



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

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

(11)



1-0034101

(51)⁷ C07D 233/91; A61P 3/04; A61P 9/00; (13) B
A61K 31/4168; A61P 3/10

(21) 1-2019-03447

(22) 05/01/2018

(86) PCT/US2018/012491 05/01/2018

(87) WO2018/129258 12/07/2018

(30) 62/443,244 06/01/2017 US; 62/581,355 03/11/2017 US; 62/585,326 13/11/2017 US

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/12/2019 381A

(73) RIVUS PHARMACEUTICALS, INC. (US)

706B Forest Street, Charlottesville, VA 22903, United States of America

(72) KHAN, Shaharyar M. (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT PHENYL VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất là dẫn xuất của phenyl, 5-[(2,4-dinitrophenoxy)metyl]-1-metyl-2-nitro-1H-imidazol hoặc muối được dung của nó, hợp chất này hữu ích để điều hòa hoạt tính ty thể, làm giảm tình trạng béo phì, điều trị các bệnh bao gồm bệnh đái tháo đường và các biến chứng liên quan đến bệnh đái tháo đường. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chất dẫn xuất phenyl mới. Các hợp chất mới này là hữu ích để điều hòa hoạt tính ty thể, làm giảm tình trạng béo phì, điều trị các bệnh bao gồm bệnh đái tháo đường và các biến chứng liên quan đến bệnh đái tháo đường.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh béo phì là một yếu tố nguy cơ đã biết rõ đối với sự phát triển của nhiều loại bệnh thông thường như bệnh đái tháo đường typ 2 (T2D: Type 2 Diabetes) và bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease). Bệnh béo phì thường được coi là mức độ mỡ thừa bất kỳ mà gây ra nguy cơ về sức khỏe. Khi lượng nạp năng lượng vượt quá lượng tiêu hao, lượng calo dư được dự trữ chủ yếu trong mô mỡ, và nếu trạng thái cân bằng dương thực này bị kéo dài, thì bệnh béo phì sẽ xảy ra, nghĩa là có hai thành phần đối với sự cân bằng trọng lượng, và sự bất thường ở phía nào (nạp hay tiêu hao) cũng đều có thể dẫn đến bệnh béo phì. Quá trình này có thể bị làm mất tác dụng bằng cách làm tăng lượng tiêu hao năng lượng hoặc làm giảm lượng nạp năng lượng. Do đó, cần có các dược chất có khả năng kiểm soát mô mỡ chẳng hạn bằng cách làm tăng lượng tiêu hao năng lượng hoặc làm giảm lượng nạp năng lượng.

Cơ thể nhận năng lượng thông qua quá trình oxy hóa thức ăn như glucoza và axit béo. Đã biết rằng ty thể điều khiển sự trao đổi chất trong các tế bào cá thể bằng cách đốt cháy đường và chất béo. Một trong số các chức năng chính của nó là thực hiện quá trình phosphoryl hóa - oxy hóa, mà thông qua quá trình đó năng lượng thu được từ sự trao đổi chất của các nhiên liệu như glucoza hoặc axit béo sẽ được chuyển hóa thành ATP. Quá trình tạo ra ATP trong ty thể được kết hợp với quá trình oxy hóa NADH để dẫn đến sự vận chuyển proton trong chuỗi vận chuyển điện tử. Các chất phân tách hóa học có thể ức chế quá trình sản xuất năng lượng (ATP) hiệu quả trong các tế bào bằng ty thể. Chúng tách cặp quá trình phosphoryl hóa - oxy hóa bằng cách mang các proton đi qua màng ty thể, dẫn tới sự tiêu thụ năng lượng (sự tiêu hao năng lượng) nhanh chóng mà không tạo ra ATP. Nói cách khác, các chất phân tách làm tràn chất nền ty thể bằng các proton, và quá trình oxy hóa NADH tiếp diễn nhưng thay vì tạo ra năng lượng ở dạng ATP, năng lượng của gradien proton bị tổn hao ở dạng nhiệt.

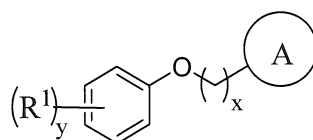
Việc điều khiển các chất phân tách hóa học trong ty thể để làm giảm các chất béo lắng đã trở thành mục tiêu khoa học trong hơn tám mươi năm qua. Xem Simkins S “Dinitrophenol and desiccated thyroid in the treatment of obesity: a comprehensive clinical and laboratory study”. J Am Med Assoc 108: 2110–2117 (1937) và Fleury C et al, Nature Genetics 15, 269 - 272 (1997), Uncoupling Protein-2: A Novel Gene Linked to Obesity and Hyperinsulinemia. Chất phân tách hóa học được biết rõ nhất là 2,4-dinitrophenol (DNP), hợp chất này đã được cho thấy là làm tăng mức tiêu hao năng lượng ở người cũng như ở động vật. Tuy nhiên, các chất phân tách hóa học thường có tính độc. Các mối lo ngại về tác dụng phụ nguy hiểm đã dẫn đến việc loại bỏ DNP ra khỏi thị trường.

Cần có các chất phân tách ty thể an toàn mà có thể tạo ra tác dụng y học mong muốn một cách an toàn mà không gây hại cho cá thể. Các chất dẫn xuất phenyl mới được bộc lộ trong sáng chế đáp ứng được các nhu cầu này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến hợp chất mới, 5-[(2, 4-dinitrophenoxy)methyl]-1-metyl-2-nitro-1H-imidazol hoặc muối được dụng của nó (Hợp chất A).

Sáng chế cũng đề cập đến các hợp chất mới có Công thức I



Công thức I,

hoặc muối được dụng của nó, trong đó

vòng A là imidazol, được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế độc lập được chọn từ –NO₂ và metyl;

từng nhóm R¹ độc lập là halo, xyano, NO₂, -C(O)H, -COOH, -C(O)O(C₁₋₄ alkyl), -C(O)(C₁₋₄ alkyl), C₁₋₄ alkyl, C₁₋₄ alkenyl, hoặc C₁₋₄ alkynyl, trong đó từng nhóm C₁₋₄ alkyl, C₁₋₄ alkenyl, và C₁₋₄ alkynyl này độc lập và tùy ý được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế được chọn từ nhóm gồm halo, NO₂, và xyano;

y bằng 1, 2, hoặc 3; và

x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6.

Theo một số phương án, vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ –NO₂ và metyl;

từng nhóm R^1 độc lập là halo, NO_2 , C_{1-4} alkyl, C_{1-4} alkenyl, và C_{1-4} alkynyl, trong đó từng nhóm C_{1-4} alkyl, và C_{1-4} alkenyl đã nêu độc lập và tùy ý được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế được chọn từ nhóm gồm halo, NO_2 , và xyano;

y bằng 1, 2, hoặc 3; và

x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3.

Theo một số phương án, vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-NO_2$ và methyl;

từng nhóm R^1 độc lập là halo, hoặc NO_2 ;

y bằng 1, 2, hoặc 3; và

x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2.

Theo một số phương án, vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-NO_2$ và methyl;

từng nhóm R^1 độc lập là halo, hoặc NO_2 ;

y bằng 1, 2, hoặc 3; và

x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2.

Theo một số phương án, vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-NO_2$ và methyl;

từng nhóm R^1 là NO_2 ;

y bằng 1 hoặc 2; và

x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2.

Theo một số phương án, vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-NO_2$ và methyl;

từng nhóm R^1 là NO_2 ;

y bằng 2; và

x bằng 1.

Các hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều hòa hoạt tính ty thể, làm giảm tình trạng béo phì, điều trị các bệnh bao gồm rối loạn chuyển hóa, bệnh đái tháo đường và các biến chứng liên quan đến bệnh đái tháo đường như bệnh tim và chứng suy thận, và điều hòa hoặc kiểm soát sự tăng thể trọng ở động vật có vú.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa mức phơi nhiễm tổng cộng của DNP (màu xám) và Hợp chất A (màu đen) được tính toán bởi diện tích dưới đường cong (AUC: Area Under the Curve)

trong 24 giờ đầu tiên sau khi sử dụng hợp chất này qua đường miệng và nồng độ tương ứng của nó mà được thể hiện bên dưới trục x. Một nửa số động vật được cho sử dụng DNP không sống sót trong nghiên cứu, điều này thiết lập trị số LD50 cho DNP là 100mpk.

Fig.2 minh họa việc sử dụng Hợp chất A cho chuột nhắt. Nồng độ cực đại trong huyết tương (Cmax) của gốc DNP được làm giảm mạnh so với việc cho sử dụng DNP trực tiếp, và độc tính giảm mạnh.

Fig.3 cho thấy rằng mức phơi nhiễm tổng cộng của DNP tăng theo kiểu tuyến tính cho tới ít nhất là mức liều 1500mpk Hợp chất A. Mức phơi nhiễm tổng cộng của DNP sau khi sử dụng 100mpk DNP được thiết lập là 100% trên đồ thị này. Mỗi điểm dữ liệu được thể hiện ở dạng một chấm màu đen. Tính chất tuyến tính thẳng ($Y=0,1932 \cdot x+13,94$) được vẽ đồ thị ở dạng đường nét liền màu đen, và khoảng tin cậy 95% được vẽ đồ thị ở dạng các đường nét đứt. $R^2 = 0,9770$. Mức phơi nhiễm trên đồ thị được thể hiện ở dạng tỷ lệ phần trăm của mức phơi nhiễm DNP tổng cộng, trong đó mức phơi nhiễm sau khi cho sử dụng liều 100mpk DNP được thiết lập là 100%.

Fig.4 cho thấy rằng nồng độ cực đại trong huyết tương của DNP ở chuột nhắt được nhận Hợp chất A được làm tăng tuyến tính theo liều, nhưng không đạt được cùng các mức như được quan sát thấy khi cho sử dụng liều LD50 của DNP. Nồng độ cực đại của DNP sau khi sử dụng 100mpk DNP được thiết lập là 100% trên đồ thị này. Mỗi điểm dữ liệu được thể hiện ở dạng một chấm màu đen. Tính chất tuyến tính thẳng ($Y=0,04178 \cdot x+11,34$) được vẽ đồ thị ở dạng đường nét liền màu đen, và khoảng tin cậy 95% được vẽ đồ thị ở dạng các đường nét đứt. $R^2 = 0,9770$.

Fig.5 minh họa nồng độ trong huyết tương của các enzym ALT, AST và ALP trong gan của chuột nhắt bị gây bệnh gan nhiễm mỡ sau 4 tuần được cho sử dụng Hợp chất A.

Fig.6 minh họa lượng glucoza trong máu ở các động vật được điều trị bằng Hợp chất A so với các động vật đối chứng không được điều trị ở thời gian 120 phút sau khi cho nhận liều glucoza quyết định ở cả ba nhóm điều trị ($p<0,05$ đối với nhóm điều trị bằng liều 25mg/kg và 100mg/kg, $p<0,01$ đối với nhóm điều trị bằng liều 5mg/kg). Các khác biệt giữa nhóm dùng chất dẫn và nhóm được điều trị đều có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng được thực hiện sau năm tuần điều trị bằng Hợp chất A.

Fig.7 minh họa các giọt lipid trong gan chuột nhắt đối chứng ở các con chuột nhắt

được cho ăn theo chế độ ăn thiếu metionin/cholin (MCD: Methionine/Choline-Deficient) gây bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis).

Fig.8 minh họa các giọt lipid của chuột nhắt trong gan chuột nhắt ở các con chuột nhắt được cho ăn theo chế độ ăn MCD gây bệnh NASH mà được điều trị bằng 5mpk Hợp chất A.

Fig.9 minh họa TNF α và IL-1 β trong gan giảm ở các con chuột nhắt được cho ăn thức ăn theo chế độ ăn MCD gây bệnh NASH mà được điều trị bằng 5mpk Hợp chất A.

Fig.10 minh họa mức TG trong huyết thanh của các nhóm nghiên cứu thu được từ ví dụ 5.

Fig.11 minh họa mức FFA trong huyết thanh của các nhóm nghiên cứu thu được từ ví dụ 5.

Fig.12 minh họa mức TG trong gan của các nhóm nghiên cứu thu được từ ví dụ 5.

Fig.13 minh họa mức xeromit trong gan của các nhóm nghiên cứu thu được từ ví dụ 5.

Fig.14 minh họa đường cong tiêu thụ thức ăn của các nhóm nghiên cứu thu được từ ví dụ 6.

Fig.15 minh họa mức axit béo tự do (FFA: Free Fatty Acid) ở nhóm thứ ba thu được từ ví dụ 6. Lưu ý rằng $p < 0,05$, so với $p < 0,01$ khi so với nhóm dùng chất dẫn (Giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình).

Fig.16 minh họa mức triglyxerit (TG) trong máu thu được từ ví dụ 6 thể hiện kết quả ở các nhóm được điều trị thấp hơn so với đối chứng dùng chất dẫn trong toàn bộ các nhóm nghiên cứu.

Fig.17 minh họa mức TG trong gan cũng thấp hơn ở toàn bộ các nhóm nghiên cứu của ví dụ 6 và mức giảm có ý nghĩa thống kê ở nhóm được điều trị bằng các mức cao nhất của Hợp chất A (5,0 mg/kg) với $p < 0,05$ so với nhóm dùng chất dẫn (Giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình).

Fig.18 minh họa mức insulin trong máu được quan sát thấp hơn trong toàn bộ các nhóm điều trị ở ví dụ 6.

Fig.19 minh họa tác dụng của Sorafenib khi sử dụng riêng và khi sử dụng kết hợp với Hợp chất A trong quá trình điều trị mẫu động vật ghép cùng chỗ dòng tế bào ung thư gan Hep3B-luc của người như được mô tả trong ví dụ 7.

Fig.20 minh họa thiết kế thực nghiệm và sự tiến triển bệnh ở mẫu động vật bị gây

bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn. Xem ví dụ 8.

Fig.21 minh họa sự tăng thể trọng ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn sau khi chế độ ăn Western được đưa vào (tuần 0) và trong các quá trình điều trị (tuần 12-20). Dữ liệu cho thấy mức giảm tổng thể trọng đáng kể ở nhóm dùng Hợp chất A với liều cao. Xem ví dụ 8.

Fig.22 minh họa mức giảm tổng thể trọng đáng kể ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn sau tám tuần sử dụng Hợp chất A với liều cao. Xem ví dụ 8.

Fig.23 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với trọng lượng gan sau tám tuần sử dụng thuốc theo liều. Xem ví dụ 8.

Fig.24 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với trọng lượng gan sau tám tuần sử dụng thuốc theo liều. Xem ví dụ 8.

Fig.25 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với mức ALT (alanin aminotransaminaza) trong huyết thanh. Xem ví dụ 8.

Fig.26 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với mức Alk Phos (phosphatasa kiềm) trong huyết thanh. Xem ví dụ 8.

Fig.27 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với mức AST (aspartat transaminaza) trong huyết thanh. Xem ví dụ 8.

Fig.28 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với mức ALB (albumin) trong huyết thanh. Xem ví dụ 8.

Fig.29 minh họa sự tăng trưởng tế bào của các dòng tế bào NCI-60 được điều trị bằng Hợp chất A hoặc DNP ở nồng độ 10 μ M. Xem ví dụ 10.

Fig.30 minh họa quá trình hình thành DNP từ 2 μ M Hợp chất A trong các vi thể gan của các loài khác nhau và quá trình hình thành này cần có NADPH. Xem ví dụ 11.

Fig.31 minh họa nghiên cứu độc tính ở chuột nhắt được cho sử dụng liều lặp lại trong 7 ngày để đánh giá sự thay đổi về các thông số tập tính và độ an toàn. Hợp chất A

được cho dùng qua đường miệng ở các mức cao tới 500 mg/kg không gây ra sự rối loạn chức năng thận như được xác định bởi mức creatinin trong máu, trong khi DNP với liều thấp ở mức 1 mg/kg lại làm tăng mức creatinin trong máu. Các thay đổi về mức creatinin phụ thuộc vào Cmax.

Fig.32 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với mức ALT, AST và ALP trong huyết thanh. Xem ví dụ 8.

Fig.33 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều cao đối với các điểm hoạt tính NAS và SAF. Cả hai đều được làm giảm đáng kể bằng Hợp chất A.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Như được sử dụng ở đây, tất cả các thuật ngữ đều có ý nghĩa như sẽ được hiểu theo cách thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực được phẩm.

Như được sử dụng ở đây, lượng hữu hiệu được xác định là lượng cần thiết để tạo ra tác dụng điều trị đối với bệnh nhân được điều trị, và thường được xác định dựa trên độ tuổi, diện tích bề mặt, thể trọng và tình trạng của bệnh nhân.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “động vật có vú”, “bệnh nhân” hoặc “đối tượng” dùng để chỉ động vật bất kỳ bao gồm người, gia súc và động vật nuôi trong gia đình. Cụm từ “động vật nuôi trong gia đình” hoặc “các động vật nuôi trong gia đình” dùng để chỉ các động vật được nuôi làm thú cưng. Ví dụ về động vật nuôi trong gia đình bao gồm mèo, chó, và ngựa.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kiểm soát”, “điều trị” hoặc “sự điều trị” một tình trạng bao gồm: (1) ức chế bệnh, tình trạng hoặc rối loạn, nghĩa là làm ngừng lại hoặc làm giảm sự phát triển của bệnh hoặc các triệu chứng/dấu hiệu lâm sàng của nó; hoặc (2) làm thuyên giảm bệnh, nghĩa là gây ra sự thoái triển của bệnh hoặc các triệu chứng/dấu hiệu lâm sàng của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “dược dụng” dùng để chỉ tính chất thích hợp để dùng cho động vật có vú, động vật nuôi trong gia đình hoặc gia súc.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “DNP” dùng để chỉ 2,4-dinitrophenol hoặc muối, solvat hoặc sản phẩm cộng của nó.

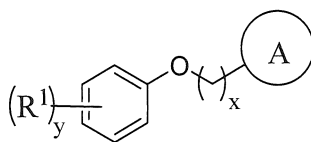
Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “rối loạn chuyển hóa” dùng để chỉ tình trạng

được đặc trưng bởi sự thay đổi hoặc rối loạn ở chức năng chuyển hóa.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “muối được dụng” dùng để chỉ muối là axit được dụng không độc, bao gồm axit vô cơ, axit hữu cơ, solvat hoặc hydrat của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất mang được dụng” dùng để chỉ nguyên liệu, chế phẩm hoặc chất mang được dụng như chất độn, chất ổn định, tác nhân phân tán, tác nhân tạo hỗn dịch, chất pha loãng, tá dược, tác nhân làm đặc, dung môi hoặc nguyên liệu tạo nang dạng lỏng hoặc rắn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các hợp chất mới có Công thức I



Công thức I,

hoặc muối được dụng của nó, trong đó

vòng A là imidazol, được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế độc lập được chọn từ –NO₂ và methyl;

từng nhóm R¹ độc lập là halo, xyano, NO₂, –C(O)H, –COOH, –C(O)O(C₁₋₄ alkyl), –C(O)(C₁₋₄ alkyl), C₁₋₄ alkyl, C₁₋₄ alkenyl, hoặc C₁₋₄ alkynyl, trong đó từng nhóm C₁₋₄ alkyl, C₁₋₄ alkenyl, và C₁₋₄ alkynyl đã nêu độc lập và tùy ý được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế được chọn từ nhóm gồm halo, NO₂, và xyano;

y bằng 1, 2, hoặc 3; và

x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6.

Theo một số phương án, vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ –NO₂ và methyl;

từng nhóm R¹ độc lập là halo, NO₂, C₁₋₄ alkyl, C₁₋₄ alkenyl, và C₁₋₄ alkynyl, trong đó từng nhóm C₁₋₄ alkyl và C₁₋₄ alkenyl đã nêu độc lập và tùy ý được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế được chọn từ nhóm gồm halo, NO₂, và xyano;

y bằng 1, 2, hoặc 3; và

x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3.

Theo một số phương án, vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ –NO₂ và methyl;

từng nhóm R¹ độc lập là halo, hoặc NO₂;

y bằng 1, 2, hoặc 3; và

x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2.

Theo một số phương án, vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-\text{NO}_2$ và metyl;

từng nhóm R^1 độc lập là halo, hoặc NO_2 ;

y bằng 1, 2, hoặc 3; và

x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2.

Theo một số phương án, vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-\text{NO}_2$ và metyl;

từng nhóm R^1 là NO_2 ;

y bằng 1 hoặc 2; và

x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2.

Theo một số phương án, vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-\text{NO}_2$ và metyl;

từng nhóm R^1 là NO_2 ;

y bằng 2; và

x bằng 1.

Theo một số phương án, vòng A là 1-imidazolyl, 5-imidazolyl, hoặc 2-imidazolyl.

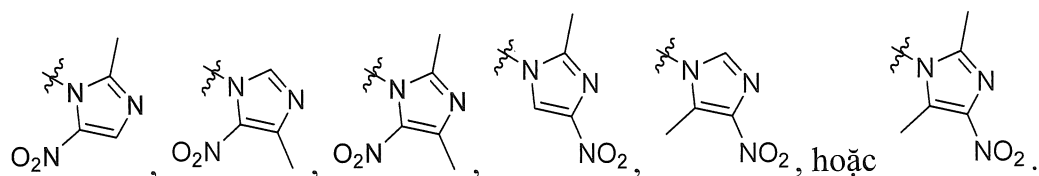
Theo một số phương án, vòng A là 1-imidazolyl hoặc 5-imidazolyl.

Theo một số phương án, vòng A là 1-imidazolyl.

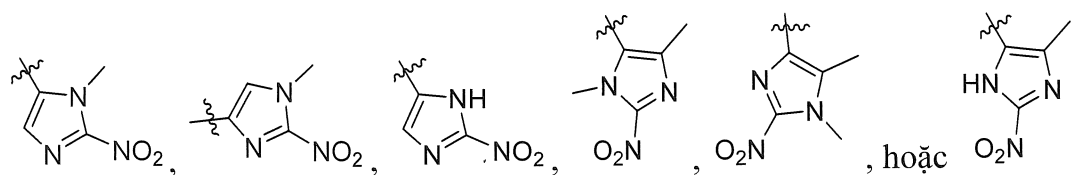
Theo một số phương án, vòng A là 5-imidazolyl.

Theo một số phương án, vòng A là 2-imidazolyl.

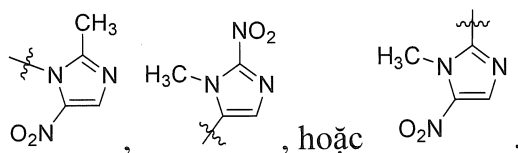
Theo một số phương án, vòng A là



Theo một số phương án, vòng A là



Theo một số phương án, vòng A là



Theo một số phương án, từng nhóm R^1 độc lập là halo, xyano, NO_2 , C_{1-4} alkyl hoặc C_{1-4} alkenyl, trong đó từng nhóm C_{1-4} alkyl, và C_{1-4} alkenyl đã nêu độc lập và tùy ý được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế xyano hoặc flo.

Theo một số phương án, nhóm thế halo được chọn từ Cl và Br. Theo một phương án khác, R^1 là CH_2F , CHF_2 , hoặc CF_3 .

Theo một số phương án, từng nhóm C_{1-4} alkyl độc lập là metyl, etyl, propyl, hoặc butyl. Theo một số phương án khác, từng nhóm C_{1-4} alkyl độc lập là propyl hoặc butyl. Theo các phương án khác nữa, từng nhóm C_{1-4} alkyl độc lập là butyl. Theo một phương án khác, từng nhóm C_{1-4} alkyl là *tert*-butyl.

Theo một số phương án, từng nhóm C_{1-4} alkenyl độc lập là etenyl, alyl, but-3-en-1-yl, hoặc but-2-en-1-yl, tùy ý được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế xyano. Theo một số phương án khác, nhóm C_{1-4} alkenyl đã nêu được thế bằng hai nhóm thế xyano. Theo một

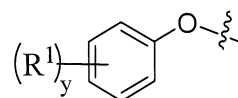
phương án khác, nhóm C_{1-4} alkenyl đã nêu là .

Theo một số phương án, R^1 là NO_2 .

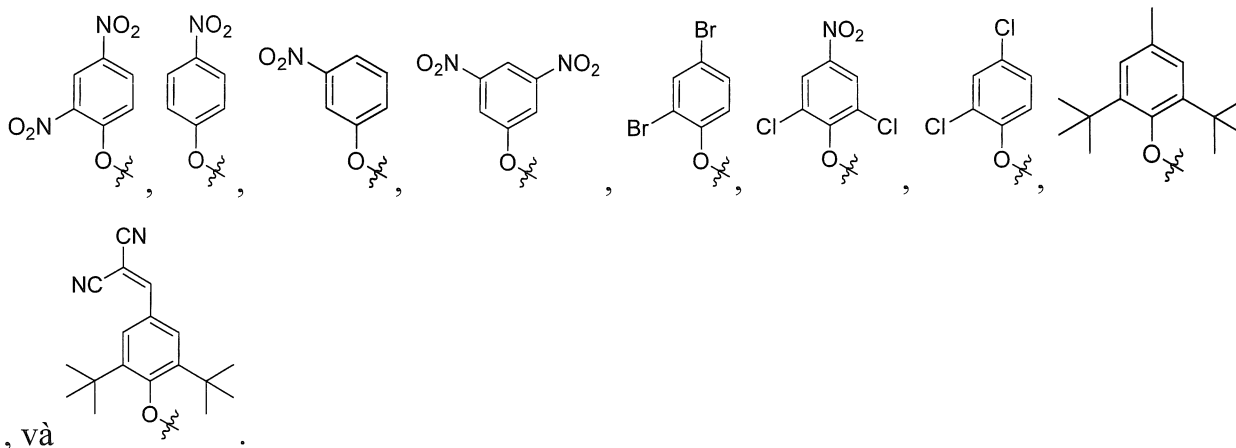
Theo một số phương án, R^1 là halo hoặc NO_2 .

Theo một số phương án, y bằng 2 và từng nhóm R^1 là NO_2 hoặc halo.

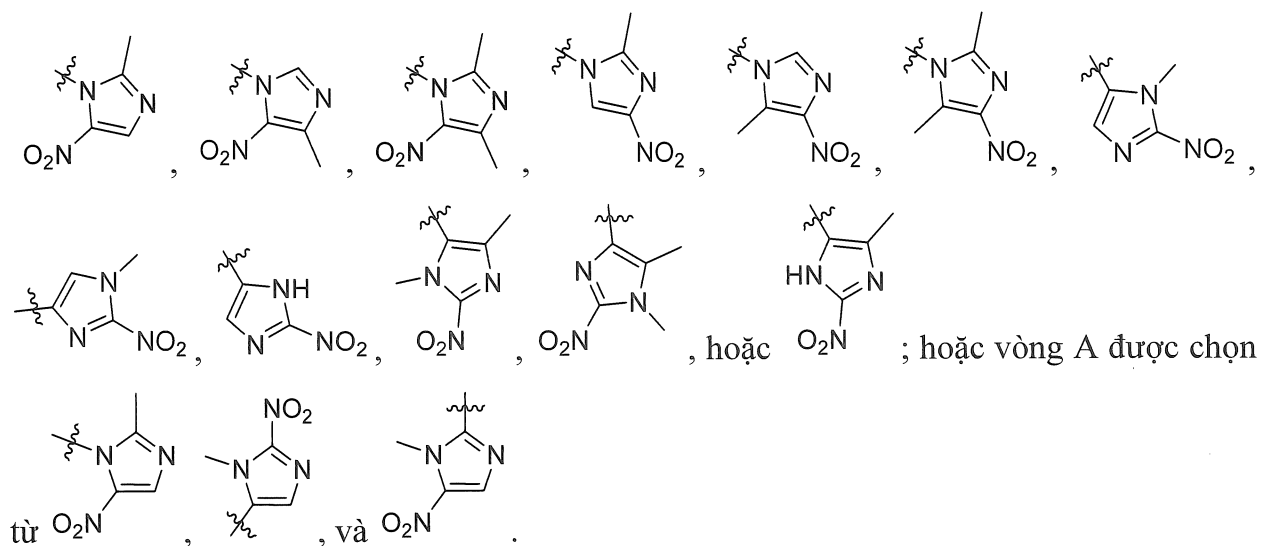
Theo một số phương án, gốc



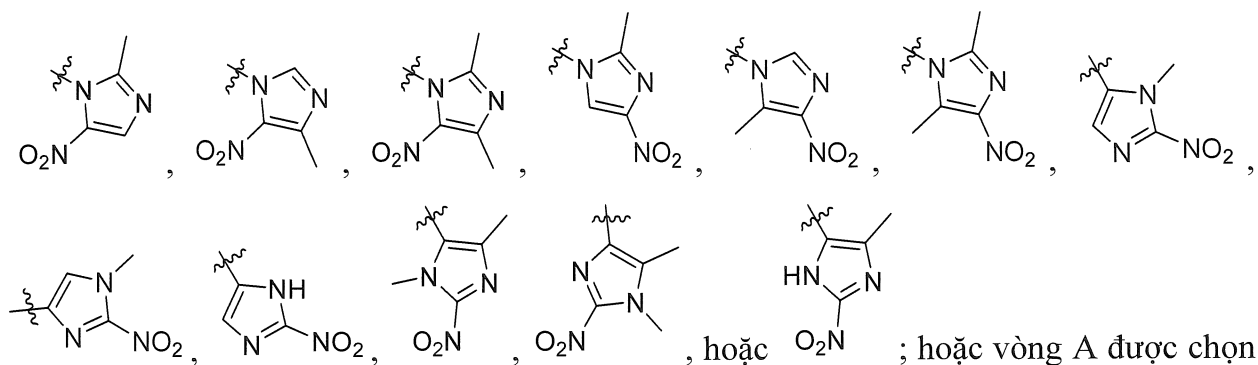
được chọn từ

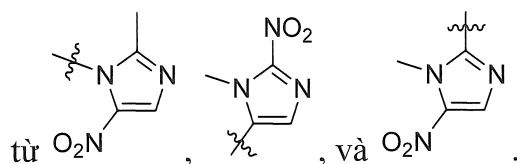


Theo một số phương án, từng nhóm R^1 độc lập là halo, xyano, NO_2 , C_{1-4} alkyl hoặc C_{1-4} alkenyl, trong đó từng nhóm C_{1-4} alkyl và C_{1-4} alkenyl đã nêu độc lập và tùy ý được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế xyano và vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-\text{NO}_2$ hoặc metyl; hoặc vòng A là imidazol, được thế bằng một nhóm $-\text{NO}_2$ và một nhóm metyl; hoặc vòng A được chọn từ nhóm gồm 1-imidazolyl, 5-imidazolyl, và 2-imidazolyl; hoặc vòng A được chọn từ nhóm gồm 1-imidazolyl và 5-imidazolyl; hoặc vòng A là 1-imidazolyl; hoặc vòng A là 5-imidazolyl; hoặc vòng A là 2-imidazolyl; hoặc vòng A là:

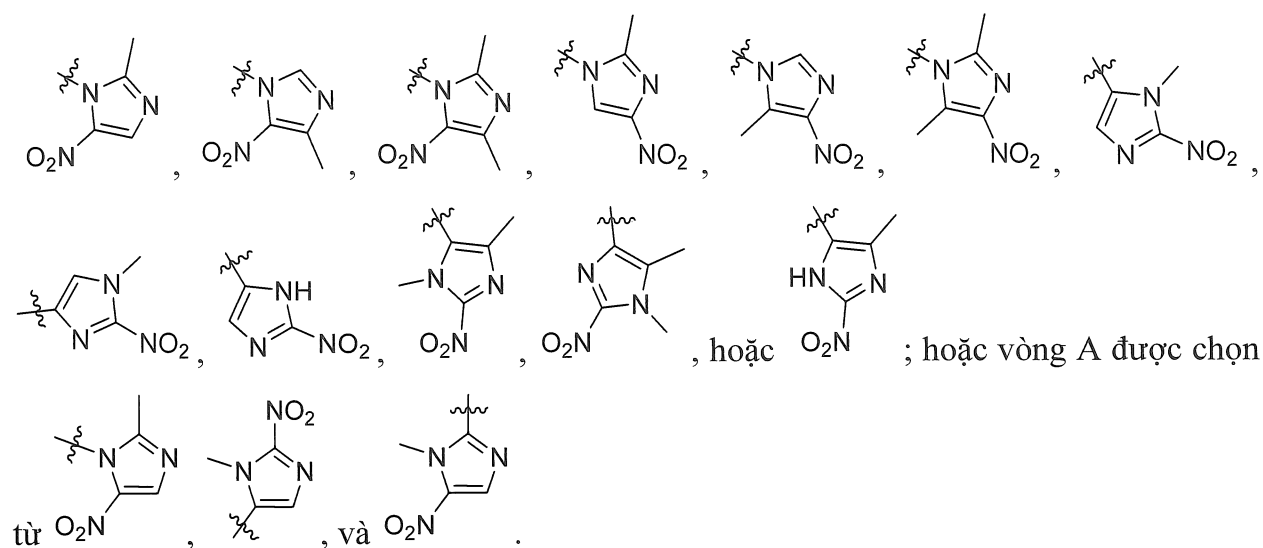


Theo một số phương án, từng nhóm R^1 độc lập là Cl, Br, xyano, NO_2 , metyl, etyl, propyl, butyl etenyl, alyl, but-3-en-1-yl, hoặc but-2-en-1-yl, trong đó etenyl, alyl, but-3-en-1-yl, hoặc but-2-en-1-yl đã nêu tùy ý được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế xyano và vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-\text{NO}_2$ hoặc metyl; hoặc vòng A là imidazol, được thế bằng một nhóm $-\text{NO}_2$ và một nhóm metyl; hoặc vòng A được chọn từ nhóm gồm 1-imidazolyl, 5-imidazolyl, và 2-imidazolyl; hoặc vòng A được chọn từ nhóm gồm 1-imidazolyl và 5-imidazolyl; hoặc vòng A là 1-imidazolyl; hoặc vòng A là 5-imidazolyl; hoặc vòng A là 2-imidazolyl; hoặc vòng A là:

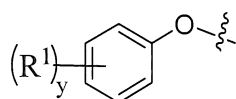




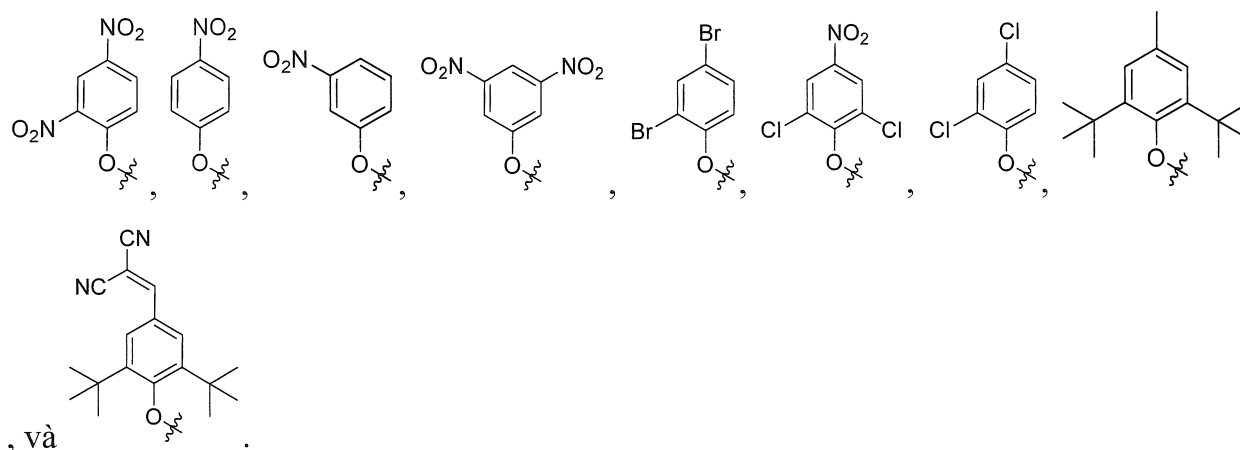
Theo một số phương án, từng nhóm R^1 độc lập là Cl, Br, xyano, NO_2 , metyl, *ter*-butyl, hoặc etenyl, trong đó etenyl đã nêu tùy ý được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm thế xyano và vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-NO_2$ hoặc metyl; hoặc vòng A là imidazol, được thế bằng một nhóm $-NO_2$ và một nhóm metyl; hoặc vòng A được chọn từ nhóm gồm 1-imidazolyl, 5-imidazolyl, và 2-imidazolyl; hoặc vòng A được chọn từ nhóm gồm 1-imidazolyl và 5-imidazolyl; hoặc vòng A là 1-imidazolyl; hoặc vòng A là 5-imidazolyl; hoặc vòng A là 2-imidazolyl; hoặc vòng A là:



Theo một số phương án, gốc

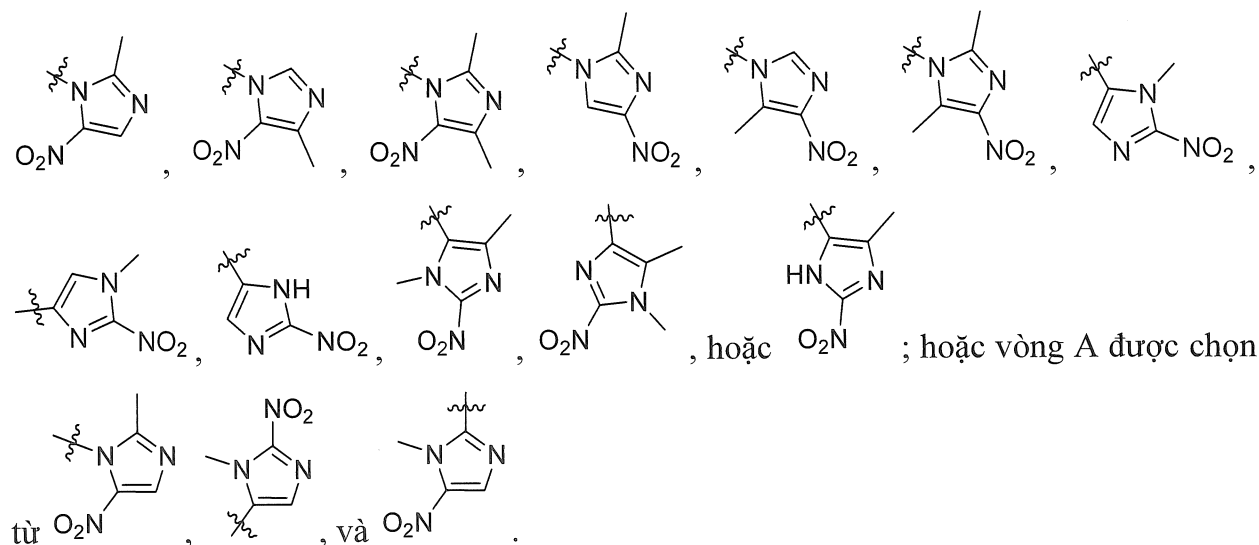


được chọn từ



và vòng A là imidazol, được thế bằng 2 nhóm thế độc lập được chọn từ $-NO_2$ hoặc metyl;

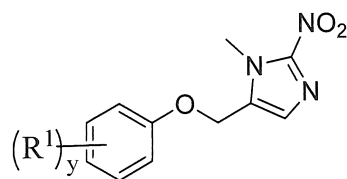
hoặc vòng A là imidazol, được thế bằng một nhóm $-\text{NO}_2$ và một nhóm methyl; hoặc vòng A được chọn từ nhóm gồm 1-imidazolyl, 5-imidazolyl, và 2-imidazolyl; hoặc vòng A được chọn từ nhóm gồm 1-imidazolyl và 5-imidazolyl; hoặc vòng A là 1-imidazolyl; hoặc vòng A là 5-imidazolyl; hoặc vòng A là 2-imidazolyl; hoặc vòng A là:



Theo một số phương án, y bằng 1. Theo một số phương án, y bằng 2. Theo một số phương án, y bằng 3.

Theo một số phương án, x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3. Theo một phương án khác, x bằng 1. Theo một phương án khác nữa, x bằng 2.

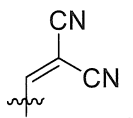
Theo một số phương án, các hợp chất mới theo sáng chế có thể được thể hiện bằng Công thức IIa:



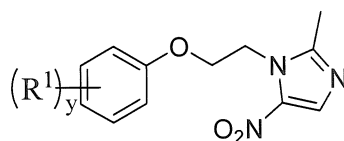
Công thức IIa

hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^1 và y được xác định như ở trên.

Theo một số phương án của Công thức IIa, y bằng 1 và R^1 là NO_2 . Theo một phương án khác, y bằng 2 và từng nhóm R^1 độc lập là NO_2 hoặc halo. Theo một phương án khác, y bằng 2 và từng nhóm R^1 độc lập là NO_2 , Cl, hoặc Br. Theo một phương án khác, y bằng 3 và từng nhóm R^1 độc lập là NO_2 hoặc Cl. Theo một phương án khác, y bằng 3 và từng nhóm R^1 độc lập là methyl hoặc *tert*-butyl. Theo một phương án khác, y bằng 3 và từng nhóm R^1 độc lập là *tert*-butyl hoặc



Theo một số phương án, các hợp chất mới theo sáng chế có thể được thể hiện bằng Công thức IIb:



Công thức IIb

hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^1 và y được xác định như ở trên.

Theo một số phương án của Công thức IIb, y bằng 1 và từng nhóm R^1 độc lập là NO_2 . Theo một phương án khác, y bằng 2 và từng nhóm R^1 độc lập là NO_2 hoặc halo. Theo một phương án khác, y bằng 2 và từng nhóm R^1 độc lập là NO_2 hoặc Cl. Theo một phương án khác, y bằng 3 và từng nhóm R^1 độc lập là NO_2 hoặc Cl.

Theo một phương án, hợp chất mới theo sáng chế được chọn từ các hợp chất được liệt kê trong bảng A dưới đây.

Bảng A

Hợp chất #	Tên công thức cấu tạo	Công thức cấu tạo
1	1-[2-(2,4-Dinitro-phenoxy)-etyl]-2-metyl-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol	
2 (Hợp chất A)	5-(2,4-Dinitro-phoxymetyl)-1-metyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol	
3	1-Metyl-2-nitro-5-(4-nitro-phoxymetyl)-1 <i>H</i> -imidazol	
4	1-Metyl-2-nitro-5-(3-nitro-phoxymetyl)-1 <i>H</i> -imidazol	
5	5-(3,5-Dinitro-phoxymetyl)-1-metyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol	

Hợp chất #	Tên công thức cấu tạo	Công thức cấu tạo
6	5-(2,4-Diclo-phenoxy)metyl)-1-metyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazolimidazol	
7	5- ((2,4-dibromophenoxy)metyl)-1-metyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol	
8	5-(2,6-Diclo-4-nitro-phenoxy)metyl)-1-metyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol	
9	2-(3,5-di-tert-butyl-4-((1-metyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)methoxy)benzyliden)malononitril	
10	5-((2,6-di-tert-butyl-4-metylphenoxy)metyl)-1-metyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol	
11	2-Metyl-5-nitro-1-(4-nitro-phenoxy)metyl)-1 <i>H</i> -imidazol	
12	2-Metyl-5-nitro-1-(3-nitro-phenoxy)metyl)-1 <i>H</i> -imidazol	
13	1-(3,5-Dinitro-phenoxy)metyl)-2-metyl-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol	

Hợp chất #	Tên công thức cấu tạo	Công thức cấu tạo
14	1-(2,4-Diclo-phenoxy-metyl)-2-metyl-5-nitro-1H-imidazol	
15	1-(2,6-Diclo-4-nitro-phenoxy-metyl)-2-metyl-5-nitro-1H-imidazol	
16	2- ((2,4-dinitrophenoxy)metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol	
17	2-[2-(2,4-Dinitro-phenoxy)-etyl]-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol	
18	1-Metyl-5-nitro-2-(4-nitro-phenoxy-metyl)-1H-imidazol	
19	1-Metyl-5-nitro-2-(3-nitro-phenoxy-metyl)-1H-imidazol	
20	2-(3,5-Dinitro-phenoxy-metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol	
21	2-(2,4-Diclo-phenoxy-metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol	
22	2-(2,6-Diclo-4-nitro-phenoxy-metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol	

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất mới, 5-[(2, 4-dinitrophenoxy)metyl]-1-metyl-2-nitro-1H-imidazol hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị các rối loạn liên quan đến ty thể, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh béo phì, bệnh đái

tháo đường, chứng kháng insulin, và bệnh suy tim hoặc suy thận ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị bệnh, rối loạn và tình trạng liên quan đến các khiếm khuyết về chức năng ty thể ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế có thể kích thích mức tiêu thụ oxy (OCR: Oxygen Consumption Rate) ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị bệnh đái tháo đường, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), bệnh thoái hóa mỡ ở gan, và bệnh đái tháo đường typ 2 (T2DM) ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị chứng loạn dưỡng mỡ (mắc phải hoặc di truyền) ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị chứng tăng triglycerit huyết ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị các bệnh hoặc rối loạn chuyển hóa ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị bệnh béo phì hoặc làm giảm tình trạng béo phì ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để kiểm soát hoặc phòng ngừa sự tăng thể trọng hoặc duy trì thể trọng ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để kiểm soát hoặc phòng ngừa bệnh béo phì hoặc tình trạng thừa chất béo trong cơ thể ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị chứng rối loạn lipid huyết ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị bệnh tim mạch ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị bệnh tim ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị bệnh tim mạch ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị bệnh vữa xơ động mạch ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để kiểm soát hoặc phòng ngừa tổn thương thiếu máu - tái tưới máu ở động vật có vú cần điều trị.

Theo một phương án khác, hợp chất mới theo sáng chế hữu ích để điều trị chứng viêm và chứng xơ hóa gây ra bệnh NASH.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm bao gồm chất mang được dụng và hợp chất mới theo sáng chế.

Các đường dùng thuốc

Khi sử dụng trong điều trị để kiểm soát hoặc phòng ngừa sự tăng thể trọng ở động vật có vú, hợp chất theo sáng chế hoặc các dược phẩm của nó có thể được sử dụng qua đường miệng, hoặc ngoài đường tiêu hóa.

Theo các phương án nhất định, hợp chất theo sáng chế hoặc các dược phẩm của nó có thể được sử dụng một lần hằng ngày qua đường miệng.

Muối được dụng

Hợp chất có công thức I có thể được sử dụng ở dạng tự nhiên của nó hoặc ở dạng muối. Trong trường hợp việc tạo ra muối axit hoặc bazơ không độc ổn định được mong muốn, việc sử dụng hợp chất này ở dạng muối được dụng có thể trở nên thích hợp.

Các muối được dụng thích hợp bao gồm muối được điều chế từ axit vô cơ hoặc hữu cơ gồm sulfat, hydro sulfat, axit clohydric, axit bromhydric, axit hydriodic, axit nitric, axit cacbonic, axit sulfuric, axit phosphoric, axit formic, axit axetic, axit propionic, axit suxinic, axit glycolic, axit gluconic, axit lactic, axit malic, axit tartaric, axit citric, axit ascorbic, axit glucuronic, axit maleic, axit fumaric, axit pyruvic, axit aspartic, axit glutamic, axit benzoic, axit antranilic, axit 4-hydroxy benzoic, axit phenylacetic, axit mandelic, axit embonic (pamoic), axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit benzensulfonic, axit pantothenic, axit triflometansulfonic, axit sulfanilic, axit stearic, axit alginic, axit 2-hydroxyetansulfonic, axit p-toluen sulfonic, axit xyclohexylaminosulfonic, axit salixylic, axit galactaric, axit β -hydroxybutyric và axit galacturonic; hoặc muối được điều chế từ muối amoni và muối kim loại bao gồm muối canxi, magie, kali, natri và kẽm.

Dược phẩm/Dạng bào chế

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sản xuất theo các quy trình đã được biết rõ trong lĩnh vực, ví dụ, bằng các quá trình trộn, hòa tan, tạo hạt, tạo viên bao đường, tạo

thể lơ lửng, tạo nhũ, bao nang, tạo bầy giữ, làm đông khô nhanh hoặc sấy phun thông thường.

Các dược phẩm để sử dụng theo sáng chế có thể được bào chế theo cách thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang dược dụng bao gồm tá dược và chất phụ trợ để tạo điều kiện thuận lợi cho việc xử lý hoạt chất thành chế phẩm mà có thể được sử dụng làm dược phẩm. Dạng bào chế phù hợp phụ thuộc vào đường dùng thuốc được chọn. Các tá dược và chất mang dược dụng thường là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và do đó sẽ được bao gồm trong sáng chế. Các tá dược và chất mang như vậy được mô tả chẳng hạn trong “Remington’s Pharmaceutical Sciences” Mack Pub. Co., New Jersey (1991).

Liều lượng

Các dược phẩm thích hợp để sử dụng trong sáng chế bao gồm các dược phẩm trong đó các hoạt chất được chứa với lượng đủ để đạt được mục đích dự định, nghĩa là, kiểm soát hoặc phòng ngừa sự tăng thể trọng, hoặc duy trì thể trọng.

Lượng hợp phần hoạt tính, mà là hợp chất mới theo sáng chế, trong dược phẩm và dạng liều đơn vị của nó có thể được thay đổi hoặc điều chỉnh tùy thuộc vào hiệu lực của hợp chất cụ thể và nồng độ mong muốn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hoàn toàn có khả năng xác định lượng hữu hiệu để điều trị. Nói chung, lượng hợp phần hoạt tính sẽ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 99,9% theo trọng lượng của dược phẩm.

Nói chung, lượng hữu hiệu để điều trị trong liều lượng của hợp phần hoạt tính có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,001 đến khoảng 1000 mg/kg thể trọng/ngày. Liều mong muốn có thể được trình bày một cách thuận tiện trong liều đơn hoặc thành các liều chia được sử dụng ở các khoảng thời gian phù hợp, ví dụ như hai, ba, bốn hoặc nhiều liều phụ mỗi ngày.

Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của hợp chất mới theo sáng chế lớn hơn khoảng 0,01 mg/kg. Theo các phương án khác, lượng hữu hiệu của hợp chất mới nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 1000 mg/kg và bất kỳ và tất cả các số gia toàn phần hoặc một phần trong khoảng đó, bao gồm khoảng 0,1 mg/kg, khoảng 1 mg/kg, khoảng 0,01 mg/kg, khoảng 0,1 mg/kg, khoảng 1 mg/kg, khoảng 10 mg/kg, và khoảng 100 mg/kg.

Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của hợp chất mới là khoảng 100-50 mg/kg. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của hợp chất mới là khoảng 50-10 mg/kg. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của hợp chất mới là khoảng 10-5 mg/kg. Theo

một số phương án, lượng hữu hiệu của hợp chất mới là khoảng 5-2,5 mg/kg.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các định nghĩa

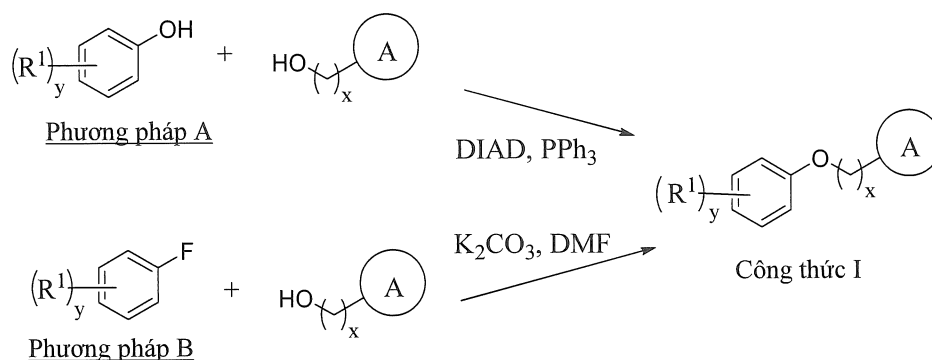
ALT = alanin aminotransaminaza.

AST = aspartat transaminaza.

ALP = phosphataza kiềm.

ALB = albumin.

Sơ đồ tổng hợp chung



Các hợp chất có công thức I có thể được điều chế bằng các phương pháp tổng hợp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Hai trong số các phương pháp này được thể hiện trên Sơ đồ 1, trong đó các biến số vòng A, R¹, x, và y là như được xác định trên đây, và không được dự định giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế theo bất kỳ cách nào. Thực vậy, có thể còn có nhiều cách hơn nữa để tổng hợp các hợp chất theo sáng chế.

Như được thể hiện ở Phương pháp A, phương pháp hóa học Mitsunobu có thể được sử dụng để hoạt hóa oxy hydroxyl của hợp chất imidazol bằng cách sử dụng tổ hợp chất phản ứng như diisopropyl azodicarboxylat (DIAD) hoặc diethyl azodicarboxylat (DEAD) với triphenylphosphin, để tạo điều kiện thuận lợi cho phản ứng thế ái nhân của hydroxyl hoạt hóa bằng phenol.

Các hợp chất có công thức I cũng có thể được tạo ra bằng phản ứng thế ái nhân ở vòng thơm theo Phương pháp B. Ở đây, hợp chất flophenyl được cho phản ứng với hợp chất imidazol trong điều kiện bazơ nhẹ, như kali cacbonat trong dimetylformamit. Phản ứng thế florua bằng nhóm hydroxyl của hợp chất imidazol tạo ra liên kết ete cho hợp chất có công thức I.

Ví dụ 1: Nồng độ trong huyết tương của DNP và Hợp chất A sau khi sử dụng DNP hoặc Hợp chất A

Nguyên liệu và phương pháp: Chuột đực C57BL/6 5-7 tuần tuổi có trọng lượng 18-20g thu được từ Beijing Vital River Co., LTD. Các con vật này được cách ly trong lồng polycarbonat đặt trong phòng thông gió tốt, có môi trường được theo dõi và duy trì ở nhiệt độ $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm tương đối nằm trong khoảng 40%-80% trong các phòng được thông khí theo dòng chảy tầng với số lượng 3 con trong mỗi lồng trong thời gian 7 ngày trước khi và trong suốt nghiên cứu. Đèn huỳnh quang cung cấp thời gian chiếu sáng khoảng 12 giờ mỗi ngày. Nguyên liệu lót nền lồng là lõi ngô được thay một lần mỗi tuần. Mỗi con chuột nhất được gán một số định danh. Các con chuột nhất được cho tiếp cận với thức ăn dạng hạt khô được tiệt trùng bằng cách chiếu xạ (Beijing Keaoxieli Feed Co., Ltd., Beijing, China) và nước uống vô trùng tùy ý trong suốt toàn bộ quá trình nghiên cứu.

Trên cơ sở thể trọng, các con vật được gán một cách ngẫu nhiên ($n=4$) vào nhóm tương ứng bằng cách sử dụng phương pháp ngẫu nhiên hóa được tạo ra bằng máy tính. Các liều sau đây được cho sử dụng bằng cách đưa qua ống theo đường miệng trong dung dịch DMSO 7,1% trong nước muối sinh lý: Một mình chất dẫn (DMSO 7,1% trong nước muối), 100mg/kg DNP, và 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 1000, 1250, 1500mg/kg Hợp chất A. DNP thu được từ Sinopharm Chemical Reagent Beijing Co., Ltd. DMSO thu được từ Sigma Aldrich.

Huyết tương được thu gom vào các ống ly tâm phủ heparin dung tích 0,5 ml bằng cách chọc hóc mắt sau thời gian 0, 15 phút, 30 phút, 45 phút, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 12 giờ, 20 giờ và 24 giờ.

Các mẫu được ly tâm trong thời gian 5 phút ở tốc độ 4000 rcf trên máy ly tâm để bàn. Dịch nổi bề mặt trong được chuyển vào ống mới và bảo quản ở nhiệt độ -80°C để phân tích được động học.

Toàn bộ phân tích thống kê được tiến hành, và mức ý nghĩa được thiết lập ở mức $P<0,05$. Các giá trị trung bình của nhóm và sai số chuẩn được tính toán đối với tất cả các tham số đo mà nghiên cứu thiết kế. Các so sánh ANOVA một chiều trong các nhóm được thực hiện với phần mềm SPSS 17.0.

Kết quả: Hai (50%) trong số các con vật được cho sử dụng liều 100mg/kg DNP chết trong vòng hai giờ đầu sau khi sử dụng và một trong số các con vật được cho sử dụng liều

1500mg/kg Hợp chất A bị chết sau 12 giờ. Không có các triệu chứng lâm sàng bất thường nào khác được quan sát thấy trong toàn bộ thí nghiệm. Phân tích được động học cho thấy rằng Hợp chất A được thủy phân thành gốc DNP, và Hợp chất A được phát hiện trong huyết tương chỉ với lượng nhỏ ở các con vật được cho dùng liều cao nhất. Fig.1 và Fig.2 cho thấy ở các con vật được cho sử dụng Hợp chất A, nồng độ cực đại trong huyết tương (C_{max}) của gốc DNP được giảm mạnh so với việc sử dụng DNP một cách trực tiếp. Không có nhóm nào trong số các nhóm tiếp nhận Hợp chất A đạt đến cùng trị số C_{max} như nhóm tiếp nhận DNP. T_{max} bị trễ ở các con vật được cho sử dụng Hợp chất A. Đồng thời, đo được mức phơi nhiễm tổng cộng cao hơn đáng kể của gốc DNP ở các con vật được cho sử dụng Hợp chất A so với trường hợp được cho sử dụng DNP. Tóm lại, Hợp chất A là được chất an toàn hơn so với DNP do có trị số C_{max} giảm. Cả mức phơi nhiễm tổng cộng và C_{max} của gốc DNP đều tăng theo liều Hợp chất A theo kiểu tuyến tính.

Ví dụ 2: Nồng độ trong huyết tương của enzym gan ALT, AST và ALP sau khi sử dụng Hợp chất A cho chuột nhắt bị gây bệnh gan nhiễm mỡ

Chuột đực C57BL/6 thu được từ Beijing Vital River Co., LTD. Các con vật này được cách ly trong lồng polycarbonat đặt trong phòng thông gió tốt, có môi trường được theo dõi và duy trì ở nhiệt độ $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm tương đối nằm trong khoảng 40%-80% trong các phòng được thổi khí theo dòng chảy tầng với số lượng 3 con trong mỗi lồng trong thời gian 7 ngày trước khi và trong suốt nghiên cứu. Đèn huỳnh quang cung cấp thời gian chiếu sáng khoảng 12 giờ mỗi ngày. Chuột được cho tiếp cận với thức ăn dạng hạt khô được tiệt trùng bằng cách chiếu xạ (Beijing Keaoxieli Feed Co., Ltd., Beijing, China) và nước uống vô trùng tùy ý trong suốt tuần đầu tiên.

Sau khi thích nghi, và trong suốt quá trình nghiên cứu, thức ăn được thay đổi thành thức ăn thiếu hụt metionin/cholin (MCD: methionine/choline-deficient chow) để gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD: Nonalcoholic Fatty Liver Disease) ở các con vật. Sau bốn tuần sử dụng MCD, các con vật được chia thành bốn nhóm ($n=8$) và được cho sử dụng liều 0mpk, 5mpk, 25mpk hoặc 100mpk Hợp chất A bằng cách đưa qua ống theo đường miệng trong dung dịch DMSO 7,1% trong nước muối sinh lý.

Máu được thu gom vào ống không chứa chất chống đông, các mẫu huyết thanh được xử lý ngay lập tức bằng cách ly tâm ở 4°C , 6000 g trong 15 phút, và sau đó được chuyển vào một ống nghiệm mới. Các mẫu được phân tích đối với ba loại enzym gan: ALT;

AST; và ALP bằng cách sử dụng thiết bị phân tích sinh hóa tự động TOSHIBA TBA-40FR.

Kết quả: Như được thấy trên Fig.5, các mức ALT và AST tăng mạnh ở các chuột nhất được cho sử dụng MCD. Các mức này được làm giảm bằng Hợp chất A theo cách phụ thuộc vào liều. Các mức giảm có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy ở mức liều 5mpk và 100mpk, trong khi ý nghĩa thống kê chỉ đạt được ở nhóm sử dụng mức liều 25mpk khi hai giá trị ngoại lệ thống kê được loại bỏ khỏi phân tích.

Ví dụ 3: Thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng sau khi sử dụng Hợp chất A cho chuột nhất bị gây bệnh gan nhiễm mỡ

Các con chuột nhất được xử lý như đã mô tả ở Ví dụ 2. Thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng (OGTT: Oral Glucose Tolerance Test) được tiến hành đối với tất cả các con vật được nghiên cứu sau năm tuần điều trị bằng Hợp chất A. Mức glucoza chuẩn (thời gian 0) được đo sau 16 giờ nhịn ăn. Sau khi cho sử dụng qua đường miệng glucoza với mức 2 g/kg, mức glucoza trong máu được đo ở thời điểm 30, 60 và 120 phút bằng cách sử dụng hệ thống Accu-Chek Performa.

Kết quả: Các mức glucoza trong máu thấp hơn đáng kể ở thời gian 120 phút sau thử nghiệm glucoza ở cả ba nhóm điều trị ($p < 0,05$ đối với nhóm điều trị bằng liều 25mg/kg và 100mg/kg, $p < 0,01$ đối với nhóm điều trị bằng liều 5mg/kg). Xem Fig.6.

Ví dụ 4: Đánh giá tác dụng của Hợp chất A ở mẫu chuột nhất bị gây bệnh NASH bằng chế độ ăn MCD.

Các tác giả sáng chế cho thấy rằng Hợp chất A làm giảm bệnh viêm gan nhiễm mỡ và xytokin gây viêm ở gan chuột nhất bị gây bệnh NASH bằng chế độ ăn MCD. Sự xuất hiện của các giọt lipid được giảm sau 6 tuần điều trị. Xem Fig.7 và Fig.8. Các hình ảnh này cho thấy lượng dự trữ chất béo giảm mạnh trong gan sau khi điều trị bằng liều 5 mpk Hợp chất A. Fig.7 thể hiện các giọt lipid ở gan chuột nhất đối chứng trong số các con chuột nhất được cho ăn theo chế độ ăn MCD gây bệnh NASH. Fig.8 thể hiện các giọt lipid ở gan chuột nhất trong số các con chuột nhất được cho ăn theo chế độ ăn MCD gây bệnh NASH mà được điều trị bằng liều 5 mpk Hợp chất A. Các con chuột nhất được điều trị có lượng giọt lipid giảm mạnh sau 6 tuần điều trị.

TNF α và IL-1 β gan cũng giảm ở các con chuột nhất được điều trị. Xem Fig.9.

Ví dụ 5: Đánh giá tác dụng của Hợp chất A ở mẫu chuột cống bị gây bệnh NAFLD bằng chế độ ăn HFD

Để xác định tác dụng của Hợp chất A đối với các con chuột cống được cho ăn theo chế độ ăn giàu chất béo (HFD: High Fat Diet), Hợp chất A được cho sử dụng bằng cách đưa qua ống theo đường miệng một lần hằng ngày trong 14 ngày. 50 con chuột cống SD ở độ tuổi từ 6 đến 8 tuần tuổi được cung cấp bởi Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. Các con vật này được cách ly trong ít nhất 7 ngày trước khi nghiên cứu. Các con chuột này được giữ trong các phòng được thổi khí theo dòng chảy tầng ở nhiệt độ và độ ẩm không đổi, nước uống vô trùng được cung cấp tùy ý, với một con trong mỗi lồng. Sau giai đoạn thích nghi 7 ngày, các con chuột cống được cho ăn theo chế độ giàu chất béo (D12492, Research Diets) trong giai đoạn gây bệnh hai tuần. Sau giai đoạn gây bệnh, các con vật được chia ngẫu nhiên thành các nhóm tương ứng trên cơ sở thể trọng của chúng. Các nhóm nghiên cứu và thông tin chi tiết về chế độ điều trị được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1: Nhóm và các chất điều trị

Nhóm	Chất điều trị	Mức liều (mg/kg)	HFD	Đường dùng	Chế độ	Ví dụ số
1	Chất dẫn	-	Có	PO	QD X14d	10
2	Hợp chất A	0,1	Có	PO	QD X14d	10
3	Hợp chất A	0,5	Có	PO	QD X14d	10
4	Hợp chất A	5	Có	PO	QD X14d	10
5	DNP	1	Có	PO	QD X14d	10

Các con vật được cho sử dụng Hợp chất A, DNP hoặc một mình chất dẫn (DMSO 7,5% trong nước) qua đường miệng (PO: per oral) với liều 5 mL/kg bằng cách đưa qua ống theo đường miệng một lần hằng ngày trong 14 ngày (từ ngày 15 đến ngày 28). Thể trọng của tất cả các con vật được đo hai lần mỗi tuần trong suốt nghiên cứu. Mức tiêu thụ thức ăn được ghi lại đối với các con vật ở tất cả các nhóm hai lần mỗi tuần trong suốt nghiên cứu. Các mẫu máu được thu gom vào ống không có chất chống đông bằng cách chọc hóc mắt vào ngày 15 (trước điều trị), ngày 22 và ngày 29. Các mẫu máu được ly tâm ở 6000 g trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C, sau đó các mẫu huyết thanh được thu gom và chuyển vào ống chứa mẫu khác. Các mẫu huyết thanh được giữ ở -80°C nếu mẫu phân tích không được

phân tích ngay. Các mức lipit bao gồm triglyxerit (TG), cholesterol tổng số (TCHO), cholesterol lipoprotein tỷ trọng cao (HDL-C), cholesterol lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL-C) và axit béo tự do (FFA) được đo ở cuối quá trình nghiên cứu bằng cách sử dụng thiết bị phân tích sinh hóa tự động TOSHIBA TBA-40FR. Các con vật trong toàn bộ các nhóm nghiên cứu được làm chết nhân đạo vào ngày 29, sau đó việc mổ xác được tiến hành.

Các mẫu mô gan được thu gom từ tất cả các con vật, và mỗi mẫu gan được cắt thành 3 mảnh, một mảnh dùng để phân tích mức lipit trong gan, một mảnh dùng để phân tích mô học, và mảnh cuối cùng được làm đông lạnh nhanh để làm mẫu dự phòng. Ở cuối nghiên cứu, mức TG, TCHO, HDL-C, LDL-C và FFA trong gan được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị phân tích hóa học và các mức xeramit trong gan được phân tích bằng phương pháp LC-MS/MS.

Các kết quả của nghiên cứu này cho thấy rằng không có sự thay đổi hoặc xu hướng đáng kể nào ở mức dung nạp glucoza (như được đo bằng thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng), thể trọng hoặc mức tiêu thụ thức ăn được quan sát thấy giữa các nhóm nghiên cứu.

Mức FFA trong huyết thanh thể hiện sự khác biệt đáng kể sau bảy ngày dùng thuốc so với đối chứng dùng chất dẫn mặc dù mức FFA trong huyết thanh và mức TG trong huyết thanh có xu hướng trở nên thấp hơn theo cách phụ thuộc vào liều so với đối chứng dùng chất dẫn (xem Fig.8 và Fig.9). Fig.9 có giá trị thống kê với $p < 0,05$ (thử nghiệm T), khi so với nhóm dùng chất dẫn (Giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình). Các kết quả cho thấy rằng Hợp chất A có thể được sử dụng để làm giảm nguy cơ đối với bệnh tim mạch, bệnh NASH và bệnh NAFLD.

Fig.10 là biểu đồ thể hiện mức TG trong huyết thanh. Trên Fig.10, $p < 0,05$ (ANOVA) (Giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình). Fig.11 là biểu đồ thể hiện mức FFA trong huyết thanh.

Chú ý rằng toàn bộ các mức lipit trong gan bao gồm TG, TCHO, HDL-C, LDL-C, FFA và xeramit có xu hướng hạ thấp ở toàn bộ các liều điều trị. Quan sát được sự giảm đáng kể đối với FFA ở hai liều cao nhất của Hợp chất A. Sự giảm xeramit trong gan cũng đạt được mức có ý nghĩa ở nhóm được cho dùng liều cao nhất.

Fig.12 minh họa mức TG trong gan. Fig.13 minh họa mức xeramit trong gan.

Ví dụ 6: Đánh giá tác dụng của Hợp chất A ở chuột cống béo Zucker mắc bệnh đái tháo đường (ZDF: Zucker Diabetic Fatty)

Để xác định tác dụng của Hợp chất A được cho sử dụng bằng cách đưa qua ống theo đường miệng một lần hằng ngày trong 28 ngày ở các con chuột cống ZDF, 50 con chuột cống đực thu được từ Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co. Các con vật này ở độ tuổi 8 tuần tuổi khi bắt đầu bị gây bệnh và được cách ly trong 7 ngày trước khi nghiên cứu. Các con chuột này được giữ trong các phòng được thổi khí theo dòng chảy tầng ở nhiệt độ và độ ẩm không đổi, với một con trong mỗi lồng, và nước uống được cung cấp tùy ý trong quá trình cách ly và nghiên cứu.

Sau giai đoạn thích nghi 7 ngày, 50 con chuột cống ZDF được duy trì chế độ ăn đặc biệt (chế độ ăn Purina 5008) trong 4 tuần để gây bệnh đái tháo đường typ 2. Sau 4 tuần gây bệnh, các con vật được chia ngẫu nhiên vào các nhóm tương ứng của chúng trên cơ sở thể trọng và mức glucoza lúc đói. Các nhóm nghiên cứu và số con vật trong mỗi nhóm được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: Nhóm và các chất điều trị

Nhóm	Chất điều trị	Mức liều (mg/kg)	Đường dùng	Chế độ	Ví dụ số
1	Chất dẫn	-	PO	QD X28 d	10
2	DNP	1	PO	QD X28 d	10
3	Hợp chất A	0,1	PO	QD X28 d	10
4	Hợp chất A	0,5	PO	QD X28 d	10
5	Hợp chất A	5,0	PO	QD X28 d	10

Các sản phẩm thử nghiệm được hòa tan trong dung dịch DMSO (Sigma) 7% trong nước (thể tích/thể tích) và được cho dùng qua đường miệng với lượng 5 ml/kg một lần hằng ngày trong 30 ngày từ ngày 29 đến ngày 58. Các chế phẩm được chuẩn bị hai lần mỗi tuần.

Thể trọng được đo hai lần mỗi tuần trong suốt quá trình nghiên cứu, và mức tiêu thụ thức ăn (lượng thức ăn đưa vào/lượng thức ăn lấy ra) được ghi lại đối với các con vật trong toàn bộ các nhóm nghiên cứu trên cơ sở hàng tuần trong suốt quá trình nghiên cứu.

Mức glucoza trong máu lúc đói của các con vật nghiên cứu được đo hằng tuần sau giai đoạn gây bệnh bằng cách lấy máu ở tĩnh mạch đuôi bằng cách sử dụng hệ thống Accu-

Chek Performa. Toàn bộ các thử nghiệm được tiến hành ở ngày 29 (đường chuẩn), 36, 43, 50 và 57. Các con vật được để nhịn đói qua đêm (16 giờ từ 17:00 đến 9:00 ngày hôm sau) trước khi đo.

Profin lipit trong huyết thanh và mức enzyme gan được đo hằng tuần sau giai đoạn gây bệnh và các tham số hóa học trong máu cụ thể được liệt kê ở bảng 3. Toàn bộ các thử nghiệm được tiến hành ở ngày 29 (đường chuẩn), 36, 43, 50 và 57. Máu được thu gom từ tĩnh mạch hốc mắt vào ống không chứa chất chống đông, các mẫu huyết thanh được xử lý ngay lập tức bằng cách ly tâm ở 4°C, 6000 g trong 15 phút, và sau đó được chuyển vào một ống nghiệm mới. Các mức lipit và hóa học máu theo panel đầy đủ được đo bằng cách sử dụng thiết bị phân tích sinh hóa tự động TOSHIBA TBA-40FR.

Bảng 3: Các thông số sinh hóa trong máu

Loại	Chữ viết tắt	Định nghĩa
Enzym gan	ALT	Alanin aminotransferaza
	AST	Aspartat aminotransferaza
	ALP	Phosphataza kiềm
Lipit trong máu	TG	Triglycerit
	TCHO	Cholesterol tổng cộng
	HDL-C	Cholesterol lipoprotein tỷ trọng cao
	LDL-C	Cholesterol lipoprotein tỷ trọng thấp
	FFA	Axit béo tự do

Các mức insulin của toàn bộ các con vật nghiên cứu được đo ở ngày 57 theo phương pháp ELISA. Huyết thanh trong máu được sử dụng cho phân tích này.

Vào ngày kết thúc (ngày 59), việc mổ xác toàn bộ được tiến hành và gan được thu gom từ toàn bộ các con vật. Các mẫu gan được chia thành 3 phần; 1/3 được cố định trong formalin 10% và xử lý thành khối parafin mô học, 1/3 được xử lý để đo lipit (TG, TCHO, HDL-C, LDL-C và FFA) và 1/3 còn lại được làm lạnh đông nhanh và bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho việc phân tích trong tương lai.

Các thử nghiệm thống kê được tiến hành đối với toàn bộ dữ liệu, và mức ý nghĩa được thiết lập ở mức 5% hoặc $P < 0,05$. Các giá trị trung bình của nhóm và độ lệch chuẩn được tính toán đối với tất cả các tham số đo mà nghiên cứu thiết kế. Phép phân tích phương

sai một chiều (ANOVA) được sử dụng trong các nhóm với phần mềm GraphPad Prism 6.0.

Các tác giả sáng chế báo cáo rằng không có sự thay đổi đáng kể ở thể trọng và mức tiêu thụ thức ăn quan sát được giữa các nhóm nghiên cứu mặc dù có khuynh hướng mức tiêu thụ thức ăn cao hơn ở nhóm được cho sử dụng liều Hợp chất A cao nhất, kết hợp với khuynh hướng thể trọng giảm ở toàn bộ các nhóm dùng thuốc sau ngày 36 so với đối chứng dùng chất dẫn. Fig.14 minh họa đường cong tiêu thụ thức ăn của các nhóm nghiên cứu thu được từ ví dụ 6.

Fig.15 thể hiện mức NEFA (Axit béo không este hóa (Non-Esterified Fatty Acid), nghĩa là axit béo tự do (FFA)) thấp hơn đáng kể ở hai nhóm được điều trị bằng mức cao nhất của Hợp chất A. Nhóm thứ ba, 0,1 mg/kg cũng có khuynh hướng giảm. Xem Fig.15. Lưu ý rằng trên Fig.16, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ so với nhóm dùng chất dẫn (Giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình). Fig.16 thể hiện việc mức triglycerit (TG) trong máu cho thấy kết quả tương tự và thấp hơn so với đối chứng dùng chất dẫn trong toàn bộ các nhóm nghiên cứu, (Giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình). Xem Fig.16. Fig.17 minh họa mức TG trong gan cũng thấp hơn ở toàn bộ các nhóm nghiên cứu, và mức giảm có ý nghĩa thống kê ở nhóm được điều trị bằng các mức cao nhất của Hợp chất A (5,0 mg/kg) * $p < 0,05$ so với nhóm dùng chất dẫn (Giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình). Xem Fig.17. Fig.18 thể hiện mức insulin trong máu được quan sát thấp hơn trong toàn bộ các nhóm điều trị. Lưu ý rằng * $p < 0,05$ so với nhóm dùng chất dẫn (Giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình) (Xem Fig.18). Nghiên cứu chỉ ra rằng Hợp chất A có thể là hữu hiệu trong việc làm giảm nguy cơ mắc bệnh tim và bệnh tim mạch, và có thể được sử dụng để điều trị bệnh NAFLD, NASH và bệnh đái tháo đường typ 2.

Ví dụ 7: Đánh giá tác dụng của Hợp chất A ở mẫu chuột ghép cùng chỗ dòng tế bào ung thư gan Hep3B-luc của người

Sáu mươi (60) chuột nhắt cái trụi lông BALB/c được cách ly trong 7 ngày trước thí nghiệm. Trong suốt thời gian nghiên cứu, các con vật này được giữ trong các điều kiện phòng thí nghiệm tiêu chuẩn, và được cho tiếp cận tự do với thức ăn dạng hạt khô được tiệt trùng bằng cách chiếu xạ và nước uống vô trùng. Sau giai đoạn cách ly, các con chuột được cấy tại chỗ bằng 1×10^6 tế bào Hep3B-luc biểu hiện luxiferaza được tạo huyền phù trong 10 μ l hỗn hợp MEM/Matrigel (7:3). Da và phúc mạc được rạch để làm lộ ra thùy gan trái

ở chuột được gây mê và các tế bào được tiêm chậm vào thùy gan trái này, sao cho đốm nước trong suốt chứa tế bào được nhìn thấy qua màng gan. Sự phát triển khối u được quan sát bằng cách phân tích hình ảnh. Ở ngày 14, các con chuột được chia ngẫu nhiên bằng cách sử dụng phương pháp ngẫu nhiên hóa được tạo ra bằng máy tính thành 6 nhóm dựa trên cơ sở thể trọng và các giá trị hình ảnh phát quang sinh học (BLI: Bio Luminescent Imaging) (10 chuột cho mỗi nhóm) để đảm bảo rằng giá trị BLI trung bình là tương tự giữa các nhóm.

Các con vật nghiên cứu được theo dõi không chỉ đối với sự phát triển khối u mà còn được theo dõi đối với tập tính như sự vận động, sự tiêu thụ thức ăn và nước uống (chỉ bằng cách kiểm tra tại lồng), thể trọng (BW), sự xỉn màu mắt/lông và tác dụng bất thường bất kỳ khác.

Đối với các phép đo BLI, các con chuột được tiêm trong phúc mạc D-luxiferin (Pharmaron) 15 mg/ml (ở mức 5 μ l/g BW) và gây mê bằng cách cho hít isofluran 1-2%. Ở thời điểm 10 phút sau khi tiêm luxiferin, các con chuột được chụp ảnh bằng cách sử dụng thiết bị IVIS Lumina II (Caliper) hai lần mỗi tuần.

Phần mềm Living Image (Caliper) được sử dụng để tính toán các vùng được quan tâm (ROI: Region of Interest) và tích hợp tín hiệu phát quang sinh học tổng ở mỗi ROI. Các tín hiệu phát quang sinh học (photon/giây) từ ROI được định lượng và sử dụng làm giá trị chỉ báo về mức phát triển khối u và hoạt tính kháng khối u.

Các quá trình điều trị được bắt đầu khi các tín hiệu phát quang sinh học trung bình đạt đến giá trị khoảng 52×10^6 photon/giây ở ngày 14 sau khi cấy tế bào khối u. Các con vật được chia thành các nhóm điều trị sau đây (n=10/nhóm)

1. Đối chứng dùng chất dẫn
2. Sorafenib Tosylat 80mg/kg
3. Sorafenib Tosylat 80mg/kg + Hợp chất A 25 mg/kg
4. Sorafenib Tosylat 80mg/kg + Hợp chất A 100 mg/kg
5. Sorafenib Tosylat 80mg/kg + Hợp chất A 200 mg/kg
6. Sorafenib Tosylat 80mg/kg + Hợp chất A 300 mg/kg

Tất cả các dược chất được hòa tan trong DMSO 7% + Hydroxypropyl beta cyclodextrin (HPBCD) 20%.

Không quan sát thấy sự thay đổi nào về thể trọng trong quá trình thử nghiệm, hoặc giữa các nhóm nghiên cứu. Sorafenib ở dạng đơn tác nhân thể hiện khuynh hướng có tác

dụng làm giảm BLI của sự phát quang sinh học in vivo ở khối u trong gan người Hep3B-luc sau quá trình điều trị 28 ngày liên tục (xem Fig.19). Tuy nhiên, tác dụng này không được làm tăng bởi Hợp chất A ở bất kỳ mức liều nào trong số các mức liều được thử nghiệm, Hợp chất A dường như không cải thiện tác dụng của Sorafenib hoặc làm nhạy cảm hóa các tế bào với sự chết tế bào theo chương trình. Trên thực tế, Sorafenib khi dùng một mình có giá trị BLI thấp nhất ở cuối quá trình nghiên cứu. Toàn bộ các sản phẩm thử nghiệm được dung nạp tốt ở điều kiện thử nghiệm hiện tại bởi các con chuột mang khối u ghép cùng chỗ.

Không quan sát được các bất thường lâm sàng đáng kể khác ở tất cả các con vật trong giai đoạn điều trị. Fig.19 minh họa tác dụng của Sorafenib khi sử dụng riêng và khi sử dụng kết hợp với Hợp chất A trong quá trình điều trị mẫu động vật ghép cùng chỗ dòng tế bào ung thư gan Hep3B-luc của người.

Ví dụ 8: Mô tả hiệu lực của Hợp chất A ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn.

Nghiên cứu này đánh giá tác dụng của Hợp chất A đối với bệnh viêm gan nhiễm mỡ và sự tiến triển thành chứng xơ hóa ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn là chuột nhắt đực C57BL/6J(B6)-129s1/SvImJ(S129) (DIAMOND). Mẫu chuột nhắt DIAMOND Sanyal tái hiện các thay đổi sinh lý, trao đổi chất, mô học, phiên mã và truyền tín hiệu tế bào quan trọng ở người có bệnh NASH tiến triển. Cũng xem tài liệu *Journal of Hepatology* Volume 65, Issue 3, tháng 9/2016, trang 579-588 ‘A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer’ của A. Asgharpour và các đồng tác giả.

Hai mức liều Hợp chất A (liều hằng ngày 1 mg/kg hoặc 5 mg/kg trong chất dẫn trong 8 tuần) được so sánh với đối chứng dùng chất dẫn và dữ liệu lịch sử từ giống phù hợp với chuột đối chứng âm dùng thức ăn thông thường (thức ăn cho chuột thông thường Harlan, TD 7012 Teklad LM-485) và nước tinh lọc thẩm thấu ngược (RO: Reverse Osmosis).

Ở giai đoạn đầu của nghiên cứu (Tuần 0), 30 con chuột nhắt đực 8-12 tuần tuổi được cho ăn theo chế độ ăn Western tùy ý, thức ăn Harlan có 42% calo thu được từ chất béo (Harlan TD.88137) và nước đường (SW d-fructoza 23,1 g/L + d-glucoza 18,9 g/L). Các con chuột này được để tiến triển thành bệnh viêm gan nhiễm mỡ trong 12 tuần, sau đó

chúng được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm điều trị (n=10):

1. Đối chứng dùng chất dẫn - natri carboxymetyl xenluloza 0,5% trong nước với 0,1% Tween-80 (VC)
2. Hợp chất A 1,0 mg/kg/ngày trong chất dẫn (Hợp chất A liều thấp)
3. Hợp chất A 5,0 mg/kg/ngày trong chất dẫn (Hợp chất A liều cao)

Hai nhóm bổ sung (dữ liệu lịch sử) cũng được sử dụng để so sánh.

4. Đối chứng âm - chuột nhắt được cho ăn theo chế độ thức ăn thông thường (NC 20 tuần)
5. Đối chứng dương - chuột nhắt được cho ăn theo chế độ WD với SW, không điều trị, không nhồi qua ống (PC 20 tuần)

Sau tám tuần điều trị sau tuần 20, toàn bộ các con chuột được mổ xác.

Các tác giả sáng chế thấy rằng các con vật được cho dùng liều 5mg/kg thể hiện mức giảm thể trọng đáng kể ở tuần 20. Các con vật thuộc nhóm này cũng có các trị số trọng lượng gan, cholesterol tổng cộng, ALT, ALP và ASP giảm có ý nghĩa thống kê. Tình trạng viêm ở thùy gan được làm giảm đáng kể bằng hợp chất A. Điểm hoạt tính NAS và SAF được làm giảm đáng kể bằng hợp chất A. Sự tiến triển thành bệnh NASH được làm giảm đáng kể nhờ hợp chất A (chỉ có một con chuột dùng hợp chất A tiến triển thành bệnh NASH trong khi toàn bộ các con chuột đối chứng đều tiến triển thành bệnh NASH). Nghiên cứu chỉ ra rằng Hợp chất A sẽ trở nên hữu hiệu để điều trị bệnh NAFLD và NASH, và còn có thể hữu hiệu để làm giảm BMI để điều trị bệnh béo phì, và làm giảm nguy cơ bệnh tim.

Các kết quả này được mô tả trên các hình vẽ sau: Fig.20 minh họa thiết kế thực nghiệm và sự tiến triển bệnh ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn. Fig.21 minh họa sự tăng thể trọng ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn sau khi chế độ ăn Western được đưa vào (tuần 0) và trong các quá trình điều trị (tuần 12-20). Dữ liệu thể hiện mức giảm tổng thể trọng đáng kể ở nhóm dùng Hợp chất A liều cao. Fig.22 minh họa mức giảm tổng thể trọng đáng kể ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn sau tám tuần sử dụng Hợp chất A ở liều cao. Fig.23 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với trọng lượng gan sau tám tuần sử dụng thuốc theo liều. Fig.24 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với trọng lượng gan sau tám tuần sử dụng thuốc theo liều. Fig.25 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ

không do rượu bằng chế độ ăn đối với mức ALT (alanin aminotransaminaza.) trong huyết thanh. Fig.26 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với mức ALP (phosphataza kiềm) trong huyết thanh. Fig.27 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với mức ALP (phosphataza kiềm) trong huyết thanh. Fig.28 minh họa tác dụng của Hợp chất A ở liều thấp và liều cao ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn đối với mức ALB (albumin) trong huyết thanh.

Ví dụ 9: Điều chế 5-[(2,4-dinitrophenoxy)metyl]-1-metyl-2-nitro-1H-imidazol (Hợp chất #2 trong bảng A hoặc Hợp chất A).



2,4-dinitrophenol (được làm ướt bằng xấp xỉ 20% nước, mua được từ TCI America, Cat. No. D0109) (khối lượng lúc ướt 269 mg, khối lượng lúc khô 215 mg, 1,17 mmol) được hòa tan trong metylen clorua (2 mL) và khuấy với natri sulfat khan ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 giờ. Dung dịch metylen clorua được lắng gạn vào bình phản ứng và natri sulfat được rửa bằng lượng metylen clorua bổ sung (2 mL). Thêm (1-metyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl) metanol (115 mg, 0,732 mmol, được điều chế theo quy trình được mô tả trong US 8003625 B2) và triphenylphosphin (211 mg, 0,805 mmol) vào dung dịch này. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi thu được dung dịch. Sau đó, dung dịch này được làm lạnh trong bể nước đá và xử lý bằng diisopropyl azodicarboxylat, DIAD (158 μ l, 0,805 mmol). Sau 1 giờ, bể nước đá được bỏ ra và hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột silicagel để tách sản phẩm bị lẫn triphenylphosphin oxit. Chất rắn được nghiền thành bột với t-butyl metyl ete để loại triphenylphosphin oxit để tạo ra 5-[(2,4-dinitrophenoxy)metyl]-1-metyl-2-nitro-1H-imidazol (70 mg, 0,236 mmol, hiệu suất 30%).

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 8,80 (d, $J = 2,4$ Hz, 1 H), 8,58 (dd, $J = 9,6, 2,4$ Hz, 1 H); δ 7,82 (D, $J = 9,6$ Hz, 1 H), 7,40 (s, 1 H), 5,66 (s, 2 H), 3,95 (s, 3 H). MS (ESI+) của $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_7$ m/z 324,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Ví dụ 10: Đánh giá các tính chất ức chế tăng trưởng của Hợp chất A ở panel dòng tế bào ung thư NCI-60

Các dòng tế bào khối u của người thuộc panel tầm soát ung thư được nuôi trong môi trường RPMI 1640 chứa 5% huyết thanh bào thai bò và 2 mM L-glutamin. Đối với thí nghiệm tầm soát điển hình, các tế bào được cấy vào đĩa vi chuẩn độ 96 lỗ trong 100 μ l ở các mật độ cấy rìa nằm trong khoảng từ 5000 đến 40000 tế bào/lỗ tùy thuộc vào thời gian nhân đôi của các dòng tế bào cá thể. Sau khi cấy tế bào, các đĩa vi chuẩn độ được ủ ở nhiệt độ 37°C, trong môi trường chứa 5% CO₂, 95% không khí và độ ẩm tương đối 100% trong 24 giờ trước khi được bổ sung được chất thí nghiệm.

Sau 24 giờ, hai đĩa chứa mỗi dòng tế bào được cố định tại chỗ bằng TCA để đại diện cho phép đo quần thể tế bào đối với mỗi dòng tế bào ở thời điểm bổ sung được chất (Tz). Các được chất thí nghiệm được hòa tan trong dimetyl sulfoxit ở nồng độ gấp 400 lần nồng độ thử nghiệm cực đại cuối cùng mong muốn và được bảo quản đông lạnh trước khi sử dụng. Tại thời điểm bổ sung được chất, lượng phân ước của phân cô đặc đông lạnh được làm tan băng và pha loãng đến nồng độ gấp đôi nồng độ thử nghiệm cực đại cuối cùng mong muốn bằng môi trường hoàn chỉnh chứa 50 μ g/ml gentamixin. Các lượng phân ước 100 μ l dịch pha loãng chứa được chất được thêm vào các lỗ vi chuẩn độ thích hợp đã chứa sẵn 100 μ l môi trường để tạo ra nồng độ được chất cuối cùng mong muốn.

Sau khi thêm được chất, các đĩa được ủ thêm 48 giờ ở nhiệt độ 37°C, trong môi trường chứa 5% CO₂, 95% không khí và độ ẩm tương đối 100%. Đối với các tế bào bám dính, thử nghiệm được dừng bằng cách thêm TCA lạnh. Các tế bào được cố định tại chỗ bằng cách thêm nhẹ nhàng 50 μ l TCA 50% (trọng lượng/thể tích) lạnh (đến nồng độ cuối TCA 10%) và ủ trong 60 phút ở 4°C. Dịch nổi bề mặt được tách ra, và các đĩa được rửa năm lần bằng nước máy và làm khô bằng không khí. Dung dịch sulforhodamin B (SRB) (100 μ l) ở nồng độ 0,4 % (trọng lượng/thể tích) trong axit axetic 1% được thêm vào mỗi lỗ, và các đĩa được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi nhuộm màu, thuốc nhuộm không liên kết được loại bỏ bằng cách rửa năm lần bằng axit axetic 1% và các đĩa được làm khô bằng không khí. Sau đó, thuốc nhuộm liên kết được hòa tan bằng bazơ trizma 10 mM, và độ hấp thụ được đọc trên thiết bị đọc đĩa tự động ở bước sóng 515 nm. Đối với các tế bào lơ lửng, thực hiện phương pháp tương tự ngoại trừ việc thử nghiệm được dừng bằng cách cố định các tế bào lắng ở đáy lỗ bằng cách thêm nhẹ nhàng 50 μ l TCA 80% (đến

nồng độ cuối TCA 16%). Bằng cách sử dụng bảy phép đo độ hấp thụ [thời gian không, (Tz), mức độ tăng trưởng đối chứng, (C), và mức độ tăng trưởng thử nghiệm với sự có mặt của dược chất ở năm mức nồng độ (Ti)], tỷ lệ phần trăm tăng trưởng được tính toán ở mỗi mức nồng độ dược chất. Tỷ lệ phần trăm ức chế tăng trưởng được tính là:

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

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

Dữ liệu một liều được thể hiện ở dạng đồ thị giá trị trung bình của phần trăm tăng trưởng của tế bào được điều trị. Số được báo cáo là mức độ tăng trưởng so với mẫu đối chứng không dùng thuốc, và so với số tế bào ở thời gian không. Điều này cho phép phát hiện cả mức độ ức chế tăng trưởng (trị số nằm trong khoảng từ 0 đến 100) và mức độ gây chết (trị số nhỏ hơn 0).

Đối với NCI-60, Hợp chất A có tỷ lệ phần trăm tăng trưởng trung bình của mẫu đối chứng là 98,63 với delta bằng 26,47 phần trăm đối với toàn bộ các dòng tế bào được thử nghiệm và khoảng biến thiên là 40,14 phần trăm. Tương tự, DNP có tỷ lệ phần trăm tăng trưởng trung bình của mẫu đối chứng là 98,4 với delta bằng 28,44 đối với toàn bộ các dòng tế bào được thử nghiệm với khoảng biến thiên là 44,43 phần trăm. Các kết quả theo dòng tế bào được thể hiện dưới đây. Cả Hợp chất A lẫn DNP đều không tạo ra mức độ ức chế tăng trưởng mạnh (ít nhất là 50 phần trăm) ở nồng độ 10 μ M ở bất kỳ dòng tế bào nào trong số các dòng tế bào NCI-60. Fig.29 minh họa sự tăng trưởng tế bào của các dòng tế bào NCI-60 được điều trị bằng Hợp chất A hoặc DNP ở nồng độ 10 μ M.

Ví dụ 11: Sự tạo thành DNP từ Hợp chất A bởi các vi thể gan

Bước 1: Dung dịch được điều chế theo bảng 4.

Bảng 4: Điều chế dung dịch gốc

Thuốc thử	Nồng độ gốc	Thể tích	Nồng độ cuối
Đệm phosphat	200 mM	200 μ l	100 mM
H ₂ O siêu tinh khiết	-	106 μ l	-
Dung dịch MgCl ₂	50 mM	40 μ l	5 mM
Vi thể	20 mg/ml	10 μ l	0,5 mg/ml

Bước 2: 40 μ l dung dịch NADPH 10 mM được thêm vào mỗi lỗ. Nồng độ cuối của dung dịch NADPH là 1 mM. Hỗn hợp được làm ấm sơ bộ ở nhiệt độ 37°C trong thời

gian 5 phút. Các mẫu đối chứng âm được điều chế bằng cách thay dung dịch NADPH bằng 40 μL H_2O siêu tinh khiết. Đối chứng âm được sử dụng để loại trừ yếu tố gây sai lệch mà được gây ra từ sự không ổn định của bản thân hóa chất. Các mẫu chứa dung dịch NADPH được chuẩn bị với bộ mẫu đôi. Các đối chứng âm được chuẩn bị với bộ mẫu đơn (xem Fig.30). Tạo ra DNP từ Hợp chất A 2 μM trong vi thể gan của các loài khác nhau. Nguồn loài thử nghiệm được liệt kê trong bảng 5.

Bảng 5: Thông tin vi thể gan

Loài	Số phân loại	Số lô	Giống và giới tính	Nhà cung cấp
Người	452117	38291	Nam & nữ, được lưu trữ	Corning
Chuột cống	452501	62547	Sprague-Dawley đực, được lưu trữ	Corning
Chuột nhắt	452701	4133003	CD-1 đực, được lưu trữ	Corning
Khỉ (cyno)	-	ZDD	Cynomolgus đực, được lưu trữ	RILD (Thượng Hải)
Chó	D1000	1310086	Beagle đực, được lưu trữ	Xenotech

Bước 3: Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm 4 μL dung dịch hợp chất đối chứng hoặc hợp chất thử nghiệm có nồng độ 200 μM . Verapamil được sử dụng làm đối chứng dương trong nghiên cứu này. Nồng độ cuối của hợp chất thử nghiệm hoặc hợp chất đối chứng là 2 μM .

Bước 4: Các lượng phân ước 50 μL được lấy ra từ dung dịch phản ứng ở thời gian 0, 15, 30, 45 và 60 phút. Phản ứng được dừng bằng cách thêm lượng gấp 4 lần thể tích của metanol lạnh chứa IS (200 nM imipramin, 200 nM labetalol và 2 μM ketoprofen). Các mẫu được ly tâm ở 3, 220 g trong thời gian 40 phút. Lượng phân ước 90 μL của dịch nổi bề mặt được trộn với 90 μL H_2O siêu tinh khiết và sau đó được sử dụng cho phân tích LC-MS/MS.

Bước 5: Phân tích dữ liệu

Toàn bộ các tính toán được thực hiện bằng cách sử dụng Microsoft Excel.

Các diện tích đỉnh được xác định từ phổ sắc ký ion được chiết. Giá trị độ dốc, k, được xác định bằng phép hồi quy tuyến tính của loga tự nhiên của tỷ lệ phần trăm còn lại của dược chất gốc đối với đường cong thời gian ủ.

Kết quả cho thấy rằng sự tạo thành DNP có thể chuyển đổi giữa các loài và xảy ra

dễ dàng nhờ các enzym thông thường trong gan.

Ví dụ 12: Các tiêu chuẩn đưa vào thử nghiệm lâm sàng pha 1/2 được đề xuất

Tiêu chuẩn đưa vào:

- 2-3 chỉ dấu về hội chứng trao đổi chất
- 10% mỡ trong gan
- ALT bằng 40 hoặc cao hơn
- Panel FIB4 vượt quá 1,1

Tiêu chuẩn loại trừ:

- BMI < 25, sử dụng rượu
- Tiền sử về chứng nhịp tim nhanh xoang, bệnh thiếu máu cục bộ hoặc rối loạn chức năng thận

ĐIỂM CUỐI HIỆU LỰC THẨM DÒ TỪ NGHIÊN CỨU PHA 1/2

- Định lượng mỡ trong gan bằng cách sử dụng MRI-PDFF và MRE
- CK18 tuần hoàn
- Xét nghiệm hơi thở không xâm lấn để xác định hoạt tính ty thể trong gan (Hệ thống BreathID®, Exalenz Biosciences)
- Xác định mức độ đáp ứng mục tiêu và PD
- Phân loại bệnh nhân và ID của người đáp ứng
- Phê duyệt nhanh mục tiêu thiết kế
- Hệ thống BreathID® được sử dụng trong nhiều nghiên cứu pha II của bệnh NASH (NCT02314026, NCT01244503, NCT01281059)

Ví dụ 13: Tổng hợp 1-[2-(2,4-Dinitro-phenoxy)-ethyl]-2-metyl-5-nitro-1*H*-imidazol (Hợp chất #1 trong bảng A).



2,4-dinitrophenol (được làm ướt bằng xấp xỉ 20% nước) (khối lượng lúc ướt 269 mg, khối lượng lúc khô 215 mg, 1,17 mmol) được hòa tan trong metylen clorua (2 mL) và khuấy với natri sulfat khan ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 giờ. Dung dịch metylen

clorua được lắng gạn vào bình phản ứng và natri sulfat được rửa bằng lượng metylen clorua bổ sung (2 mL). Thêm 2-(2-metyl-5-nitro-imidazol-1-yl)-etanol (125 mg, 0,732 mmol) và triphenylphosphin (211 mg, 0,805 mmol) vào dung dịch này. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi thu được dung dịch. Sau đó, dung dịch này được làm lạnh trong bể nước đá và xử lý bằng diisopropyl azodicarboxylat, DIAD (158 μ L, 0,805 mmol). Sau 1 giờ, bể nước đá được bỏ ra và hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột silicagel để tách sản phẩm bị lẫn triphenylphosphin oxit. Chất rắn được nghiền thành bột với t-butyl metyl ete để loại triphenylphosphin oxit để tạo ra 1-[2-(2,4-Dinitro-phenoxy)-etyl]-2-metyl-5-nitro-1*H*-imidazol. MS (ESI+) của $C_{12}H_{11}N_5O_7$ m/z 338,1 (M+H)⁺.

Ví dụ 14: Tổng hợp 1-Metyl-2-nitro-5-(4-nitro-phenoxy-metyl)-1*H*-imidazol (hợp chất #3 trong bảng A).



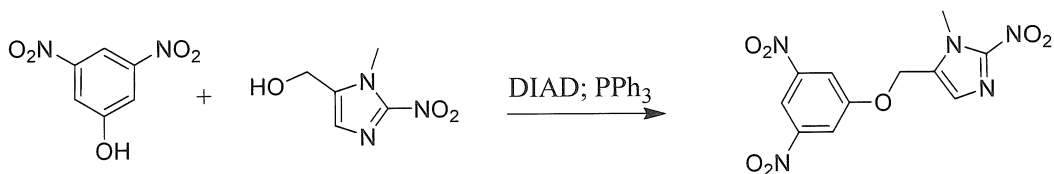
4-Nitrophenol (162 mg, 1,17 mmol) được hòa tan trong metylen clorua (2 mL). Thêm (3-metyl-2-nitro-3*H*-imidazol-4-yl)-metanol (115 mg, 0,732 mmol) và triphenylphosphin (211 mg, 0,805 mmol) vào dung dịch này. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi thu được dung dịch. Sau đó, dung dịch này được làm lạnh trong bể nước đá và xử lý bằng diisopropyl azodicarboxylat, DIAD (158 μ L, 0,805 mmol). Sau 1 giờ, bể nước đá được bỏ ra và hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột silicagel để tách sản phẩm bị lẫn triphenylphosphin oxit. Chất rắn được nghiền thành bột với t-butyl metyl ete để loại triphenylphosphin oxit để tạo ra 1-metyl-2-nitro-5-(4-nitro-phenoxy-metyl)-1*H*-imidazol. MS (ESI+) của $C_{11}H_{10}N_4O_5$ m/z 279,1 (M+H)⁺.

Ví dụ 15: Tổng hợp 1-metyl-2-nitro-5-(3-nitro-phenoxy-metyl)-1*H*-imidazol (hợp chất #4 trong bảng A).



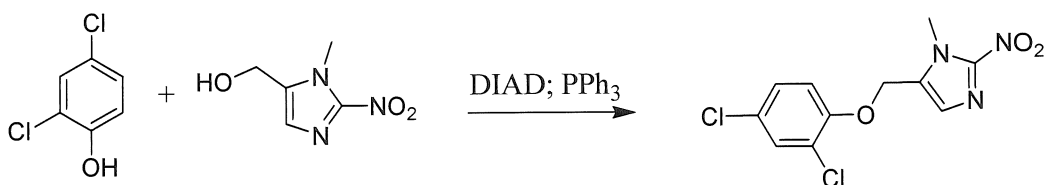
3-nitrophenol (162 mg, 1,17 mmol) được hòa tan trong metylen clorua (2 ml). Thêm (3-metyl-2-nitro-3*H*-imidazol-4-yl)-metanol (115 mg, 0,732 mmol) và triphenylphosphin (211 mg, 0,805 mmol) vào dung dịch này. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi thu được dung dịch. Sau đó, dung dịch này được làm lạnh trong bể nước đá và xử lý bằng diisopropyl azodicarboxylat, DIAD (158 μ L, 0,805 mmol). Sau 1 giờ, bể nước đá được bỏ ra và hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột silicagel để tách sản phẩm bị lẫn triphenylphosphin oxit. Chất rắn được nghiền thành bột với t-butyl metyl ete để loại triphenylphosphin oxit để tạo ra 1-metyl-2-nitro-5-(3-nitro-phenoxy-metyl)-1*H*-imidazol. MS (ESI⁺) của C₁₁H₁₀N₄O₅ m/z 279,1 (M+H)⁺.

Ví dụ 16: Tổng hợp 5-(3,5-Dinitro-phenoxy-metyl)-1-metyl-2-nitro-1*H*-imidazol (hợp chất #5 trong bảng A).



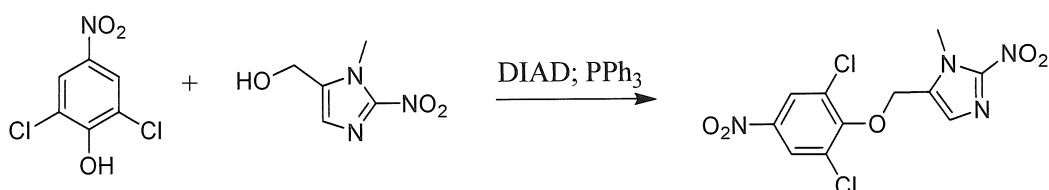
3,5-Dinitro-phenol (215 mg, 1,17 mmol) được hòa tan trong metylen clorua (2 ml). Thêm (3-metyl-2-nitro-3*H*-imidazol-4-yl)-metanol (115 mg, 0,732 mmol) và triphenylphosphin (211 mg, 0,805 mmol) vào dung dịch này. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi thu được dung dịch. Sau đó, dung dịch này được làm lạnh trong bể nước đá và xử lý bằng diisopropyl azodicarboxylat, DIAD (158 μ L, 0,805 mmol). Sau 1 giờ, bể nước đá được bỏ ra và hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột silicagel để tách sản phẩm bị lẫn triphenylphosphin oxit. Chất rắn được nghiền thành bột với t-butyl metyl ete để loại triphenylphosphin oxit để tạo ra 5-(3,5-dinitro-phenoxy-metyl)-1-metyl-2-nitro-1*H*-imidazol. MS (ESI⁺) của C₁₁H₉N₅O₇ m/z 324,1 (M+H)⁺.

Ví dụ 17: Tổng hợp 5-(2,4-Diclo-phenoxy-metyl)-1-metyl-2-nitro-1*H*-imidazolimidazol (hợp chất #6 trong bảng A).



2,4-Diclo-phenol (190 mg, 1,17 mmol) được hòa tan trong metylen clorua (2 mL). Thêm (3-metyl-2-nitro-3*H*-imidazol-4-yl)-metanol (115 mg, 0,732 mmol) và triphenylphosphin (211 mg, 0,805 mmol) vào dung dịch này. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi thu được dung dịch. Sau đó, dung dịch này được làm lạnh trong bể nước đá và xử lý bằng diisopropyl azodicarboxylat, DIAD (158 μ L, 0,805 mmol). Sau 1 giờ, bể nước đá được bỏ ra và hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột silicagel để tách sản phẩm bị lẫn triphenylphosphin oxit. Chất rắn được nghiền thành bột với *t*-butyl metyl ete để loại triphenylphosphin oxit để tạo ra 5-(2,4-diclo-phenoxymetyl)-1-metyl-2-nitro-1*H*-imidazol. MS (ESI+) của $C_{11}H_9Cl_2N_3O_3$ m/z 301,1 (M+H)⁺.

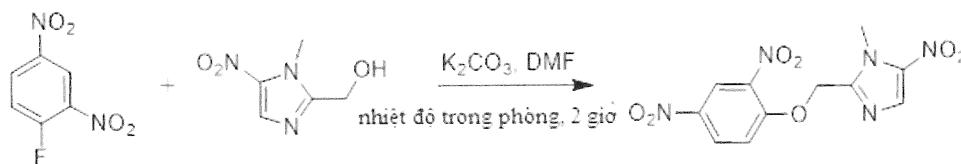
Ví dụ 18: Tổng hợp 5-(2,6-Diclo-4-nitro-phenoxymetyl)-1-metyl-2-nitro-1*H*-imidazol (hợp chất #8 trong bảng A).



2,6-Diclo-4-nitro-phenol (243 mg, 1,17 mmol) được hòa tan trong metylen clorua (2 mL). Thêm (3-metyl-2-nitro-3*H*-imidazol-4-yl)-metanol (115 mg, 0,732 mmol) và triphenylphosphin (211 mg, 0,805 mmol) vào dung dịch này. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi thu được dung dịch. Sau đó, dung dịch này được làm lạnh trong bể nước đá và xử lý bằng diisopropyl azodicarboxylat, DIAD (158 μ L, 0,805 mmol). Sau 1 giờ, bể nước đá được bỏ ra và hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột silicagel để tách sản phẩm bị lẫn triphenylphosphin oxit. Chất rắn được nghiền thành bột với *t*-butyl metyl ete để loại triphenylphosphin oxit để tạo ra 5-(2,6-diclo-4-nitro-phenoxymetyl)-1-metyl-2-nitro-1*H*-imidazol. MS (ESI+) của $C_{11}H_8Cl_2N_4O_5$ m/z 347,0 (M+H)⁺.

Ví dụ 19: Tổng hợp 2-((2,4-dinitrophenoxy)metyl)-1-metyl-5-nitro-1*H*-imidazol (hợp chất

#16 trong bảng A).



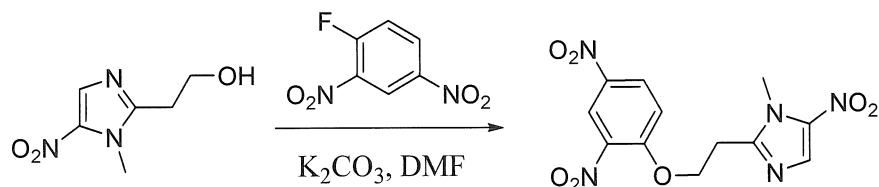
Hỗn hợp gồm (1-metyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)metanol (176 mg, 1,12 mmol) và 1-flo-2,4-dinitrobenzen (250 mg, 1,34 mmol) và K_2CO_3 (465 mg, 3,36 mmol) trong DMF (5 mL) được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường. Phản ứng được xử lý bằng cách chiết. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế với điều kiện sau đây: cột: cột C18 OBD điều chế XBridge 19×150 mm, 5 μ m; pha động A: nước (NH_4HCO_3 10 mmol/L), pha động B: ACN; tốc độ chảy: 20 mL/phút; rửa giải gradien. Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom và sau đó làm đông khô nhanh để tạo ra 2-(2,4-dinitro-phenoxy-metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol ở dạng chất rắn màu vàng. LC-MS: (ES, m/z) 324. $(M+H)^+$. 1H -NMR: (400MHz, $DMSO-d_6$) δ 8,79 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 8,57 (dd, $J_1 = 2,8$ Hz, $J_2 = 9,2$ Hz, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,79 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H), 5,72 (s, 2H), 3,95 (s, 3H); phân tích: C, 42,79; H, 3,43; N, 20,68; O, 33,25.

Sự tạo thành DNP từ Hợp chất B bởi các vi thể gan

Thực hiện theo các phương pháp thí nghiệm được mô tả trong ví dụ 11 mà không thay đổi điều kiện thí nghiệm nhưng thay Hợp chất A bằng hợp chất nêu ở đề mục trong enzym người, thu được các kết quả sau đây:

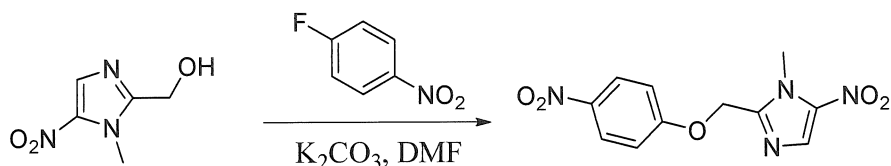
Loài	Dạng thức thử nghiệm	Lượng tạo thành DNP (μ M)					Tỷ lệ phần trăm tạo thành (%)				
		0 phút	15 phút	30 phút	45 phút	60 phút	0 phút	15 phút	30 phút	45 phút	60 phút
Người	có NADPH	0,031	0,038	0,025	0,023	0,018	1,56	1,90	1,26	1,13	0,91
	Không có NADPH	0,017	0,015	0,014	0,014	0,013	0,83	0,75	0,72	0,69	0,63

Ví dụ 20: Tổng hợp 2-[2-(2,4-Dinitro-phenoxy)-etyl]-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol (Hợp chất #17 trong bảng A).



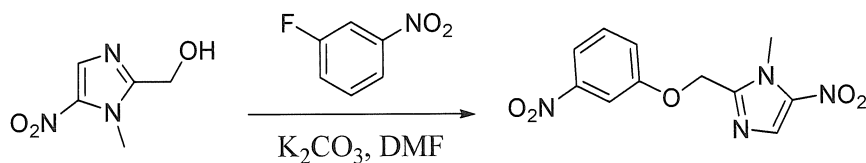
Hỗn hợp gồm 2-(1-metyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-etanol (1,32 mmol) và 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (1,65 mmol) và K_2CO_3 (465 mg, 3,36 mmol) trong DMF (5 mL) được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường. Phản ứng được xử lý bằng cách chiết. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế với điều kiện sau đây: cột: cột C18 OBD điều chế XBridge 19×150 mm, 5 μ m; pha động A: nước (NH_4HCO_3 10 mmol/L), pha động B: ACN; tốc độ chảy: 20 mL/phút; rửa giải gradien. Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom và sau đó làm đông khô nhanh để tạo ra 2-[2-(2,4-dinitro-phenoxy)-etyl]-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol. LC-MS: (ES, m/z) 338,07($M+H$)⁺; phân tích: C, 42,62; H, 3,20; N, 20,83; O, 33,32.

Ví dụ 21: Tổng hợp 1-metyl-5-nitro-2-(4-nitro-phenoxy-metyl)-1H-imidazol (hợp chất #18 trong bảng A).



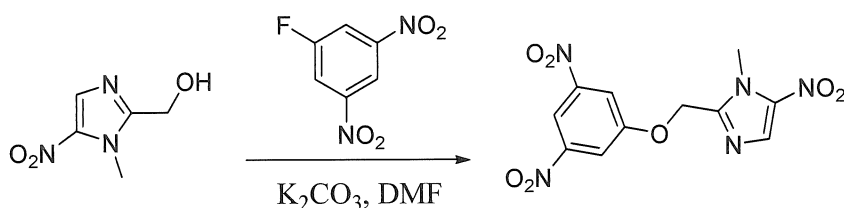
Hỗn hợp gồm 2-(1-metyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-etanol (1,24 mmol) và 1-fluoro-4-nitrobenzen (1,45 mmol) và K_2CO_3 (465 mg, 3,36 mmol) trong DMF (5 mL) được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường, sau đó gia nhiệt. Phản ứng được xử lý bằng cách chiết. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế với điều kiện sau đây: cột: cột C18 OBD điều chế XBridge 19×150 mm, 5 μ m; pha động A: nước (NH_4HCO_3 10 mmol/L), pha động B: ACN; tốc độ chảy: 20 mL/phút; rửa giải gradien. Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom và sau đó làm đông khô nhanh để tạo ra 1-metyl-5-nitro-2-(4-nitro-phenoxy-metyl)-1H-imidazol. LC-MS: (ES, m/z) 279,07($M+H$)⁺; phân tích: C, 47,35; H, 3,71; N, 20,24; O, 28,82.

Ví dụ 22: Tổng hợp 1-metyl-5-nitro-2-(3-nitro-phenoxy-metyl)-1H-imidazol (hợp chất #19 trong bảng A).



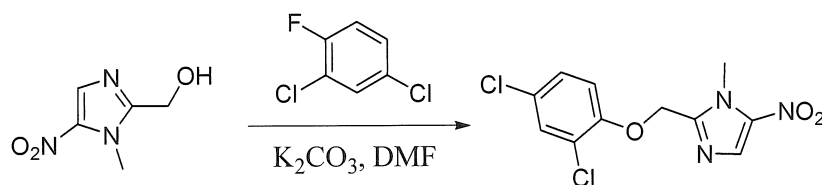
Hỗn hợp gồm 2-(1-metyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-etanol (1,32 mmol) và 1-fluoro-3-nitrobenzen (1,67 mmol) và K_2CO_3 (465 mg, 3,36 mmol) trong DMF (5 mL) được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường, sau đó gia nhiệt. Phản ứng được xử lý bằng cách chiết. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế với điều kiện sau đây: cột: cột C18 OBD điều chế XBridge 19×150 mm, 5 um; pha động A: nước (NH_4HCO_3 10 mmol/L), pha động B: ACN; tốc độ chảy: 20 mL/phút; rửa giải gradien. Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom và sau đó làm đông khô nhanh để tạo ra 1-metyl-5-nitro-2-(3-nitrophenoxy)metyl)-1H-imidazol. LC-MS: (ES, m/z) 279,07($M+H$)⁺; phân tích: C, 47,53; H, 3,69; N, 20,24; O, 28,85.

Ví dụ 23: Tổng hợp 2-(3,5-Dinitro-phenoxy)metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol (hợp chất #20 trong bảng A).



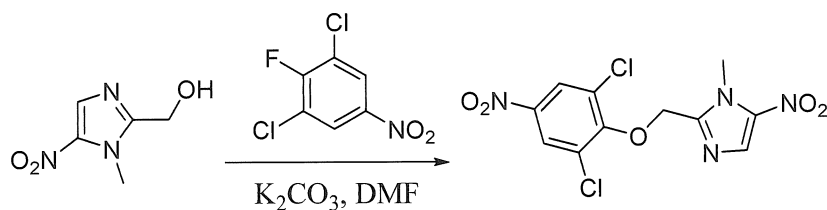
Hỗn hợp gồm 2-(1-metyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-etanol (1,22 mmol) và 3,5-di-nitro-1-flobenzen (1,54 mmol) và K_2CO_3 (465 mg, 3,36 mmol) trong DMF (5 mL) được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường, sau đó gia nhiệt. Phản ứng được xử lý bằng cách chiết. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế với điều kiện sau đây: cột: cột C18 OBD điều chế XBridge 19×150 mm, 5 um; pha động A: nước (NH_4HCO_3 10 mmol/L), pha động B: ACN; tốc độ chảy: 20 ml/phút; rửa giải gradien. Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom và sau đó làm đông khô nhanh để tạo ra 2-(3,5-dinitro-phenoxy)metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol. LC-MS: (ES, m/z) 324,05($M+H$)⁺; phân tích: C, 40,90; H, 2,89; N, 21,72; O, 34,60.

Ví dụ 24: Tổng hợp 2-(2,4-Diclo-phenoxy)metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol (hợp chất #21 trong bảng A).



Hỗn hợp gồm 2-(1-metyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-etanol (1,25 mmol) và 2,4-di-clo-1-flobenzen (1,45 mmol) và K_2CO_3 (465 mg, 3,36 mmol) trong DMF (5 mL) được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường, sau đó gia nhiệt. Phản ứng được xử lý bằng cách chiết. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế với điều kiện sau đây: cột: cột C18 OBD điều chế XBridge 19×150 mm, 5 μ m; pha động A: nước (NH_4HCO_3 10 mmol/l), pha động B: ACN; tốc độ chảy: 20 ml/phút; rửa giải gradien. Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom và sau đó làm đông khô nhanh để tạo ra 2-(2,4-diclo-phenoxy-metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol. LC-MS: (ES, m/z) 302,00($M+H$)⁺; phân tích: C, 43,78; H, 3,08; Cl, 23,52; N, 13,81; O, 15,99.

Ví dụ 25: Tổng hợp 2-(2,6-diclo-4-nitro-phenoxy-metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol (hợp chất #22 trong bảng A).



Hỗn hợp gồm 2-(1-metyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-etanol (1,15 mmol) và 1,3-diclo-2-flo-5-nitro-benzen (1,24 mmol) và K_2CO_3 (465 mg, 3,36 mmol) trong DMF (5 mL) được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường, sau đó gia nhiệt. Phản ứng được xử lý bằng cách chiết. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế với điều kiện sau đây: cột: cột C18 OBD điều chế XBridge 19×150 mm, 5 μ m; pha động A: nước (NH_4HCO_3 10 mmol/L), pha động B: ACN; tốc độ chảy: 20 mL/phút; rửa giải gradien. Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom và sau đó làm đông khô nhanh để tạo ra 2-(2,6-diclo-4-nitro-phenoxy-metyl)-1-metyl-5-nitro-1H-imidazol. LC-MS: (ES, m/z) 346. ($M+H$)⁺; phân tích: C, 38,01; H, 2,22; Cl, 20,13; N, 16,19; O, 23,15.

Ví dụ 26: Tổng hợp các hợp chất 11, 12, 13, 14, và 15 trong bảng A.

Trong bình phản ứng, hỗn hợp gồm hợp chất imidazol (1 đương lượng mol), metylen iodua (1 đương lượng mol), muối kali của hợp chất phenol (1 đương lượng mol),

triethylamin khô (1 đương lượng mol), và TBAB với lượng xúc tác được hòa tan trong axetonitril khô. Dung dịch được hồi lưu trong 2 giờ, sau đó làm bay hơi dung môi. Tiếp theo, phần cặn được hòa tan trong CHCl_3 và rửa bằng nước (2x 200 mL). Lớp hữu cơ được làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và làm bay hơi để tạo ra sản phẩm thô. Bước tinh chế thêm được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký cột trên silicagel.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất 5-[(2,4-dinitrophenoxy)metyl]-1-metyl-2-nitro-1H-imidazol hoặc muối được dụng của nó.
2. Dược phẩm bao gồm chất mang được dụng và hợp chất theo điểm 1 hoặc muối được dụng của nó.

FIG. 1

MỨC PHỐI NHIỄM TỔNG CỘNG

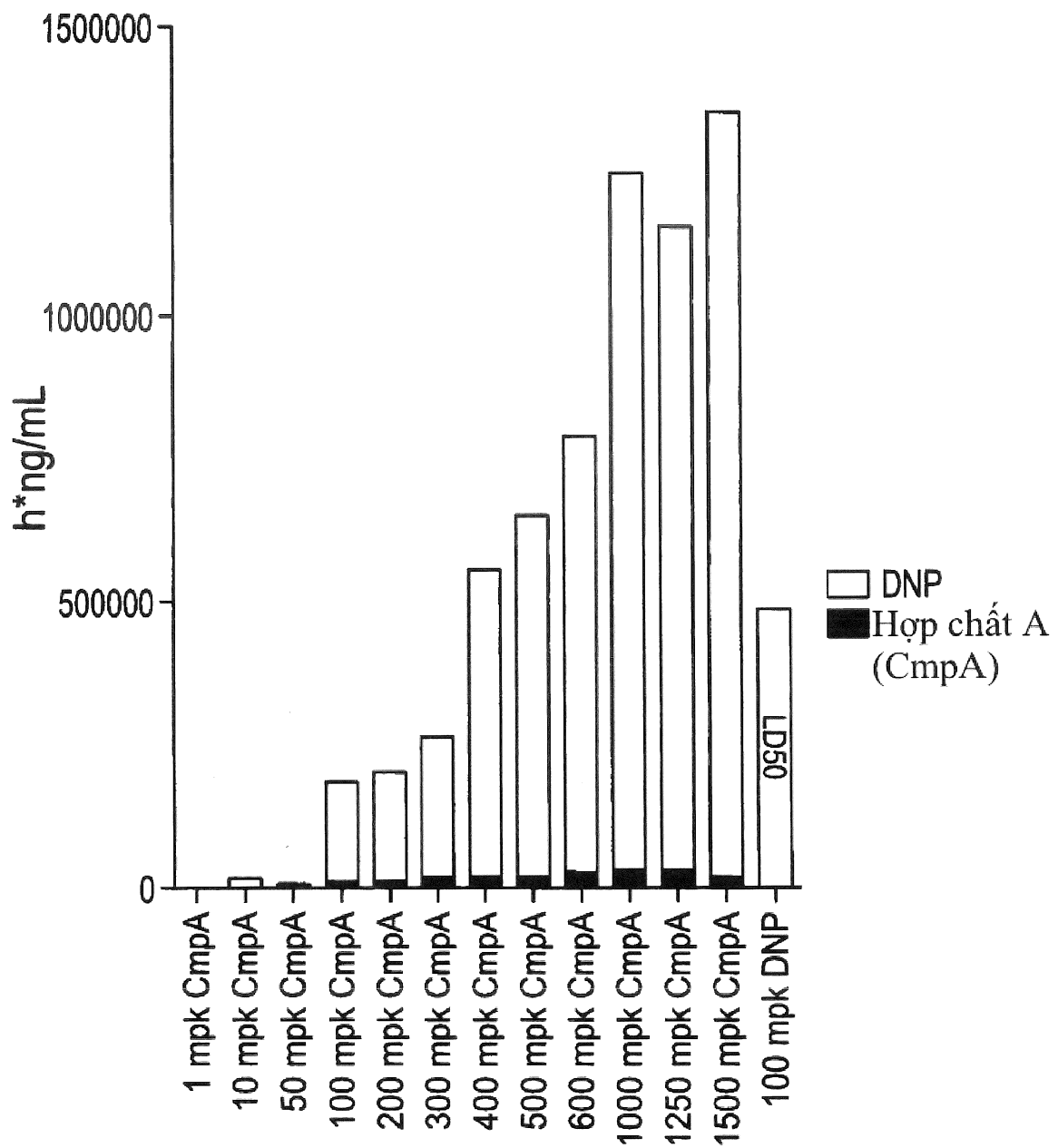
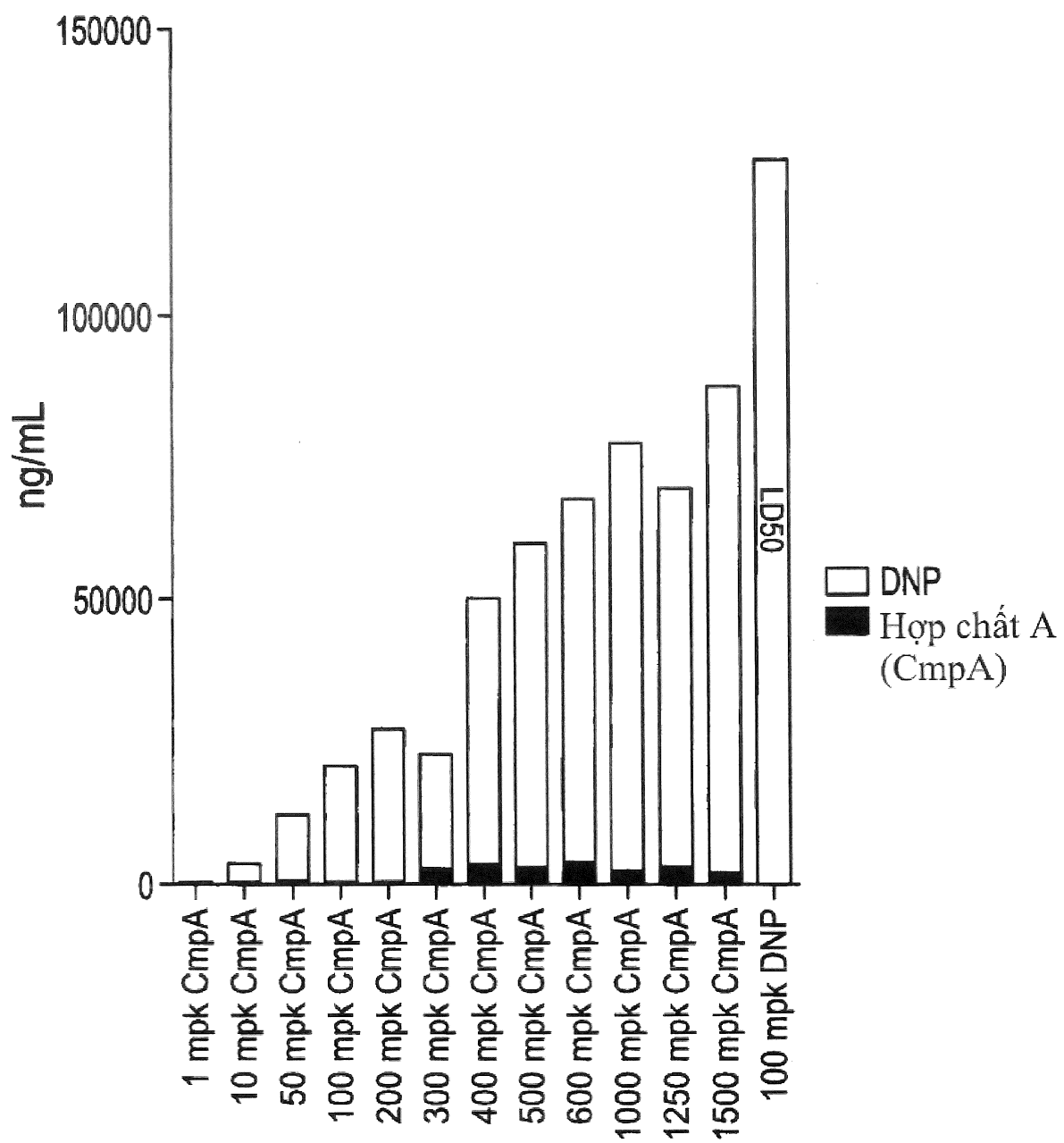


FIG. 2

$C_{\max}$ của gốc DNP theo liều



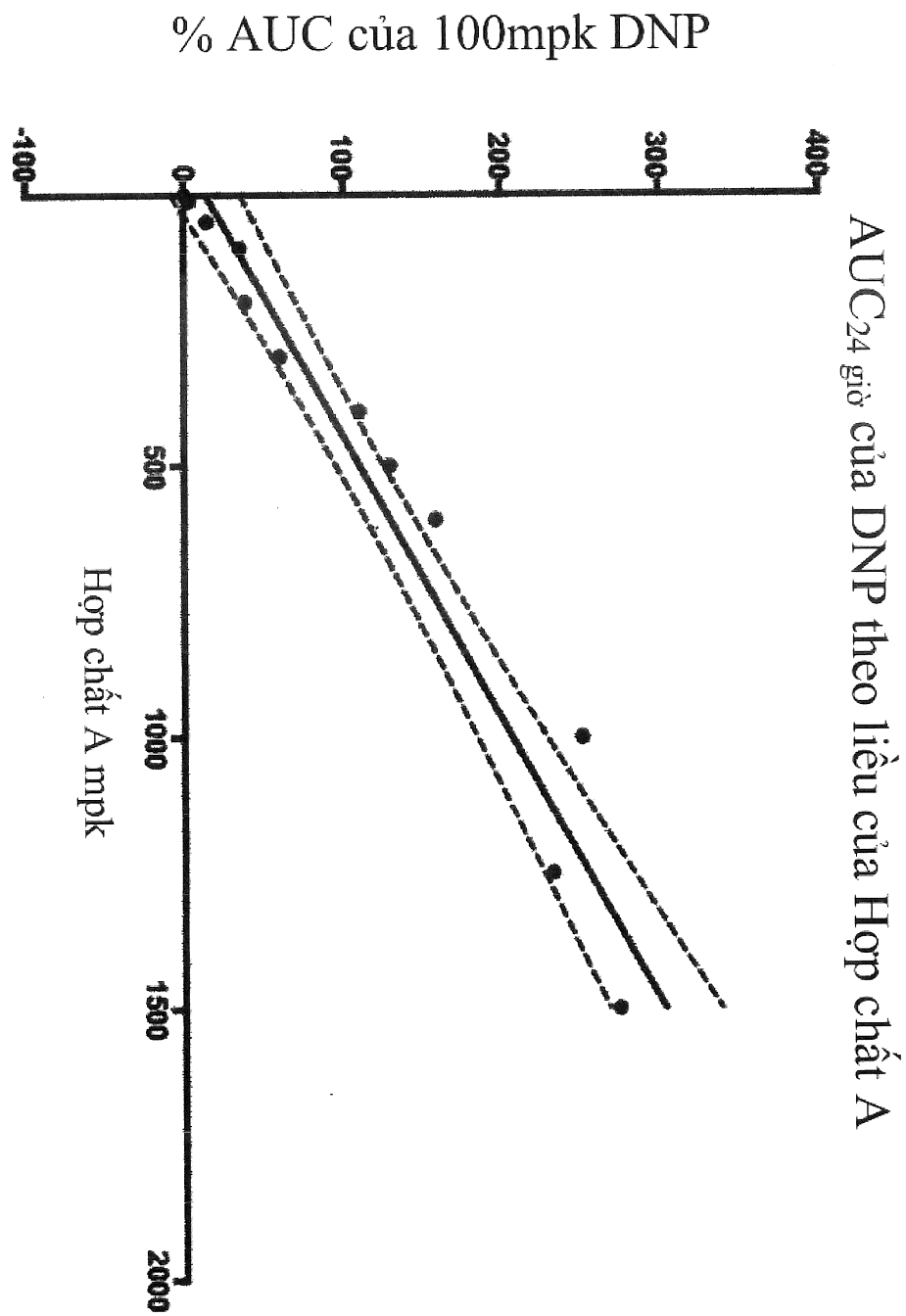
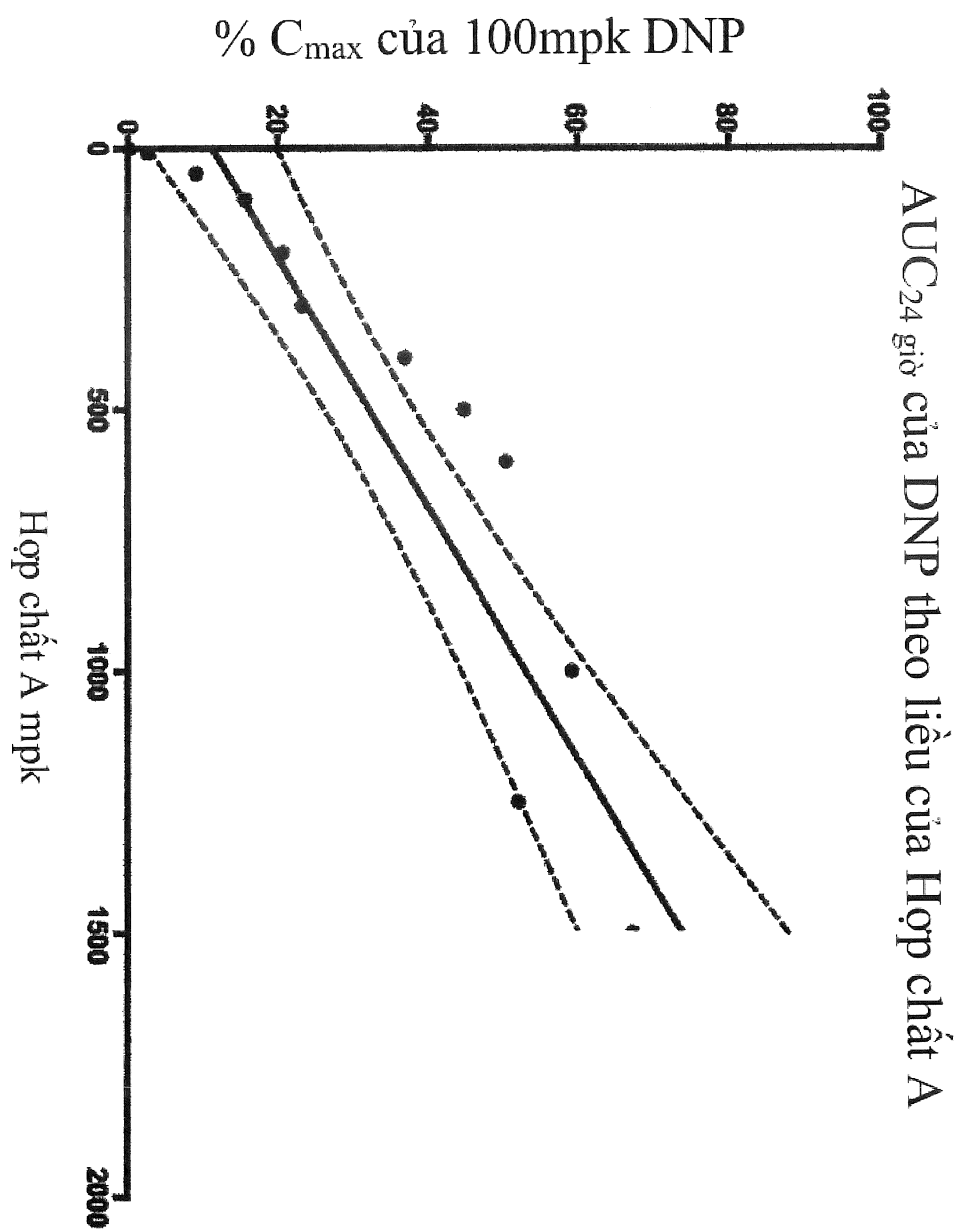
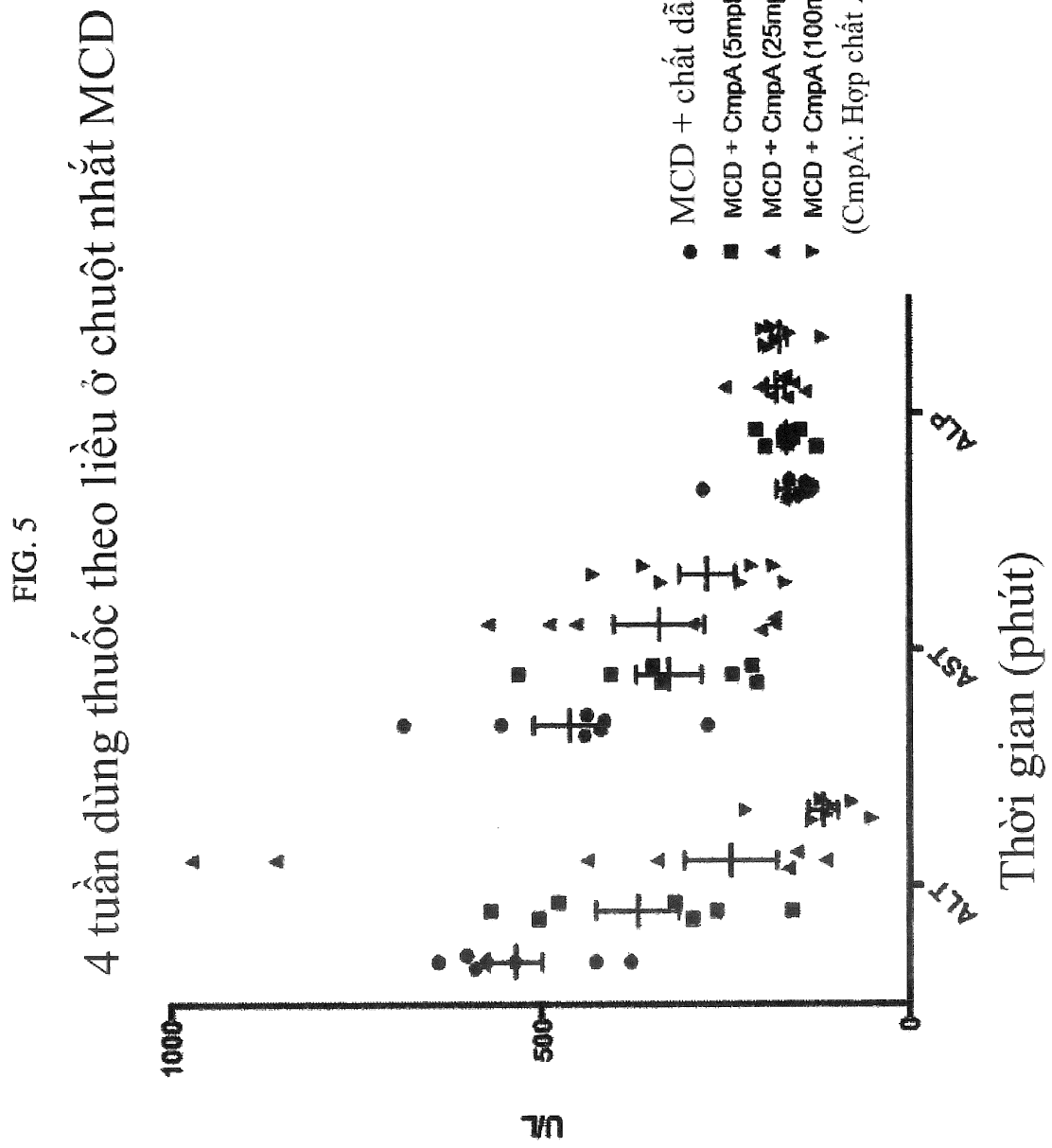


FIG. 3

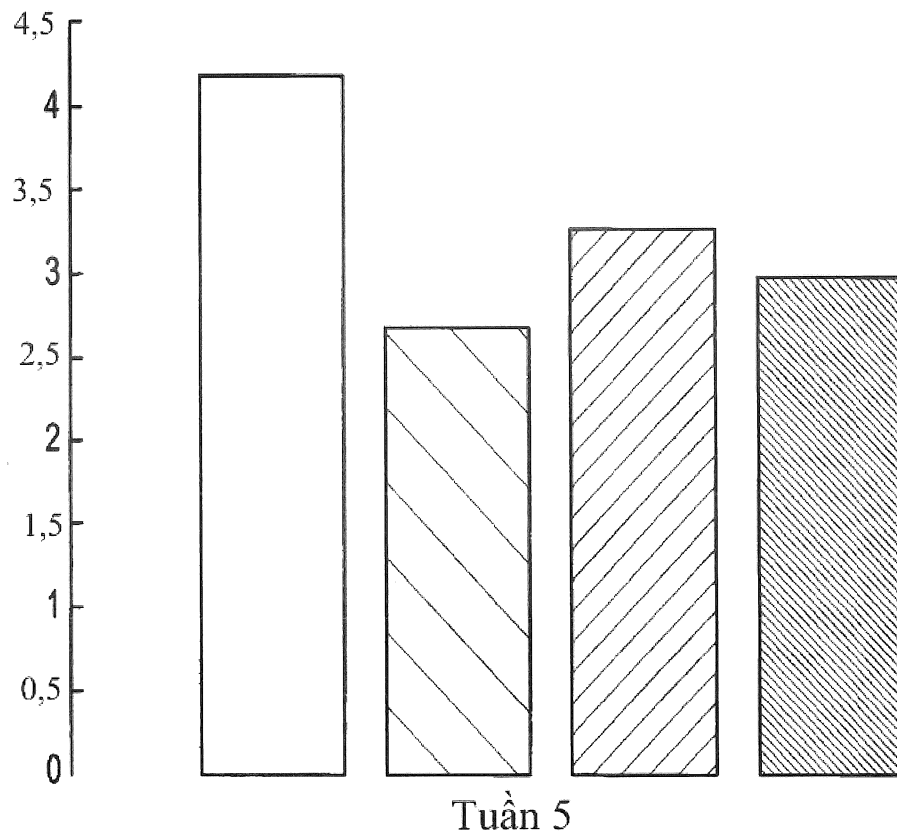




lượng glucoza trong máu mmol/l ở thời gian 120 phút sau khi cho nhận liều quyết định

FIG. 6

Điều trị bằng Hợp chất A làm tăng mức dung nạp glucoza



-  MCD + Chất dẫn
 -  MCD + CmpA @ 5 mg/kg
 -  MCD + CmpA @ 25 mg/kg
 -  MCD + CmpA @ 100 mg/kg
- (CmpA: Hợp chất A)

FIG. 7

Đánh giá tác dụng của Hợp chất A ở mẫu chuột bị gây bệnh NASH bằng chế độ ăn MCD

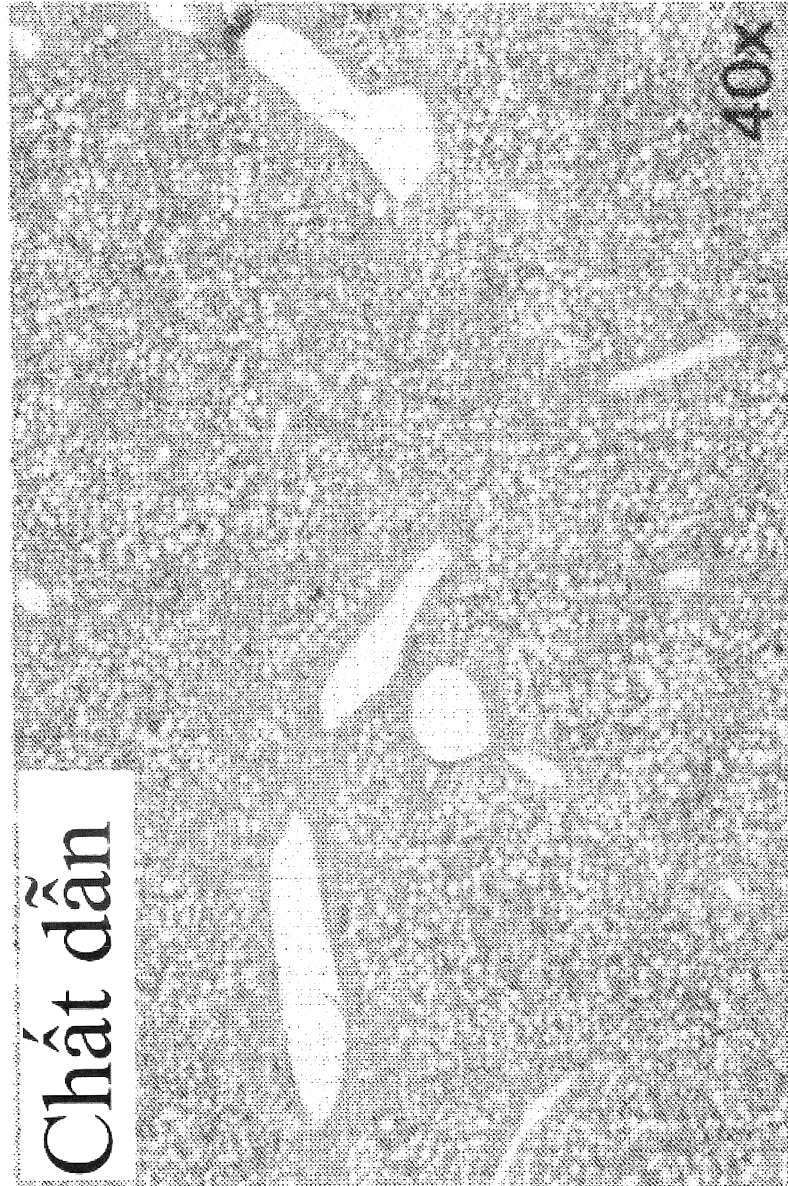


FIG. 8

Hợp chất A làm giảm bệnh viêm gan nhiễm mỡ và xytokin gây viêm ở gan chuột bị gây bệnh NASHL bằng chế độ ăn MCD. Các giọt lipid được làm giảm sau 6 tuần điều trị.

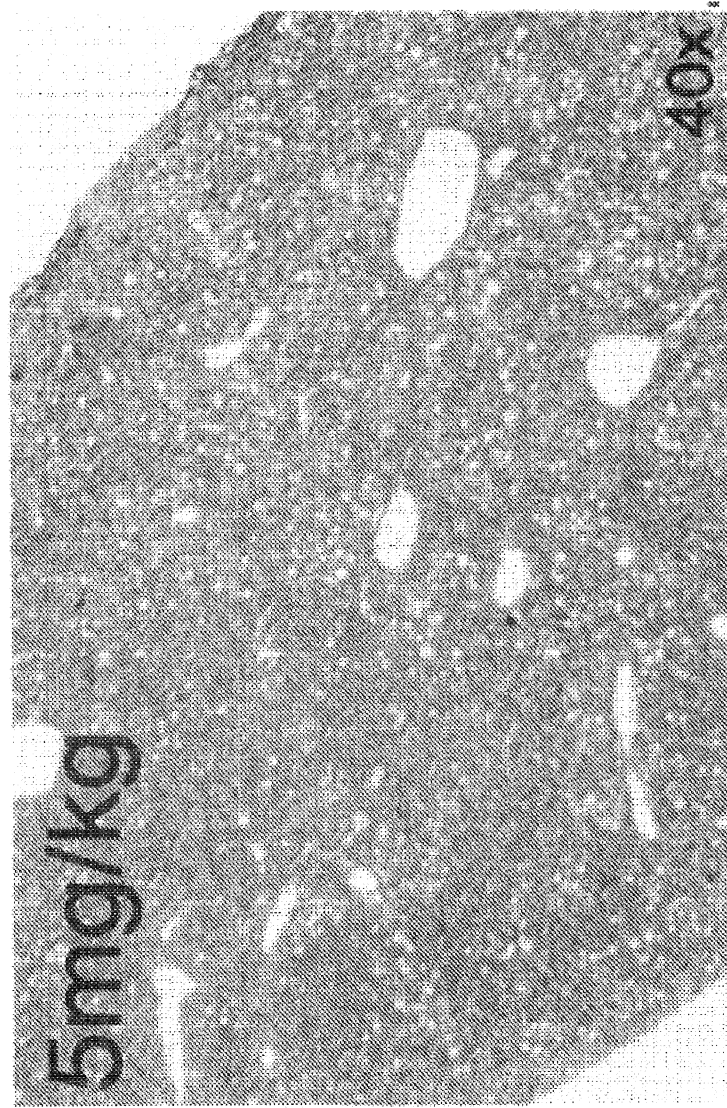


FIG. 9

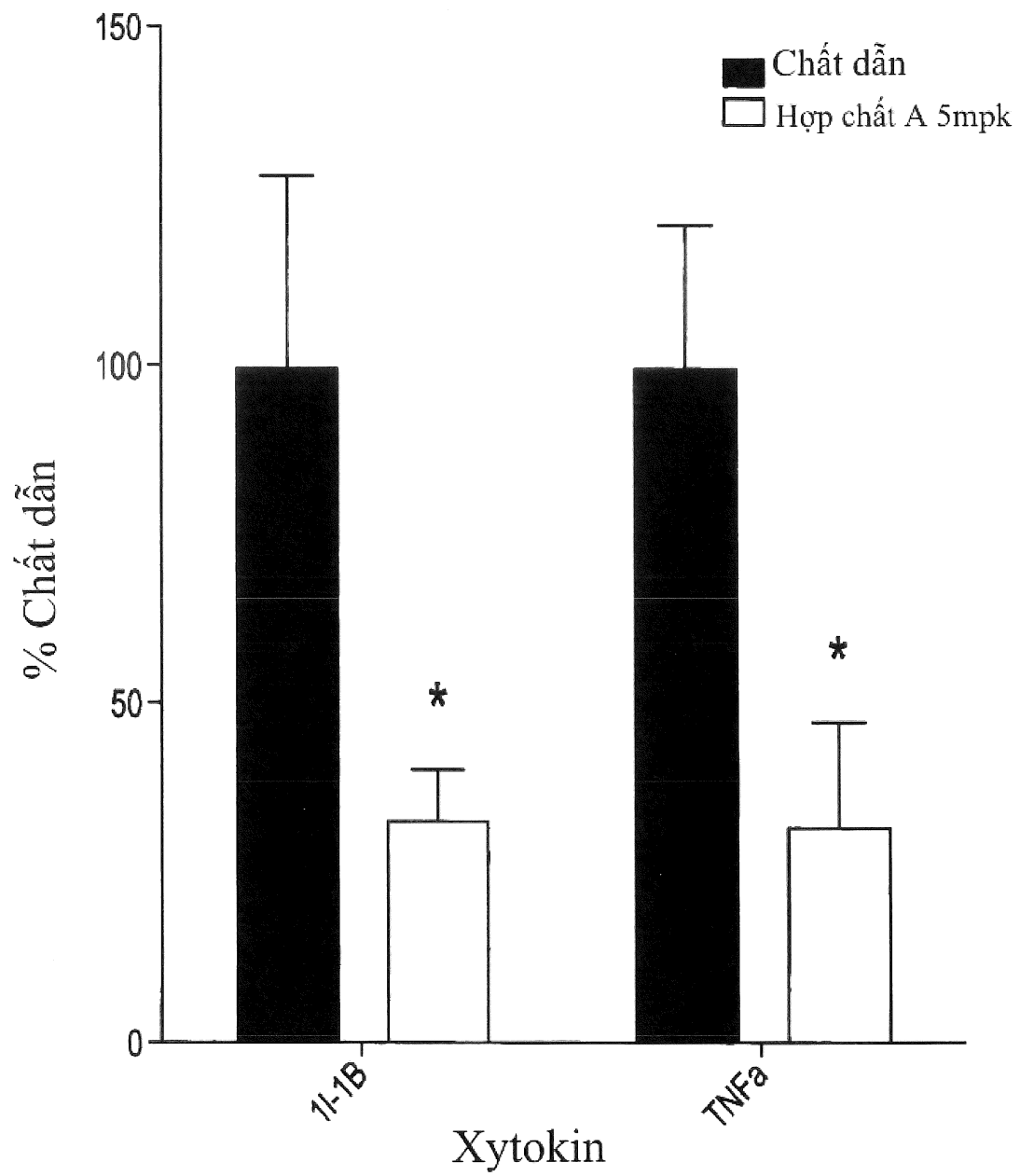
 $\text{TNF}\alpha$ và $\text{IL-1}\beta$ trong gan cũng giảm

FIG. 10

Mức TG trong huyết thanh của các nhóm nghiên cứu

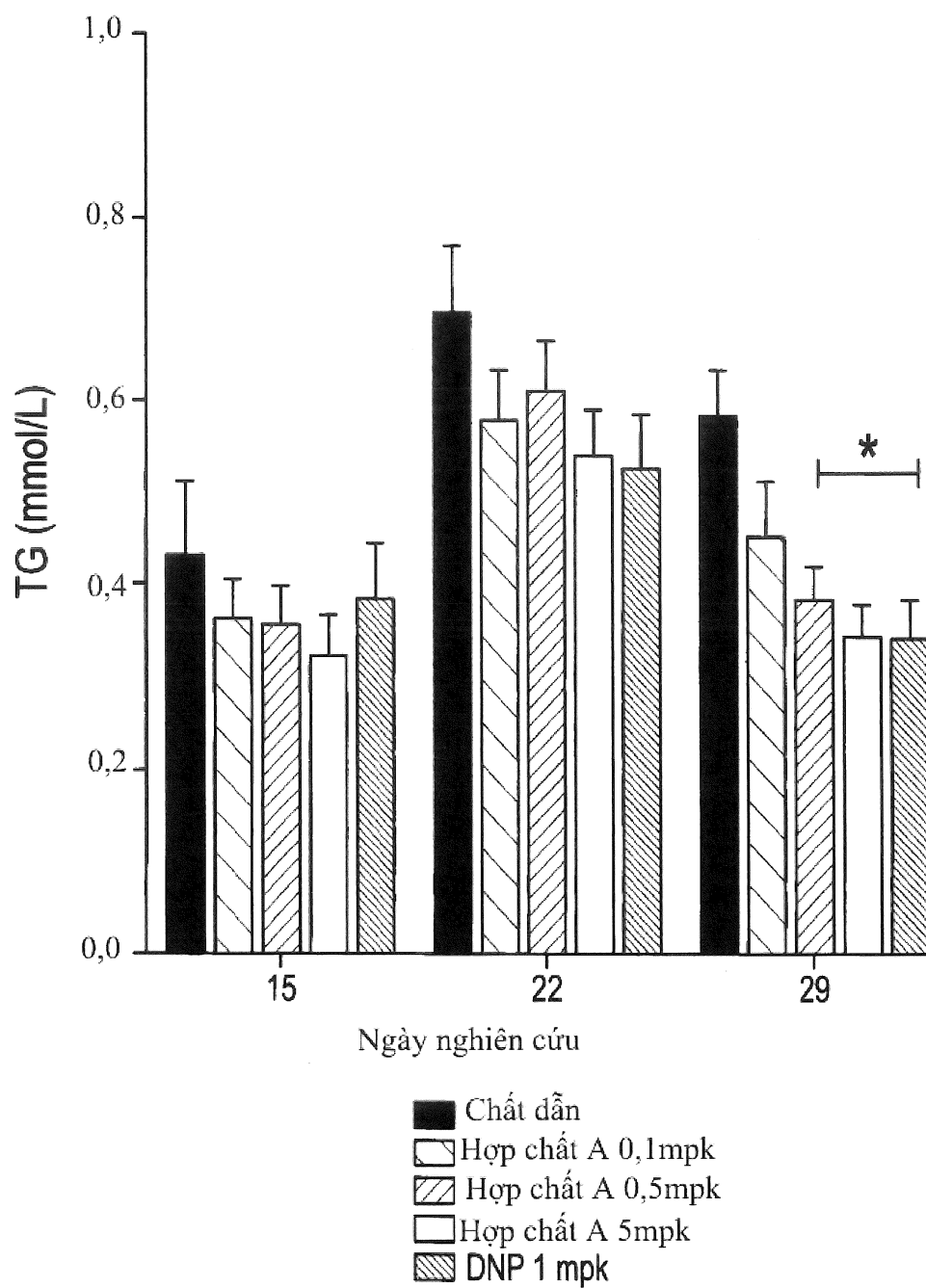


FIG. 11

Mức FFA trong huyết thanh của các nhóm nghiên cứu

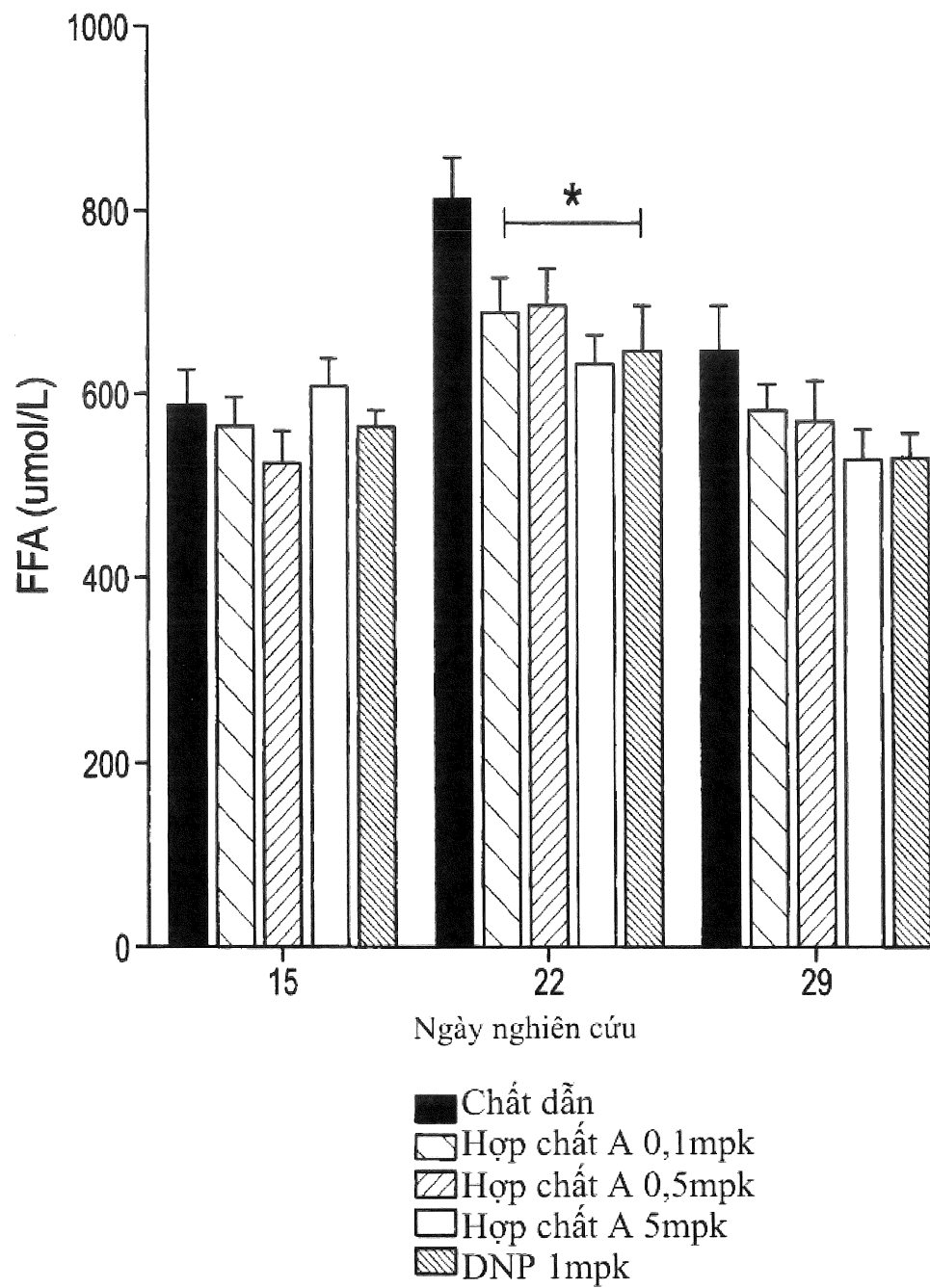


FIG. 12

Mức TG trong gan của các nhóm nghiên cứu

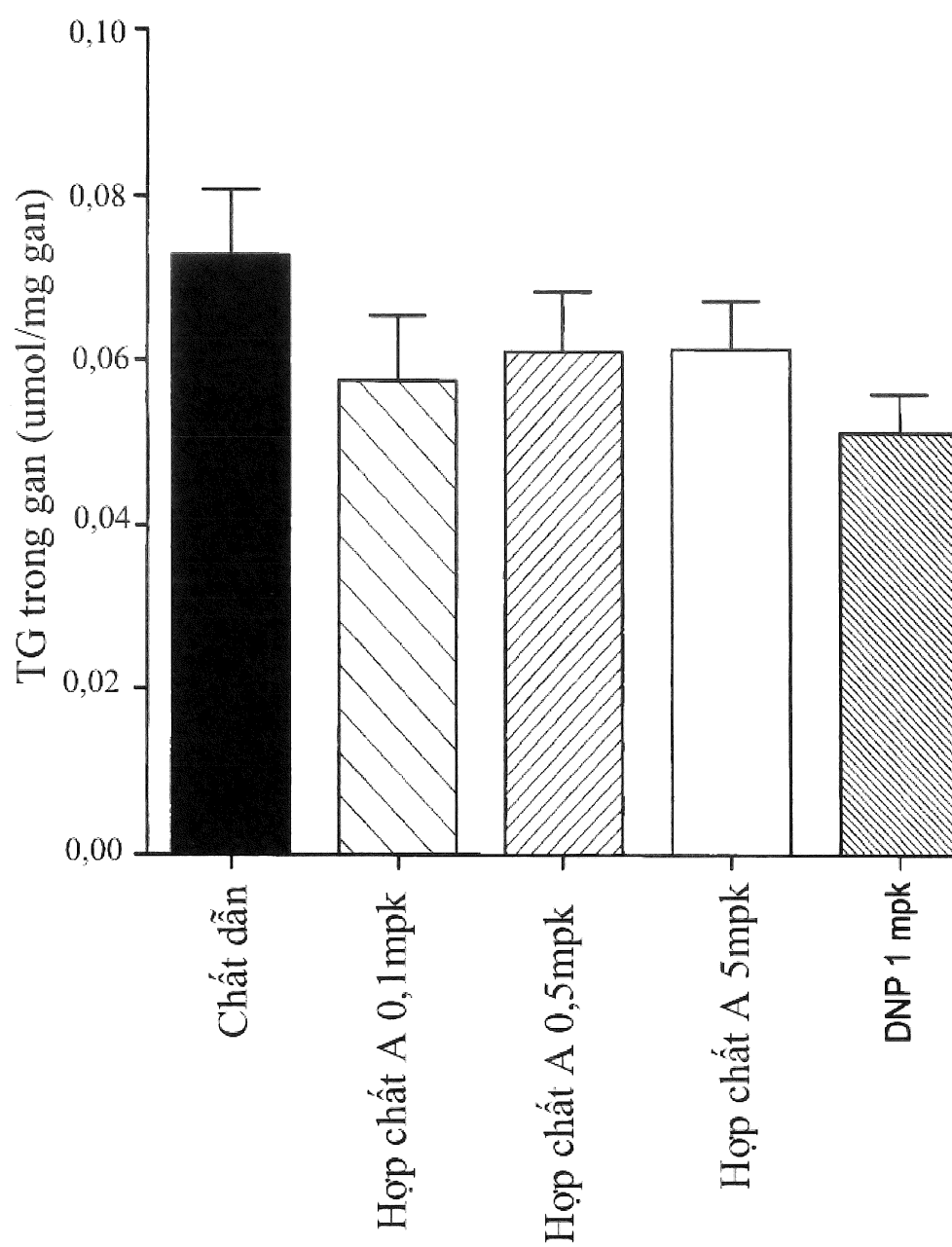


FIG. 13

Mức xeromit trong gan của các nhóm nghiên cứu

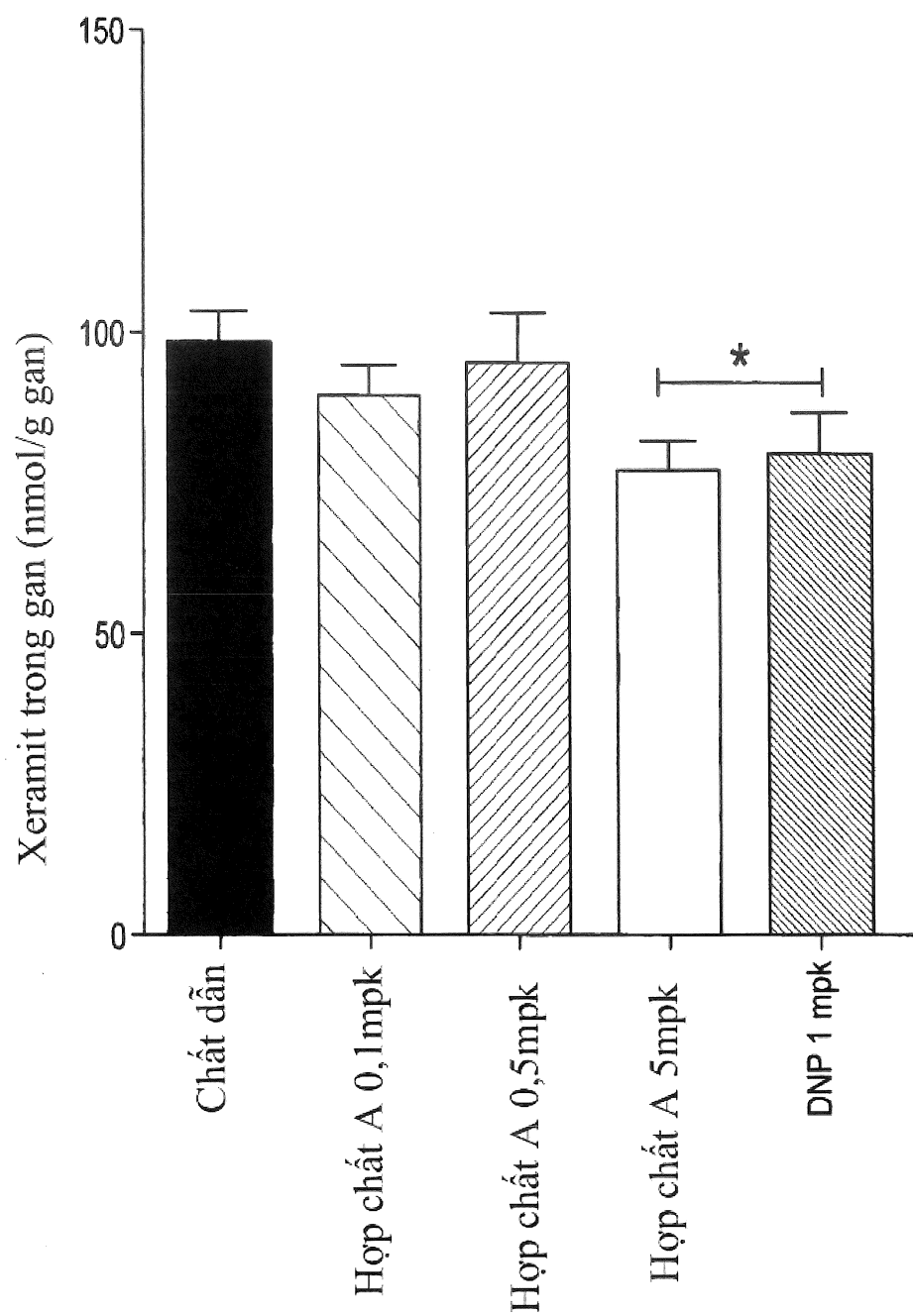


FIG. 14

Đường cong tiêu thụ thức ăn ở các nhóm nghiên cứu

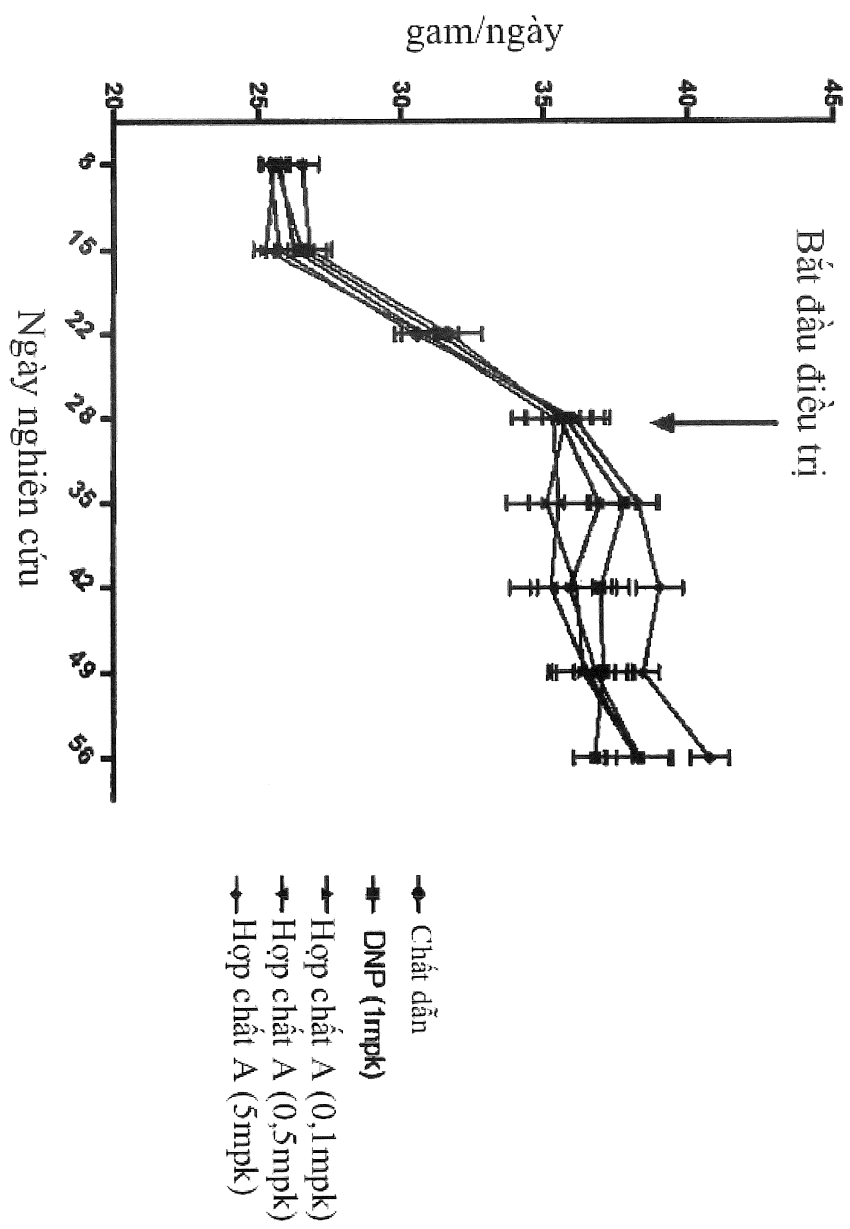


FIG. 15

*p<0,05, **p<0,01 so với nhóm dùng chất dẫn
(Giá trị trung bình $\pm$ độ lệch tiêu chuẩn)

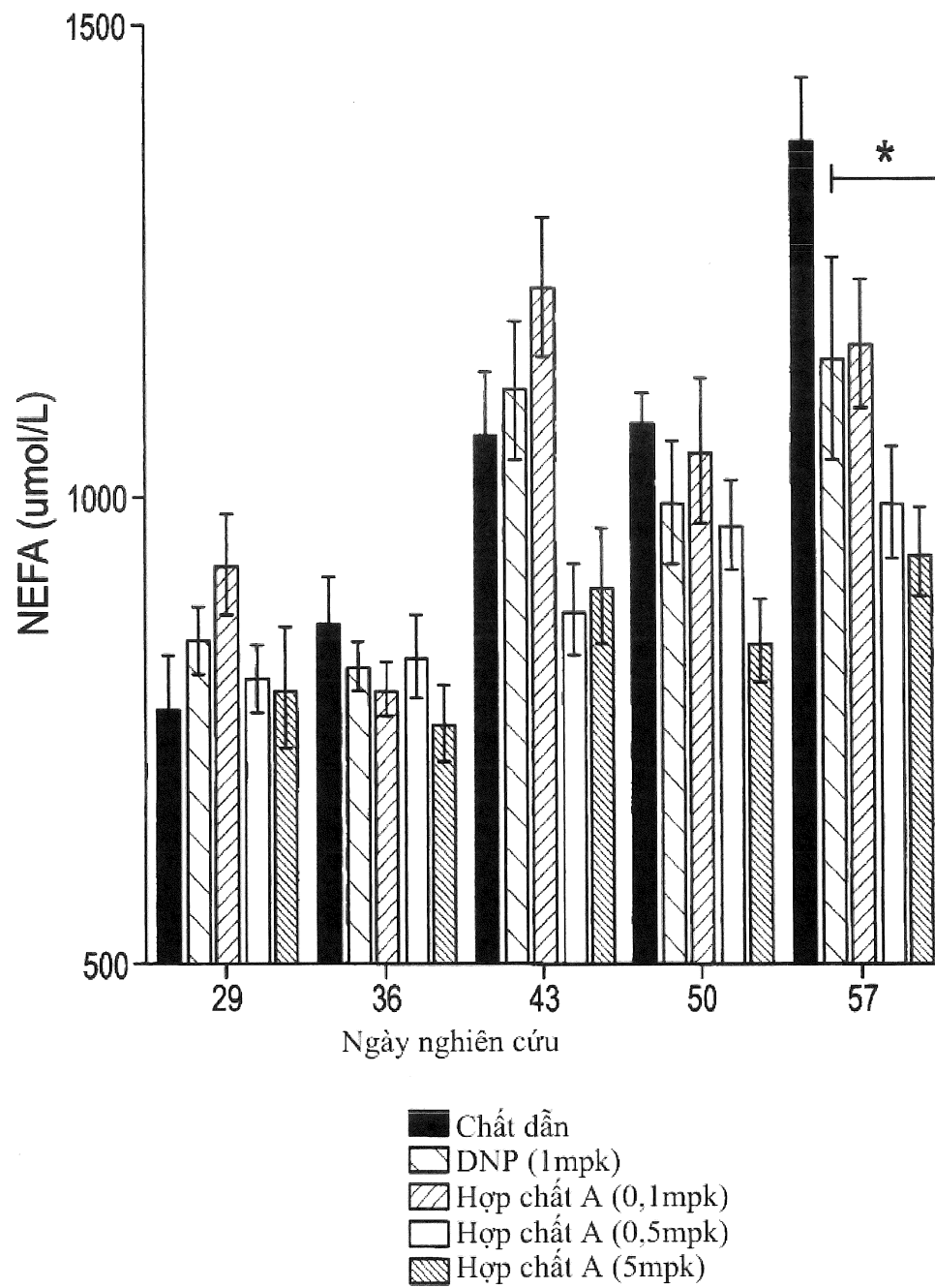


FIG. 16

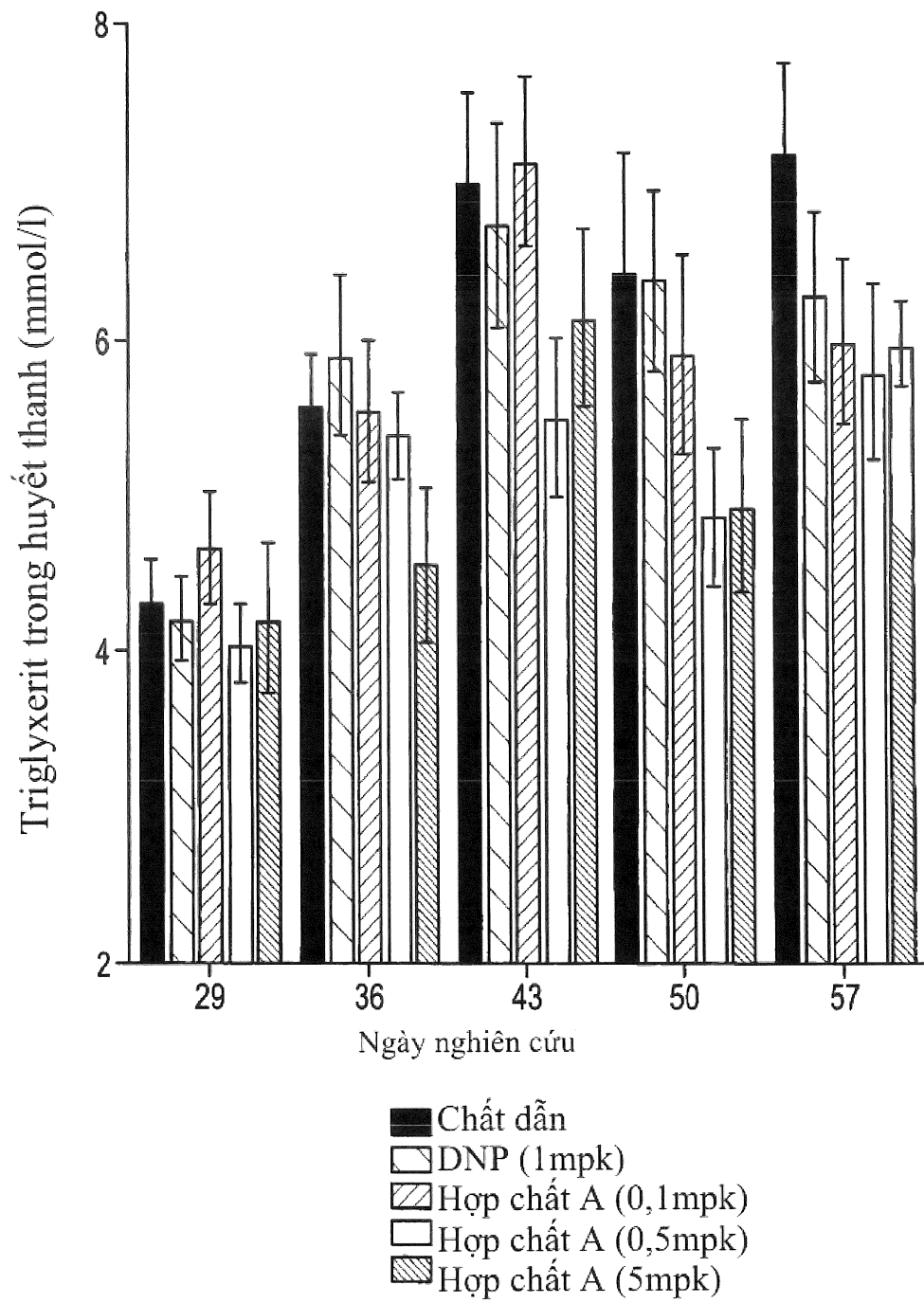


FIG. 17

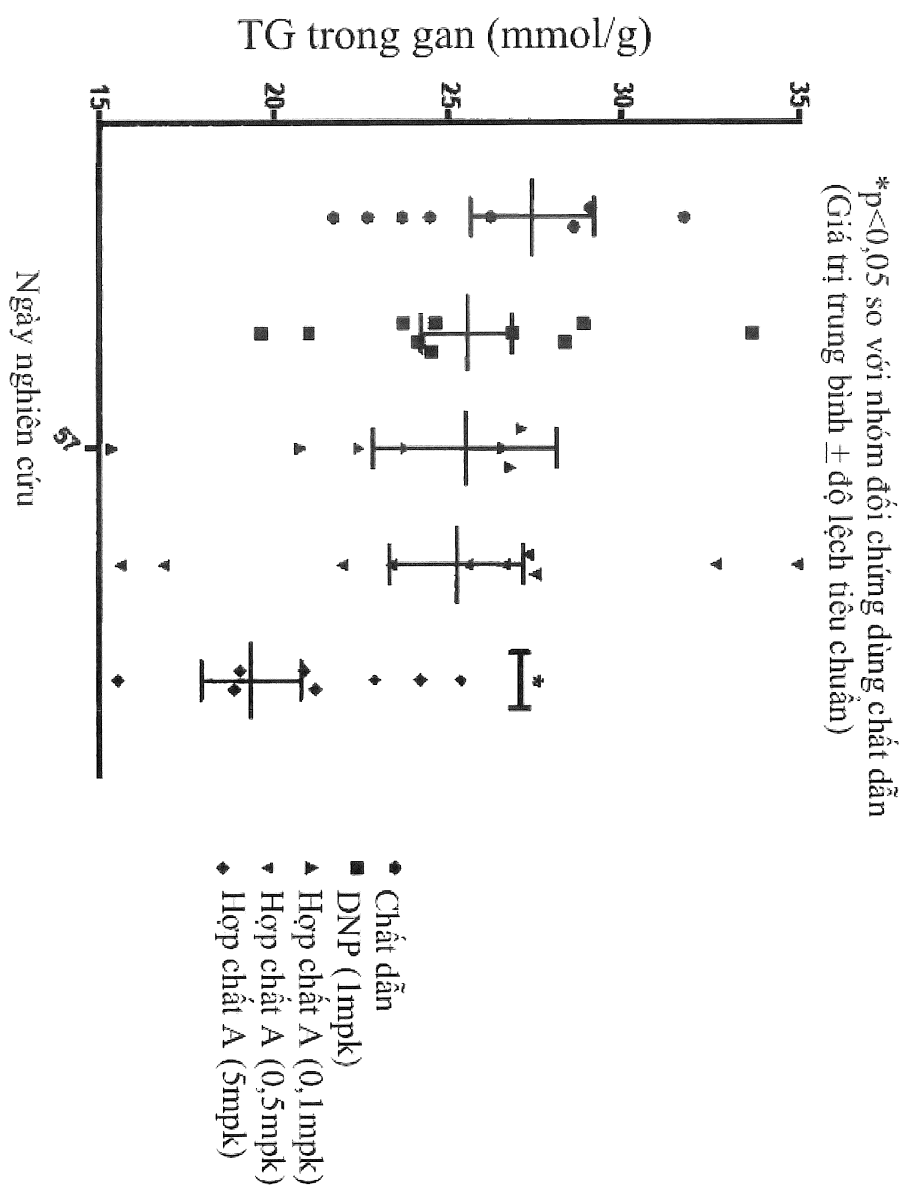


FIG. 18

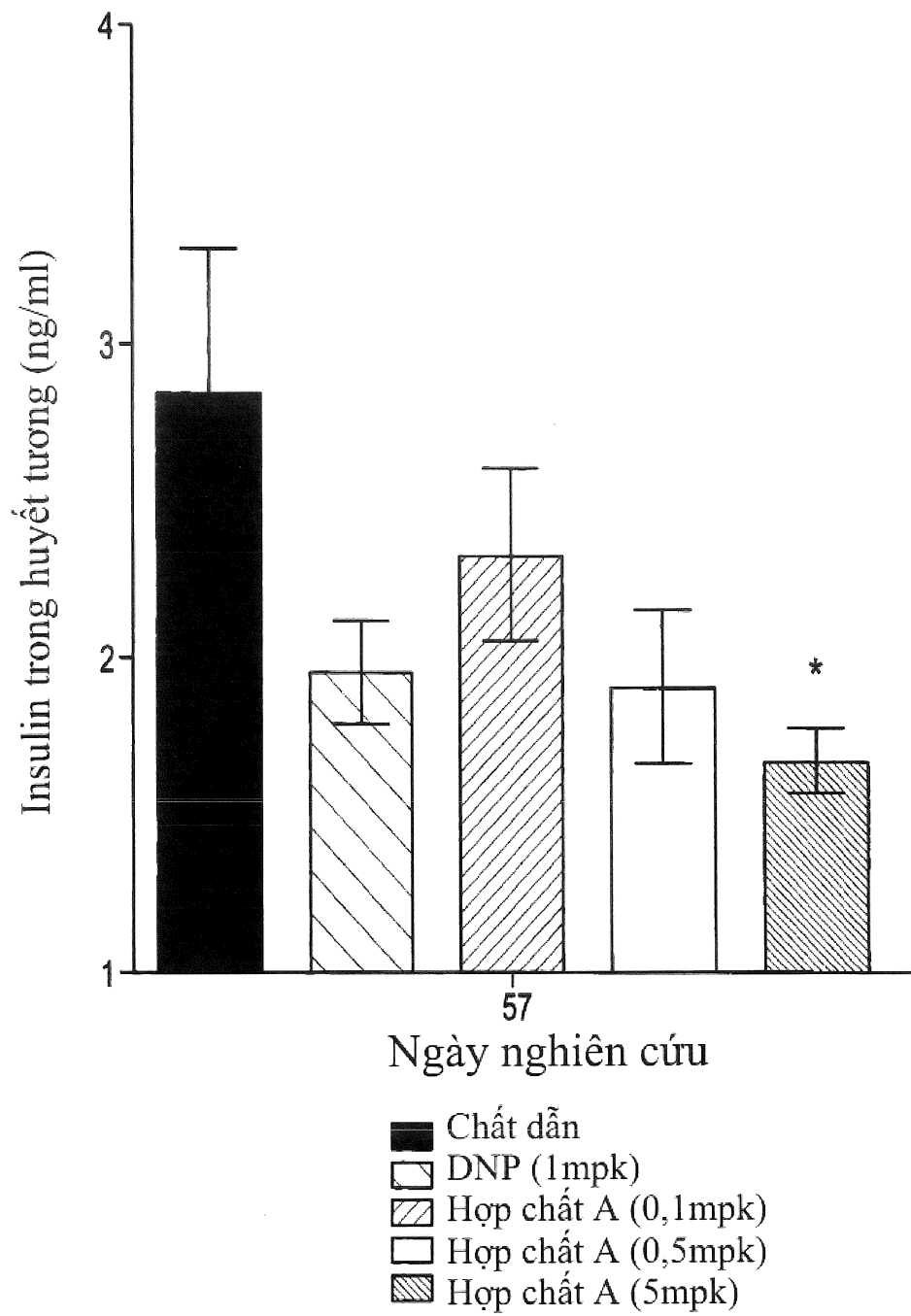


FIG. 19
 Tác dụng của Sorafenib khi sử dụng riêng và khi sử dụng kết hợp với hợp chất A trong điều trị mẫu động vật ghép cùng chỗ
 dòng tế bào ung thư gan Hep3B-luc của người

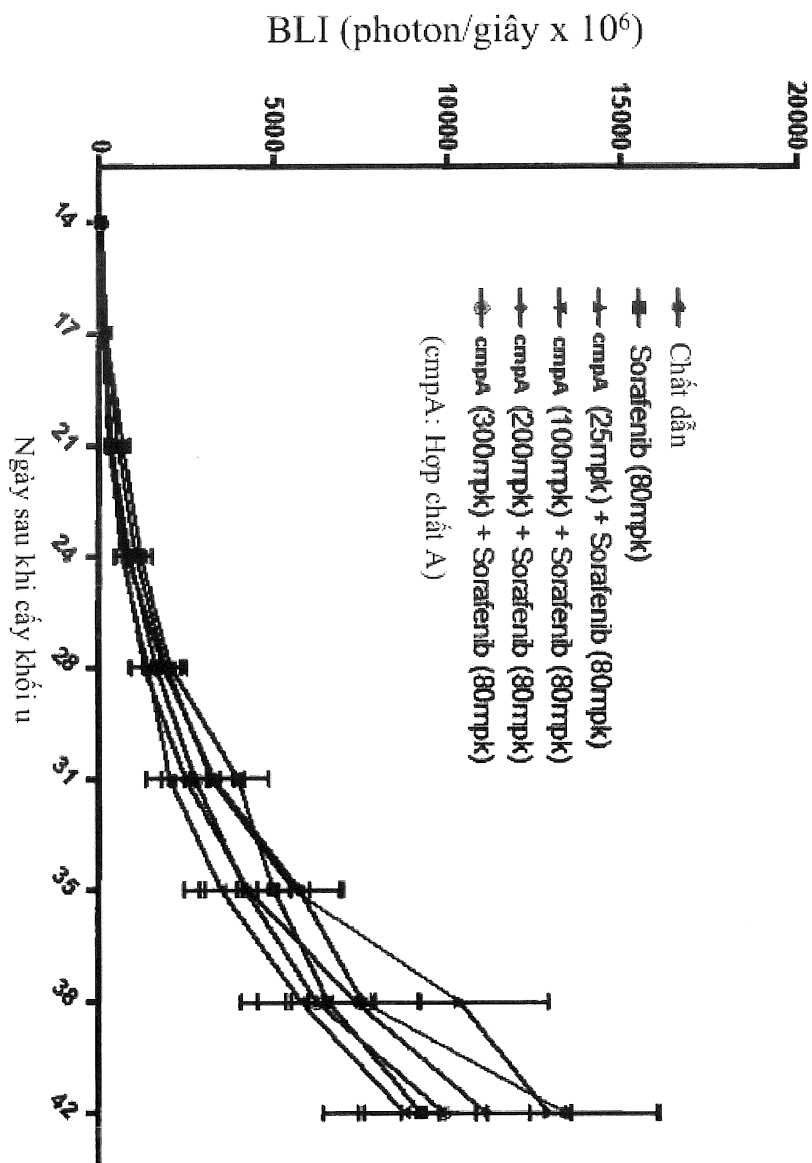


FIG. 20

Hiệu lực của hợp chất A ở mẫu động vật bị gây bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bằng chế độ ăn

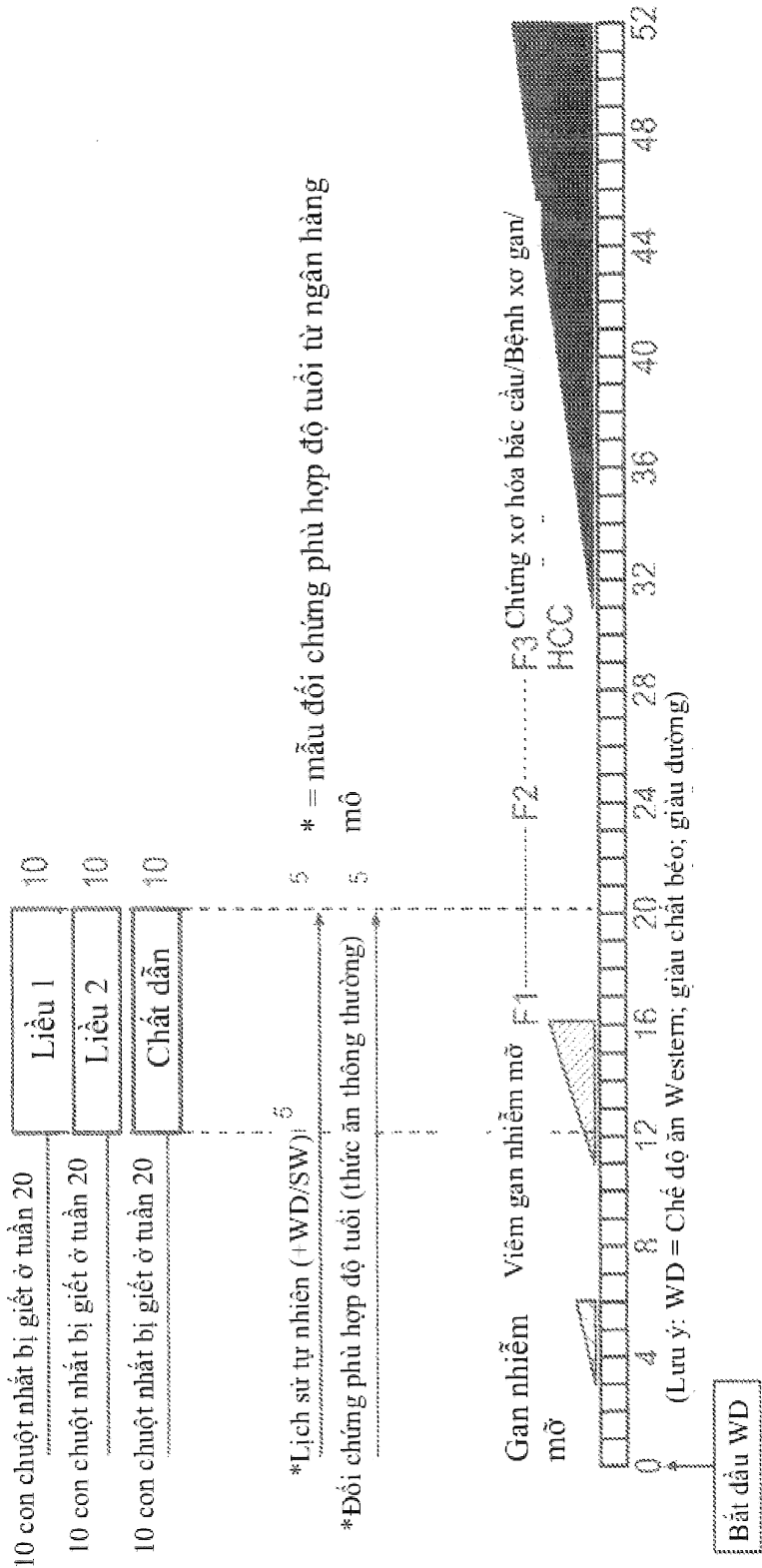


FIG. 21

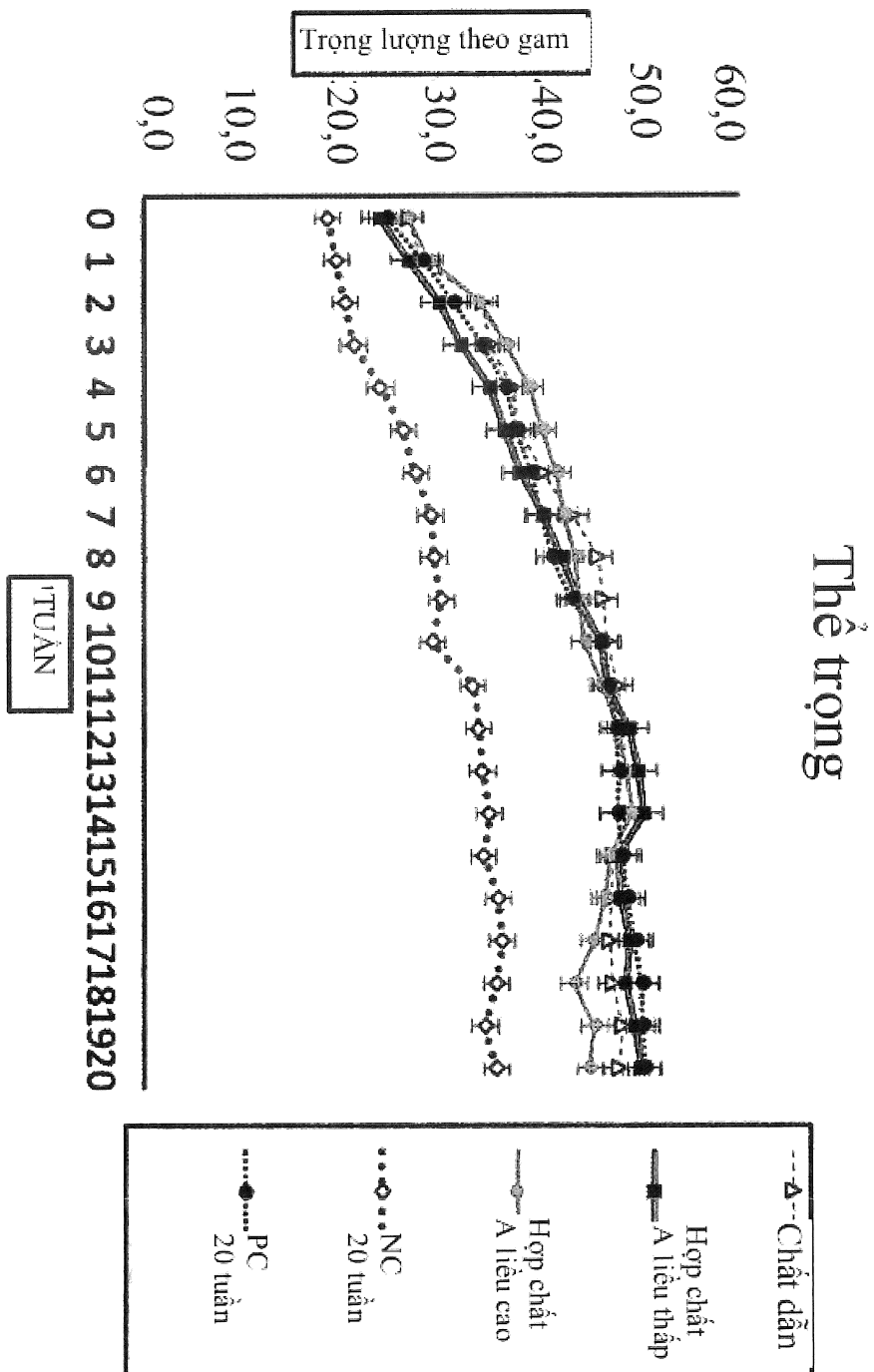
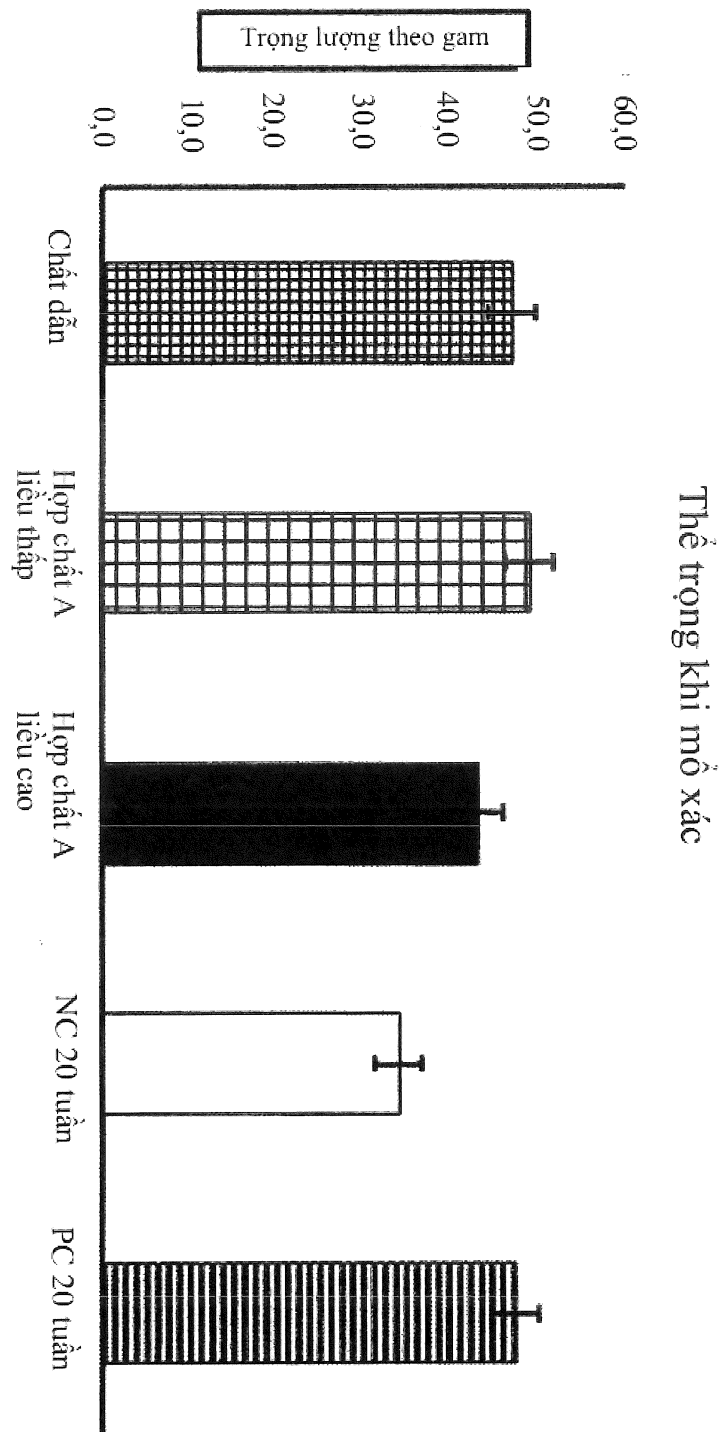


FIG. 22



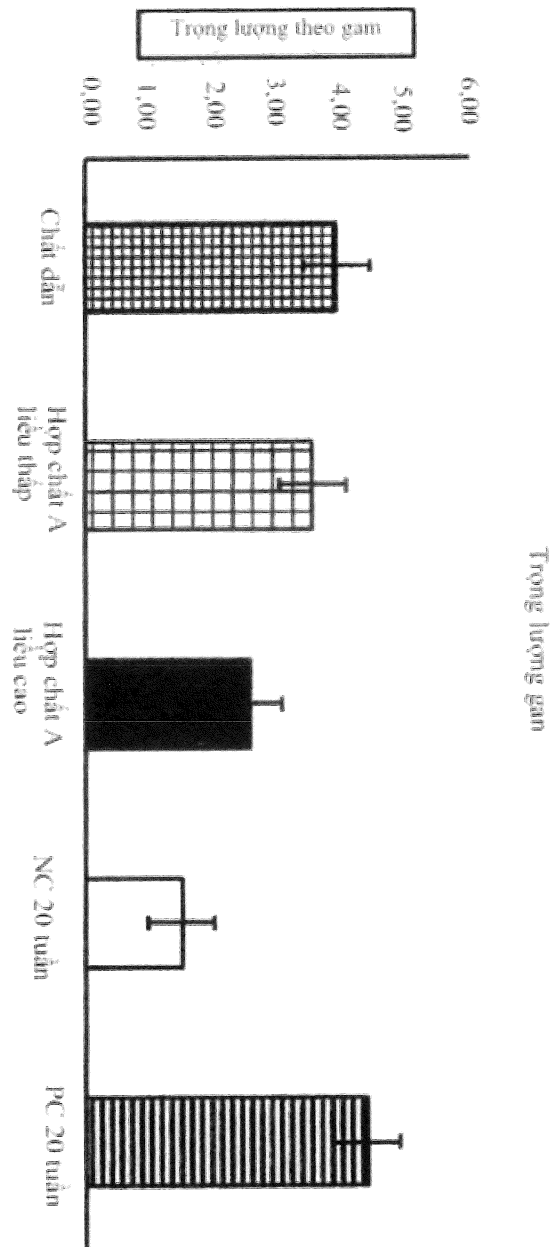
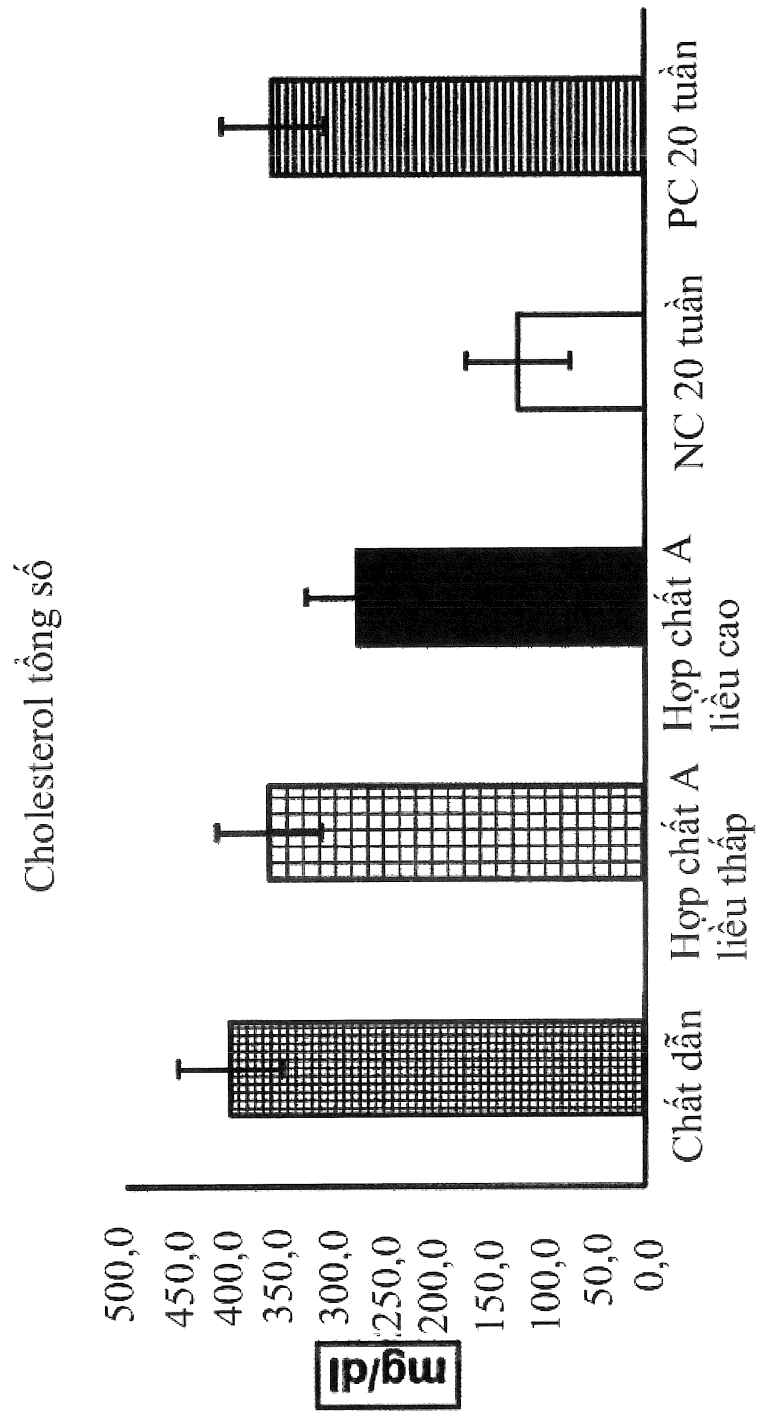


FIG. 24



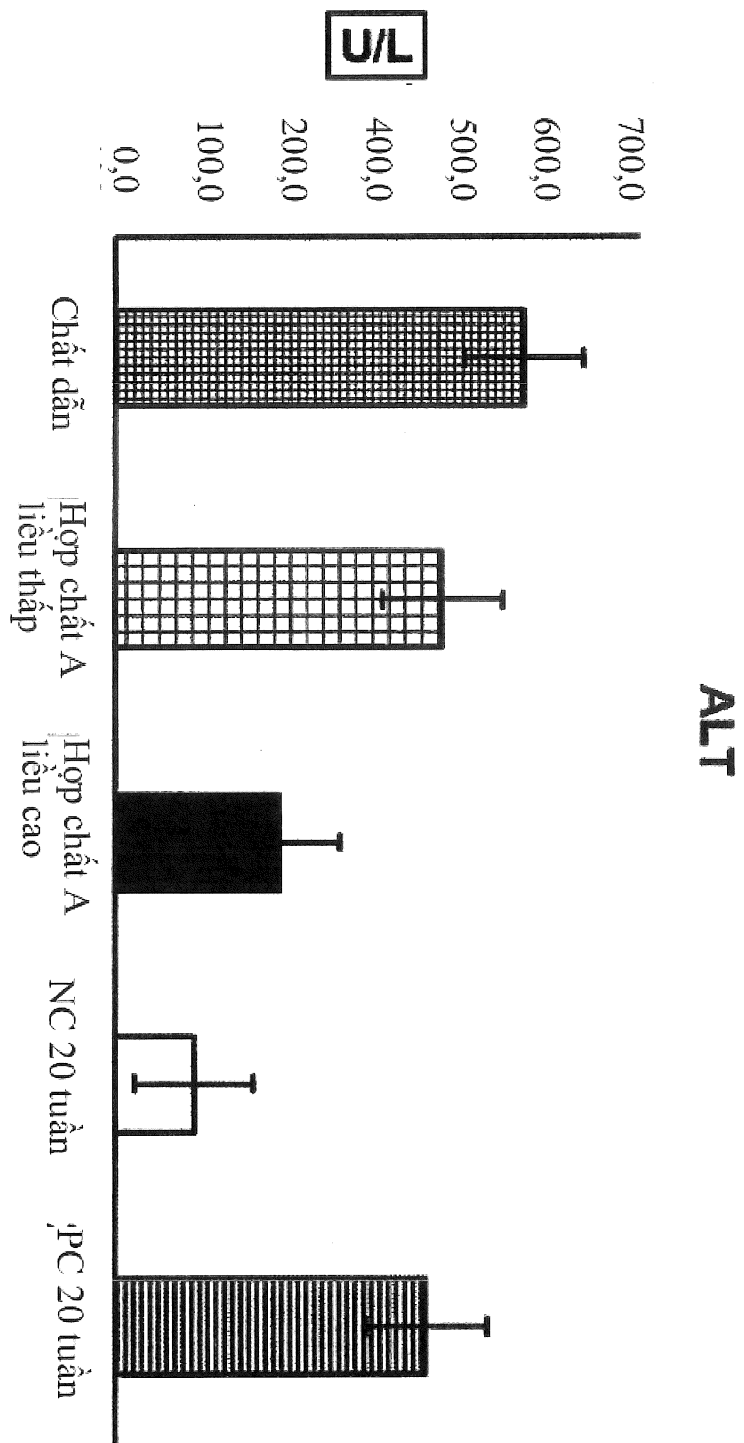
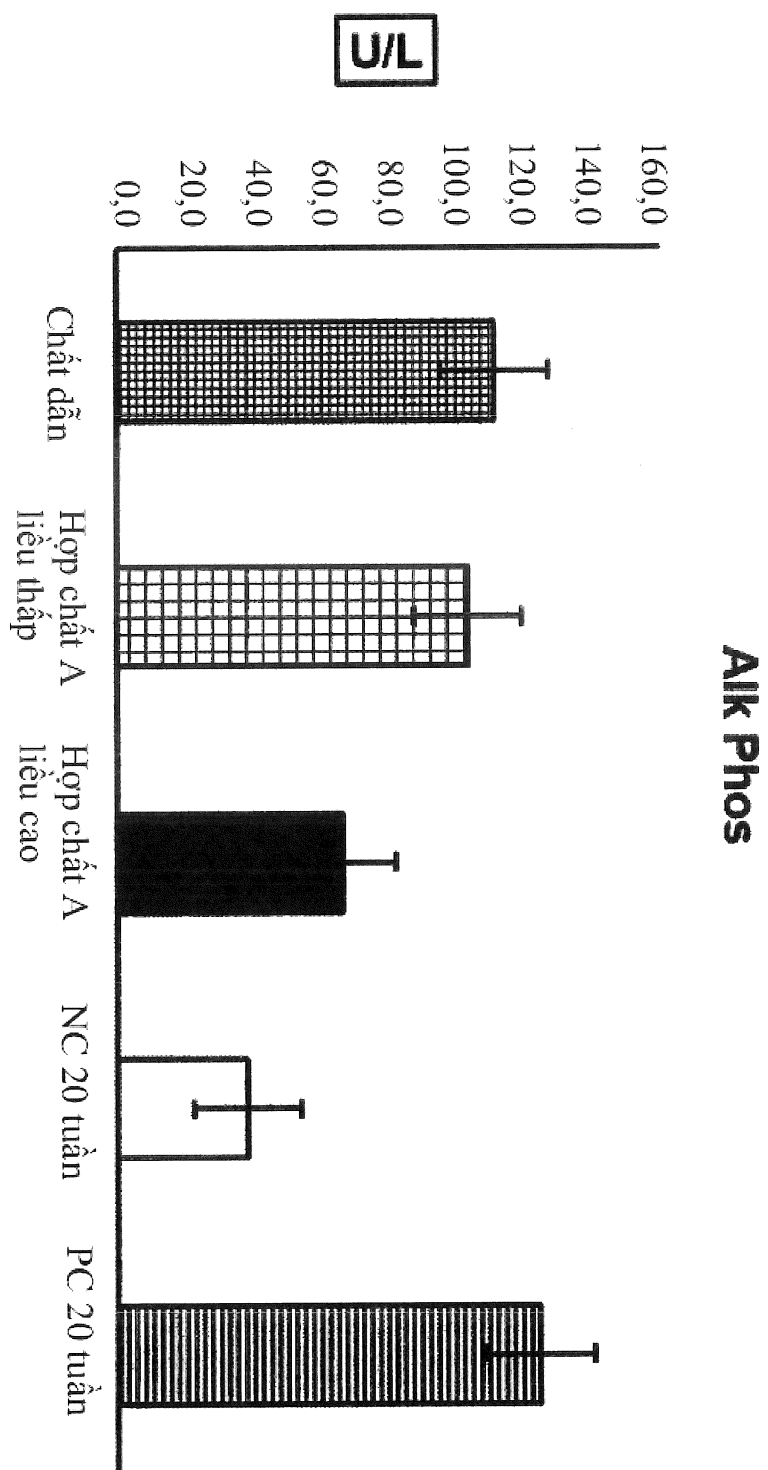


FIG. 25

FIG. 26



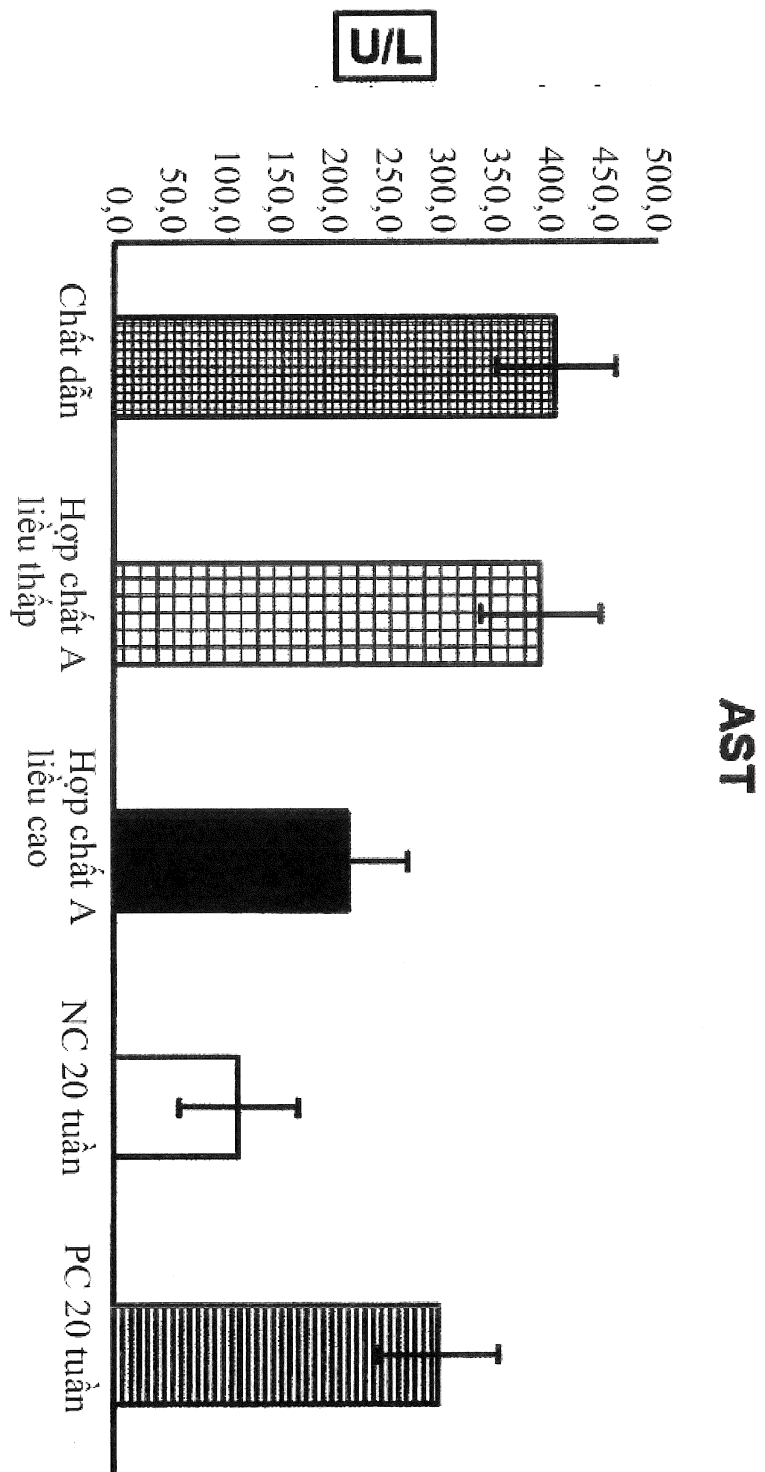


FIG. 27

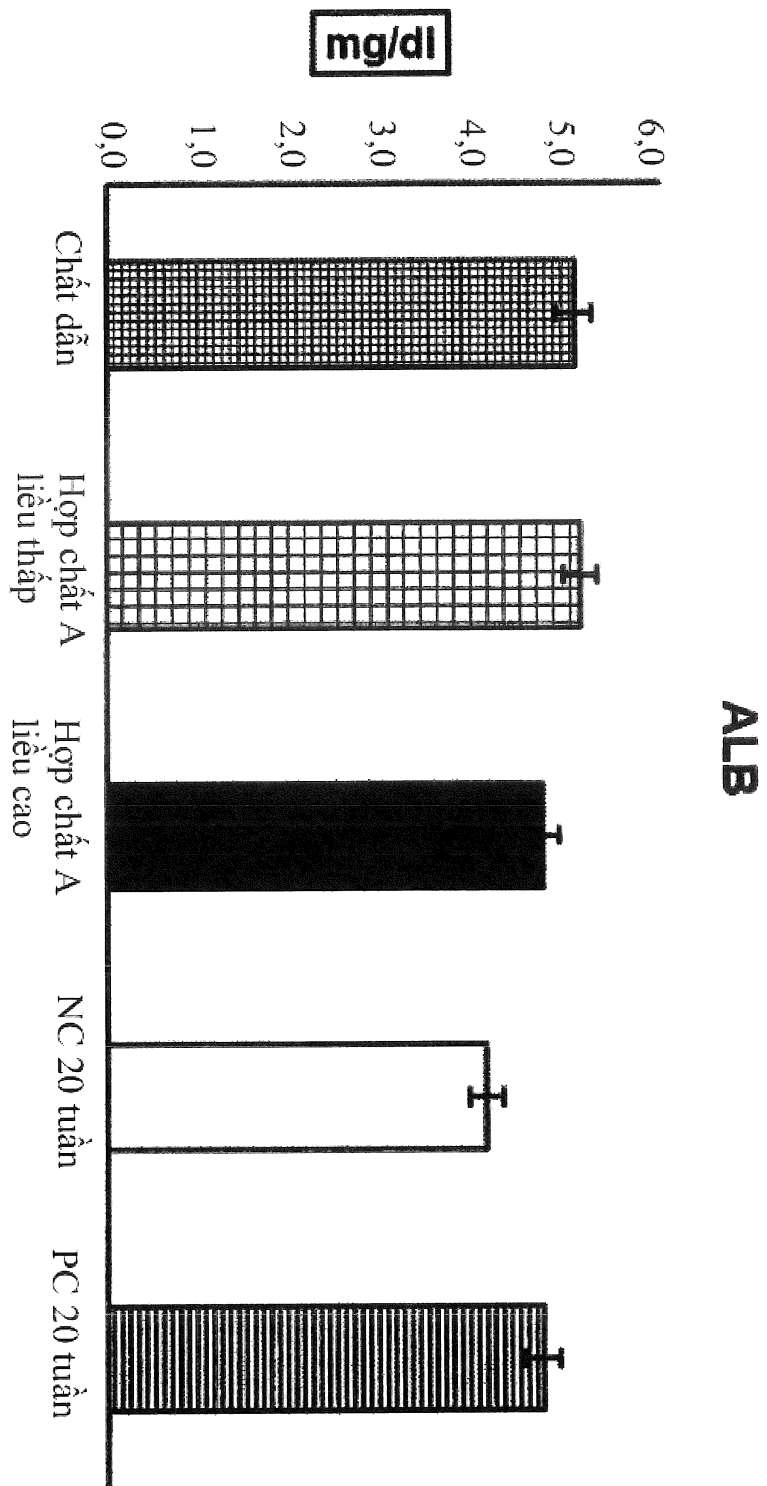


FIG. 28

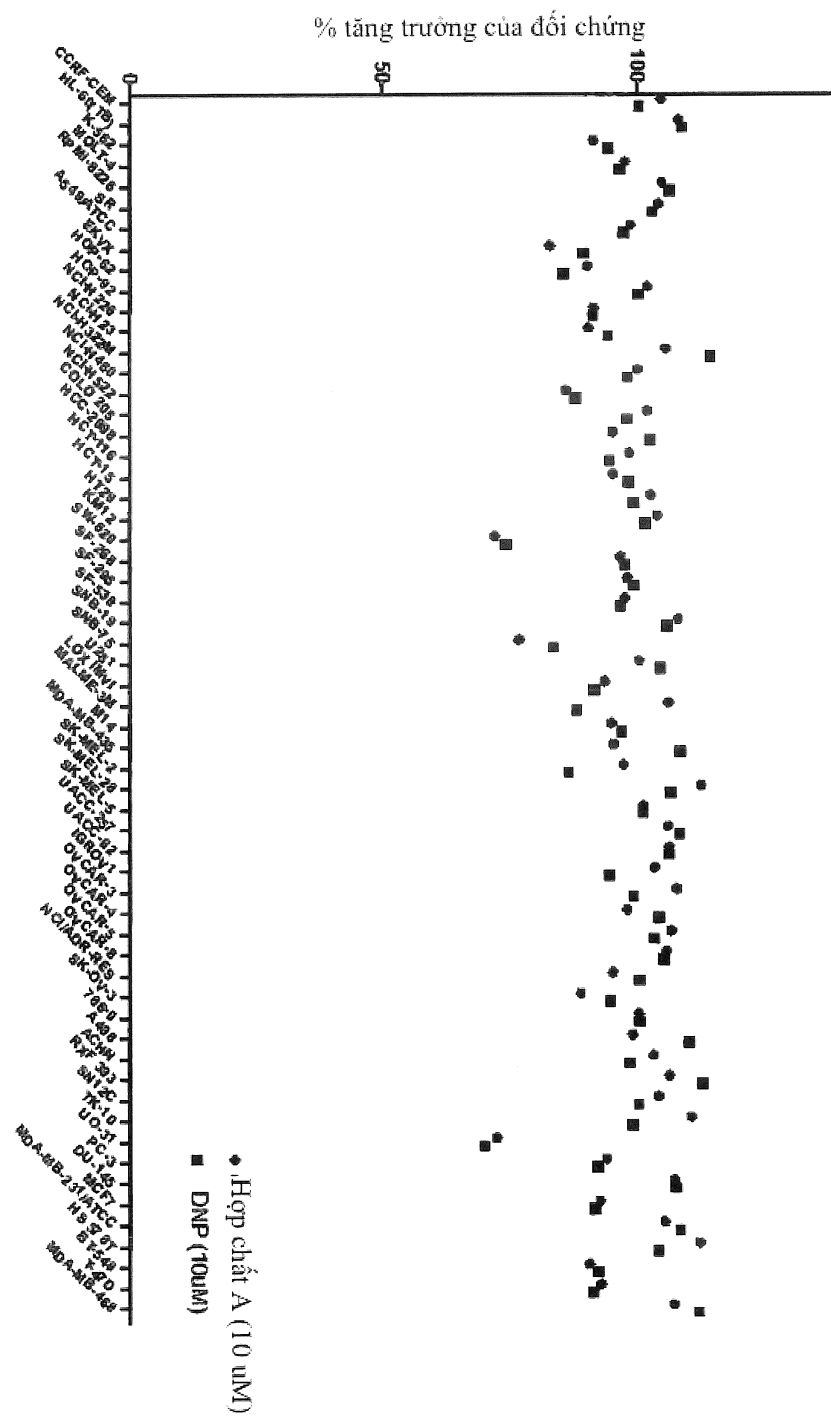


FIG. 29

FIG. 30

Sự hình thành DNP từ 2 μ M Hợp chất A trong vi thể gan từ các loài khác nhau

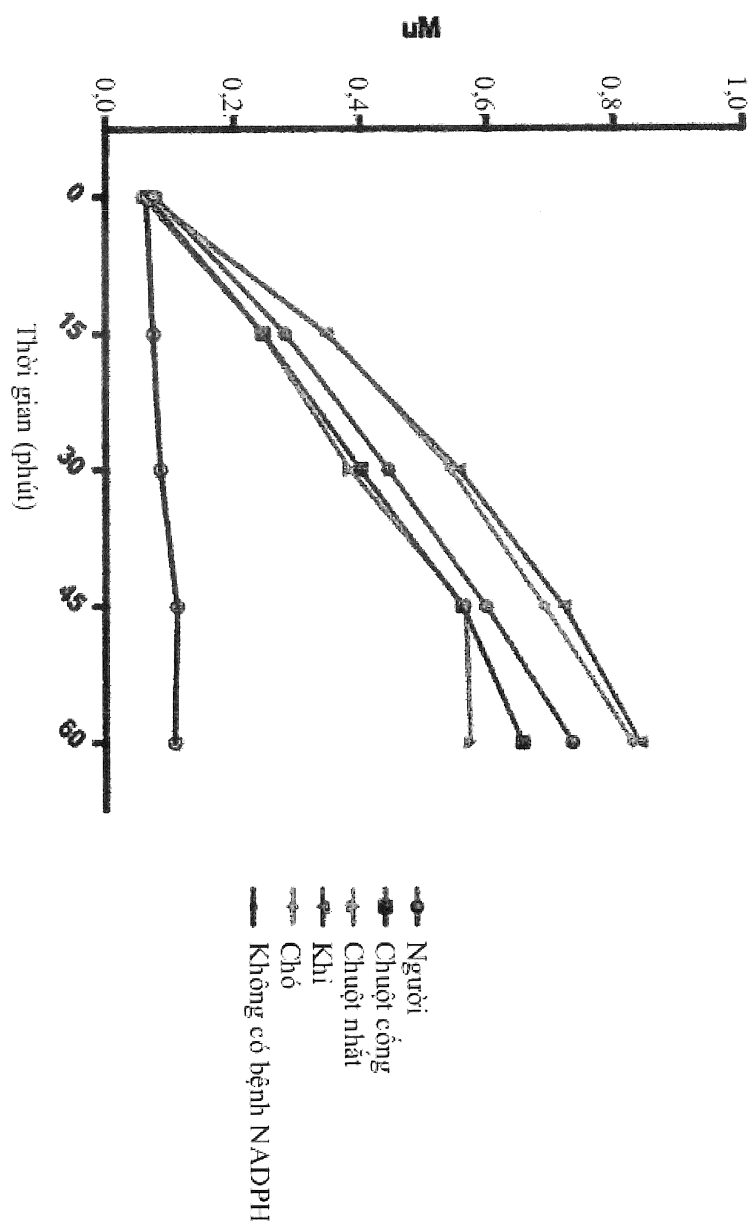
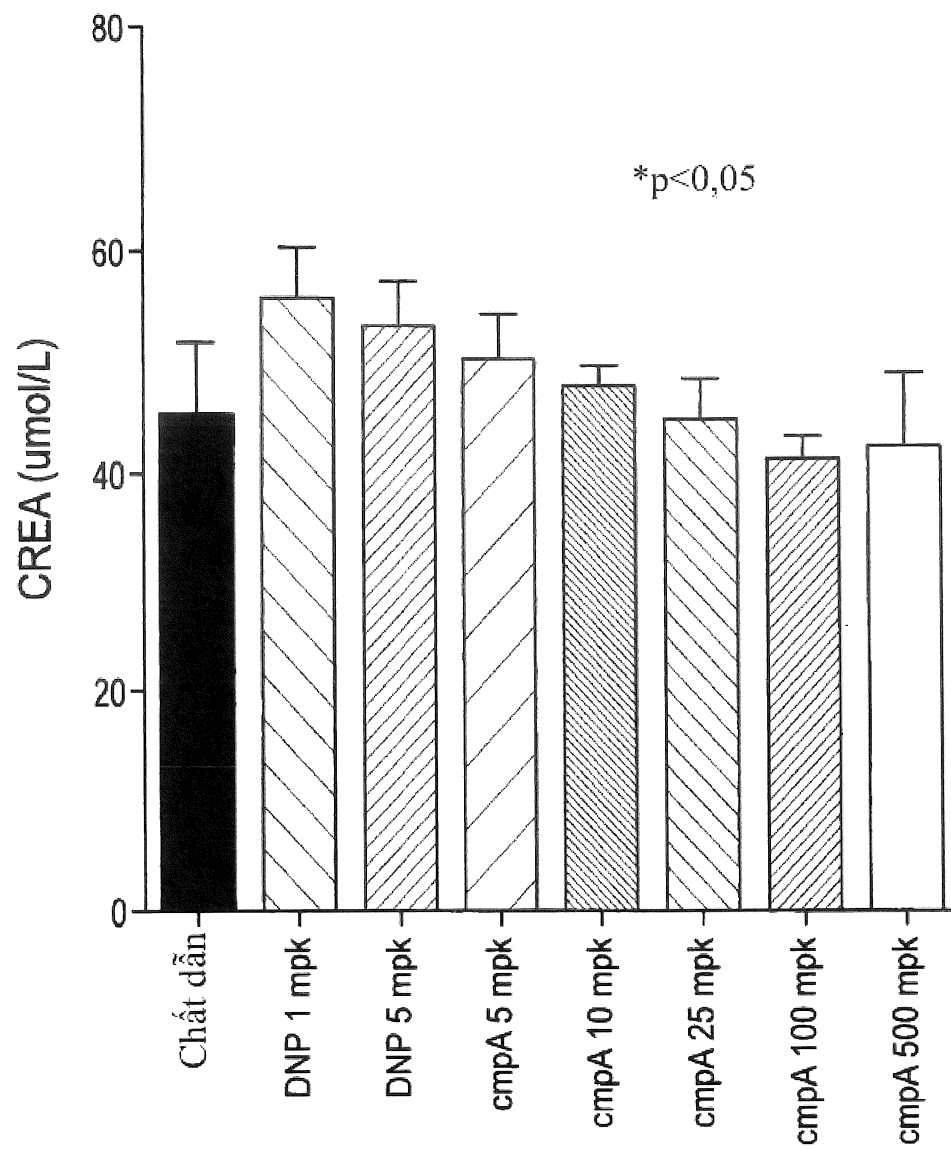


FIG. 31



(cmpA: Hợp chất A)

FIG. 32

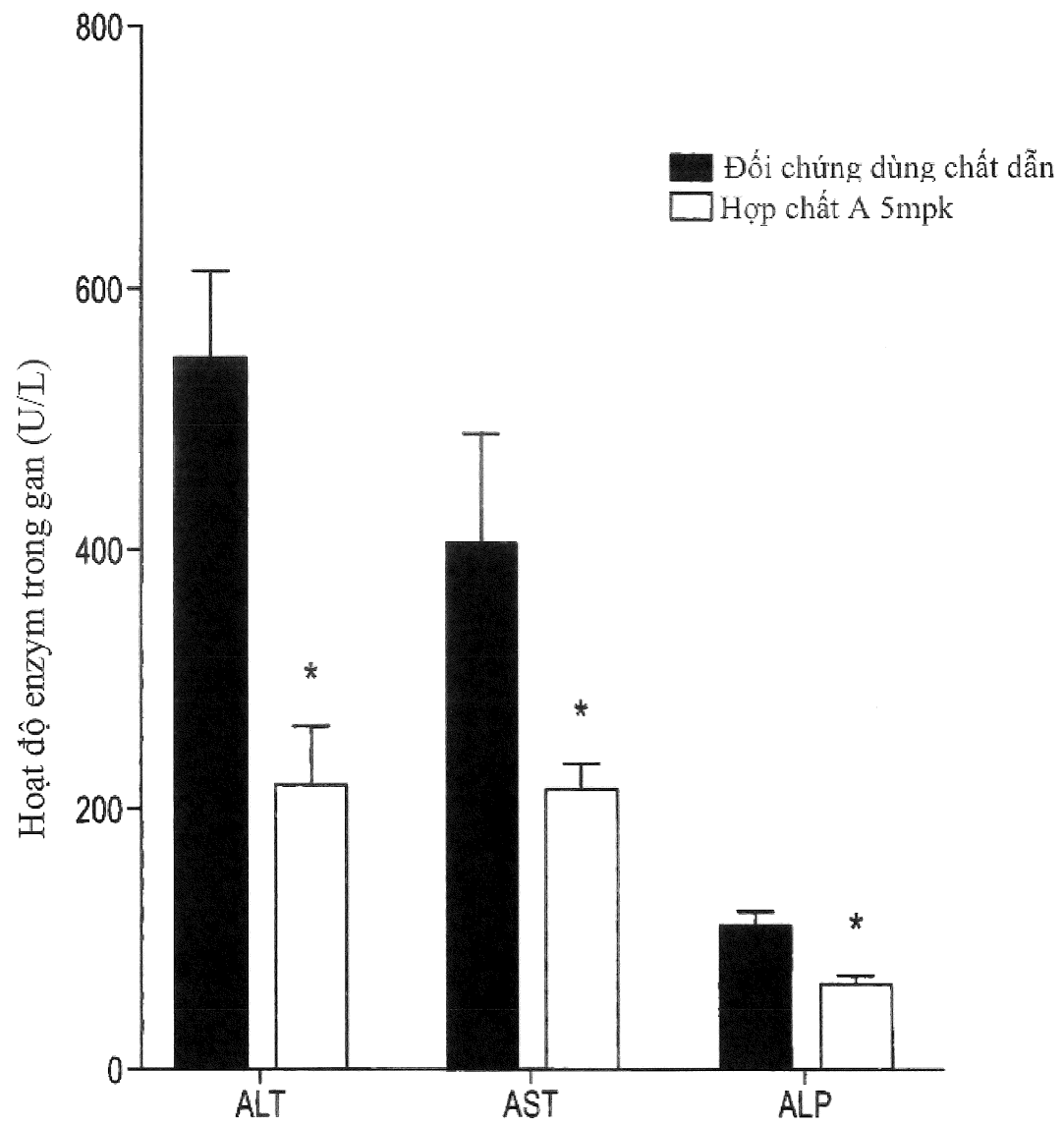


FIG. 33

