờ. Làm bay hơi hỗn hợp phản ứng trong môi trường chân không. Bổ sung 1-[bis(dimetylamino)metylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridini 3-oxit hexaflophosphat (0,353mmol, 137mg), amoni clorua (0,71mmol, 38mg) và *N,N*-diisopropyletylamin (0,705mmol, 0,123mL) vào dung dịch chứa phần cặn thu được trong *N,N*-dimetylformamit (3mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Làm bay hơi hỗn hợp phản ứng trong môi trường chân không và xử lý phần cặn thu được bằng nước sau đó chiết bằng diclometan. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế sản phẩm thô thông qua HPLC pha đảo, sau đó là SFC và làm khô lạnh để tạo ra 15,0mg (15%) **102**. LCMS (ESI): R_T (phút) = 3,03, $[M+H]^+ = 412,2$, phương pháp = D; 1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,96 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,39 - 7,36 (brs, 1H), 7,13 (s, 1H), 7,00 - 6,97 (brs, 1H), 6,44 (dd, $J = 8,9, 2,3$ Hz, 1H), 6,14 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 5,96 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 4,62 - 4,49 (m, 2H), 4,38 - 4,28 (m, 4H), 4,06-4,03 (m, 1H), 3,70 - 3,61 (m, 1H), 2,06 - 1,75 (m, 6H), 1,42 - 1,34 (m, 3H).

Ví dụ 103 (*S*)-2-xyclopropyl-2-((2-((*S*)-4-(diflometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit **103**

Khử khí hỗn hợp của (*S*)-3-(9-bromo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-(diflometyl)oxazolidin-2-on từ Ví dụ 101, bước 12 (400mg, 1,00mmol), *L*-xyclopropylglyxin (230mg, 2,00mmol), đồng iodua (38mg, 0,20mmol) và kali phosphat tribazơ (424mg, 2,00mmol) trong dimetyl sulfoxit (2,0mL) bằng argon trong điều kiện sóng âm. Gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ 100°C trong 5 giờ sau đó làm nguội xuống nhiệt độ môi trường. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng dimetyl sulfoxit (5,0mL) và bổ sung amoni clorua (320mg, 6,00mmol) và trietylamin (1,4mL,

10,0mmol). Sau đó, bổ sung từng phần 1-[bis(dimethylamino)metylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridini 3-oxit hexaflophosphat (2,28g, 6,0mmol) vào huyền phù đã khuấy, và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng dung dịch nước amoniac 15% và được chiết bằng etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế phần cặn thô thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradient dung môi: 0-7% metanol trong etyl axetat). Hòa tan phần cặn trong lượng tối thiểu axetonitril. Sau đó, bổ sung nước để kết tủa chất rắn, chất này được gom bằng cách lọc và làm khô trong môi trường chân không để tạo ra 324mg (75%) **103** dưới dạng chất rắn màu trắng đục. LCMS (ESI): R_T (phút) = 3,21, $[M+H]^+ = 434$, Phương pháp = A; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,98 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,40 (br s, 1H), 7,17 (s, 1H), 7,03 (br s, 1H), 6,71 (t, $J = 56,0$ Hz, 1H), 6,42 (dd, $J = 8,9, 2,4$ Hz, 1H), 6,24 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 6,09 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 5,01 - 4,89 (m, 1H), 4,63 - 4,51 (m, 2H), 4,38 - 4,29 (m, 4H), 3,15 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 1,16 - 1,05 (m, 1H), 0,56 - 0,44 (m, 3H), 0,33 - 0,25 (m, 1H).

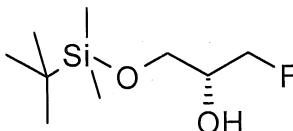
Ví dụ 104 (*S*)-2-xyclopropyl-2-((2-((*R*)-4-metyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit **104**

Gia nhiệt hỗn hợp của (*R*)-3-(9-bromo-5,6-dihydroimidazo[1,2-*d*][1,4]benzoxazepin-2-yl)-4-metyl-oxazolidin-2-on (Ví dụ 102, bước 3) (1,098mmol, 400mg), đồng iodia (0,330mmol, 62,8mg), axit (2*S*)-2-amino-2-xyclopropyl-axetic (3,295mmol, 379,3mg) và kali phosphat tribazơ (4,393mmol, 951,5mg) trong dimetyl sulfoxit (35mmol, 2,5mL) ở nhiệt độ 110°C trong 2 giờ trong điều kiện chiếu xạ vi sóng. Làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng. Bổ sung 1-[bis(dimethylamino)metylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridini 3-oxit hexaflophosphat (12,08mmol, 4260mg), amoni clorua (12,08mmol, 646mg) và trietylamin (1,53mL, 11,0mmol) vào hỗn hợp phản ứng. Sau 20 phút ở nhiệt độ trong phòng, xử lý hỗn hợp phản ứng bằng nước, sau đó chiết bằng diclometan. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế sản phẩm thô thông qua HPLC pha đảo và làm khô lạnh để tạo ra 110mg (25% trong 2 bước) **104**. LCMS (ESI): R_T (phút) = 2,588, $[M+H]^+ = 398,2$, phương pháp = B; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,96 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,39 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 7,13 (s, 1H), 7,02 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 6,42 (dd, $J = 8,9, 2,4$ Hz, 1H),

6,20 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 6,09 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 4,61 – 4,49 (m, 2H), 4,40 – 4,27 (m, 4H), 4,10 – 3,99 (m, 1H), 3,22 – 3,09 (m, 1H), 1,42 – 1,36 (m, 3H), 1,16 – 1,04 (m, 1H), 0,56 – 0,42 (m, 3H), 0,32 – 0,27 (m, 1H).

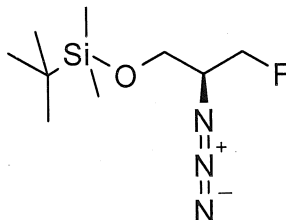
Ví dụ 105 (*S*)-2-xyclopropyl-2-((2-((*S*)-4-(flometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit **105**

Bước 1: (*R*)-1-(*tert*-Butyldimetylsilanyloxy)-3-flopropan-2-ol



Bổ sung *tert*-Butyldimetylsilyl clorua (1,60g, 10,63mmol) vào dung dịch chứa (*R*)-3-flopropan-1,2-diol (1,00g, 10,6mmol), trietylamin (1,93mL, 13,8mmol) và 4-(dimetylamino)pyridin xúc tác trong diclometan ở nhiệt độ 0°C và để ẩm hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng nước và được chiết bằng diclometan. Rửa các phần hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế phân cận thô thu được thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradien dung môi: 0-40% etyl axetat trong xyclohexan) để tạo ra 1,80g (81%) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu không màu. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4,45 – 4,36 (m, 1H), 4,34 – 4,25 (m, 1H), 3,87 – 3,73 (m, 1H), 3,66 – 3,56 (m, 2H), 2,30 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H), 0,82 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

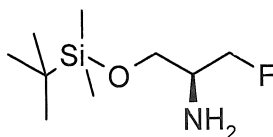
Bước 2: (*S*)-2-azido-3-flopropoxy)-*tert*-butyldimetylsilan



Bổ sung từng giọt anhydrit triflometansulfonic (1,67mL, 9,93mmol) vào dung dịch chứa (*R*)-1-(*tert*-butyldimetylsilanyloxy)-3-flopropan-2-ol (1,80g, 8,60mmol) và pyridin (1,2mL, 13,8mmol) trong diclometan ở nhiệt độ -20°C và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -20°C trong 20 phút sau đó ở nhiệt độ 0°C trong 30 phút. Pha loãng hỗn hợp phản ứng với HCl 0,5N chứa nước và được chiết bằng diclometan. Làm khô các

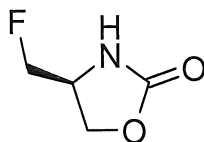
chất chiết hữu cơ đã kết hợp trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Hòa tan phần cặn trong *N,N*-dimethylformamit (5,0mL) và bổ sung natri azit (1,68g, 25,9mmol) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng nước và được chiết bằng etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không để tạo ra hợp chất thô nêu ở đề mục, hợp chất này được sử dụng tiếp mà không cần tinh chế. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4,58 - 4,26 (m, 2H), 3,75 - 3,63 (m, 2H), 3,62 - 3,46 (m, 1H), 0,80 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

Bước 3: (*S*)-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxymetyl)-2-fluetylamin



Bổ sung paladi hydroxit (400mg, 20% trên cacbon) vào dung dịch chứa ((*S*)-2-azido-3-flopropoxy)-*tert*-butyldimethylsilan (thô, giả sử 8,60mmol) trong etyl axetat (15mL) và metanol (5,0mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng bằng bóng bóp hydro trong 16 giờ. Lọc hỗn hợp thu được, bổ sung paladi hydroxit sạch (400mg, 20% trên cacbon) vào và khuấy hỗn hợp phản ứng bằng bóng bóp hydro trong 16 giờ nữa. Lọc hỗn hợp thu được và làm bay hơi dịch lọc trong môi trường chân không để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng hỗn hợp tỷ lệ ~2:1 của sản phẩm: nguyên liệu ban đầu, hợp chất này được sử dụng tiếp mà không cần tinh chế.

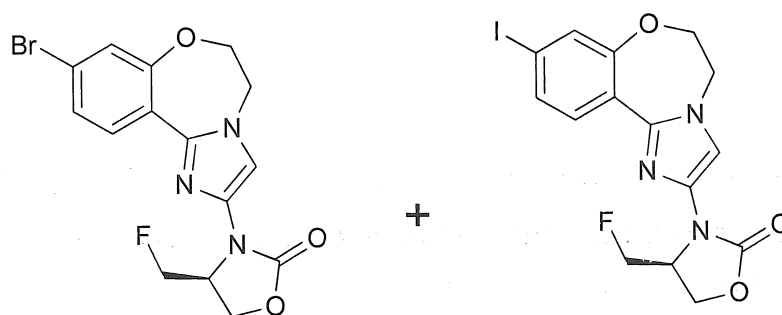
Bước 4: (*S*)-4-Flometyloxazolidin-2-on



Bổ sung HCl trong dioxan (4N, 2,0mL, 8,00mmol) vào dung dịch chứa (*S*)-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxymetyl)-2-fluetylamin (thô, giả sử 8,60mmol) trong metanol (3,0mL) và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Làm bay hơi hỗn hợp phản ứng trong môi trường chân không. Hòa tan phần cặn thu được trong hỗn hợp của toluen (20mL) và KOH (2,89g, 51,6mmol, 12,5% nước) ở nhiệt độ 0°C. Bổ sung từng giọt phosgen (13,6mL, 20% trong toluen) vào hỗn hợp này, loại bỏ bể làm mát và khuấy hỗn hợp thu được trong 1 giờ. Làm bay hơi hỗn hợp phản ứng trong môi

trường chân không và được chiết phần cạn thu được bằng cồn công nghiệp nóng được methyl hóa. Làm bay hơi dịch lọc trong môi trường chân không và tinh chế phần cạn thu được thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradient dung môi: 50-100% etyl axetat trong xyclohexan) để tạo ra 450mg (44%, 3 bước) hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng đục. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5,69 (br s, 1H), 4,59 - 4,42 (m, 2H), 4,42 - 4,32 (m, 1H), 4,25 - 4,08 (m, 2H).

Bước 5: (*S*)-3-(9-bromo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-(flometyl)oxazolidin-2-on và (*S*)-3-(9-Iodo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-(flometyl)oxazolidin-2-on



Đẩy kín hỗn hợp của 9-bromo-2-iodo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin (722mg, 1,85mmol), (*S*)-4-flometyloxazolidin-2-on (220mg, 1,85mmol), 3,4,7,8-tetrametyl-1,10-phenanthrolin (131mg, 0,55mmol), $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (74mg, 0,37mmol), kali cacbonat (510mg, 3,70mmol) và dioxan (6,0mL) trong ống và khử khí hỗn hợp bằng argon trong điều kiện sóng âm. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 100°C trong 72 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng thu được bằng dung dịch nước amoniac 15% và được chiết bằng etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế phần cạn thô thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradient dung môi: 0-100% etyl axetat trong xyclohexan) để tạo ra 390mg (53%) hợp chất nêu ở đề mục (hỗn hợp tỷ lệ khoảng 2:1 của 9-Br và sản phẩm 9-I). LCMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 382/384/430$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,22 (d, $J = 9,3$ Hz, 0,7H), 8,05 (d, $J = 8,8$ Hz, 0,3H), 7,43 - 7,37 (m, 0,6H), 7,29 (s, 1,2H), 7,23 - 7,18 (m, 1,2H), 5,03 - 4,66 (m, 3H), 4,60 (t, $J = 8,5$ Hz, 1H), 4,54 (dd, $J = 8,6, 4,3$ Hz, 1H), 4,47 - 4,43 (m, 2H), 4,37 - 4,33 (m, 2H).

Bước 6: (*S*)-2-xyclopropyl-2-((2-((*S*)-4-(flometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamid

Khử khí hỗn hợp của (*S*)-3-(9-bromo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-(flometyl)oxazolidin-2-on và (*S*)-3-(9-iodo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-(flometyl)oxazolidin-2-on (195mg, hỗn hợp Br:I tỷ lệ ~2:1, ~0,49mmol), *L*-xyclopropylglyxin (104mg, 0,90mmol), đồng iodua (17mg, 0,09mmol) và kali phosphat tribazơ (190mg, 0,90mmol) trong dimetyl sulfoxit (1,5mL) bằng argon trong điều kiện sóng âm. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 100°C trong 16 giờ sau đó làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng dimetyl sulfoxit (1,0mL) và bổ sung amoni clorua (144mg, 2,70mmol) và trietylamin (950μL, 6,75mmol) vào. Sau đó, bổ sung từng phần 1-[bis(dimetylamino)metylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridini 3-oxit hexaflophosphat (1,54g, 4,05mmol) vào hỗn hợp này, và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa và được chiết bằng etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế phần cặn thô thu được thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradien dung môi: 0-5% metanol trong diclometan) và sau đó tinh chế thêm bằng sắc ký nhanh trên silicagel (gradien dung môi: 0-100% metyl axetat trong xyclohexan) để tạo ra 90mg (48%) **105** dưới dạng chất rắn màu trắng đục. LCMS (ESI): R_T (phút) = 2,76 $[M+H]^+ = 416$, Phương pháp = A; 1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,94 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,40 (br s, 1H), 7,17 (s, 1H), 7,03 (br s, 1H), 6,41 (dd, $J = 8,8, 2,3$ Hz, 1H), 6,22 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 6,09 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 4,99 (ddd, $J = 48,3, 9,8, 2,5$ Hz, 1H), 4,81 - 4,56 (m, 3H), 4,40 (dd, $J = 8,6, 3,9$ Hz, 1H), 4,37 - 4,29 (m, 4H), 3,15 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 1,16 - 1,05 (m, 1H), 0,54 - 0,43 (m, 3H), 0,33 - 0,25 (m, 1H).

Ví dụ 106 (*S*)-2-((2-((*S*)-4-(Flometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)propanamit **106**

Khử khí hỗn hợp của (*S*)-3-(9-bromo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-(flometyl)oxazolidin-2-on và (*S*)-3-(9-iodo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-(flometyl)oxazolidin-2-on (Ví dụ 105, bước 5) (195mg, hỗn hợp 9-Br: 9-I tỷ lệ khoảng 2:1, khoảng 0,49mmol), *L*-alanin (87mg, 0,98mmol), đồng iodua (17mg, 0,09mmol) và kali phosphat tribazơ (208mg, 0,98mmol) trong dimetyl sulfoxit (3,0mL) bằng argon trong điều kiện sóng âm. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 100°C trong 4 giờ sau đó làm nguội xuống nhiệt độ

trong phòng. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng dimetyl sulfoxit (3,0mL) và bổ sung amoni clorua (157mg, 2,94mmol) và trietylamin (683 μ L, 4,8mmol) vào. Sau đó, bổ sung từng phần 1-[bis(dimetylamino)metylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridini 3-oxit hexaflophosphat (1,10g, 2,94mmol) vào hỗn hợp này, và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa và được chiết bằng etyl axetat. Rửa các chất chiết hữu cơ đã kết hợp bằng nước muối, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế phần cặn thu được thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradient dung môi: 0-5% metanol trong diclometan) và sau đó tinh chế thêm bằng sắc ký lỏng siêu tới hạn bất đối xứng để tạo ra 36mg (19%) **106** dưới dạng chất rắn màu trắng đục. LCMS (ESI): R_T (phút) = 2,43 $[M+H]^+ = 390$, Phương pháp = A; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,96 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,37 (br s, 1H), 7,17 (s, 1H), 7,00 (br s, 1H), 6,39 (dd, $J = 8,6, 1,6$ Hz, 1H), 6,15 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 6,09 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 5,08 - 4,55 (m, 5H), 4,42 - 4,28 (m, 4H), 3,76 (quintet, $J = 7,2$ Hz, 1H), 1,30 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H).

Ví dụ 107 (*S*)-2-((2-((*S*)-4-(diflometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)butanamit **107**

Khuấy hỗn hợp (*S*)-3-(9-bromo-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-yl)-4-(diflometyl)oxazolidin-2-on (Ví dụ 101, bước 12) (240mg, 0,60mmol), axit (*S*)-2-aminobutyric (124mg, 1,19mmol), đồng iodua (22,8mg, 0,119mmol), kali phosphat tribazơ (255mg, 1,19mmol) và dimetyl sulfoxit (6,0mL) trong môi trường argon ở nhiệt độ 100°C trong 6 giờ. Để nguội hỗn hợp thu được xuống nhiệt độ trong phòng và sau đó bổ sung amoni clorua (188mg, 3,52mmol) và trietylamin (1,2mL, 8,80mmol) vào. Bổ sung từng phần 1-[bis(dimetylamino)metylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridini 3-oxit hexaflophosphat (2,01g, 5,28mmol) vào huyền phù đã khuấy, và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Pha loãng hỗn hợp thu được bằng etyl axetat, rửa bằng amoni clorua bão hòa, làm khô trên magie sulfat, lọc, và làm bay hơi trong môi trường chân không. Tinh chế sản phẩm thô thông qua sắc ký nhanh trên silicagel (gradient dung môi: 0-10% metanol trong etyl axetat), tinh chế thêm thông qua HPLC pha đảo, sau đó là sắc ký lỏng siêu tới hạn bất đối xứng để tạo ra 73,6mg (30%) **107** dưới dạng chất rắn màu trắng. LCMS (ESI): R_T (phút) = 3,13, $[M+H]^+ = 422$, Phương pháp = A; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,99 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,17 (s, 1H), 7,03 (s, 1H), 6,71 (t, $J = 56,0$ Hz, 1H), 6,44 (dd, $J =$

8,8, 2,2 Hz, 1H), 6,13 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 6,09 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 5,02 - 4,89 (m, 1H), 4,62 - 4,53 (m, 2H), 4,41 - 4,27 (m, 4H), 3,65 - 3,60 (m, 1H), 1,72 - 1,59 (m, 2H), 0,94 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

Ví dụ 901 Thử nghiệm gắn kết p110 α (alpha) PI3K

Thử nghiệm gắn kết PI3K được dự định để xác định hoạt lực sinh hóa của chất ức chế PI3K phân tử nhỏ. Phản ứng PI3K lipid kinaza được thực hiện khi có mặt cơ chất lipid PIP2:3PS (Promega #V1792) và ATP. Sau khi kết thúc nếu là phản ứng kinaza, sự luân chuyển ATP thành ADP bằng cách phosphoryl hóa cơ chất lipid được phát hiện ra bằng cách sử dụng thử nghiệm Promega ADP-Glo™ (Promega #V1792). Các phản ứng được tiến hành bằng cách sử dụng các điều kiện sau cho mỗi dạng đồng phân PI3K như trong Bảng 5.

Bảng 5.

Kinaza	Nguồn	Nồng độ kinaza cuối cùng	ATP (μ M)	PIP2:3PS (μ M)	Thời gian phản ứng (phút)
PI3K alpha	Millipore #14-602-K	0,2 nM	40	50	120
PI3K beta	Promega #V1751	0,6 nM	40	50	120
PI3K delta	Millipore #14-604-K	0,25 nM	40	50	120
PI3K gamma	Millipore #14-558-K	0,4 nM	25	50	120

Sau thời gian phản ứng 120 phút, phản ứng kinaza kết thúc. ATP bất kỳ còn lại sau phản ứng được gạn sạch, chỉ để lại ADP. Sau đó chất phản ứng phát hiện kinaza được bổ sung để chuyển hóa ADP thành ATP, được sử dụng trong phản ứng kết hợp luxiferin/luxiferaza. Hiệu suất phát quang được đo và tương quan với hoạt tính kinaza.

Tất cả các phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng. Đối với mỗi dạng đồng phân PI3K, 3 μ l hỗn hợp (1:1) của enzym/dung dịch cơ chất lipid được bổ sung vào đĩa thử nghiệm màu trắng có 384 giếng (Perkin Elmer #6007299) chứa 50nl hợp chất thử nghiệm hoặc DMSO chỉ dành cho đối chứng không được xử lý. Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 2 μ l ATP/MgCl₂. Chất đệm phản ứng kinaza chứa 50mM HEPES, 50mM NaCl, 3mM MgCl₂, 0,01% BSA, 1% DMSO, và nồng độ enzym và nồng độ cơ chất như được nêu trong bảng trên đây. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 10 μ L chất phản ứng ADP-Glo. Các đĩa được đọc trong hệ thống Perkin Elmer Envision bằng cách sử dụng kiểu phát quang. Các đường cong đáp ứng liều 10 điểm được tạo ra đối

với mỗi hợp chất thử nghiệm. Các giá trị Ki đối với mỗi hợp chất được xác định bằng cách sử dụng đẳng thức Morrison.

Thử nghiệm gắn kết: Các thử nghiệm phân cực ban đầu được thực hiện trên chất phân tích HT 96-384 (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA.). Các mẫu để đo ái lực phân cực huỳnh quang được điều chế bằng cách bổ sung các phân pha loãng theo dãy với tỷ lệ 1:3 của p110alpha PI3K (Upstate Cell Signaling Solutions, Charlottesville, VA) bắt đầu ở nồng độ cuối cùng là 20ug/mL trong chất đệm phân cực (10mM Tris độ pH = 7,5, 50mM NaCl, 4mM MgCl₂, 0,05% Chaps, và 1mM DTT) đến nồng độ cuối cùng 10mM PIP₂ (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.). Sau thời gian ủ 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, các phản ứng được dừng bằng cách bổ sung đầu dò GRP-1 và PIP3-TAMRA (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.) ở nồng độ cuối cùng lần lượt là 100nM và 5nM. Đọc bằng kính lọc cắt bỏ tiêu chuẩn cho phân tử huỳnh quang rodamin ($\lambda_{ex} = 530\text{nm}$; $\lambda_{em} = 590\text{nm}$) trong Proxiplates® màu đen 384 giếng có thể tích thấp (PerkinElmer, Wellesley, MA.) Các giá trị phân cực huỳnh quang được vẽ biểu đồ làm chức năng của nồng độ protein. Các giá trị EC₅₀ thu được bằng cách khớp dữ liệu với đẳng thức bốn thông số bằng cách sử dụng phần mềm KaleidaGraph® (Synergy software, Reading, PA). Thử nghiệm này còn thiết lập nồng độ protein thích hợp để sử dụng trong các thử nghiệm cạnh tranh tiếp sau với các chất ức chế.

Giá trị IC₅₀ của chất ức chế được xác định bằng cách bổ sung 0,04mg/mL p110alpha PI3K (nồng độ cuối cùng) kết hợp PIP₂ (nồng độ cuối cùng 10mM) vào các giếng chứa các phân pha loãng bằng tỷ lệ 1:3 của chất đối kháng trong nồng độ cuối cùng là 25mM ATP (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) trong chất đệm phân cực. Sau thời gian ủ 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, các phản ứng được dừng bằng cách bổ sung đầu dò GRP-1 và PIP3-TAMRA (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.) ở nồng độ cuối cùng lần lượt là 100nM và 5nM. Đọc bằng kính lọc cắt bỏ tiêu chuẩn cho phân tử huỳnh quang rodamin ($\lambda_{ex} = 530\text{nm}$; $\lambda_{em} = 590\text{nm}$) trong Proxiplates® màu đen có 384 giếng thể tích thấp (PerkinElmer, Wellesley, MA.) Các giá trị phân cực huỳnh quang được vẽ biểu đồ làm chức năng của nồng độ chất đối kháng, và các giá trị IC₅₀ thu được bằng cách khớp số liệu này với đẳng thức 4 thông số trong phần mềm Assay Explorer (MDL, San Ramon, CA.).

Theo một cách khác, việc ức chế PI3K được xác định trong thử nghiệm đo bức xạ bằng cách sử dụng enzym tinh chế, tái tổ hợp và ATP ở nồng độ bằng 1μM

(micromol). Hợp chất được pha loãng theo dãy trong DMSO 100%. Phản ứng kinaza được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung PBS. Giá trị IC₅₀ sau đó được xác định sử dụng cách dựng kỹ thuật khớp đường cong đáp ứng liều lượng hàm sigmoid (độ dốc biến đổi).

Ví dụ 902 Ức chế chọn lọc PI3K α (alpha) đột biến

Khả năng của hợp chất theo sáng chế trong việc tác động ưu tiên kháng các tế bào chứa PI3K α (alpha) đột biến được xác định bằng cách đo mức ức chế con đường PI3K trong dòng tế bào đẳng gen SW48: PI3K α loại dại (ban đầu), E545K đột biến miền xoắn, và H1047R đột biến miền kinaza. Các thử nghiệm sau được dự định nhằm xác định hoạt lực tế bào và độ chọn lọc đột biến của chất ức chế PI3K α phân tử nhỏ. Thử nghiệm sử dụng dòng tế bào đẳng gen biểu hiện E545K/+ đột biến PI3K α WT, PI3K α (Horizon Discovery 103-001), hoặc H1047R/+ đột biến PI3K α (Horizon Discovery 103-005). Hoạt lực ức chế pPRAS40 bởi PI3K α trong mỗi dòng tế bào được đo sau 24 giờ xử lý bằng hợp chất. Độ chọn lọc đột biến của chất ức chế PI3K α được xác định bằng tỷ lệ hoạt lực EC₅₀ trong dòng tế bào WT so với dòng tế bào E545K và dòng tế bào WT so với dòng tế bào H1047R.

Nuôi cấy tế bào: Dòng tế bào được duy trì trong tủ ủ nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ trong môi trường nuôi cấy tế bào chứa RPMI1640 (được điều chế tại Genentech), 10% FBS (Gibco 16140-071), 2mM L-glutamin (được điều chế tại Genentech), và 10mM HEPES độ pH = 7,2 (được điều chế tại Genentech). Các tế bào được phân chia cứ 72 giờ một lần ở tỷ lệ 1:8 bằng cách sử dụng Trypsin-EDTA 0,25% (Gibco 25200).

Quy trình thử nghiệm: Các tế bào được thu hoạch và được dàn trên đĩa trong đĩa thử nghiệm được xử lý bằng môi trường nuôi cấy mô có 384 giếng (Greiner cat #781091) và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C ở 5% CO₂. Ba dòng tế bào (WT, E545K, và H1047R) được dàn trên đĩa và được thử nghiệm song song. Ngày sau đó, các hợp chất thử nghiệm được pha loãng theo dãy trong dimethyl sulfoxit (DMSO) và được bổ sung vào các tế bào (nồng độ DMSO cuối cùng là 0,5%). Sau đó các tế bào được ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Sau 24 giờ, các tế bào được làm tan và nồng độ pPRAS40 được đo bằng cách sử dụng bộ kit thử nghiệm Meso-Scale custom pPRAS40 384w (Meso Scale Discovery, cat # L21CA-1). Dịch làm tan tế bào được bổ sung vào đĩa thử nghiệm được

phủ trước với kháng thể kháng PRAS40 được phosphoryl hóa. PRAS40 được phosphoryl hóa trong các mẫu được cho phép gắn kết với kháng thể bắt qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Kháng thể phát hiện (kháng toàn bộ PRAS40, được đánh dấu bằng SULFO-TAG điện hóa phát quang) được bổ sung vào dịch làm tan gắn kết và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Chất đệm đọc MSD được bổ sung sao cho khi điện áp được áp dụng vào các điện cực đĩa, các chất đánh dấu gắn kết với ánh sáng phát ra từ bề mặt điện cực. Công cụ MSD Sector đo cường độ ánh sáng, và đo về mặt số lượng lượng phospho-PRAS40 trong mẫu. Phần trăm ức chế sự phosphoryl hóa PRAS40 bằng cách thay đổi nồng độ của hợp chất thử nghiệm được tính so với đối chứng không được xử lý. Giá trị EC₅₀ được tính bằng cách sử dụng mô hình đáp ứng liều lượng hồi quy không tuyến tính logic 4 thông số.

Phân tích thống kê: Giá trị EC₅₀ là giá trị trung bình hình học của tối thiểu 4 thử nghiệm độc lập. Tất cả các thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm KaleidaGraph (phiên bản 4.1.3). Thử nghiệm t Student được thực hiện bằng cách sử dụng dữ liệu lẻ cặp với phương sai bằng nhau để so sánh hoạt tính kháng tế bào đột biến và tế bào loại đại. $P < 0,05$ được coi là ý nghĩa.

Ví dụ 903 Thử nghiệm khả năng sống của tế bào *in vitro*

Tế bào được nuôi cấy (1500 mỗi giếng) trong đĩa 384 giếng trong 16 giờ. Vào ngày 2, chín phần pha loãng hợp chất theo dãy với tỷ lệ 1:3 được tạo ra trong DMSO trong đĩa 96 giếng. Hợp chất sau đó được pha loãng thành môi trường sinh trưởng bằng cách sử dụng robot Rapidplate (Zymark Corp.). Các hợp chất đã pha loãng sau đó được bổ sung vào 4 giếng giống nhau trong đĩa tế bào 384 giếng và được ủ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Sau 4 ngày, số lượng tế bào sống sót tương đối được đo nhờ phát quang bằng cách sử dụng Cell Titer-Glo (Promega) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và đọc trên bộ đọc Wallac Multilabel Reader (Perkin-Elmer). Giá trị EC₅₀ được tính bằng cách sử dụng phần mềm Prism 6.0 (GraphPad).

Ví dụ 904 Hiệu quả ghép ngoại lai khối u *in vivo* ở chuột

Chuột nhắt: Chuột nhắt cái thiếu hụt miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (C.B-17 SCID.bg Charles River Labs, San Diego), NOD.SCID (Charles River Labs, Hollister) hoặc chuột nhắt không lông NCR (Taconic) 8 đến 9 tuần tuổi và có BW nằm trong khoảng từ 18 đến 26 gam vào Ngày 0 của nghiên cứu. Các con chuột cho uống nước

thoải mái và chế độ ăn cho loài gặm nhấm hấp tiệt trùng được trong phòng thí nghiệm (Laboratory Autoclavable Rodent Diet) 5010 (LabDiet St. Louis, MO). Chuột nhắt được nuôi nhốt trong lồng nhỏ ngăn cách trong chu kỳ ánh sáng 12 giờ. Genentech đặc biệt tuân theo khuyến cáo về chỉ dẫn chăm sóc và sử dụng động vật trong phòng thí nghiệm về sự ràng buộc, quản lý, quy trình phẫu thuật, nuôi ăn và điều hòa dịch thể, và chăm sóc thú y. Chương trình chăm sóc và sử dụng động vật tại Genentech được cấp phép bởi Hiệp hội đánh giá và cấp phép chăm sóc động vật trong phòng thí nghiệm quốc tế (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International - AAALAC), đảm bảo sự tuân thủ theo các tiêu chuẩn được chấp nhận về chăm sóc và sử dụng động vật trong phòng thí nghiệm. Chuột nhắt được nuôi nhốt tại Genentech trong các lồng nhỏ ngăn cách loài gặm nhấm tiêu chuẩn và được làm thích nghi với các điều kiện nghiên cứu trong ít nhất 3 ngày trước khi cấy tế bào khối u. Chỉ các động vật có vẻ khỏe mạnh và không có các bất thường rõ rệt mới được sử dụng để nghiên cứu.

Cấy khối u: Các mảnh ghép ngoại lai được bắt đầu bằng tế bào ung thư (HCC1954x1 hoặc KPL4) hoặc khối u cấy chuyển (HCI-003). Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò, 2mM glutamin, 100 đơn vị/mL penixilin, 100µg/mL (microgam trong mỗi mL) streptomycin sulfat và 25µg/mL gentamixin, được thu hoạch trong sinh trưởng pha log và được tái tạo huyền phù trong 50% Matrigel không chứa phenol đỏ (Becton Dickinson Bioscience; San Jose, CA) và dung dịch muối cân bằng Hank ở nồng độ là 3×10^6 hoặc 5×10^6 tế bào/mL tùy thuộc vào thời gian nhân đôi của dòng tế bào. Đối với mô hình thu được từ bệnh nhân HCI-003, 30mg viên sáp ong chứa khoảng 1mg 17β (beta)-estradiol được cấy dưới da 3 ngày trước khi cấy mảnh khối u. Tế bào hoặc mảnh khối u được cấy vào 2/3 khối mỡ sau bánh chè của động vật có vú, và sự phát triển khối u được theo dõi làm kích thước trung bình gần với khoảng đích từ 100 đến 250mm³. Một khi phần lớn các khối u đạt đến khoảng đích, chuột nhắt được phân bổ vào các nhóm gồm 7 đến 10 con dựa trên thể tích khối u.

Chất trị liệu: Hợp chất PI3K được cung cấp dưới dạng bazơ tự do trong bột khô và được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng tránh ánh sáng. Chất dẫn thuốc dùng cho taselisib (GDC-0032) và BYL719 là 0,5% methylxenluloza: 0,2% Tween 80 (MCT) trong nước khử ion. Đối chứng chất dẫn thuốc dùng cho hợp chất **101** là huyền phù cỡ nano 0,5% methylxenluloza/0,2% Tween-80 (MCT). Huyền phù cỡ nano MCT được tạo ra

bằng cách ban đầu điều chế huyền phù MCT. Mỗi khi được điều chế, 1mm hạt thủy tinh và thanh khuấy từ đất hiếm được sử dụng để nghiền huyền phù MCT trong khoảng 24 giờ thành huyền phù cỡ nano mịn. Máy phân tích cỡ hạt được sử dụng để kiểm tra cỡ hạt cuối cùng. Liều lượng được chất được chuẩn bị hằng tuần và được bảo quản ở 4°C.

Điều trị: Chuột nhất được cho dùng (chất dẫn thuốc) hoặc quy định liều lượng tính theo mg/kg của hợp chất PI3K (được biểu hiện dưới dạng đương lượng bazơ tự do), PO bằng ống thông hằng ngày trong 21 đến 28 ngày ở thể tích bằng 100 μ L, microlit (5mL/kg).

Điểm cuối: Thể tích khối u được đo theo 2 kích thước (chiều dài và chiều rộng), sử dụng thước đo Ultra Cal IV (mô hình 54 10 111; Fred V. Fowler Company), như sau: thể tích khối u (mm^3) = (chiều dài x chiều rộng²) x 0,5 và được phân tích bằng cách sử dụng Excel phiên bản 11.2 (Microsoft Corporation). Phương pháp tạo mô hình ảnh hưởng hỗn hợp tuyến tính (LME) được sử dụng để phân tích phép đo lặp lại các thể tích khối u từ các động vật giống nhau theo thời gian (Pinheiro J, et al. nlme: linear và nonlinear mixed effects models, 2009; R package phiên bản 3.2.5. Phương pháp này hướng đến cả các phép đo lặp lại và sự sụt giảm vừa phải do chết liên quan đến việc không điều trị bất kỳ của động vật trước khi kết thúc nghiên cứu. Hàm đa thức gãy khúc hồi quy bậc ba (Cubic regression spline) được sử dụng để khớp profin không tuyến tính với chu trình thời gian thể tích khối u log2 ở mỗi nồng độ liều lượng. Các profin không tuyến tính này sau đó liên quan đến liều lượng trong mô hình hỗn hợp. Mức ức chế sự phát triển khối u là phần trăm đối chứng chất dẫn thuốc (% TGI) được tính dưới dạng phần trăm diện tích dưới đường cong đã khớp (AUC) đối với nhóm liều lượng tương ứng trong mỗi ngày liên quan đến chất dẫn thuốc, sử dụng công thức sau: % TGI = 100 x (1 – AUC_{liều lượng}/ AUC_{chất dẫn thuốc}). Bằng cách sử dụng công thức này, giá trị TGI bằng 100% chỉ sự cân bằng khối u, giá trị TGI lớn hơn (>) 1% nhưng nhỏ hơn (<) 100% chỉ sự trì hoãn phát triển khối u, và giá trị TGI lớn hơn (>) 100% chỉ sự thoái lui khối u. Đáp ứng một phần (PR) đối với động vật được xác định là sự giảm khối u lớn hơn (>) 50% nhưng nhỏ hơn (<) 100% thể tích khối u ban đầu. Đáp ứng hoàn toàn (CR) được xác định là giảm khối u 100% (tức là, không có khối u đo được) vào ngày bất kỳ trong nghiên cứu.

Độc tính: Động vật được cân hằng ngày trong năm ngày đầu tiên của nghiên cứu và hai lần hằng tuần sau đó. Trọng lượng cơ thể của động vật được xác định bằng cách

sử dụng thang tỷ lệ Adventurer Pro® AV812 (Ohaus Corporation). Phần trăm thay đổi trọng lượng được tính như sau: thay đổi trọng lượng cơ thể (%) = $[(\text{trọng lượng}_{\text{ngày mới}} - \text{trọng lượng}_{\text{ngày 0}}) / \text{trọng lượng}_{\text{ngày 0}}] \times 100$. Chuột nhất được quan sát thường xuyên về các dấu hiệu hiển nhiên của tác dụng phụ liên quan đến điều trị bất lợi bất kỳ, và dấu hiệu lâm sàng của độc tố được ghi lại khi quan sát được. Độc tố chấp nhận được được xác định là sự giảm trọng lượng cơ thể (BW) trung bình nhóm thấp hơn 20% trong khi nghiên cứu và không lớn hơn một trường hợp chết liên quan đến điều trị (TR) trong số mười con vật được điều trị. Chế độ định liều bất kỳ dẫn đến độc tố lớn hơn được coi là cao hơn liều dung nạp tối đa (MTD). Trường hợp chết được phân loại là TR nếu được quy cho tác dụng phụ điều trị như được chứng minh bởi dấu hiệu lâm sàng và/hoặc mổ tử thi, hoặc cũng có thể được phân loại là TR nếu do các nguyên nhân chưa rõ trong giai đoạn định liều hoặc trong vòng 10 ngày của liều lượng cuối cùng. Trường hợp chết được phân loại là NTR nếu không có bằng chứng là cái chết này liên quan đến tác dụng phụ điều trị.

Ví dụ 905. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào và thử nghiệm chất ức chế *in vitro*

Dòng tế bào được cho sinh trưởng trong các điều kiện nuôi cấy mô tiêu chuẩn trong môi trường RPMI với 10% huyết thanh bào thai bò, 100U/mL penixilin, và 100µg/mL streptomycin. HCC-1954 và HDQ-P1 là các dòng tế bào ung thư vú (American Type Culture Collection; Manassas, VA. Tế bào HCC-1954 và tế bào HDQ-P1 được đặt trong mỗi giếng của đĩa nuôi cấy mô 6 giếng ở 80000 tế bào/giếng và được ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Các tế bào được ủ với các nồng độ được chỉ định của mỗi hợp chất trong 24 giờ. Sau khi ủ, các tế bào được rửa một lần bằng nước muối lạnh được đệm phosphat (PBS) và làm tan trong chất đệm chiết tế bào Biosource™ (Invitrogen; Carlsbad, CA) được bổ sung chất ức chế proteaza (F. Hoffman-LaRoche; Mannheim, Germany), 1mM phenylmethylsulfonyl florua, và hỗn hợp chất ức chế phosphatase 1 và 2 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Nồng độ protein được xác định bằng cách sử dụng bộ kit thử nghiệm Protein Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL).

Thử nghiệm protein

Nồng độ protein được xác định bằng cách sử dụng bộ kit thử nghiệm Protein Pierce BCA (Rockford, IL). Đối với thẩm tách miễn dịch, các lượng protein bằng nhau

được tách bằng cách điện di qua gel gradien NuPage Bis-Tris 4-12% (Invitrogen; Carlsbad, CA); protein được chuyển lên trên màng Nitrocellulose bằng cách sử dụng hệ thống IBlot và phương pháp từ Invitrogen. Kháng thể đối với p110 α , và phospho-Akt (Ser473), thu được từ Cell Signaling (Danvers, MA). Kháng thể đối với β -actin và GAPDH là từ Sigma.

Ví dụ 906 Biểu hiện CD69 trong tế bào B, thử nghiệm máu toàn phần ở người để biểu hiện CD69 trong tế bào B dương tính với CD19 âm tính với CD27

Môi trường nuôi cấy: Máu toàn phần của người được phân tán vào đĩa 96 giếng sâu ở 100 μ l trong mỗi giếng. Hợp chất được pha loãng trong DMSO để tạo ra nồng độ ban đầu mong muốn và sau đó pha loãng thêm trong PBS đến nồng độ hoạt động mong muốn và được bổ sung ở thể tích là 5,5 μ L trong mỗi giếng. Sau đó các mẫu được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong 5% CO₂ trước khi bổ sung 5 μ g (10 μ l trong mỗi giếng) kháng IgM F(ab')₂ dê (Southern Biotech, AL), và được ủ trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C trong 5% CO₂. Tất cả các điều trị được thử nghiệm hai lần.

Quy trình phân lập tế bào và nhuộm tế bào: Sau khi ủ, mức độ biểu hiện CD69 trên tế bào dương tính với CD19 âm tính với CD27 được xác định bằng cách nhuộm mẫu máu toàn phần với hỗn hợp CD27; 10 μ l/giếng (dòng vô tính L128; BD Biosciences, NJ) CD19; 7,5 μ l/giếng (dòng vô tính SJ25C1; BD Biosciences, NJ) và CD69; 10 μ l (dòng vô tính FN50; BD Biosciences, NJ). Ngoài ra, máu toàn phần của người từ mỗi đối tượng cho được nhuộm bằng kháng thể đối chứng huỳnh quang phù hợp với isotyp. Sau khi bổ sung hỗn hợp kháng thể thích hợp, mẫu máu toàn phần được nhuộm trong 30 phút trong bóng tối và sau đó được làm tan bằng cách sử dụng BD Pharm Lysis (BD Bioscience, NJ). Sau đó các mẫu thu được được rửa bằng chất đệm FACS (nước muối được đệm phosphat (không chứa Ca/Mg⁺⁺), 1mM EDTA, 25mM HEPES độ pH = 7,0, 1% huyết thanh bào thai bò (bất hoạt bằng nhiệt) và được cố định trong chất đệm FACS được bổ sung 0,1% Formaldehyt (Polysciences Inc, PA) và 0,1% Pluronic F-68 (Sigma, MO). Dữ liệu có được bằng cách sử dụng BD LSR-II (BD Biosciences) với phần mềm BD FACSDiva.

Biểu hiện CD69 của tế bào B dương tính với CD19 âm tính với CD27. Các tế bào được đánh giá bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy đối với các nồng độ CD19, CD27 và CD69 bằng cách sử dụng phần mềm BD FACSDiva và giá trị trung bình MFI

của CD69 của quần thể tế bào lympho dương tính với CD19 âm tính với CD27 được xác định. Nồng độ của hợp chất dẫn đến ức chế 50% giá trị trung bình MFI của CD69 (IC₅₀) được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Genedata (Genedata Screener, MA).

Ví dụ 907 EC₅₀ của HCC1954 và HDQP1 pPRAS40

Các tế bào được dàn trên đĩa trong đĩa thử nghiệm được xử lý môi trường nuôi cấy mô 384 giếng và được ủ qua đêm. Ngày sau đó, các tế bào được xử lý bằng hợp chất và được ủ trong 24 giờ. Sau 24 giờ, các tế bào được làm tan và nồng độ pPRAS40 được đo bằng cách sử dụng nền thử nghiệm Meso-Scale. Các dòng tế bào này khá hữu ích để đặc trưng hóa độ chọn lọc của chất ức chế PI3Ka đối với PI3Ka đột biến. Dòng tế bào HCC1954 biểu hiện PI3Ka đột biến (E545K) so với WT trong HDQP1.

Nguyên tắc thử nghiệm: Nền MSD cung cấp phương pháp đo nồng độ được phosphoryl hóa của pPRAS40 trong mẫu đơn lẻ. Dịch làm tan tế bào được bổ sung vào đĩa thử nghiệm được phủ trước với kháng thể kháng toàn bộ PRAS40. Sau khi làm tan tế bào, PRAS40 trong các mẫu được cho phép gắn kết với kháng thể bắt. Kháng thể phát hiện (kháng phospho PRAS40), được đánh dấu bằng hợp chất điện hóa phát quang MSD SULFO-TAG, được bổ sung vào dịch làm tan gắn kết. Chất đệm đọc MSD được bổ sung sao cho khi điện áp được áp dụng vào các điện cực đĩa, chất đánh dấu gắn kết với ánh sáng phát ra từ bề mặt điện cực. Công cụ MSD Sector đo cường độ ánh sáng, và đo về mặt định lượng lượng phospho_EGFR trong mẫu (nguyên tắc thử nghiệm Meso Scale).

Nguyên liệu:

Đĩa thử nghiệm	Đĩa được xử lý TC, vô trùng màu đen có đáy trong hình chữ u có 384 giếng (Greiner cat #781091)
Loại tế bào	Dòng ban đầu WT: HDQ-P1 (CL131963) Đột biến E545K: HCC1954 (CL130216)
Môi trường	RPMI 1640 10% FBS (Gibco 16140-071) 2 mM L-Glutamin (GNE trong nhà) 1% HEPES (GNE trong nhà)
Chất phản ứng nuôi cấy tế bào khác	0,25% Trypsin EDTA 1X (Invitrogen Gibco, cat # 25200)
Bộ kit chất phản ứng thử nghiệm	Bộ kit thử nghiệm 384 giếng pPRAS40 tùy chỉnh bộ kit chứa toàn bộ dịch tan tế bào (Meso Scale Discovery, cat # L21CA-1 đối với 100 đĩa)

Quy trình:

- Hợp chất được điều chế ở nồng độ là 2mM trong DMSO. Chuẩn bị đĩa chuẩn độ hợp chất DMSO, 1:3 trong DMSO sạch.
- Đĩa ban đầu DMSO chứa 72 μ l 13 hợp chất.
- Hợp chất kiểm soát chọn lọc đột biến: bổ sung 72 μ l của 2mM hợp chất kiểm soát vào giếng B2 trên mỗi đĩa thử nghiệm. Hợp chất kiểm soát này cho thấy hoạt lực lớn hơn khoảng 20 lần trong dòng tế bào HCC1954 so với dòng tế bào HDQP1.
- Sử dụng pipet nhiều kênh, chuyển 36 μ l từ mỗi giếng hợp chất đến giếng ngay dưới (ví dụ B2 đến C2) để thiết lập hai đường cong đáp ứng liều giống hệt.
- Sử dụng phương pháp Biomek Fx tên là “pha loãng theo dãy SLS/1 đĩa_384_3_13_3x” để tạo ra các phần pha loãng theo dãy của hợp chất trong đĩa ban đầu.
- Bịt kín và giữ cả đĩa ban đầu và đĩa con DMSO với thiết bị bịt kín bằng nhiệt khi không sử dụng.

Ngày 1: Dàn tế bào trên đĩa

1. Gieo 12500 tế bào trong 45 μ l môi trường đối với mỗi dòng tế bào. Cho phép tế bào đọng lại/gắn vào đĩa trong 15 đến 20 phút ở nhiệt độ trong phòng.
2. Ủ các tế bào qua đêm trong tủ ủ ẩm 37°C và được kiểm soát bằng CO₂.

Ngày 2: Chuẩn bị đĩa hợp chất và xử lý hợp chất

1. Đối với đĩa pha loãng hợp chất trung gian 10X: bổ sung 95 μ l môi trường không chứa huyết thanh vào đĩa polypropylen có 384 giếng profil greiner tiêu chuẩn.
2. Sử dụng phương pháp biomek Fx để pha loãng hợp chất trung gian trong môi trường và bổ sung vào tế bào: “SLS Intermed Dil Add 5 μ l to Cells July 13 2012.” Phương pháp Biomek này chuyển 5 μ l từ đĩa con DMSO sang đĩa pha loãng hợp chất trung gian chứa 95 μ l môi trường và trộn môi trường+hợp chất. Phương pháp này sau đó chuyển 5 μ l từ đĩa pha loãng hợp chất trung gian sang đĩa tế bào thích hợp.
3. Ủ các tế bào được xử lý ở 37 độ trong 24 giờ trong tủ ủ ẩm 5% CO₂.

Ngày 3: Làm tan tế bào và bổ sung vào đĩa MSD

Phong bế đĩa thử nghiệm MSD bằng 50ul chất phong bế A 3%/1X chất đệm rửa MSD từ 1 đến 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch này có thể được bảo quản ở nhiệt độ 4°C lên đến một tháng. Chất đệm phong bế A chứa 1X chất đệm rửa MSD. 20mL 1X chất đệm rửa Tris và 600mg chất phong bế A.

Điều chế chất đệm làm tan:

	3 đĩa (mL)	6 đĩa (mL)	9 đĩa (mL)	12 đĩa (mL)
Chất đệm làm tan MSD	65,0	120	180	240
Hỗn hợp Phosphatase Inh. 1 (hoặc Sigma phosphatase Inhib 2 Cat# P5726-5mL)	0,65	1,2	1,8	2,4
Hỗn hợp Phosphatase Inh. 2 (hoặc Sigma phosphatase Inhib 3, Cat# P0044-5mL)	0,65	1,2	1,8	2,4
Protease inh (hoặc Sigma Cat# P2714-1BTL được tạo lại huyền phù trong 10mL PBS)	0,65	1,2	1,8	2,4

Hút môi trường và làm tan tế bào

1. Làm tan các tế bào trong 50ul chất đệm làm tan. Làm tan ở nhiệt độ trong phòng trong 10 đến 20 phút trên thiết bị lắc đĩa.
2. Trong khi các tế bào đang tan, rửa các đĩa phong bế 1x chất đệm rửa MSD.
3. Chuyển 42ul dịch tan (21 + 21μL) sang đĩa thử nghiệm MSD pPRAS40 được phong bế.
4. Bịt kín các đĩa MSD và ủ ở nhiệt độ 4°C đồng thời lắc qua đêm.

Ngày 4: Thử nghiệm/phát hiện MSD

8. Tạo ra dung dịch chứa 1% chất phong bế A trong 1X chất đệm rửa MSD. (20mL 1X chất đệm rửa Tris và 200mg chất phong bế A (1% trọng lượng/thể tích). Dung dịch này có thể được bảo quản ở nhiệt độ 4°C lên đến một tháng.
9. Rửa các đĩa MSD bằng 1x chất đệm rửa MSD.
10. Bổ sung 10μl kháng thể phát hiện SULFO-TAG đã được pha loãng vào đĩa. Ủ trong 1 giờ đồng thời lắc ở nhiệt độ trong phòng.

	3 đĩa (mL)	6 đĩa (mL)	9 đĩa (mL)	12 đĩa (mL)
1% chất phong bế A trong chất đệm rửa MSD	13,0	25,0	36,0	48,0
2% chất phong bế DM (100X)	0,13	0,25	0,36	0,48
Sulfo-TAG kháng pPRAS40 (50X)	0,26	0,5	0,72	0,96

11. Rửa đĩa 4x bằng 1X chất đệm rửa MSD.

12. Bổ sung 35µl 1X chất đệm đọc đồng thời hút ngược bằng ống pipet để tránh bong bóng.

13. Đọc đĩa ngay lập tức trên công cụ MSD Sector.

Ví dụ 908 Đồng tinh thể với p110α (alpha)

p110α (alpha) được cắt cụt ở đầu tận cùng N được tạo ra theo Chen và các đồng tác giả and Nacht và các đồng tác giả (Chen, P., Y. L. Deng, S. Bergqvist, M. D. Falk, W. Liu, S. Timofeevski và A. Brooun "Engineering of an isolated p110alpha subunit of PI3Kalpha permits crystallization and provides a platform for structure-based drug design," (2014) Protein Sci 23(10): 1332-1340; Nacht, M. et al (2013) "Discovery of a potent and isoform-selective targeted covalent inhibitor of the lipid kinase PI3Kalpha," J. Med. Chem. 56(3): 712-721).

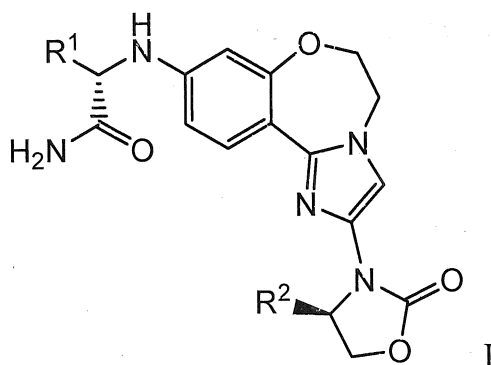
Các phương pháp tiêu chuẩn được áp dụng để tạo ra tinh thể khi có mặt hợp chất dự định. Các tinh thể được thu hoạch được bảo quản để thu thập dữ liệu nhiễu xạ bằng cách nhúng trong nitơ lỏng và được lắp trên đường dẫn chùm sáng synchrotron tạo tia x đơn sắc. Dữ liệu nhiễu xạ được thu thập, rút gọn và kết hợp bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn. Tế bào đơn vị tinh thể học và nhóm không gian là đẳng cấu với các tế bào được báo cáo trước đó (Nacht, 2013; Chen, 2014). Việc bố trí hợp chất dự định vào bản đồ mật độ electron và tinh lọc tinh thể đến giới hạn phân giải nằm trong khoảng từ 2,36 đến 2,56 Å được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn.

Trong sáng chế này, các đơn vị ul, uMol v.v. có nghĩa là µl, µmol, v.v..

Mặc dù sáng chế được mô tả trong một số chi tiết nhờ minh họa và ví dụ nhằm mục đích là để hiểu rõ, phần mô tả và các ví dụ không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Phần mô tả của tất cả các patent và tài liệu khoa học được trích dẫn ở đây được kết hợp toàn bộ một cách rõ ràng bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất được chọn từ công thức I:



và các chất đồng phân lập thể, chất đồng phân hình học, chất hỗn biến, và muối được dụng của nó, trong đó:

R^1 được chọn từ $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, xyclopropyl, và xyclobutyl;

R^2 được chọn từ $-\text{CH}_3$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, và $-\text{CF}_3$.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R^1 là CH_3 hoặc xyclopropyl.
3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó R^2 là $-\text{CHF}_2$.
4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hợp chất công thức I này là:

(*S*)-2-((2-((*S*)-4-(diflometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)propanamit.

5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hợp chất công thức I này là:

(*S*)-2-xyclobutyl-2-((2-((*R*)-4-metyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit.

6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó Công thức I là:

(*S*)-2-xyclopropyl-2-((2-((*S*)-4-(diflometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit.

7. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hợp chất công thức I này là:

(*S*)-2-xyclopropyl-2-((2-((*R*)-4-metyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit.

8. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hợp chất công thức I này là:

(*S*)-2-xyclopropyl-2-((2-((*S*)-4-(flometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)axetamit.

9. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hợp chất công thức I này là:

(*S*)-2-((2-((*S*)-4-(flometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)propanamit.

10. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hợp chất công thức I này là:

(*S*)-2-((2-((*S*)-4-(diflometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)butanamit.

11. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 và chất mang, chất gây trượt, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

12. Dược phẩm theo điểm 11, trong đó chất mang, chất gây trượt, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng được chọn từ silic dioxit, xenluloza dạng bột, xenluloza vi tinh thể, stearat kim loại, natri aluminosilicat, natri benzoat, canxi cacbonat, canxi silicat, tinh bột ngô, magie cacbonat, bột talc không chứa amian, stearowet C, tinh bột, tinh bột 1500, magie lauryl sulfat, magie oxit, và các hỗn hợp của chúng.

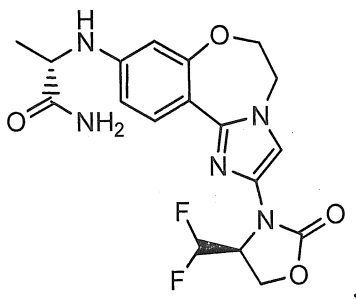
13. Quy trình bào chế dược phẩm bao gồm bước kết hợp hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 với chất mang, chất gây trượt, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

14. Bộ kit dùng để điều trị bệnh ung thư vú, bao gồm:

a) dược phẩm theo điểm 11 hoặc 12; và

b) hướng dẫn sử dụng trong điều trị bệnh ung thư vú.

15. Hợp chất (S)-2-((2-((S)-4-(diflometyl)-2-oxooxazolidin-3-yl)-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-yl)amino)propanamit, có công thức cấu tạo:



hoặc muối dược dụng của nó.

16. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 15 và chất mang, chất gây trượt, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

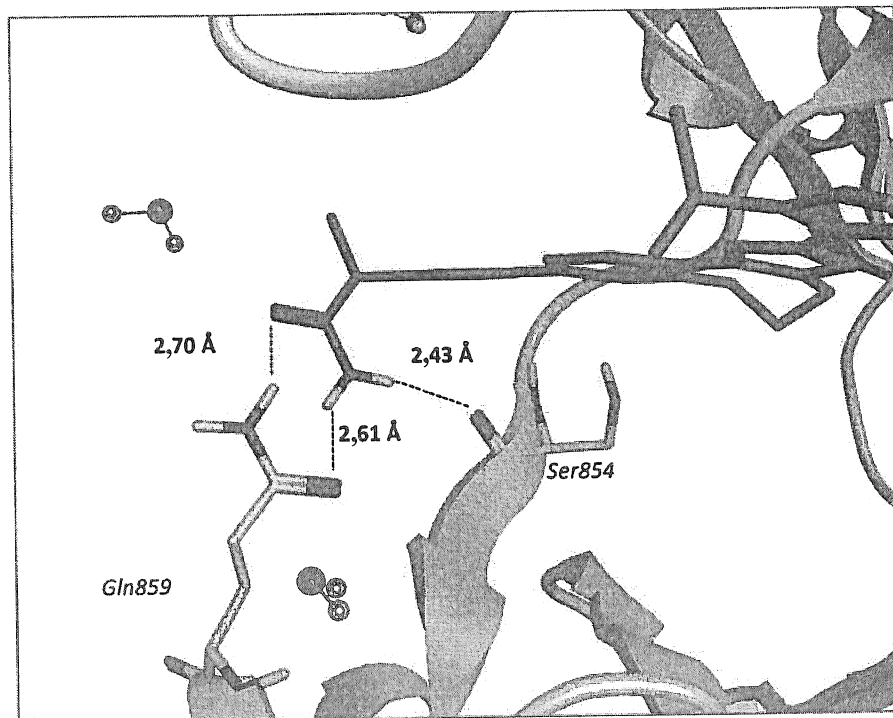
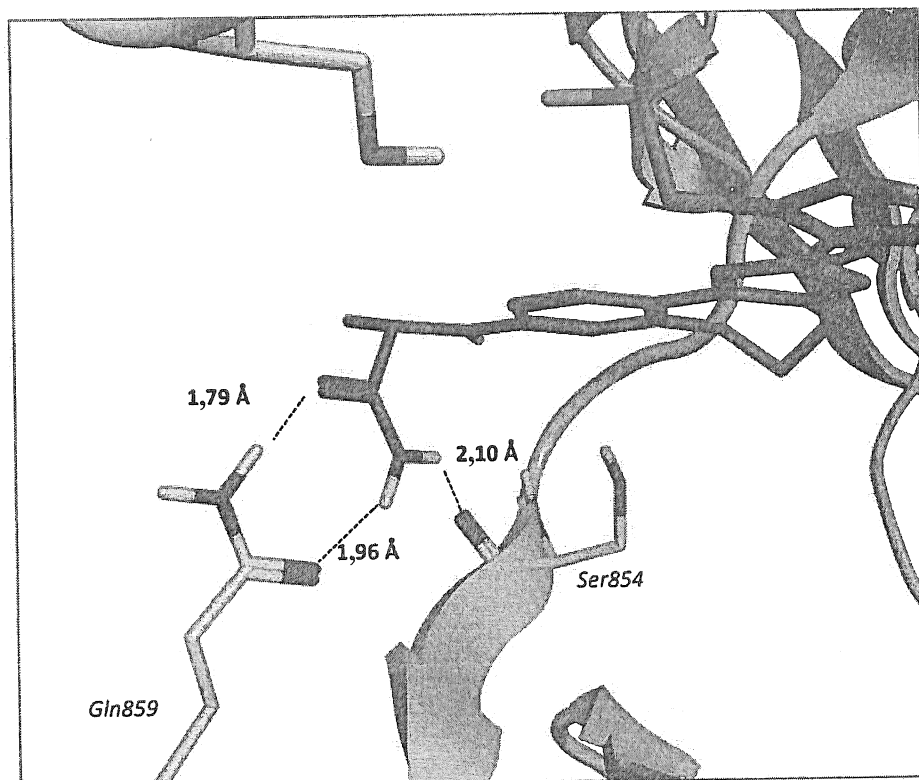
17. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó chất mang, chất gây trượt, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng được chọn từ silic dioxit, xenluloza dạng bột, xenluloza vi tinh thể, stearat kim loại, natri aluminosilicat, natri benzoat, canxi cacbonat, canxi silicat, tinh bột ngô, magie cacbonat, bột talc không chứa amian, stearowet C, tinh bột, tinh bột 1500, magie lauryl sulfat, magie oxit, và các hỗn hợp của chúng

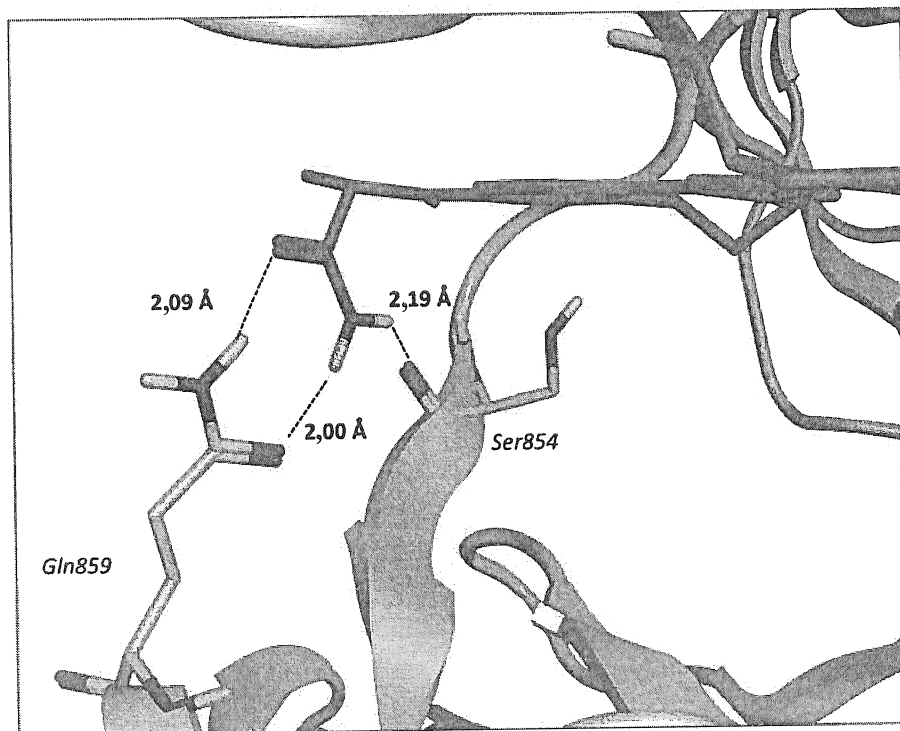
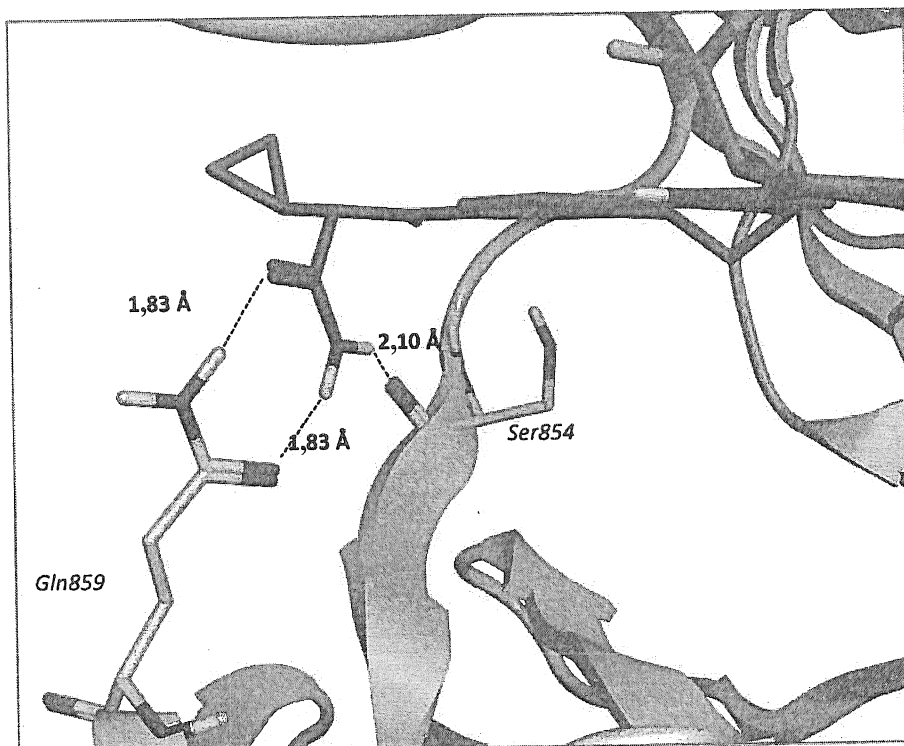
18. Quy trình bào chế dược phẩm, quy trình này bao gồm bước kết hợp hợp chất theo điểm 15 với chất mang, chất gây trượt, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

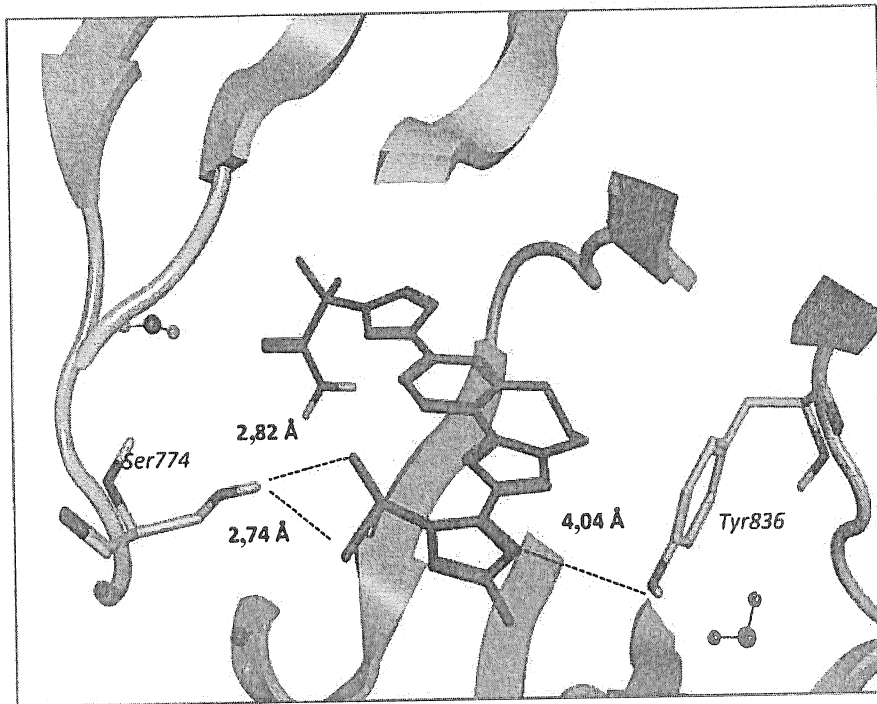
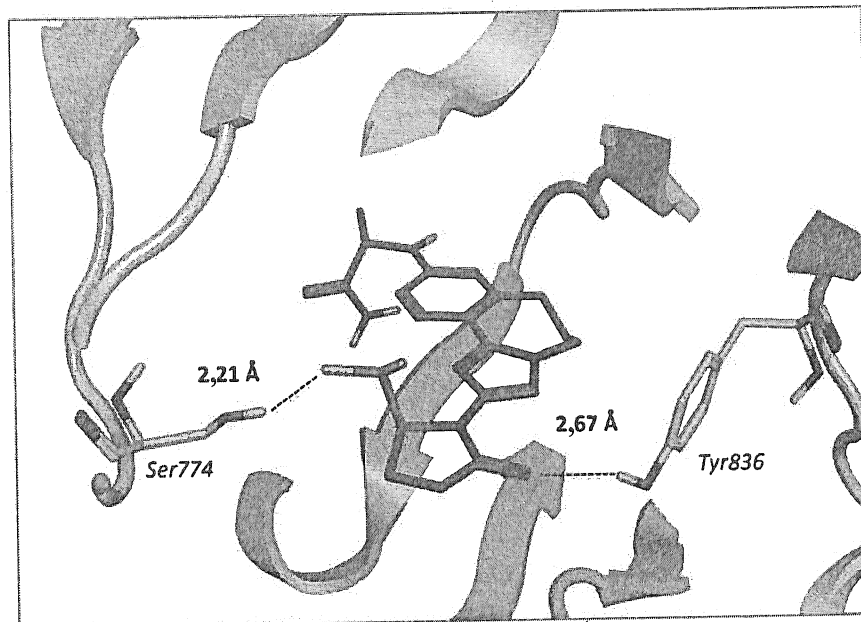
19. Bộ kit dùng để điều trị bệnh ung thư vú, bao gồm:

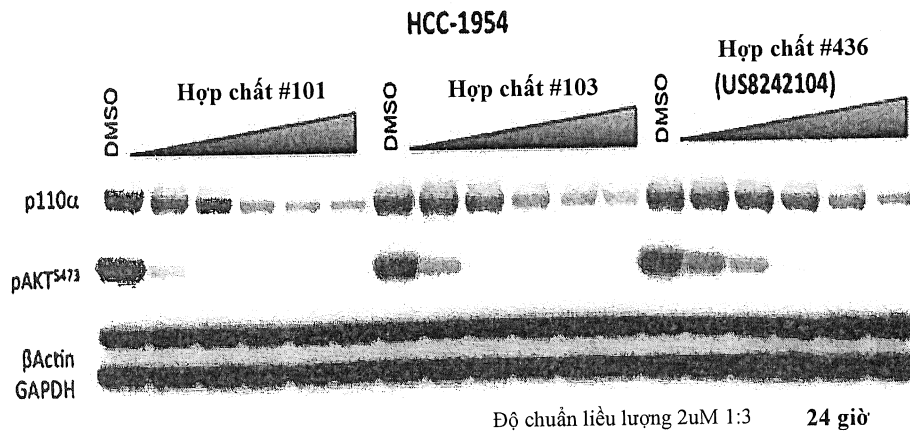
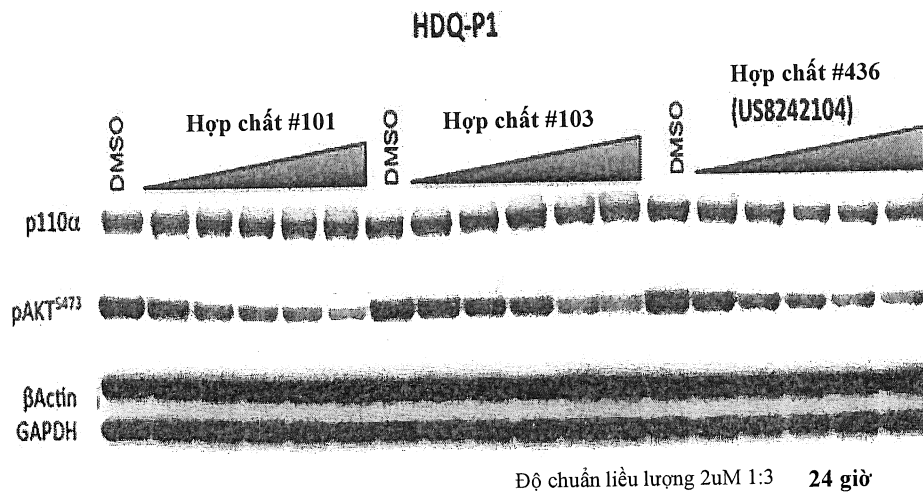
a) dược phẩm theo điểm 16 hoặc 17; và

b) các hướng dẫn sử dụng trong điều trị bệnh ung thư vú.

*Fig. 1A**Fig. 1B*

*Fig. 1C**Fig. 1D*

*Fig. 2A**Fig. 2B*

*Fig. 3A**Fig. 3B*