



(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)



1-0035911

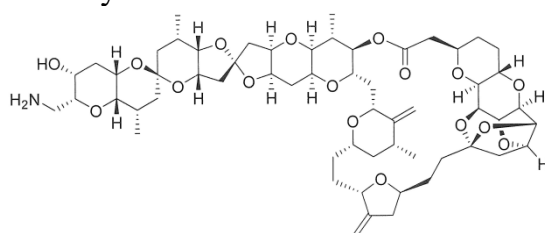
(51)¹⁹ C07D 493/22; A61K 31/357; A61P
35/00

(13) B

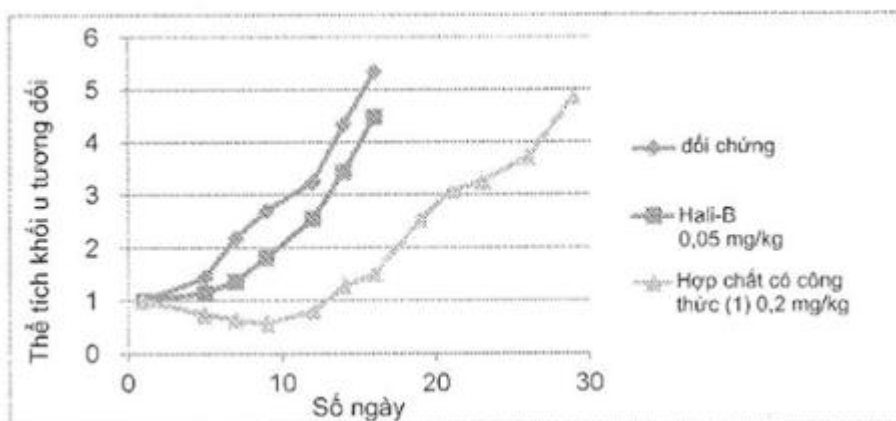
- (21) 1-2019-06161 (22) 03/04/2018
(86) PCT/US2018/025887 03/04/2018 (87) WO/2018/187331 11/10/2018
(30) 62/482,030 05/04/2017 US; 62/526,677 29/06/2017 US; 62/586,416 15/11/2017 US;
15/814,105 15/11/2017 US
(45) 26/06/2023 423 (43) 25/03/2020 384ASC
(73) 1. PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (US)
17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138, U.S.A.
2. Eisai R&D Management CO., LTD. (JP)
4-6-10 Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8088, Japan
(72) KISHI, Yoshito (US); KIRA, Kazunobu (JP); ITO, Ken (JP).
(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) HỢP CHẤT VÒNG LỚN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (1) có hiệu quả tái mô hình hóa mạch của khối u và/hoặc hoạt tính kháng nguyên bào sợi liên quan đến khối u (Cancer Associated Fibroblast: CAF), hoặc muối dược dụng của nó, tùy ý trong chất mang dược dụng, và dược phẩm chứa hợp chất này



Hợp chất có công thức (1).



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất vòng lớn có hiệu quả tái mô hình hóa mạch của khối u và hoạt tính kháng nguyên bào sợi liên quan đến khối u (Cancer Associated Fibroblast: CAF). Hợp chất này có thể dùng để điều trị bệnh ung thư hoặc ức chế sự phát triển của khối u ở đối tượng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các hợp chất Halichondrin, như Halichondrin B, là các chất kháng bệnh ung thư ban đầu được phân lập từ bọt biển *Halichondria okadai* (ví dụ, xem tài liệu: D. Uemura *et al.* “Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge” J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985)), và sau đó được tìm thấy trong các loài *Axinella sp.*, *Phakellia carteri*, và *Lissondendryx sp.*. Toàn bộ quá trình tổng hợp Halichondrin B đã được công bố năm 1992 (ví dụ, xem tài liệu: Y. Kishi *et al.* “Total Synthesis of Halichondrin B and Norhalichondrin B” J. Am. Chem. Soc., 114, 3162 (1992)). Halichondrin B đã được chứng minh *in vitro* là có tác dụng ức chế sự polyme hóa tubulin, quần tụ vi ống, tạo liên kết ngang của beta 5-tubulin, gắn kết GTP và vinblastine với tubulin, và sự thủy phân GTP phụ thuộc tubulin, và đã được chứng minh là có đặc tính kháng bệnh ung thư *in vitro* và *in vivo* (ví dụ, xem tài liệu: Y. Hirata *et al.* “Halichondrins-antitumor polyether macrolides from a marine sponge” Pure Appl. Chem., 58, 701 (1986); Fodstad *et al.* “Comparative antitumor activities of Halichondrins and vinblastine against human tumor xenografts” J. of Experimental Therapeutics & Oncology 1996; 1: 119, 125).

Sản phẩm Eribulin mesylat (HalavenTM), được phát triển trên cơ sở Halichondrin B (ví dụ, xem Công bố đơn quốc tế số WO 1999/065894, được công bố ngày 23 tháng 12 năm 1999; Công bố đơn quốc tế số WO 2005/118565, được công bố ngày 15 tháng 12 năm 2005; và tài liệu: W. Zheng *et al.* “Macrocyclic ketone analogues of Halichondrin B” Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14, 5551–5554 (2004)), hiện đang được sử dụng trong lâm sàng ở nhiều nước để điều trị, ví dụ, bệnh ung thư vú di căn và bệnh sacôm mỡ tiến triển.

Các tài liệu công bố sáng chế khác mô tả halichondrin bao gồm Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.436.238 cấp cho Kishi và các đồng tác giả ngày 25 tháng 7 năm 1995; Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.338.865 cấp cho Kishi và các đồng tác giả ngày 16 tháng 8 năm 1994; và Công bố đơn quốc tế số WO 2016/003975 của Kishi và

các đồng tác giả, tất cả các tài liệu này đã được chuyển nhượng cho Chủ đơn President and Fellows of Harvard College.

Ví dụ, xem thêm các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.786.492; US 8.598.373; US 9.206.194; US 9.469.651; các Công bố đơn quốc tế số WO/2009/124237A1; WO/1993/017690A1; WO/2012/147900A1; các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 7.982.060; US 8.618.313; US 9.303.050; US 8.093.410; US 8.350.067; US 8.975.422; US 8.987.479; US 8.203.010; US 8.445.701; US 8.884.031; US RE45.324; US 8.927.597; US 9.382.262; US 9.303.039; các Công bố đơn quốc tế số WO/2009/046308A1; WO/2006/076100A3; WO/2006/076100A2; WO/2015/085193A1; WO/2016/176560A1; các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 9.278.979; US 9.029.573; các Công bố đơn quốc tế số WO/2011/094339A1; WO/2016/179607A1; WO/2009/064029A1; WO/2013/142999A1; WO/2015/066729A1; WO/2016/038624A1; và WO/2015/000070A1.

Các nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư (CAF), được tìm thấy rộng rãi trong nhiều khối u dạng rắn, là các tế bào nền. Đã biết rõ rằng CAF đóng vai trò quan trọng trong sự tạo mạch, sự xâm lấn, và sự di căn. Đã có thông báo rằng có mối tương quan chặt chẽ giữa lượng CAF và sự chẩn đoán trong lâm sàng, ví dụ, trong bệnh ung thư vú xâm lấn (ví dụ, xem tài liệu: M. Yamashita *et al.* “Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome” Breast cancer 19, 170, 2012) và caxinom tuyến thực quản (ví dụ, xem tài liệu: T. J. Underwood *et al.* “Cancer-associated fibroblasts predict poor outcome and promote periostin-dependent invasion in esophageal adenocarcinoma” Journal of Pathol., 235, 466, 2015). Cũng đã có thông báo rằng CAF có tương quan với tính kháng thuốc trong nhiều loại khối u, ví dụ như bệnh ung thư vú (ví dụ, xem tài liệu: P. Farmer *et al.* “A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer” Nature Medicine., 15(1), 68, 2009), và bệnh ung thư vùng đầu và cổ (ví dụ, xem tài liệu: S. Schmitz *et al.* “Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer” Oncotarget, 6 (33), 34288, 2015; Y. Matsuoka *et al.* “The tumor stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma” APMIS 123(3), 205, 2015).

Do đó, đã quan sát được rằng hiệu quả tái mô hình hóa mạch của khối u và hoạt tính kháng CAF dẫn đến sự cải thiện vi môi trường của bệnh ung thư, điều này trợ giúp cho việc điều trị khối u. Các mạch máu là rất cần thiết cho sự phát triển của khối u. Các

mạch máu được tái cấu trúc trong khối u có thể cung cấp chất kháng bệnh ung thư đến các khối u, ngoài việc đạt được sự giảm oxy không khí đi vào. Đã có thông báo rằng sự tái mô hình hóa được cảm ứng bởi eribulin của hệ mạch khối u bất thường dẫn đến vi môi trường nhiều chức năng hơn để có thể làm giảm mức độ xâm lấn của khối u do việc loại bỏ tình trạng giảm oxy không khí đi vào khối u bên trong. Do các vi môi trường của khối u bất thường làm gia tăng cả tính kháng thuốc và sự di căn, khả năng rõ ràng của eribulin trong việc làm đảo ngược các đặc tính xâm lấn này có thể góp phần vào các lợi ích lâm sàng của nó (ví dụ, xem tài liệu: Y. Funahashi *et al.* “Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models” *Cancer Sci.* 105 (2014), 1334–1342). Cho đến nay, vẫn chưa có thông báo về các dược chất kháng bệnh ung thư có hiệu quả tái mô hình hóa mạch của khối u và hoạt tính kháng CAF.

Mặc dù có sự tiến triển nhất định, vẫn cần tiến hành nghiên cứu các hợp chất bổ sung và sự chăm y tế đối với các khối u và bệnh ung thư.

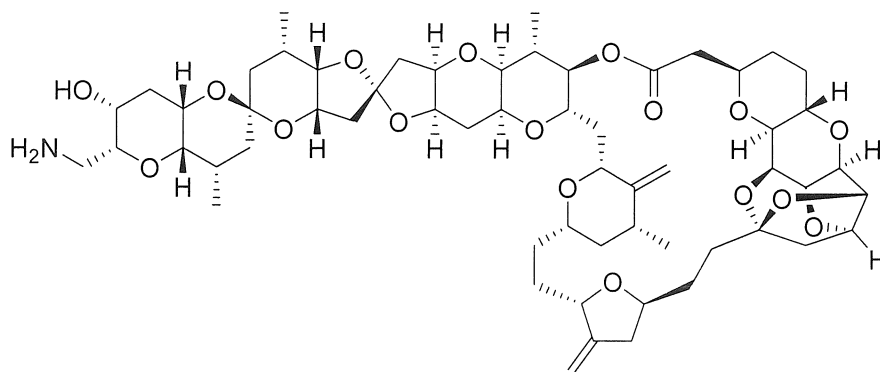
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất vòng lớn và và dược phẩm chứa hợp chất này.

Sáng chế đề cập đến hợp chất vòng lớn (ví dụ, hợp chất có công thức (1)) có hiệu quả tái mô hình hóa mạch của khối u và hoạt tính kháng CAF, và các muối dược dụng của nó, và các dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, và dược phẩm chứa chúng.

Sáng chế còn mô tả phương pháp sử dụng hợp chất có công thức (1) để điều trị bệnh ung thư, phương pháp ức chế sự nguyên phân trong tế bào theo cách thuận nghịch hoặc không thuận nghịch, và phương pháp ức chế sự phát triển của khối u *in vitro*, *in vivo*, hoặc ở đối tượng. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit chứa hợp chất có công thức (1), hoặc muối dược dụng của nó, hoặc dược phẩm chứa chúng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất là hợp chất có công thức (1):



Hợp chất có công thức (1),

và các muối dược dụng của nó; và các dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hợp chất có công thức (1), hoặc muối dược dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó. Dược phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều tá dược hoặc chất mang dược dụng. Dược phẩm này có thể còn chứa một hoặc nhiều các chất điều trị bổ sung kết hợp, xen kẽ, hoặc loại khác của liệu pháp được đồng bộ hóa, để đạt được mục đích điều trị mong muốn.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế hợp chất có công thức (1) hoặc các hợp chất trung gian của nó. Các hợp chất trung gian tổng này cũng được đề xuất ở đây làm một phần của sáng chế.

Đã phát hiện được rằng hợp chất có công thức (1) có hiệu quả có lợi đối với sự tái mô hình hóa mạch của khối u và có hoạt tính kháng CAF, như được chứng minh trên các hình vẽ và trong phần ví dụ. Theo đó, hợp chất (1) có ứng dụng tiềm năng trong việc điều trị bệnh ung thư (ví dụ, bệnh caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (squamous cell carcinoma of the head and neck: SCCHN), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư bàng quang, bệnh sacôm, các bệnh ung thư hiếm gặp).

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp ức chế sự phát triển của khối u hoặc bệnh ung thư bất kỳ mà sẽ đáp ứng với hợp chất có hiệu quả tái mô hình hóa mạch của khối u và/hoặc hoạt tính kháng CAF, ở đối tượng, cụ thể là người, bằng hợp chất có công thức (1), hoặc muối dược dụng, hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó.

Hợp chất có công thức (1), hoặc muối dược dụng, hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc hỗn hợp của chúng, có thể được sử dụng kết hợp với chất có hoạt tính khác bất kỳ để tạo ra các kết quả có lợi cho bệnh nhân. Theo một số phương án, hợp chất có công thức (1) được sử dụng kết hợp với kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng). Theo một phương án, hợp chất có công thức (1) được sử dụng kết hợp, xen kẽ, hoặc trong liệu pháp được đồng bộ hóa khác với liệu pháp miễn dịch, như kháng thể kháng EGFR (thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì), kháng thể kháng HER2 (thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì của người), kháng thể kháng PD-1, hoặc kháng thể kháng PD-L1, như được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Ví dụ, phương pháp được mô tả để điều trị bệnh caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) ở đối tượng, cụ thể là người, cần điều trị bao gồm bước cho đối tượng sử

dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng, hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc hỗn hợp của chúng, kết hợp với liệu pháp kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody: mAb) kháng EGFR (thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì). Theo một số phương án, kháng thể mAb kháng EGFR (thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì) là cetuximab.

Theo ví dụ khác, phương pháp điều trị bệnh ung thư vú ở đối tượng, cụ thể là người, cần điều trị bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng, hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc hỗn hợp của chúng, kết hợp với liệu pháp kháng thể mAb HER2 (thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì của người). Theo một số phương án, kháng thể mAb HER2 (thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì của người) là trastuzumab. Theo các phương án khác, hợp chất có công thức (1) có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú kết hợp với liệu pháp hóa học truyền thống như adriamycin, cyclophosphamide, taxol, v.v., hoặc chất kháng estrogen như chất điều biến estrogen chọn lọc (selective estrogen modulator: SERM), chất làm thoái biến estrogen chọn lọc (selective estrogen degrader: SERD), chất ức chế estrogen một phần hoặc hoàn toàn (như fulvestrant) hoặc chất ức chế CDK 4/6 như palbociclib (Pfizer).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng, hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, có thể ở dạng hydrat, solvat, đa hình, hoặc hỗn hợp của chúng, trong kit, có thể là bao gói dạng liều dùng. Các kit được mô tả ở đây có thể bao gồm một liều đơn hoặc nhiều liều của hợp chất hoặc dược phẩm chứa nó. Kit theo sáng chế có thể bao gồm hướng dẫn sử dụng các dạng liều dùng điều trị được đề xuất (ví dụ, các hướng dẫn sử dụng hợp chất hoặc dược phẩm được đưa vào kit này).

Do đó, sáng chế bao gồm ít nhất là các đặc điểm sau:

- (i) Hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, có thể tùy ý ở dạng hydrat, solvat, hoặc đa hình;
- (ii) Phương pháp điều trị bao gồm bước cho đối tượng như người sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, có thể tùy ý ở dạng hydrat, solvat hoặc đa hình, để điều trị bệnh ung thư vùng đầu và cổ (ví dụ, bệnh caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN), caxinom nang VA), bệnh ung thư vú (ví dụ, bệnh ung thư vú âm tính với HER2, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính), bệnh ung thư thực quản (ví dụ, caxinom tuyến thực quản), bệnh ung thư tử cung (ví dụ, sacôm tử cung), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh sacôm (ví dụ, sacôm hoạt dịch, sacôm mạch,

sacôm mô mềm, sacôm sợi, sacôm tử cung), bệnh ung thư bàng quang (ví dụ, bệnh ung thư tế bào chuyển tiếp), bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non (ví dụ, caxinom tuyến ruột non), bệnh ung thư màng trong tử cung, hoặc bệnh ung thư hiếm gặp;

- (iii) Phương pháp điều trị bao gồm bước cho đối tượng như người sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, có thể tùy ý ở dạng hydrat, solvat hoặc đa hình, để sử dụng trong việc điều trị rối loạn y học như bệnh ung thư hoặc khối u đáp ứng với hiệu quả tái mô hình hóa mạch và/hoặc hoạt tính kháng CAF;
- (iv) Hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, có thể tùy ý ở dạng hydrat, solvat hoặc đa hình, để sử dụng trong việc điều trị bệnh caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh sacôm, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư màng trong tử cung, hoặc bệnh ung thư hiếm gặp;
- (v) Hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, thể tùy ý ở dạng hydrat, solvat hoặc đa hình, để sử dụng trong việc điều trị rối loạn y học như bệnh ung thư hoặc khối u đáp ứng với hiệu quả tái mô hình hóa mạch và/hoặc hoạt tính kháng CAF;
- (vi) Dẫn xuất được đoteri hóa của hợp chất có công thức (1);
- (vii) Quy trình sản xuất thuốc dùng cho mục đích điều trị để điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn như bệnh ung thư hoặc khối u đáp ứng với hiệu quả tái mô hình hóa mạch và/hoặc hoạt tính kháng CAF, khác biệt ở chỗ, hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, có thể tùy ý ở dạng hydrat, solvat hoặc đa hình đã mô tả trên đây, hoặc một phương án của hợp chất có hoạt tính, được sử dụng trong quá trình sản xuất này;
- (viii) Hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, ở dạng gần như tinh khiết (ví dụ, ít nhất 90 hoặc 95%);
- (ix) Chế phẩm được dụng chứa hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, có thể tùy ý ở dạng hydrat, solvat hoặc đa hình, trong chất mang hoặc tá dược được dụng;
- (x) Dạng liều dùng được dụng của hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, có thể tùy ý ở dạng hydrat, solvat hoặc đa hình, tùy ý trong chất mang hoặc tá dược được dụng;
- (xi) Hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng

vị của nó, để điều trị rối loạn được mô tả ở đây, mà nhờ đó nó có tác dụng thông qua cơ chế khác với hiệu quả tái mô hình hóa mạch và/hoặc hoạt tính kháng CAF; và

(xii) Phương pháp sản xuất các hợp chất được mô tả ở đây, và các hợp chất trung gian trong quá trình tổng hợp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ kèm theo được kết hợp vào đây và tạo thành một phần của bản mô tả này, minh họa một số phương án của sáng chế và cùng với phần mô tả, tạo ra các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Fig.1 thể hiện hiệu quả kháng u của hợp chất có công thức (1) trong mô hình mô ghép khác loài tế bào FaDu dưới da (bệnh ung thư vùng đầu và cổ) ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn như được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm được lý 4.

Fig.2 thể hiện hoạt tính kháng u của hợp chất có công thức (1) đối với mô hình mô ghép khác loài tế bào OSC-19 dưới da (bệnh ung thư vùng đầu và cổ) ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn như được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm được lý 5.

Fig.3 thể hiện hoạt tính kháng u của hợp chất có công thức (1) đối với mô hình mô ghép khác loài tế bào HCC-1806 dưới da (bệnh ung thư vú) ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn như được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm được lý 6.

Fig.4 thể hiện hiệu quả kháng u của hợp chất có công thức (1) trong mô hình mô ghép khác loài tế bào FaDu dưới da kết hợp với cetuximab ở chuột như được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm được lý 7.

Fig.5 thể hiện hoạt tính kháng u của hợp chất có công thức (1) trong mô hình mô ghép khác loài tế bào KPL-4 dưới da (bệnh ung thư vú) kết hợp với trastuzumab ở chuột như được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm được lý 8.

Fig.6A và Fig.6B thể hiện hiệu quả kháng u của hợp chất có công thức (1) trong mô hình chuột ghép tế bào HSC-2 cùng chỗ. Fig.6A thể hiện Chuột nhắt trần được cấy tế bào HSC-2 đã tải nạp luciferaza (1×10^6 tế bào/điểm) ở lưng. Lượng tế bào HSC-2 đã tải nạp luciferaza được phân tích bằng cách sử dụng hệ thống chụp ảnh *in vivo* (In Vivo Imaging System: IVIS). Các số liệu thể hiện mức độ phát huỳnh quang sinh học ở lưng của mỗi con chuột. Fig.6B thể hiện hình ảnh phát huỳnh quang sinh học làm đại diện của 16 con chuột. CDDP, CTX, CDDP+CTX được sử dụng làm các chất đối chứng, các chất này hiện đang được sử dụng trong việc điều trị cho bệnh nhân ung thư SCCHN. CDDP= cisplatin, CTX= cetuximab.

Fig.7A và Fig.7B thể hiện lợi thế đối với sự sống của hợp chất có công thức (1) kết hợp với cetuximab trong mô hình chuột ghép tế bào HSC-2 cùng chỗ. Fig.7A thể hiện chuột nhất trần được cấy các tế bào HSC-2 đã tải nạp luciferaza (1×10^6 tế bào/điểm) ở lưỡi. Các số liệu cho thấy rằng đường cong sự sống cho đến ngày 100 sau khi điều trị bằng các được chất (n=16). *P<0,0001 so với hợp chất có công thức (1) hoặc CTX một mình (thử nghiệm Log-rank (Mantel-Cox)). Fig.7B thể hiện lượng tế bào HSC-2 đã tải nạp luciferaza được phân tích bằng cách sử dụng hệ thống chụp ảnh *in vivo* (IVIS). Các hình ảnh phát huỳnh quang sinh học của 10 con chuột còn sống của nhóm sử dụng kết hợp hợp chất có công thức (1) + CTX vào ngày 100. RBW (relative body weight) = trọng lượng cơ thể tương đối. CDDP= cisplatin, CTX= cetuximab.

Fig.8A và Fig.8B thể hiện hiệu quả kháng u của hợp chất có công thức (1) kết hợp với liệu pháp xạ trị trong mô hình mô ghép khác loài tế bào FaDu ở chuột. Fig.8A thể hiện chuột nhất trần được cấy dưới da các tế bào FaDu đã tải nạp luciferaza (5×10^6 tế bào/điểm) vào đùi phải. 13 ngày sau khi cấy, chuột được chia nhóm ngẫu nhiên (n=6), và được tiêm hợp chất có công thức (1) qua đường trong tĩnh mạch với liều 90 $\mu\text{g/kg}$ vào ngày 1 và ngày 8 có hoặc không sử dụng liệu pháp RT 18 Gy vào ngày 4 và ngày 11. Lượng tế bào FaDu đã tải nạp luciferaza được phân tích bằng cách sử dụng hệ thống chụp ảnh *in vivo* (IVIS). Các số liệu cho thấy mức độ phát huỳnh quang sinh học tương đối trung bình vào ngày 1 và SEM (n=6). SEM (standard error of the mean) = sai số chuẩn của giá trị trung bình. * P<0,05 so với nhóm không được điều trị vào ngày 29 (kiểm định t không ghép cặp). Fig.8B thể hiện các hình ảnh mức độ phát huỳnh quang sinh học làm đại diện của 6 con chuột trong mỗi nhóm vào ngày 29. RT (radiation therapy) = liệu pháp xạ trị.

Fig.9 thể hiện hoạt tính kháng u của hợp chất có công thức (1) kết hợp với kháng thể kháng mPD-1. Mô hình chuột đồng gen được cấy CT26 dưới da (s.c.) (caxinom ruột kết) được điều trị bằng hợp chất có công thức (1) và kháng thể kháng mPD-1 theo liệu trình 7 ngày một lần (Q7D) và liệu trình hai lần mỗi tuần tương ứng, trong 3 tuần. Các kết quả thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SEM của thể tích khối u (mm^3) (n=8).

Fig.10A thể hiện thử nghiệm polyme hóa tubulin không có tế bào. Hợp chất có công thức (1) có hoạt tính ức chế đối với sự polyme hóa tubulin. Fig.10B thể hiện thử nghiệm động lực học vi ống. Hợp chất có công thức (1) cũng có hoạt tính đối với động lực học vi ống.

Fig.11 cho thấy rằng hợp chất có công thức (1) là chất chống tăng sinh mạnh đối với dòng tế bào ung thư thực quản (OE21, OE33, và TE-8) và ung thư tử cung (MES-SA,

MES-SA/Dx5-Rx1).

Fig.12 cho thấy rằng hợp chất có công thức (1) có hoạt tính kháng u mạnh trong mô hình mô ghép khác loài dưới da của bệnh ung thư vú và bệnh ung thư buồng trứng (KPL-4 và COLO-704, tương ứng) dưới dạng liệu pháp đơn.

Fig.13 thể hiện hiệu quả của hợp chất có công thức (1) đối với vi môi trường khối u. Như được thể hiện, hợp chất có công thức (1) làm tăng tỷ trọng vi mạch. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$ so với nhóm không được điều trị (thử nghiệm nhiều so sánh Dunnett).

Fig.14 thể hiện hiệu quả của hợp chất có công thức (1) đối với các vi môi trường khối u. Như được thể hiện, hợp chất có công thức (1) làm giảm CAF dương tính với α -SMA.

Fig.15 cho thấy rằng hợp chất có công thức (1) làm giảm nồng độ các protein ECM từ CAF trong mô hình mô ghép khác loài tế bào FaDu dưới da. Các khối u mô ghép khác loài tế bào FaDu được lấy vào ngày 6 sau khi sử dụng một lần hợp chất có công thức (1) 180 $\mu\text{g/kg}$ + cetuximab vào ngày 1.

Fig.16 cho thấy rằng hợp chất có công thức (1) có hiệu quả kết hợp không phụ thuộc liều dùng với cetuximab trong mô hình mô ghép khác loài tế bào FaDu dưới da. Liều đơn, $n = 6$. Hợp chất có công thức (1) và cetuximab (CTX) được sử dụng vào ngày 1 trong mô hình mô ghép khác loài tế bào FaDu.

Fig.17 thể hiện hiệu quả kháng u trong mô hình mô ghép khác loài sácôm mô mềm ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn. Các tế bào MES-SA (sácôm tử cung của người), HT-1080 (sácôm sợi của người), và CTG-2041 (sácôm mạch của người) được thể hiện.

Fig.18 thể hiện hiệu quả kháng u trong hình mô ghép khác loài ung thư màng trong tử cung ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn. Các tế bào HEC-108 và AN3CA (bệnh ung thư màng trong tử cung) được thể hiện.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “muối” để chỉ muối bất kỳ và tất cả các muối, và bao gồm cả các muối được dùng. Thuật ngữ “muối được dùng” để chỉ các muối mà trong phạm vi đánh giá y học hợp lý, thích hợp để sử dụng tiếp xúc với các mô của người và động vật lớp thấp mà không có độc tính quá mức, sự kích ứng, đáp ứng dị ứng, và hiện tượng tương tự, và tương xứng với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý. Các muối

được dùng là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, Berge và các đồng tác giả mô tả chi tiết các muối được dùng trong tài liệu: *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66, 1-19, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo. Các muối được dùng của hợp chất theo sáng chế này bao gồm các muối có nguồn gốc từ các axit và bazơ vô cơ và hữu cơ thích hợp. Các ví dụ về muối cộng axit không độc, được dùng là các muối của nhóm amino được tạo ra với các axit vô cơ, như axit clohydric, axit bromhydric, axit phosphoric, axit sulfuric, và axit perchloric hoặc với các axit hữu cơ, như axit axetic, axit oxalic, axit maleic, axit tartric, axit xitric, axit succinic hoặc axit malonic hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này như phương pháp trao đổi ion. Các muối được dùng khác bao gồm muối adipat, alginat, ascorbat, aspartat, benzensulfonat, benzoat, bisulfat, borat, butyrat, camphorat, camphorsulfonat, xitrat, xyclopentanpropionat, digluconat, dodexylsulfat, etansulfonat, format, fumarat, glucoheptonat, glyxerophosphat, gluconat, hemisulfat, heptanoat, hexanoat, hydroiodua, 2-hydroxy-etansulfonat, lactobionat, lactat, laurat, lauryl sulfat, malat, maleat, malonat, metansulfonat, 2-naphtalensulfonat, nicotinat, nitrat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, pectinat, persulfat, 3-phenylpropionat, phosphat, picrat, pivalat, propionat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, thioxyanat, p-toluensulfonat, undecanoat, valerat, và muối tương tự. Các muối có nguồn gốc từ các bazơ thích hợp bao gồm các muối kim loại kiềm, kim loại kiềm thổ, amoni, và $N^+(C_{1-4} \text{ alkyl})_4^-$. Các muối kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ làm đại diện bao gồm natri, lithi, kali, canxi, magie, và muối tương tự. Các muối được dùng khác bao gồm, khi thích hợp, các cation amoni, amoni bậc bốn, và amin không độc được tạo ra bằng cách sử dụng các ion đối như halogenua, hydroxit, carboxylat, sulfat, phosphat, nitrat, alkyl sulfonat thấp, và aryl sulfonat. Hợp chất có công thức (1) cũng được đề xuất, và có thể được sử dụng, dưới dạng bazơ tự do.

Cũng cần hiểu rằng các hợp chất có cùng công thức phân tử nhưng khác về tính chất hoặc trình tự liên kết của các nguyên tử của chúng hoặc sự sắp xếp các nguyên tử của chúng trong không gian được gọi là “các chất đồng phân”. Các chất đồng phân khác nhau về sự sắp xếp các nguyên tử của chúng được gọi là “chất đồng phân lập thể”.

Các thuật ngữ “hỗn hợp” và “chế phẩm” được sử dụng thay thế lẫn nhau.

Thuật ngữ “đối tượng” được dự định cho sử dụng để chỉ người (nghĩa là nam hoặc nữ ở nhóm độ tuổi bất kỳ, ví dụ, đối tượng là trẻ em (ví dụ, trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ, hoặc thanh thiếu niên) hoặc đối tượng là người trưởng thành (ví dụ, thanh niên, người trung tuổi, hoặc người cao tuổi)) hoặc động vật không phải người. Theo một số phương án, động vật không phải người là động vật có vú (ví dụ, động vật linh trưởng (ví dụ, khỉ

cynomolgus hoặc khỉ *rhesus*), động vật có vú liên quan về mặt thương mại (ví dụ, trâu-bò, lợn, ngựa, cừu, dê, mèo hoặc chó), hoặc chim (ví dụ, chim liên quan về mặt thương mại, như gà, vịt, ngỗng, hoặc gà tây)). Theo một số phương án, động vật không phải người là cá, động vật bò sát, hoặc động vật lưỡng cư. Động vật không phải người có thể là con đực hoặc con cái ở giai đoạn phát triển bất kỳ. Động vật không phải người có thể là động vật chuyển gen hoặc động vật được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền. Thuật ngữ “bệnh nhân” để chỉ đối tượng là người cần được điều trị bệnh.

Thuật ngữ “thực hiện”, “việc sử dụng” hoặc “sử dụng” để chỉ việc cấy, hấp thụ, uống, tiêm, hít, hoặc đưa vào theo cách khác, hợp chất được mô tả ở đây, hoặc hỗn hợp của chúng, vào hoặc ở đối tượng.

Các thuật ngữ “sự điều trị”, “điều trị” và “việc điều trị” để chỉ việc làm đảo ngược, làm giảm, làm chậm sự khởi phát, hoặc ức chế sự tiến triển của bệnh được mô tả ở đây. Theo một số phương án, việc điều trị có thể được thực hiện sau khi một hoặc nhiều dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh đã phát triển hoặc quan sát được. Theo các phương án khác, việc điều trị có thể được thực hiện khi không có mặt các triệu chứng hoặc dấu hiệu của bệnh. Ví dụ, việc điều trị có thể thực hiện cho đối tượng mắc cảm trước khi khởi phát các triệu chứng. Việc điều trị cũng có thể được tiếp tục sau khi các triệu chứng đã được giải quyết, ví dụ, để làm chậm hoặc ngăn ngừa sự tái phát.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” của hợp chất được mô tả ở đây để chỉ lượng đủ để tạo ra đáp ứng sinh học mong muốn. Lượng hữu hiệu của hợp chất được mô tả ở đây có thể thay đổi tùy theo các yếu tố như kết quả sinh học mong muốn, dược động học của hợp chất, tình trạng bệnh được điều trị, chế độ sử dụng, và độ tuổi và sức khỏe của đối tượng. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu là lượng có hiệu quả điều trị. Theo cách khác, trong phương pháp hoặc cách sử dụng riêng rẽ, sáng chế có thể được sử dụng, khi được chỉ định và có hiệu quả, dưới dạng phương pháp điều trị dự phòng. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu là lượng của hợp chất được mô tả ở đây theo liều đơn. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu là lượng kết hợp của hợp chất được mô tả ở đây theo nhiều liều.

Thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” của hợp chất được mô tả ở đây là lượng đủ để tạo ra lợi ích trị liệu trong việc điều trị tình trạng bệnh hoặc để làm chậm hoặc làm giảm đến mức tối thiểu của một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến tình trạng bệnh này. Lượng có hiệu quả điều trị của một hợp chất có nghĩa là lượng của chất điều trị, một mình hoặc kết hợp với các liệu pháp khác, tạo ra lợi ích trị liệu trong việc điều trị tình trạng bệnh. Thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” có thể bao gồm lượng để cải thiện liệu

pháp tổng thể, làm giảm hoặc tránh các triệu chứng, dấu hiệu hoặc nguyên nhân của tình trạng bệnh này, và/hoặc làm gia tăng hiệu quả điều trị của chất điều trị khác. Theo một số phương án, lượng có hiệu quả điều trị là lượng đủ để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ được mô tả.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “sự ức chế”, “việc ức chế”, “ức chế” và “chất ức chế”, và thuật ngữ tương tự, để chỉ khả năng của một hợp chất làm giảm, làm chậm, làm ngừng hoặc ngăn ngừa hoạt tính của quy trình sinh học (ví dụ, sự phát triển của khối u). Theo một số phương án, mức độ ức chế nằm trong khoảng từ khoảng 45% đến 50%. Theo một số phương án, mức độ ức chế bằng khoảng 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99,9%, hoặc 100%.

Các thuật ngữ “u” và “khối u” được sử dụng thay thế lẫn nhau ở đây và để chỉ khối mô bất thường trong đó sự phát triển của khối này quá mức và không tương quan với sự phát triển của mô bình thường. U hoặc khối u có thể là “lành tính” hoặc “ác tính”, tùy thuộc vào các đặc điểm sau đây: mức độ biệt hóa của tế bào (bao gồm cả hình thái học và chức năng), tốc độ phát triển, sự xâm lấn cục bộ, và sự di căn. Thuật ngữ “u lành tính” thường là được biệt hóa tốt, có sự phát triển đặc trưng chậm hơn so với u ác tính, và vẫn khu trú ở vị trí ban đầu. Ngoài ra, u lành tính không có khả năng thâm nhiễm, xâm lấn, hoặc di căn đến các vị trí ở xa. Trái lại, “u ác tính” thường được biệt hóa kém (mất biệt hóa) và có sự phát triển nhanh đặc trưng kèm theo sự thâm nhiễm, sự xâm lấn tăng dần, và sự phá hủy mô xung quanh. Ngoài ra, u ác tính thường có khả năng di căn đến các vị trí ở xa. Thuật ngữ “sự di căn”, “tính di căn” hoặc “di căn” để chỉ sự lây lan hoặc di trú của các tế bào ung thư từ khối u nguyên phát hoặc ban đầu đến cơ quan hoặc mô khác và thường là có thể xác định bằng sự xuất hiện của “khối u thứ phát” hoặc “khối tế bào thứ phát” của loại mô của khối u nguyên phát hoặc khối u ban đầu và không phải của mô hoặc cơ quan mà trong đó khối u thứ phát (có tính di căn) khu trú.

Thuật ngữ “bệnh ung thư” để chỉ nhóm các bệnh được đặc trưng bởi sự phát triển của các tế bào bất thường tăng sinh theo cách không kiểm soát được và có khả năng thâm nhiễm và phá hủy các mô của cơ thể bình thường.

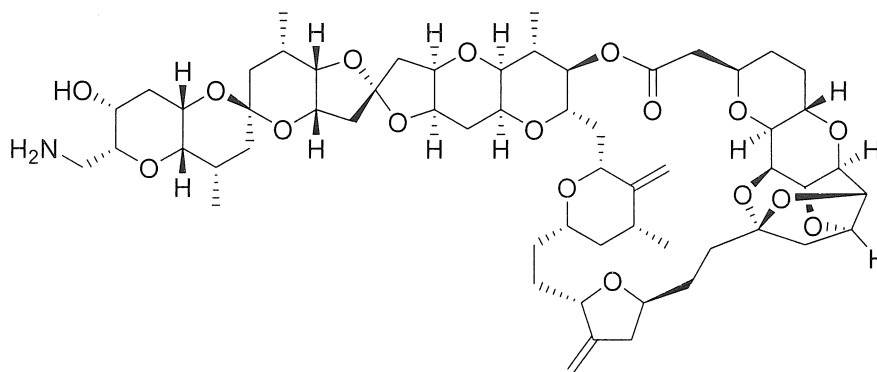
Thuật ngữ “bệnh ung thư hiếm gặp” để chỉ các bệnh ung thư xuất hiện với tỷ lệ tương đối nhỏ bệnh nhân. Các bệnh ung thư hiếm gặp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh sacôm (ví dụ, bệnh sacôm mô mềm, bệnh sacôm mỡ, bệnh sacôm tử cung, bệnh sacôm cơ trơn, bệnh sacôm niêm-xơ, bệnh sacôm xương, bệnh sacôm mạch, bệnh sacôm Ewing, bệnh sacôm hoạt dịch, bệnh sacôm cơ vân), u lymphô ác tính, bệnh

ung thư tuyến ức (ví dụ, u tuyến ức), u trung biểu mô, các khối u mô mô đệm dạ dày-ruột (gastrointestinal stromal tumor: GIST), bệnh ung thư thần kinh-nội tiết, bệnh ung thư mắt, bệnh ung thư não, các khối u mô mềm, bệnh ung thư da, và các khối u tế bào mầm.

Thuật ngữ “chất kháng bệnh ung thư” để chỉ chất điều trị bất kỳ hữu ích để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng (ví dụ, ức chế bệnh ung thư hoặc sự phát triển của khối u ở đối tượng). Chất kháng bệnh ung thư bao gồm cả chất kháng bệnh ung thư sinh trị liệu cũng như chất hóa trị liệu.

Sáng chế được mô tả chi tiết thêm dưới đây cùng với các phương án và phương án tương tự của sáng chế. Sáng chế đề xuất các hợp chất (ví dụ, hợp chất có công thức (1)), và các muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của chúng, và được phẩm chứa chúng. Sáng chế còn mô tả phương pháp ức chế sự phát triển của khối u và/hoặc điều trị bệnh ung thư ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất hoặc hỗn hợp được đề xuất ở đây. Hợp chất hoặc hỗn hợp này có thể được sử dụng dưới dạng liệu pháp đơn hoặc kết hợp với liệu pháp khác, như được mô tả ở đây. Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hợp chất có công thức (1), và các hợp chất trung gian tổng hợp hữu ích cho phương pháp này.

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức:



Hợp chất có công thức (1),

hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, có thể tùy ý ở dạng hydrat, solvat hoặc đa hình, tùy ý trong chất mang hoặc tá dược được dụng.

Hợp chất có công thức (1) có thể tồn tại dưới dạng tinh thể đa hình, và hợp chất theo sáng chế có thể ở dạng đơn tinh thể hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều dạng tinh thể. Hợp chất có công thức (1) có thể ở dạng vô định hình, hoặc có thể ở dạng anhydrit hoặc solvat, như hydrat.

Sáng chế bao gồm cả các dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của hợp chất có công thức (1) và các muối được dụng của nó. Hợp chất được đánh dấu đồng vị là tương đương

với hợp chất có công thức (1) ngoại trừ việc một hoặc nhiều nguyên tử được thay thế bằng (các) nguyên tử có khối lượng nguyên tử hoặc số khối lượng khác với khối lượng nguyên tử hoặc số khối lượng thường được tìm thấy trong tự nhiên. Các ví dụ về chất đồng vị có thể được kết hợp vào hợp chất theo sáng chế bao gồm các chất đồng vị của hydro, cacbon, nitơ, oxy, phospho, flo, iot, brom và clo, như ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{35}S , ^{123}I , và ^{125}I .

Hợp chất được đánh dấu đồng vị, như hợp chất mà chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ, ví dụ, của ^3H và/hoặc ^{14}C được đưa vào đó, hữu ích cho thử nghiệm phân bố thuốc và/hoặc chất nền trong mô. Các chất đồng vị ^3H và ^{14}C được cho là hữu ích do các chất đồng vị này có thể được điều chế và phát hiện dễ dàng. Các chất đồng vị ^{11}C và ^{18}F là hữu ích trong phương pháp chụp cắt lớp bằng bức xạ positron (positron emission tomography: PET). Chất đồng vị ^{125}I được cho là hữu ích trong phương pháp chụp cắt lớp vi tính bằng bức xạ đơn photon (single photon emission computed tomography: SPECT), và có thể hữu ích trong việc chụp ảnh não. Nguyên nhân của sự thay thế bằng chất đồng vị nặng hơn như ^2H là do tính ổn định chuyển hóa của nó cao hơn, một số lợi thế trong việc điều trị, ví dụ, kéo dài thời gian bán hủy *in vivo* hoặc làm giảm liều dùng cần thiết, và do đó được cho là hữu ích trong một số trường hợp nhất định. Hợp chất được đánh dấu đồng vị có thể được điều chế theo cách tương tự bằng cách sử dụng chất phản ứng được đánh dấu đồng vị có thể mua được dễ dàng thay cho chất phản ứng không được đánh dấu đồng vị và bằng cách thực hiện các quy trình được bộc lộ trong các sơ đồ và/hoặc ví dụ được mô tả dưới đây.

Hợp chất có công thức (1) có thể được sử dụng dưới dạng đoạn dò hóa học để bắt giữ protein đích của hợp chất có trọng lượng phân tử thấp có hoạt tính sinh học. Cụ thể, hợp chất theo sáng chế có thể được biến đổi thành đoạn dò sắc ký ái lực, đoạn dò có ái lực quang học hoặc đoạn dò tương tự bằng cách đưa nhóm đánh dấu, nhóm liên kết hoặc nhóm tương tự vào gốc không phải gốc cấu trúc cần thiết cho sự biểu hiện hoạt tính của hợp chất bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu: *J. Mass Spectrum. Soc. Jpn.* Vol. 51, No. 5, 2003, trang 492-498, Công bố đơn quốc tế số W02007/139149, hoặc tài liệu tương tự.

Các ví dụ về nhóm đánh dấu, nhóm liên kết hoặc nhóm tương tự được sử dụng trong đoạn dò hóa học này bao gồm các nhóm thuộc về các nhóm từ (1) đến (5) sau đây. (1) Các nhóm đánh dấu protein như các nhóm đánh dấu ái lực quang học (như nhóm benzoyl, nhóm benzophenon, nhóm azit, nhóm carbonyl azit, nhóm diaziridin, nhóm enon, nhóm diazo và nhóm nitro), và các nhóm có ái lực hóa học (như nhóm keton trong

đó nguyên tử cacbon alpha được thế bằng nguyên tử halogen, nhóm carbamoyl, nhóm este, nhóm alkylthio, thể nhận Michael của keton không no ở vị trí α, β , este, hoặc nhóm tương tự, và nhóm oxiran); (2) các nhóm liên kết có thể phân giải như S-S, O-Si-O, monosacarit (như nhóm glucoza hoặc nhóm galactoza) và disacarit (như lactoza), và oligopeptit có thể được phân giải bằng phản ứng enzym; (3) các nhóm đuôi cá như biotin và nhóm 3-(4, 4-diflo-5,7-dimetyl-4H-3a,4a-diaza-4-bora-s-indaxen-3-yl)propionyl; (4) các nhóm đánh dấu có hoạt tính phóng xạ như ^{125}I , ^{32}P , ^3H và ^{14}C ; các nhóm đánh dấu huỳnh quang như florescein, rhodamin, dansyl, umbelliferon, 7-nitrofurazanyl, và nhóm 3-(4,4-diflo-5,7-dimetyl-4H-3a,4a-diaza-4-bora-s-indaxen-3-yl); các nhóm huỳnh quang hóa học như luciferin và luminol; và các nhóm đánh dấu có khả năng phát hiện ion kim loại nặng như các ion kim loại lanthanoit và ion radi; và (5) các nhóm cần được gắn kết với chất mang pha rắn như hạt thủy tinh, lớp thủy tinh, đĩa vi chuẩn, hạt agarosa, lớp agarosa, hạt polystyren, lớp polystyren, hạt nylon và lớp nylon.

Đoạn dò được tạo ra bằng cách đưa nhóm đánh dấu hoặc nhóm tương tự được chọn từ các nhóm từ (1) đến (5) đã mô tả trên đây vào hợp chất của sáng chế bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu bất kỳ trong số các tài liệu đã nêu trên đây hoặc tài liệu tương tự có thể được sử dụng làm đoạn dò hóa học để xác định protein đánh dấu hữu ích cho việc nghiên cứu đích được chất tiềm năng mới.

Các ví dụ của “muối” được sử dụng ở đây bao gồm các muối với axit vô cơ, các muối với axit hữu cơ, và các muối với axit amin có tính axit, và cụ thể, các muối được dùng là được ưu tiên. Ngoài ra, muối của hợp chất theo sáng chế bao gồm cả anhydrit của muối được dùng của nó và solvat, như hydrat của muối được dùng. Các ví dụ được ưu tiên của muối với axit vô cơ bao gồm các muối với axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric và axit tương tự, và các ví dụ được ưu tiên của muối với axit hữu cơ bao gồm các muối với axit axetic, axit succinic, axit fumaric, axit maleic, axit tartaric, axit citric, axit lactic, axit stearic, axit benzoic, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic và axit tương tự. Các ví dụ được ưu tiên của muối với axit amin có tính axit bao gồm các muối với axit aspartic và axit glutamic và axit tương tự.

Trong trường hợp hợp chất có công thức (1) theo sáng chế thu được dưới dạng muối của hợp chất có công thức (1) hoặc hydrat của hợp chất có công thức (1), muối và hydrat này có thể được chuyển hóa thành thể tự do của hợp chất có công thức (1) bằng phương pháp thuận tiện.

Dược phẩm, kit, và sử dụng

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hợp chất có công thức (1), hoặc muối dược dụng hoặc dẫn xuất dược đánh dấu đồng vị của nó, và tá dược dược dụng. Theo một số phương án, hợp chất được mô tả ở đây, hoặc muối dược dụng hoặc dẫn xuất dược đánh dấu đồng vị của nó, được cung cấp với lượng hữu hiệu trong dược phẩm (ví dụ, lượng có hiệu quả điều trị).

Các dược phẩm được mô tả ở đây có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực dược lý. Nói chung, các phương pháp bào chế này bao gồm bước cho hợp chất có công thức (1) (nghĩa là “thành phần có hoạt tính”) kết hợp với chất mang hoặc tá dược, và/hoặc một hoặc nhiều thành phần phụ trợ khác, và sau đó, nếu cần và/hoặc mong muốn, tạo hình, và/hoặc bao gói sản phẩm thành một hoặc nhiều đơn vị liều dùng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế theo phương pháp đã biết như phương pháp dược mô tả trong quy tắc chung để bào chế của Dược điển Nhật, 16th edition, Dược điển Mỹ, và Dược điển châu Âu, 9th edition. Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân một cách thích hợp tùy thuộc vào dạng sử dụng.

Các dược phẩm có thể được bào chế, bao gói, và/hoặc bán với số lượng lớn, dưới dạng một liều dùng đơn vị, và/hoặc dưới dạng nhiều liều dùng đơn vị. Thuật ngữ “liều dùng đơn vị” là lượng riêng biệt của dược phẩm chứa lượng định trước của thành phần có hoạt tính. Lượng của thành phần hoạt tính này thường bằng liều lượng của thành phần có hoạt tính mà sẽ cho đối tượng sử dụng và/hoặc là phần thuận tiện của liều lượng này như một phần hai hoặc một phần ba của liều lượng này.

Lượng tương đối của thành phần có hoạt tính, tá dược dược dụng, và/hoặc các thành phần khác bất kỳ trong dược phẩm được mô tả ở đây sẽ thay đổi, tùy theo thể trạng, chỉ số kích thước, và/hoặc tình trạng bệnh của đối tượng được điều trị và còn phụ thuộc vào đường mà dược phẩm được sử dụng. Dược phẩm này có thể chứa thành phần có hoạt tính với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 100% (theo trọng lượng).

Các tá dược dược dụng được sử dụng trong quá trình sản xuất dược phẩm theo sáng chế bao gồm các chất pha loãng trợ, chất phân tán và/hoặc chất tạo hạt, chất hoạt động bề mặt và/hoặc chất nhũ hóa, chất gây rã, chất gắn kết, chất bảo quản, chất đệm, chất làm trơn, và/hoặc dầu. Các tá dược như bơ ca cao và sáp dùng cho thuốc đạn, chất tạo màu, chất bao, chất làm ngọt, chất tạo hương vị, và chất tạo mùi thơm cũng có thể có mặt trong dược phẩm này.

Hợp chất được đề xuất ở đây thường được bào chế ở dạng đơn vị liều dùng để dễ

sử dụng và tạo ra sự đồng đều về liều lượng. Tuy nhiên, cần hiểu rằng tổng lượng sử dụng hàng ngày của các dược phẩm được mô tả ở đây sẽ được quyết định bởi bác sĩ trong phạm vi đánh giá y học hợp lý. Liều dùng có hiệu quả điều trị cụ thể cho đối tượng hoặc sinh vật cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm bệnh cần được điều trị và mức độ nặng của rối loạn; hoạt tính của thành phần có hoạt tính cụ thể được sử dụng; chế phẩm cụ thể được sử dụng; độ tuổi, trọng lượng cơ thể, tình trạng sức khỏe chung, giới tính, và chế độ ăn của đối tượng; thời gian sử dụng, đường sử dụng, và tỷ lệ bài tiết của thành phần có hoạt tính cụ thể được sử dụng; khoảng thời gian điều trị; các dược chất được sử dụng kết hợp hoặc đồng thời với thành phần có hoạt tính cụ thể được sử dụng; và các yếu tố tương tự đã được biết rõ trong lĩnh vực y học.

Hợp chất theo sáng chế (hợp chất có công thức (1)) và các hỗn hợp của nó được đề xuất ở đây có thể được sử dụng qua đường bất kỳ, bao gồm đường ruột (ví dụ, đường miệng), ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong tủy sống, trong vỏ, dưới da, trong não thất, qua chân bì, giữa chân bì, trực tràng, trong âm đạo, trong màng bụng, đường khu trú (như dạng bột, thuốc mỡ, kem, và/hoặc thuốc giọt), niêm mạc, mũi, má, dưới lưỡi; bằng cách nhỏ giọt trong khí quản, nhỏ giọt trong phế quản, và/hoặc xông hít; và/hoặc dưới dạng phun qua đường miệng, phun qua đường mũi, và/hoặc khí dung. Các đường sử dụng được dự định cụ thể là sử dụng qua đường miệng, sử dụng qua đường trong tĩnh mạch (ví dụ, tiêm qua đường trong tĩnh mạch toàn thân), sử dụng theo vùng bằng cách cung cấp qua máu và/hoặc bạch huyết, và/hoặc sử dụng trực tiếp vào vị trí bị bệnh. Nói chung, đường sử dụng thích hợp nhất sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm tính chất của chất (ví dụ, tính ổn định của nó trong môi trường của đường dạ dày-ruột), và/hoặc tình trạng bệnh của đối tượng (ví dụ, đối tượng có thể dung nạp với việc sử dụng qua đường miệng hay không).

Lượng chính xác của hợp chất có công thức (1) cần thiết để đạt được lượng hữu hiệu sẽ thay đổi giữa các đối tượng, phụ thuộc vào, ví dụ, loài, độ tuổi, và tình trạng bệnh tổng thể của đối tượng, mức độ nặng của tác dụng phụ hoặc rối loạn, tính đồng nhất của hợp chất cụ thể, chế độ sử dụng, và yếu tố tương tự. Lượng hữu hiệu có thể được đưa vào một liều dùng (ví dụ, một liều dùng qua đường miệng) hoặc nhiều liều (ví dụ, nhiều liều dùng qua đường miệng). Theo một số phương án, khi nhiều liều được sử dụng cho đối tượng hoặc được sử dụng cho mô hoặc tế bào, hai liều dùng bất kỳ của nhiều liều dùng bao gồm lượng khác nhau hoặc gần như giống nhau của hợp chất được mô tả ở đây. Theo một số phương án, khi nhiều liều được sử dụng cho đối tượng hoặc được sử dụng cho mô hoặc tế bào, tần suất sử dụng nhiều liều này cho đối tượng hoặc sử dụng nhiều liều này

cho mô hoặc tế bào có thể là trong, các ví dụ không làm giới hạn, ba liều một ngày, hai liều một ngày, một liều mỗi ngày, một liều mỗi hai ngày, một liều mỗi ba ngày, một liều mỗi tuần, một liều mỗi hai tuần, một liều mỗi ba tuần, hoặc một liều mỗi bốn tuần, hoặc thậm chí là sự giải phóng chậm có kiểm soát của liều dùng trong một khoảng thời gian đã chọn bằng cách sử dụng dụng cụ giải phóng được chất. Theo một số phương án, tần suất sử dụng của nhiều liều cho đối tượng hoặc sử dụng nhiều liều cho mô hoặc tế bào là một liều/ngày. Theo một số phương án, tần suất của việc sử dụng nhiều liều cho đối tượng hoặc sử dụng nhiều liều cho mô hoặc tế bào là hai liều/ngày. Theo một số phương án, tần suất của việc sử dụng nhiều liều cho đối tượng hoặc sử dụng nhiều liều cho mô hoặc tế bào là ba liều/ngày. Theo một số phương án, khi nhiều liều được sử dụng cho đối tượng hoặc được sử dụng cho mô hoặc tế bào, khoảng thời gian giữa liều đầu tiên và liều cuối cùng của nhiều liều là khoảng hoặc ít nhất một ngày, hai ngày, bốn ngày, một tuần, hai tuần, ba tuần, một tháng, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, sáu tháng, chín tháng, một năm, hai năm, ba năm, bốn năm, năm năm, sáu năm, bảy năm, mười năm, mười lăm năm, hai mươi năm, hoặc thời gian sống của đối tượng, mô, hoặc tế bào. Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa liều đầu tiên và liều cuối cùng của nhiều liều là khoảng hoặc ít nhất ba tháng, sáu tháng, hoặc một năm. Theo một số phương án, khoảng thời gian giữa liều đầu tiên và liều cuối cùng của nhiều liều là thời gian sống của đối tượng, mô, hoặc tế bào. Theo một số phương án, liều dùng (ví dụ, liều đơn, hoặc liều bất kỳ của nhiều liều) được mô tả ở đây bao gồm liều độc lập nằm trong khoảng từ 0,001 mg/kg đến 0,01 mg/kg, nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 0,1 mg/kg, hoặc nằm trong khoảng từ 0,1 mg/kg đến 1 mg/kg, bao gồm cả hai giá trị đầu mút, của hợp chất có công thức (1). Ví dụ về các dạng liều dùng với ít nhất khoảng 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 25, hoặc 50mg hợp chất có hoạt tính, hoặc muối của nó, ở dạng liều dùng.

Khoảng liều dùng như được mô tả ở đây cung cấp hướng dẫn cho việc sử dụng các dược phẩm của sáng chế cho người trưởng thành. Lượng cần được sử dụng, ví dụ, cho trẻ em hoặc thanh thiếu niên có thể được xác định bởi bác sĩ thực hành hoặc người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể thấp hơn hoặc bằng liều được sử dụng cho người trưởng thành.

Sáng chế còn đề xuất kit (ví dụ, gói dược phẩm). Kit này có thể bao gồm dược phẩm hoặc hợp chất có công thức (1) và đồ chứa (ví dụ, lọ nhỏ, ampun, chai, bơm tiêm, và/hoặc bao gói dùng cho dụng cụ phân phối thuốc, hoặc đồ chứa thích hợp khác). Theo một số phương án, kit theo sáng chế có thể tùy ý còn bao gồm đồ chứa thứ hai để chứa tá dược dùng để pha loãng hoặc tạo hỗn dịch của dược phẩm hoặc hợp chất có công thức

(1). Theo một số phương án, dược phẩm hoặc hợp chất có công thức (1) được tạo ra trong đồ chứa thứ nhất và đồ chứa thứ hai được kết hợp để tạo ra một dạng liều dùng đơn vị. Kit được mô tả ở đây có thể bao gồm một hoặc nhiều chất có hoạt tính được bổ sung được mô tả ở đây dưới dạng hỗn hợp riêng biệt.

Phương pháp điều trị và sử dụng

Khi được thể hiện ở đây, hợp chất có công thức (1) có hiệu quả tái mô hình hóa mạch của khối u và hoạt tính kháng CAF đáng kể, và do đó, nó có ứng dụng tiềm năng để điều trị bệnh ung thư và/hoặc ức chế sự phát triển của khối u.

Sáng chế mô tả ở đây phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc dược phẩm chứa chúng. Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc dược phẩm chứa chúng, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư ở đối tượng. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc dược phẩm chứa chúng, để sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế cũng mô tả ở đây phương pháp ức chế sự phát triển của khối u ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc dược phẩm chứa chúng. Sáng chế cũng đề xuất ở đây hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc dược phẩm chứa chúng, để sử dụng trong việc ức chế sự phát triển của khối u ở đối tượng. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc dược phẩm chứa chúng, để sản xuất thuốc dùng để ức chế sự phát triển của khối u.

Theo một số phương án của các phương pháp và việc sử dụng được mô tả ở đây, bệnh ung thư là bệnh ung thư vùng đầu và cổ, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư bàng quang, hoặc bệnh sacôm

Theo một số phương án của phương pháp và việc sử dụng được mô tả ở đây, bệnh ung thư là bệnh ung thư vùng đầu và cổ (ví dụ, caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư miệng, bệnh ung thư vòm họng, bệnh ung thư tuyến nước bọt, bệnh ung thư lưỡi,

caxinom nang VA). Theo một số phương án, bệnh ung thư là caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN). Theo một số phương án, bệnh ung thư là caxinom nang VA. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú (ví dụ, bệnh ung thư vú dương tính với HER2, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính). Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú dương tính với HER2. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú bộ ba âm tính. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư kết-trực tràng (ví dụ, caxinom ruột kết). Theo một số phương án, bệnh ung thư là caxinom ruột kết. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư thực quản (ví dụ, caxinom tuyến thực quản). Theo một số phương án, bệnh ung thư là caxinom tuyến thực quản. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tử cung (ví dụ, sacôm tử cung). Theo một số phương án, bệnh ung thư là sacôm tử cung. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư buồng trứng. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh sacôm (ví dụ, sacôm tử cung, sacôm sợi, sacôm mạch, sacôm hoạt dịch, caxinom mô mềm). Theo một số phương án, bệnh ung thư là sacôm sợi. Theo một số phương án, bệnh ung thư là sacôm mạch. Theo một số phương án, bệnh ung thư là sacôm hoạt dịch. Theo một số phương án, bệnh ung thư là caxinom mô mềm. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư dạ dày. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư ruột (ví dụ, bệnh ung thư ruột non, caxinom tuyến ruột non). Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư ruột non. Theo một số phương án, bệnh ung thư là caxinom tuyến ruột non. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư bàng quang (ví dụ, bệnh ung thư tế bào chuyển tiếp). Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tế bào chuyển tiếp. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư màng trong tử cung. Theo một số phương án, bệnh ung thư bệnh ung thư hiếm gặp.

Liệu pháp kết hợp

Bên cạnh việc sử dụng dưới dạng liệu pháp đơn, hợp chất có công thức (1) có thể được sử dụng kết hợp với các chất điều trị hoặc phương pháp điều trị khác. Theo một số phương án, chất điều trị bổ sung là kháng thể. Theo một số phương án, chất điều trị bổ sung là kháng thể đơn dòng. Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất điều trị khác, như liệu pháp kháng EGFR, liệu pháp kháng HER2, liệu pháp kháng PD-1, liệu pháp kháng PD-L1, hoặc liệu pháp xạ trị.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc dược phẩm chứa chúng, được sử dụng kết hợp với liệu pháp kháng EGFR (ví dụ, kháng thể đơn dòng (mAb) kháng EGFR, như cetuximab). Theo một số phương án, liệu pháp kháng EGFR là kháng thể kháng EGFR.

Ví dụ, phương pháp được mô tả ở đây là phương pháp điều trị bệnh caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc được phẩm chứa chúng, kết hợp với liệu pháp kháng thể mAb kháng EGFR (thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì). Theo một số phương án, kháng thể mAb kháng EGFR là cetuximab (CTX).

Theo một số phương án, hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc được phẩm chứa chúng, được sử dụng kết hợp với liệu pháp kháng HER2 (ví dụ, kháng thể đơn dòng (mAb) kháng HER2 như trastuzumab). Theo một số phương án, liệu pháp kháng HER2 là kháng thể kháng HER2. Ví dụ, phương pháp được mô tả ở đây là phương pháp điều trị bệnh ung thư vú ở đối tượng cần điều trị bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc hỗn hợp của chúng, kết hợp với liệu pháp kháng thể mAb kháng HER2 (thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì của người). Theo một số phương án, kháng thể mAb kháng HER2 là trastuzumab.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc được phẩm chứa chúng, được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng thể kháng PD-L1 (ví dụ, kháng thể đơn dòng kháng PD-1 hoặc kháng PD-L1). Theo một số phương án, liệu pháp kháng PD-1 hoặc kháng PD-L1 là kháng thể. Ví dụ, phương pháp được mô tả ở đây là phương pháp điều trị bệnh ung thư kết-trực tràng ở đối tượng cần điều trị bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc hỗn hợp của chúng, kết hợp với liệu pháp kháng PD-1 hoặc kháng PD-L1 (ví dụ, liệu pháp kháng thể mAb).

Theo một số phương án, hợp chất có công thức (1), hoặc muối được dụng hoặc dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của nó, hoặc được phẩm chứa chúng, được sử dụng kết hợp với liệu pháp xạ trị (radiation therapy: RT). Theo một số phương án, hợp chất được sử dụng kết hợp với phương pháp phẫu thuật.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tổng hợp hợp chất có công thức (1)

Quy trình và phương pháp chung

Hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế bằng các phương pháp được mô tả trong các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và hợp

chất theo sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ cụ thể được đề cập dưới đây theo cách bất kỳ.

Trong các ví dụ, trừ khi được đề cập cụ thể theo cách khác, silicagel dùng để tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký cột trên silicagel là cột Hi-FlashTM (Silicagel, 30µm 60 Å hoặc 40µm 60 Å, Yamazen Corporation), silicagel dùng để tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký cột trên silicagel NH là silicagel Chromatorex NH (Fuji Silysia Chemical LTD). Phương pháp sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography: TLC) phân tích được thực hiện với silicagel TLC 60 F₂₅₄, độ dày lớp 0,25mm (Merck KGaA) hoặc silica gel Chromatorex TLC NH F₂₅₄, độ dày lớp 0,25mm (Fuji Silysia Chemical LTD). Các đĩa TLC được quan sát bằng mắt thường bằng cách nhuộm bằng thuốc nhuộm p-anisaldehyt, thuốc nhuộm axit phosphomolybdic hoặc thuốc nhuộm Hanessian.

Tất cả các phản ứng nhạy với độ ẩm được tiến hành trong môi trường trơ. Các chất phản ứng và dung môi là loại có bán trên thị trường và được sử dụng như được cung cấp, trừ khi được chỉ rõ theo cách khác.

Phổ NMR được ghi lại trên phổ kế JEOL ECZ500R (500 MHz), JEOL ECZ400S (400 MHz), Varian Inova 500 (500 MHz), Varian Mercury 400 (400 MHz) hoặc Bruker Avance (600 MHz). Sự dịch chuyển hóa học được ghi lại theo phần triệu (parts per million: ppm). Đối với phổ ¹H (CDCl₃, C₆D₆, và/hoặc CD₃OD), đỉnh dung môi dư được sử dụng làm đỉnh tham chiếu nội (7,27 ppm trong CDCl₃; 7,16 ppm trong C₆D₆; 3,31 ppm trong CD₃OD).

Thu được kết quả phổ khối lượng (mass spectra: MS) phân tích bằng cách sử dụng thiết bị Waters Acquity UPLC được trang bị thiết bị phát hiện có bốn cực đơn (SQ Detector 2) hoặc LTQ Orbitrap XLTM (ThermoScientific).

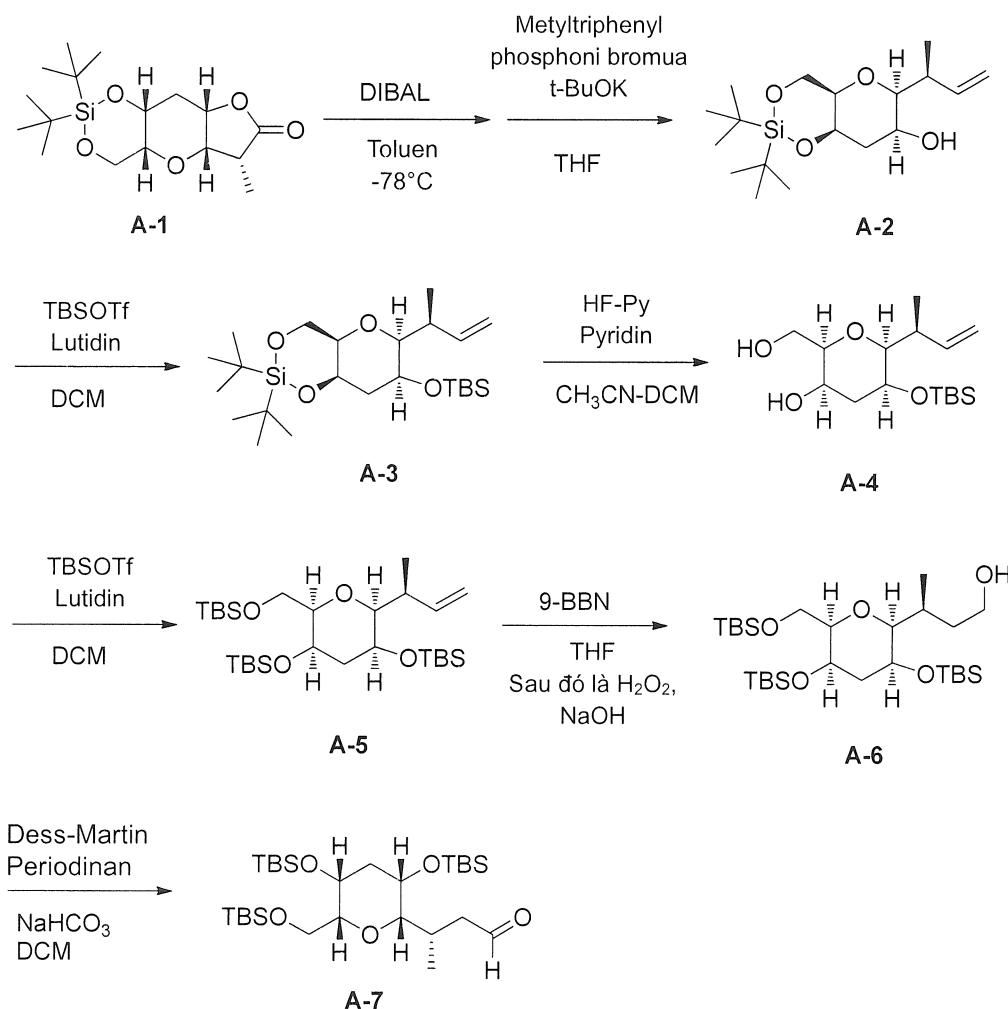
Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được tiến hành với Shimadzu LC-10AD trên thiết bị phát hiện phổ quang kế UV (200 nm, Shimadzu SPD-10A).

Các chữ viết tắt được sử dụng ở đây là như sau: AIBN (2,2'-azobis(isobutyronitrile): 2,2'-azobis(isobutyronitril); 9-BBN (9-borabicyclo[3.3.1]nonane): 9-borabicyclo[3.3.1]nonan; Bu₃SnH (tri-normal-butyltin hydride): tri-normal-butyltin hydrit; (+)-CSA ((1S)-(+)-10-Camphorsulfonic acid): axit (1S)-(+)-10-camphorsulfonic; DMAP (4-dimethylaminopyridine): 4-dimethylaminopyridin; DCM (dichloromethane): diclometan; DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone): 2,3-diclo-5,6-dixyano-1,4-benzoquinon;

DIBAL (diisobutylaluminium hydride): diisobutyl nhôm hydrua; DMF (*N,N*-dimethylformamide): *N,N*-dimetylformamit; DMSO (dimethyl sulfoxide): dimetyl sulfoxit; Et₃N (triethylamine): trietylamin; EtOAc (ethyl acetate): etyl axetat; HF-Pyridine (hydrogen fluoride pyridine): hydro florua pyridin; HPLC (high performance liquid chromatography): phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao; IPA (isopropyl alcohol): rượu isopropylic; MeCN (acetonitrile): axetonitril; MeOH (METANOL): metanol; MPM (*para*-methoxybenzyl): *para*-metoxybenzyl; PPh₃ (triphenylphosphine): triphenylphosphin; *t*-BuOH (*tertiary*-butyl alcohol): rượu butylic bậc ba; *t*BuLi (*tertiary*-butyl lithium): butyl lithi bậc ba; TBME (methyl *tertiary*-butyl ether): ete metyl butyl bậc ba; TBAF (tetrabutylammonium fluoride): tetrabutylamoni florua; TBS (*tertiary*-butyldimethylsilyl): butyldimetylsilyl bậc ba; THF (tetrahydrofuran): tetrahydrofuran; TMS (trimethylsilyl): trimetylsilyl; Ts (*para*-toluenesulfonyl): *para*-toluensulfonyl.

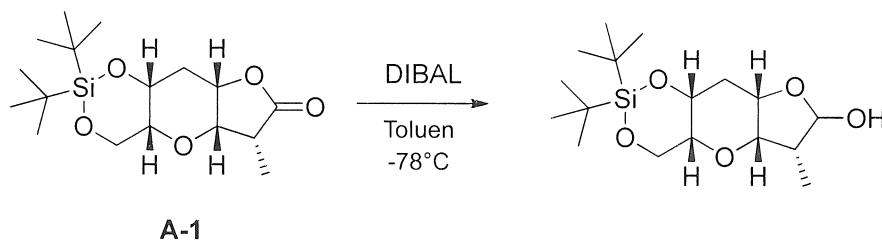
Các hợp chất trung gian tổng hợp được bộc lộ ở đây được xem xét là một phần của sáng chế.

Sơ đồ A; Điều chế hợp chất có công thức A-7



Ví dụ 1:

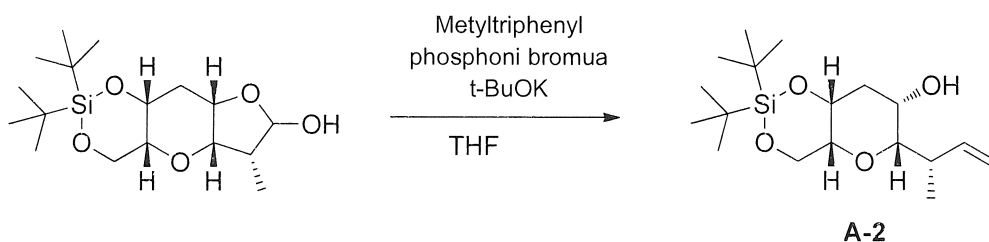
(4aR,5aS,6R,8aS,9aR)-2,2-di-*tert*-butyl-6-metyloctahydrofuro[2',3':5,6]pyrano[3,2-d][1,3,2]dioxasilin-7-ol



Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **A-1**: (4aR,5aS,6R,8aS,9aR)-2,2-di-*tert*-butyl-6-metylhexahydrofuro[2',3':5,6]pyrano[3,2-d][1,3,2]dioxasilin-7(8aH)-on (hợp chất có công thức **A-1**, 18,5g, 54,0mmol) thu được bằng phương pháp theo tài liệu: Organic Letters (2009), 11(2), 409-412 (CAS No; 1095280-04-8) trong toluen (275ml) ở nhiệt độ -78°C, được cho thêm DIBAL (70,2ml, 70,2mmol, dung dịch toluen 1,0M) trong 30 phút. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ -78°C. Sau 90 phút, hỗn hợp phản ứng được tối bằng MeOH (4,37ml) cẩn thận ở nhiệt độ -78°C, sau đó được lấy ra khỏi bể nước làm lạnh. Dung dịch kali natri tartrat tetrahydrat bão hòa (300ml) được cho thêm vào hỗn hợp phản ứng, tiếp tục khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được rót vào phễu tách, sau đó các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng EtOAc (300ml). Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối (300ml), làm khô bằng Na₂SO₄, được lọc, cô dưới áp suất giảm. Lactol dạng thô được sử dụng cho phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Ví dụ 2:

(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-but-3-en-2-yl)-2,2-di-*tert*-butylhexahydropyrano[3,2-d][1,3,2]dioxasilin-7-ol (hợp chất có công thức **A-2**)



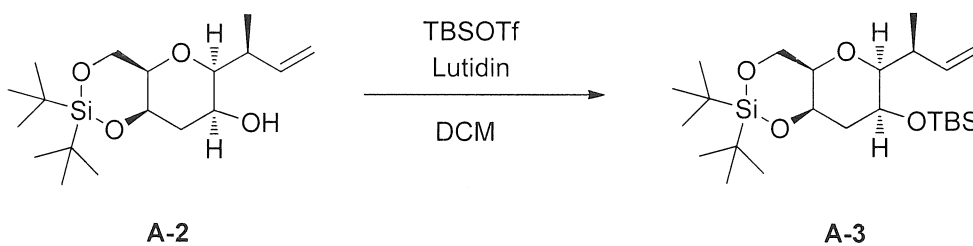
Trong môi trường nitơ, huyền phù chứa methyltriphenylphosphoni bromua (73,30g, 205,2mmol) trong THF (200ml), được cho thêm kali *tert*-butoxit (17,27g, 153,9mmol) ở nhiệt độ -5°C trong 10 phút, và sau đó được khuấy trong 60 phút ở nhiệt độ -5°C. Dung dịch chứa lactol thô được mô tả trong Ví dụ 1 trong THF (40ml) được chuyển vào hỗn

hợp phản ứng ở nhiệt độ -5°C trong 10 phút, sau đó được khuấy ở nhiệt độ -5°C trong 1 giờ, khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng nước đá (400ml), sau đó pha loãng bằng TBME (400ml) và tiếp đó các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng TBME (400ml). Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối (400ml), làm khô bằng Na_2SO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm. Phần cặn được tạo huyền phù với heptan/ EtOAc = 1/1 (100ml). Huyền phù tạo thành được lọc, rửa bằng heptan/ EtOAc = 1/1 (100ml) để loại bỏ chất có nguồn gốc triphenylphosphin. Sau đó, phần nước lọc được cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel (400g, silicagel 60, dạng hình cầu, 40-50 μm , Kanto Chemical) bằng cách sử dụng 0% đến 20% EtOAc /heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **A-2**, 16,7g, hiệu suất 90%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1,03 (d, $J=6,8$ Hz, 3 H) 1,05 (s, 9 H) 1,07 (s, 9 H) 1,75 (dt, $J=14,5, 3,0$ Hz, 1 H) 2,37 (dt, $J=14,5, 2,9$ Hz, 1 H) 2,65 - 2,76 (m, 1 H) 3,03 (dd, $J=9,8, 1,0$ Hz, 1 H) 3,31 (m, 1 H) 3,69 (d, $J=15,0$ Hz, 1 H) 3,75 - 3,79 (m, 1 H) 4,16 - 4,31 (m, 2 H) 4,41 (t, $J=2,9$ Hz, 1 H) 4,95 - 5,09 (m, 2 H) 6,02 (ddd, $J=17,3, 10,5, 6,3$ Hz, 1 H).

Ví dụ 3:

(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-but-3-en-2-yl)-2,2-di-*tert*-butyl-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)hexahydropyrano[3,2-d][1,3,2]dioxasilin (hợp chất có công thức **A-3**)



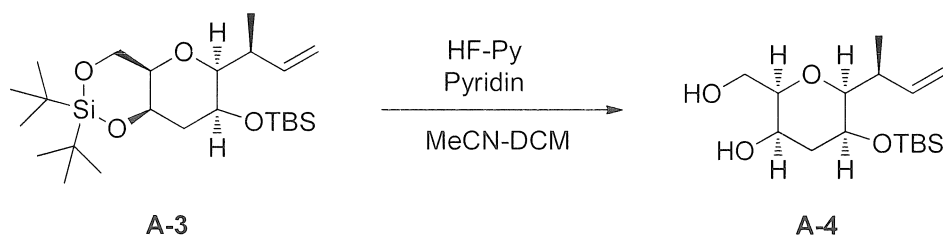
Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **A-2**: (4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-but-3-en-2-yl)-2,2-di-*tert*-butylhexahydropyrano[3,2-d][1,3,2]dioxasilin-7-ol (9,85g, 28,8mmol) được mô tả trong Ví dụ 2 trong DCM (150ml) ở nhiệt độ 0°C được cho thêm 2,6-lutidin (6,68ml, 57,5mmol) và *tert*-butyldimethylsilyl triflometansulfonat (9,25ml, 40,3mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 30 phút, sau đó khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng ete dietyl. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch HCl 0,5N, dung dịch NaHCO_3 bão hòa và sau đó rửa bằng nước muối. Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng MgSO_4 , lọc (lượng nhỏ SiO_2) và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này

trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 15% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **A-3**, 12,0g, hiệu suất 91%).

^1H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,10 (s, 3 H) 0,19 (s, 3 H) 0,91 (s, 9 H) 0,96 (d, $J=6,3$ Hz, 3 H) 1,02 (s, 9 H) 1,06 (s, 9 H) 1,73 (dt, $J=15,0, 4,0$ Hz, 1 H) 2,26 (dt, $J=15,0, 2,5$ Hz, 1 H) 2,66 - 2,74 (m, 1 H) 2,95 (dd, $J=9,5, 2,2$ Hz, 1 H) 3,17 (m, 1 H) 3,81 - 3,84 (m, 1 H) 4,12 - 4,22 (m, 2 H) 4,24 (t, $J=2,7$ Hz, 1 H) 4,93 - 5,06 (m, 2 H) 6,08 (ddd, $J=17,3, 10,5, 6,3$ Hz, 1 H).

Ví dụ 4:

(2R,3R,5S,6S)-6-((S)-but-3-en-2-yl)-5-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-2-(hydroxymetyl) tetrahydro-2H-pyran-3-ol (hợp chất có công thức **A-4**)



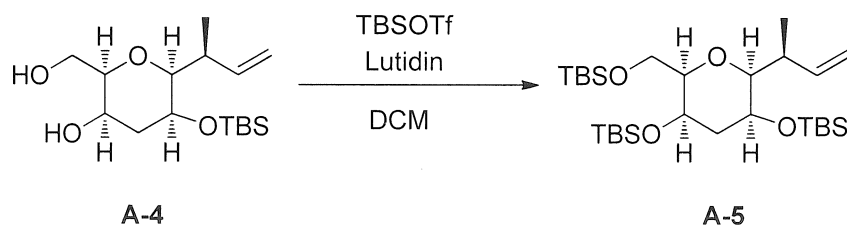
Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **A-3**: (4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-but-3-en-2-yl)-2,2-di-*tert*-butyl-7-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)hexahydropyrano[3,2-*d*][1,3,2]dioxasilin (12g, 26,3mmol) được mô tả trong Ví dụ 3 trong MeCN (120ml) và DCM (40ml) ở nhiệt độ -10°C được cho thêm dung dịch đã trộn sơ bộ chứa HF-Pyridin (4,0ml) và pyridin (20ml) trong 20ml MeCN. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ -10°C trong 15 phút, sau đó khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch NaHCO_3 bão hòa ở nhiệt độ 0°C và pha loãng bằng DCM, sau đó các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng DCM. Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối. Lớp hữu cơ kết hợp này được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 15% đến 60% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **A-4**, 8,4g, hiệu suất định lượng).

^1H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,13 (s, 3 H) 0,19 (s, 3 H) 0,94 (s, 9 H) 0,96 (d, $J=6,8$ Hz, 3 H) 1,72 (dt, $J=14,6, 2,9$ Hz, 1 H) 2,15 (dd, $J=9,8, 2,4$ Hz, 1 H) 2,23 (dt, $J=14,6, 2,9$ Hz, 1 H) 2,55 - 2,65 (m, 1 H) 3,03 (d, $J=9,8$ Hz, 1 H) 3,41 - 3,46 (m, 1 H) 3,49 (d, $J=11,7$ Hz, 1 H) 3,62 - 3,72 (m, 2 H) 3,92 (ddd, $J=11,7, 8,3, 2,4$ Hz, 1 H) 4,02 (t, $J=2,7$ Hz, 1 H) 5,01 - 5,12 (m, 2 H) 5,93 (ddd, $J=17,4, 10,4, 7,3$ Hz, 1 H).

Ví dụ 5:

((2S,3S,5R,6R)-2-((S)-but-3-en-2-yl)-6-(((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)

tetrahydro-2H-pyran-3,5-diyl)bis(oxy))bis(*tert*-butyldimetylsilan) (hợp chất có công thức **A-5**)

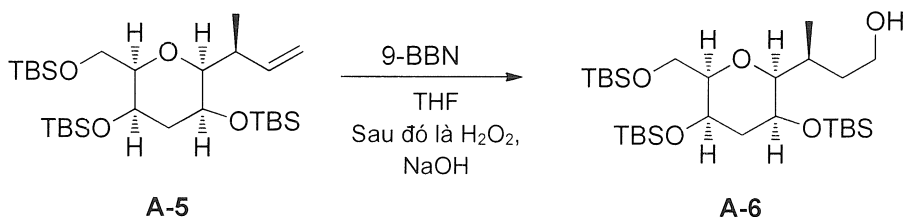


Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **A-4**: (2R,3R,5S,6S)-6-((S)-but-3-en-2-yl)-5-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-2-(hydroxymetyl)tetrahydro-2H-pyran-3-ol (997mg, 3,15mmol) được mô tả trong Ví dụ 4 trong DCM (10ml) ở nhiệt độ 5°C được cho thêm 2,6-lutidin (1,83ml, 15,8mmol) và *tert*-butyldimetylsilyl triflometansulfonat (2,17ml, 9,45mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng ete dietyl và tôi bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa, sau đó các lớp được tách ra. Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa lần lượt bằng dung dịch HCl 0,5N, dung dịch NaHCO₃ bão hòa, và sau đó rửa bằng nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô bằng MgSO₄, lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phân cận này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 5% EtOAc/heptan (chứa Et₃N 1%) thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **A-5**, 1,69g, hiệu suất 98%).

¹H NMR (500 MHz, CLOROFOM-*d*) δ ppm 0,02 - 0,08 (m, 15 H) 0,11 (s, 3 H) 0,89 (s, 9 H) 0,90 - 0,92 (m, 18 H) 0,94 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 1,82 (dt, J=14,9, 4,8 Hz, 1 H) 2,00 (dt, J=14,9, 2,9 Hz, 1 H) 2,62 - 2,72 (m, 1 H) 2,93 (dd, J=9,3, 2,0 Hz, 1 H) 3,27 - 3,34 (m, 1 H) 3,66 - 3,79 (m, 3 H) 3,83 - 3,87 (m, 1 H) 4,91 - 5,07 (m, 2 H) 6,11 (ddd, J=17,3, 10,7, 6,1Hz, 1 H).

Ví dụ 6:

(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)butan-1-ol (hợp chất có công thức **A-6**)



Dung dịch chứa hợp chất có công thức **A-5**: (((2S,3S,5R,6R)-2-((S)-but-3-en-2-yl)-6-(((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)tetrahydro-2H-pyran-3,5-diyl)bis

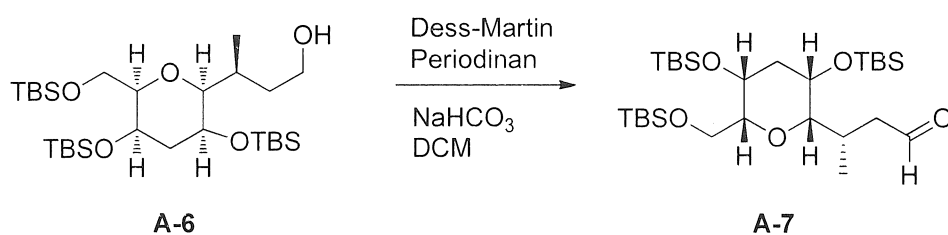
(oxy))bis(*tert*-butyldimethylsilyl)an) (1,32g, 2,42mmol) được mô tả trong Ví dụ 5 trong THF (10ml) ở nhiệt độ 0°C được cho thêm 9-BBN (9,69ml, dung dịch THF 0,5M, 4,84mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Dung dịch NaOH 3,0M (3ml, 9,00mmol) và hydro peroxit (35% trong nước, 3ml) được cho thêm vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 30 phút, sau đó khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch Na₂SO₃ bão hòa và sau đó các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 lần). Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô bằng Na₂SO₄, được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 20% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **A-6**, 1,36g, hiệu suất 100%).

¹H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,03 (s, 3 H) 0,05 - 0,08 (m, 12 H) 0,10 (s, 3 H) 0,88 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 0,89 - 0,93 (m, 27 H) 1,55 - 1,65 (m, 1H) 1,82 (dt, J=15,4, 4,4 Hz, 1 H) 1,87 - 1,96 (m, 1 H) 1,97 - 2,03 (m, 1 H) 2,17- 2,26 (m, 1H) 2,67 (dd, J=7,8, 3,9 Hz, 1 H) 2,98 - 3,10 (m, 1 H) 3,34 - 3,40 (m, 1 H) 3,59 - 3,86 (m, 6 H)

ESI-MS (m/z): 563,64 [M+H]⁺, 585,62 [M+Na]⁺

Ví dụ 7:

(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)butanal (hợp chất có công thức **A-7**)

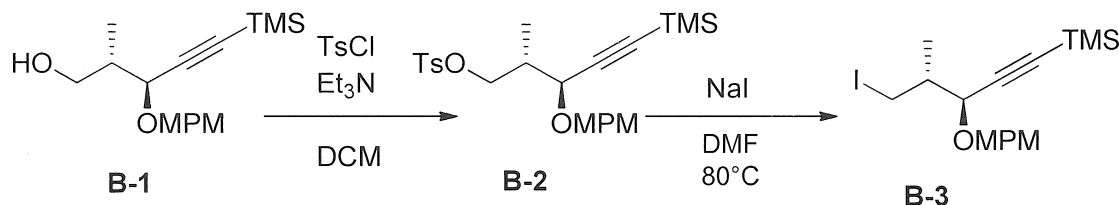


Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **A-6**: (S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)butan-1-ol (1100mg, 1,954mmol) được mô tả trong Ví dụ 6 trong DCM (30ml) ở nhiệt độ 5°C được cho thêm NaHCO₃ (41,0mg, 0,49mmol) và Dess-Martin periodinane (1077mg, 2,54mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau 3 giờ, hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng DCM và tôi bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa và dung dịch Na₂SO₃ bão hòa, sau đó các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng DCM. Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô bằng MgSO₄, được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 25% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục

này (hợp chất có công thức **A-7**, 950 mg, hiệu suất 87%).

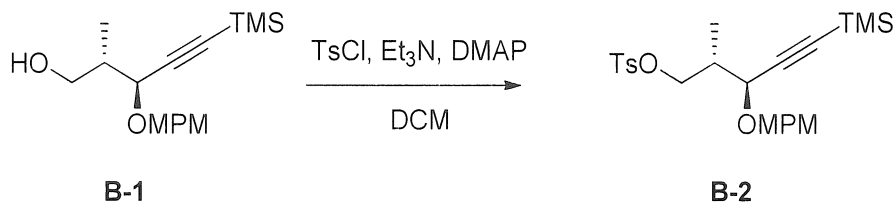
^1H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,00 (s, 3 H) 0,03 - 0,08 (m, 12 H) 0,11 (s, 3 H) 0,88 (s, 9 H) 0,91 - 0,92 (m, 21H) 1,82 (dt, $J=15,0, 4,5$ Hz, 1 H) 2,01 (dt, $J=15,0, 2,5$ Hz, 1 H) 2,28 (ddd, $J=16,0, 7,3, 2,4$ Hz, 1 H) 2,53 -2,58 (m, 1 H) 2,74 (ddd, $J=16,0, 5,5, 2,0$ Hz, 1 H) 2,94 (dd, $J=9,0, 1,7$ Hz, 1 H) 3,29 (td, $J=5,9, 2,0$ Hz, 1 H) 3,68 (d, $J=5,9$ Hz, 2 H) 3,75 - 3,82 (m, 1 H) 3,82 - 3,90 (m, 1 H) 9,73 (t, $J=2,4$ Hz, 1 H).

Sơ đồ B; Điều chế hợp chất có công thức **B-3**



Ví dụ 8:

(2S,3S)-3-((4-metoxibenzyl)oxy)-2-metyl-5-(trimetylsilyl)pent-4-yn-1-yl
4-metylbenzensulfonat (hợp chất có công thức **B-2**)



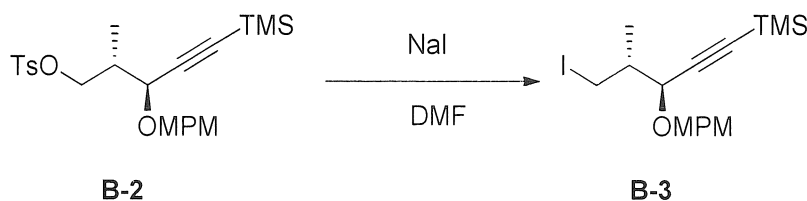
Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **B-1**: (2S,3S)-3-((4-metoxibenzyl)oxy)-2-metyl-5-(trimetylsilyl)pent-4-yn-1-ol (11,08g, 36,15mmol) thu được bằng phương pháp theo Công bố đơn quốc tế WO 9317690 A1/đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 5436238 A (CAS No; 157323-41-6) trong DCM (330ml) được cho thêm Et_3N (12,6ml, 90,4mmol) và *p*-toluensulfonyl clorua (8,27g, 43,4mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp này được rửa bằng NaHCO_3 bão hòa và nước muối, làm khô bằng MgSO_4 , lọc, sau đó được cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phân cận này trên silicagel (silicagel 60, dạng hình cầu, 40-50 μm , Kanto Chemical) bằng cách sử dụng 0% đến 10% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **B-2**, 17,7g, hiệu suất 93%).

^1H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,17 (s, 9 H) 1,02 (d, $J=6,8$ Hz, 3 H) 2,10 - 2,18 (m, 1 H) 2,44 (s, 3 H) 3,82 (s, 3 H) 3,99 (d, $J=6,8$ Hz, 1 H) 4,04 - 4,07(m, 2 H) 4,33 (d, $J=11,2$ Hz, 1 H) 4,66 (d, $J=11,2$ Hz, 1 H) 6,87 (d, $J=8,3$ Hz, 2 H) 7,21 (d,

$J=8,3$ Hz, 2 H) 7,33 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H) 7,77 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H).

Ví dụ 9:

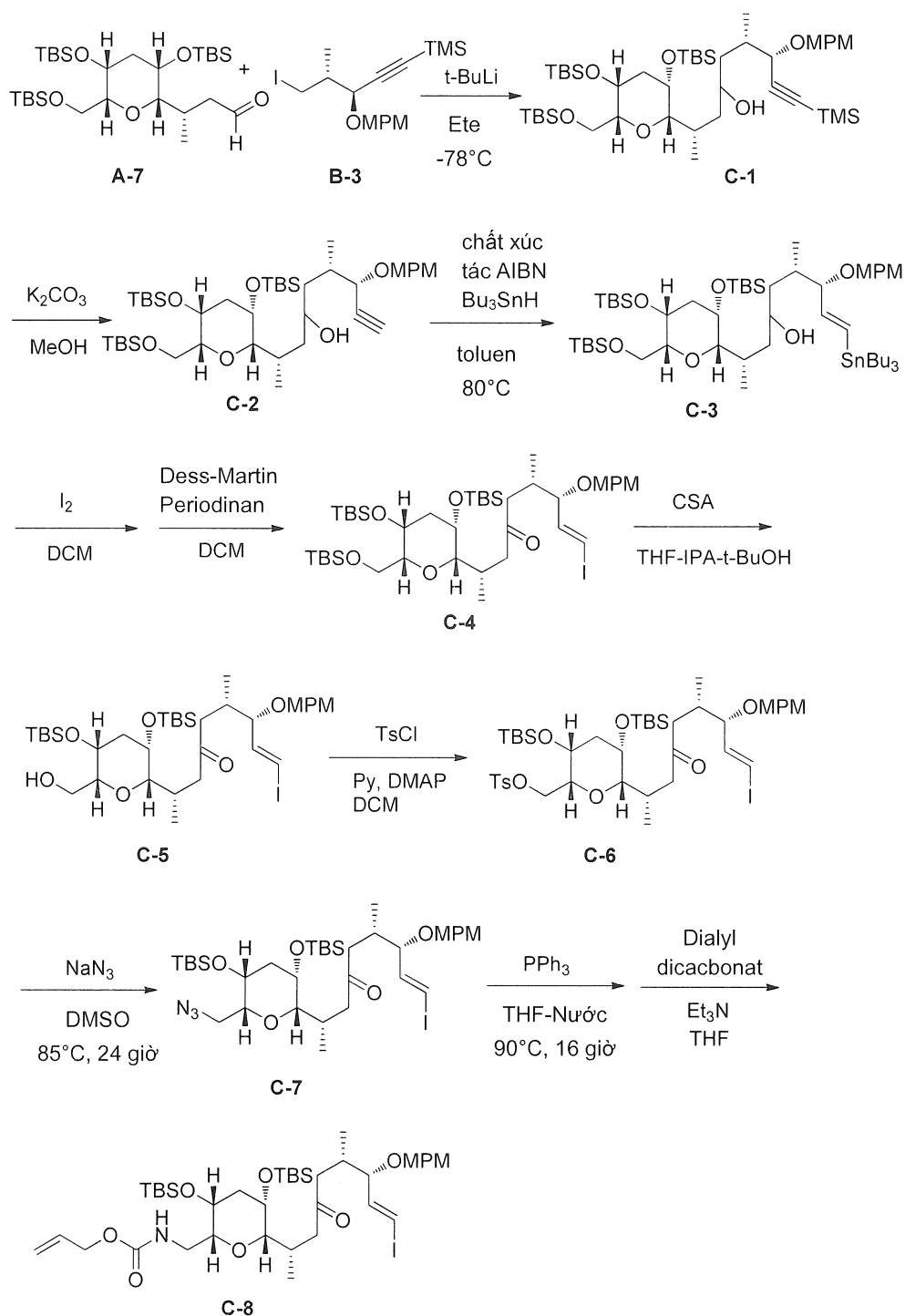
((3S,4R)-5-iodo-3-((4-methoxybenzyl)oxy)-4-methylpent-1-yn-1-yl)trimethylsilan (hợp chất **B-3**)



Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **B-2**: (2S,3S)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-1-yl 4-methylbenzensulfonat (17,7g, 38,4mmol) được mô tả trong Ví dụ 8 trong DMF (360ml), được cho thêm NaI (7,49g, 50,0mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong 2 giờ. Cho thêm tiếp 2,0g NaI vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 1,5 giờ ở nhiệt độ 80°C, sau đó được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được pha loãng bằng ete dietyl, rửa bằng nước và nước muối, làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel (silicagel 60, dạng hình cầu, 40-50 μm , Kanto Chemical) bằng cách sử dụng 10% đến 20% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **B-3**, 14,3g, hiệu suất 89%).

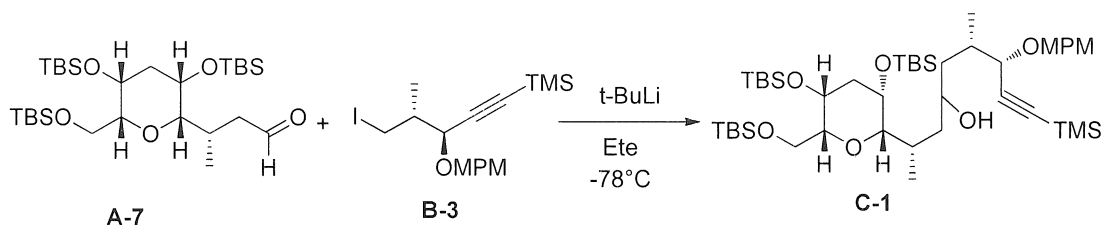
^1H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,21 (s, 9 H) 1,10 (d, $J=6,8$ Hz, 3 H) 1,74 - 1,84 (m, 1 H) 3,30 - 3,37 (m, 2 H) 3,82 (s, 3 H) 3,96 (d, $J=7,3$ Hz, 1 H) 4,44 (d, $J=11,2$ Hz, 1 H) 4,73 (d, $J=11,2$ Hz, 1 H) 6,89 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H) 7,30 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H).

Sơ đồ C; Điều chế hợp chất có công thức C-8



Ví dụ 10:

(2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-7-((4-metoxymethyl)oxy)-6-methyl-9-(trimethylsilyl)non-8-yn-4-ol (hợp chất có công thức C-1)

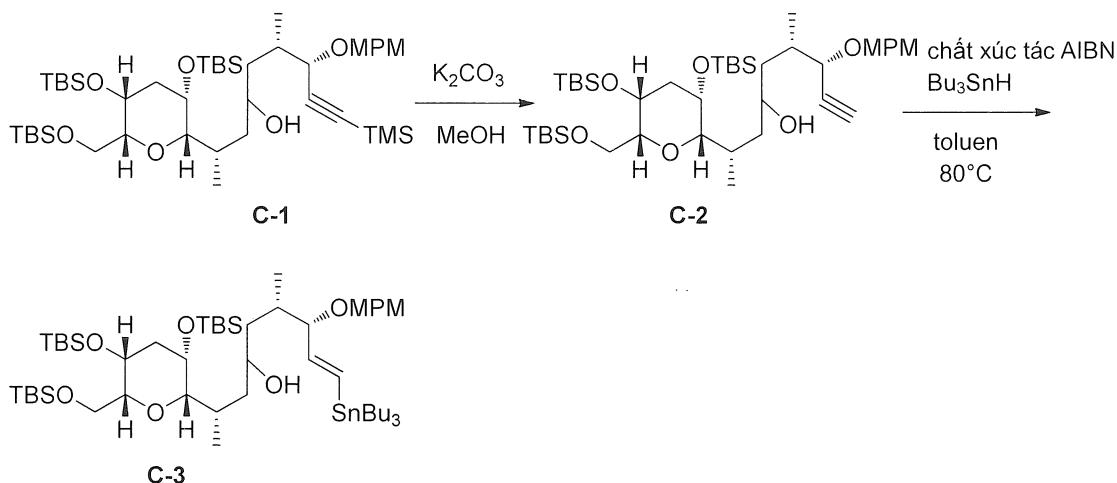


Trong môi trường argon, dung dịch chứa hợp chất có công thức **B-3**: ((3S,4R)-5-iodo-3-((4-metoxymethyl)oxy)-4-methylpent-1-yn-1-yl)trimethylsilane (1408mg, 3,382mmol) được mô tả trong Ví dụ 9 trong ete dietyl (25ml) ở nhiệt độ -78 °C được cho thêm *tert*-butyllithi (1,61M trong pentan, 4,11ml, 6,62mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ -78°C trong 45 phút. Hợp chất có công thức **A-7**: (S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)butanal (825mg, 1,47mmol) được mô tả trong Ví dụ 7 trong 5,0ml chứa ete dietyl được cho thêm vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -78 °C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ -78°C trong 60 phút. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng dung dịch NH₄Cl bão hòa. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô bằng Na₂SO₄, sau đó được cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cần này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 25% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **C-1**, 1167mg, hiệu suất 93%).

¹H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,00 - 0,12 (m, 21 H) 0,15 - 0,24 (m, 6 H) 0,82 - 0,96 (m, 30 H) 1,03 (d, J=6,3 Hz, 3H) 1,38 - 1,55 (m, 1H) 1,68 - 1,99 (m, 4 H) 2,10 - 2,30 (m, 2 H) 2,76 - 2,87 (m, 1 H) 3,15 (d, J=9,75 Hz, 1 H) 3,33 - 3,38 (m, 1 H) 3,56 - 4,02 (m, 9 H) 4,37 - 4,50 (m, 1 H) 4,64 - 4,78 (m, 1 H) 6,83 - 6,88 (m, 2H) 7,23 - 7,35 (m, 2H).

Ví dụ 11:

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-7-((4-metoxymethyl)oxy)-6-methyl-9-(tributylstannyl)non-8-en-4-ol (hợp chất có công thức **C-3**)



Dung dịch chứa hợp chất có công thức **C-1**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-7-((4-metoxymethyl)oxy)-6-methyl-9-(trimetylsilyl)non-8-yn-4-ol (1165mg, 1,37mmol) được mô tả trong Ví dụ 10 trong MeOH (20ml) ở nhiệt độ 20°C được cho thêm K₂CO₃ (189mg, 1,37mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng EtOAc và tôi bằng dung dịch NH₄Cl bão hòa, sau đó các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng EtOAc. Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô bằng MgSO₄, được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 15% EtOAc/heptan thu được hợp chất có công thức **C-2**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-7-((4-metoxymethyl)oxy)-6-methylnon-8-yn-4-ol (1050mg, hiệu suất 98%). ESI-MS (*m/z*): 801,50 [M+Na]⁺

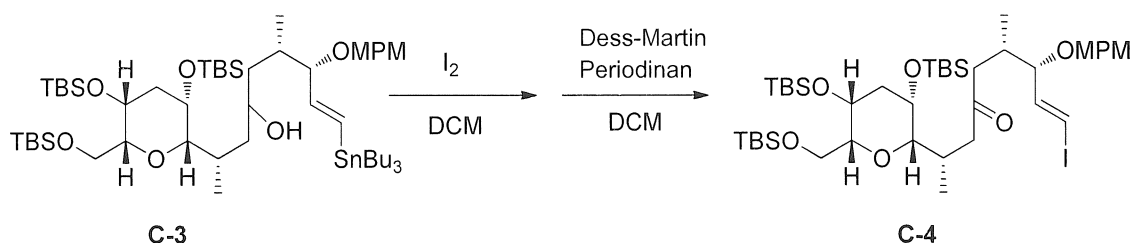
Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **C-2**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-7-((4-metoxymethyl)oxy)-6-methylnon-8-yn-4-ol (780mg, 1,00mmol) thu được trên đây trong toluen (15ml) ở nhiệt độ 20°C được cho thêm tri-*n*-butyltin hydride (2,5ml, 9,36mmol) và 2,2'-azobis(isobutyronitril) (82mg, 0,50mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 90°C trong 15 phút. Hỗn hợp phản ứng này được cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 15% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **C-3**, 970mg, hiệu suất 91%).

¹H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,02 - 0,13 (m, 18 H) 0,84 - 0,96 (m, 48 H) 1,22 - 1,37 (m, 6 H) 1,47 - 1,56 (m, 7 H) 1,72 - 1,90 (m, 3 H) 1,95-2,03 (m, 1 H) 2,11 - 2,28 (m, 2 H) 2,82 - 2,86 (m, 1 H) 3,08 - 3,15 (m, 1 H) 3,33 - 3,40 (m, 1 H) 3,43 -

3,53 (m, 1 H) 3,58 - 3,87 (m, 8 H) 4,25 - 4,31 (m, 1 H) 4,49 - 4,54 (m, 1 H) 5,83 (dd, $J=19,3, 7,6\text{Hz}$, 1 H) 6,05 - 6,13 (m, 1 H) 6,83 - 6,90 (m, 2 H) 7,24 (d, $J=8,8\text{ Hz}$, 2 H).

Ví dụ 12:

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9-iodo-7-((4-methoxybenzyl)oxy)-6-metylnon-8-en-4-on (hợp chất có công thức **C-4**)



Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **C-3**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-7-((4-methoxybenzyl)oxy)-6-metyl-9-(tributylstannyl)non-8-en-4-ol (970mg, 0,91mmol) được mô tả trong Ví dụ 11 trong 30ml DCM ở nhiệt độ 5°C được cho thêm iodin (242mg, 0,95mmol) trong DCM (6ml) cho đến khi nó duy trì được màu iot. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch Na_2SO_3 bão hòa và các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng DCM. Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối. Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng Na_2SO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 25% EtOAc/heptan thu được hợp chất (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9-iodo-7-((4-methoxybenzyl)oxy)-6-metylnon-8-en-4-ol (768mg, hiệu suất 93%).

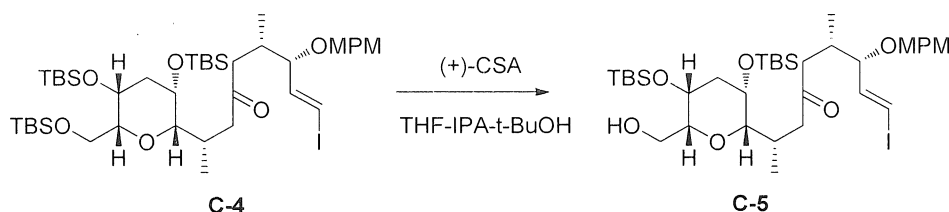
Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9-iodo-7-((4-methoxybenzyl)oxy)-6-metylnon-8-en-4-ol (768mg, 0,85mmol) thu được trên đây trong DCM (25ml) ở nhiệt độ trong phòng được cho thêm NaHCO_3 (17,8mg, 0,21mmol) và Dess-Martin periodinan (485mg, 1,14mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng DCM và tôi bằng dung dịch NaHCO_3 bão hòa và dung dịch Na_2SO_3 bão hòa, và sau đó các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng DCM. Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và

cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 20% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **C-4**, 776mg, hiệu suất định lượng).

^1H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,00 (s, 3 H) 0,03 - 0,07 (m, 12 H) 0,10 (s, 3 H) 0,81 (d, $J=6,3$ Hz, 3 H) 0,84 (d, $J=6,3$ Hz, 3 H) 0,89 (s, 9 H) 0,91 (s, 9 H) 0,92 (s, 9 H) 1,80 (dt, $J=15,0, 4,5$ Hz, 1 H) 1,99 (dt, $J=15,0, 2,5$ Hz, 1 H) 2,17 (dd, $J=16,6, 10,2$ Hz, 1 H) 2,20 - 2,29 (m, 2 H) 2,43 - 2,48 (m, 1 H) 2,54 (d, $J=12,7$ Hz, 1 H) 2,87 (dd, $J=9,0, 1,7$ Hz, 1 H) 2,99 (dd, $J=16,6, 2,9$ Hz, 1 H) 3,27 (td, $J=5,8, 2,4$ Hz, 1 H) 3,50 - 3,56 (m, 1 H) 3,66 - 3,74 (m, 2H) 3,75 - 3,78 (m, 1 H) 3,80 (s, 3 H) 3,81 - 3,85 (m, 1 H) 4,26 (d, $J=11,7$ Hz, 1 H) 4,50 (d, $J=11,7$ Hz, 1 H) 6,26 (d, $J=14,6$ Hz, 1 H) 6,42 (dd, $J=14,6, 7,8$ Hz, 1 H) 6,87 (d, $J=8,3$ Hz, 2 H) 7,21 (d, $J=8,3$ Hz, 2 H). ESI-MS (m/z): 927,39 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Ví dụ 13:

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-6-(hydroxymetyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9-iodo-7-((4-metoxymetyl)oxy)-6-metylnon-8-en-4-on (hợp chất có công thức **C-5**)



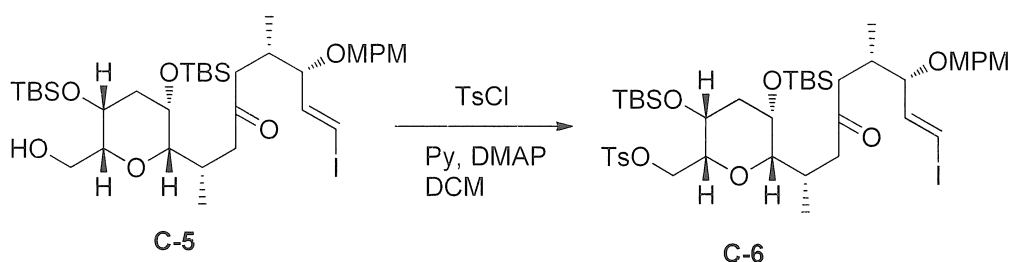
Dung dịch chứa hợp chất có công thức **C-4**: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-6-(((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9-iodo-7-((4-metoxymetyl)oxy)-6-metylnon-8-en-4-on (600mg, 0,66mmol) được mô tả trong Ví dụ 12 trong THF (5,0ml), IPA (5,0ml) và t-BuOH (5,0ml) ở nhiệt độ 4°C được cho thêm axit (1S)-(+)-10-Camphorsulfonic (154mg, 0,66mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 4°C trong 20 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng EtOAc và tôi bằng dung dịch NaHCO_3 bão hòa, sau đó các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng EtOAc. Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 35% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **C-5**, 500mg, hiệu suất 95%).

^1H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,01 (s, 3 H) 0,04 (s, 3 H) 0,07 (s, 3 H) 0,11 (s, 3 H) 0,86 - 0,91 (m, 15 H) 0,93 (s, 9 H) 1,83 (dt, $J=14,9, 4,8$ Hz, 1 H) 1,93 -

2,00 (dt, $J=14,9, 4,8$ Hz, 1 H) 2,19 - 2,26 (m, 1 H) 2,29 (dd, $J=14,9, 5,6$ Hz, 1 H) 2,39 (dd, $J=16,6, 8,3$ Hz, 1 H) 2,44 - 2,66 (m, 4 H) 2,91 (dd, $J=9,5, 1,7$ Hz, 1 H) 3,36 - 3,41 (m, 1 H) 3,48 (td, $J=11,3, 2,7$ Hz, 1 H) 3,59 (t, $J=7,1$ Hz, 1 H) 3,74 - 3,78 (m, 2 H) 3,80 (s, 3 H) 3,85 (m, 1 H) 4,25 (d, $J=11,2$ Hz, 1 H) 4,46 (d, $J=11,2$ Hz, 1 H) 6,28 (d, $J=14,6$ Hz, 1 H) 6,43 (dd, $J=14,6, 7,8$ Hz, 1 H) 6,87 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H) 7,21 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H). ESI-MS (m/z): 813,30 $[M+Na]^+$

Ví dụ 14:

((2R,3R,5S,6S)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-((2S,6S,7S,E)-9-iodo-7-((4-methoxybenzyl)oxy)-6-methyl-4-oxonon-8-en-2-yl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl 4-methylbenzensulfonat (hợp chất có công thức **C-6**)



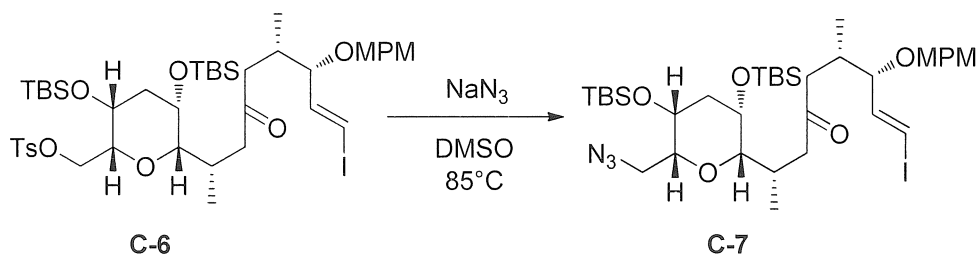
Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **C-5**: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9-iodo-7-((4-methoxybenzyl)oxy)-6-methylnon-8-en-4-on (500mg, 0,63mmol) được mô tả trong Ví dụ 13 trong DCM (10ml) ở nhiệt độ 5°C được cho thêm pyridin (2,54ml, 31,6mmol), *p*-toluensulfonyl clorua (723mg, 3,79mmol) và 4-dimethylaminopyridin (77mg, 0,63mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. *p*-Toluensulfonyl clorua (150mg, 0,79mmol) được cho thêm vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 8 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng DCM và tôi bằng dung dịch NaHCO_3 bão hòa, sau đó các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng DCM. Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô bằng Na_2SO_4 , được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 25% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **C-6**, 560mg, hiệu suất 94%).

^1H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,01 (s, 3 H) 0,04 (s, 3 H) 0,04 (s, 3 H) 0,08 (s, 3 H) 0,81 (d, $J=6,8$ Hz, 3 H) 0,83 (s, 9 H) 0,86 (d, $J=6,8$ Hz, 3 H) 0,89 (s, 9 H) 1,81 (dt, $J=14,9, 4,5$ Hz, 1 H) 1,91 - 1,96 (m, 1 H) 2,15 - 2,32 (m, 3 H) 2,36 - 2,42 (m, 1 H) 2,43 (s, 3 H) 2,57 (d, $J=12,7$ Hz, 1 H) 2,77 (dd, $J=16,6, 3,4$ Hz, 1 H) 2,87 (dd, $J=9,0,$

1,7 Hz, 1 H) 3,53 - 3,58 (m, 2 H) 3,70 - 3,75 (m, 1 H) 3,80 - 3,85 (m, 1H) 3,81 (s, 3 H) 4,06 (dd, J=10,0, 5,0 Hz, 1 H) 4,08 - 4,16 (m, 1 H) 4,28 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 4,51 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 6,30 (d, J=14,6 Hz, 1 H) 6,45 (dd, J=14,6, 7,8 Hz, 1 H) 6,88 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,24 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,31 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,76 (d, J=8,3 Hz, 2 H).

Ví dụ 15:

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(azidometyl)-3,5-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy) tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9-iodo-7-((4-metoxymetyl)oxy)-6-metylnon-8-en-4-on (hợp chất có công thức C-7)



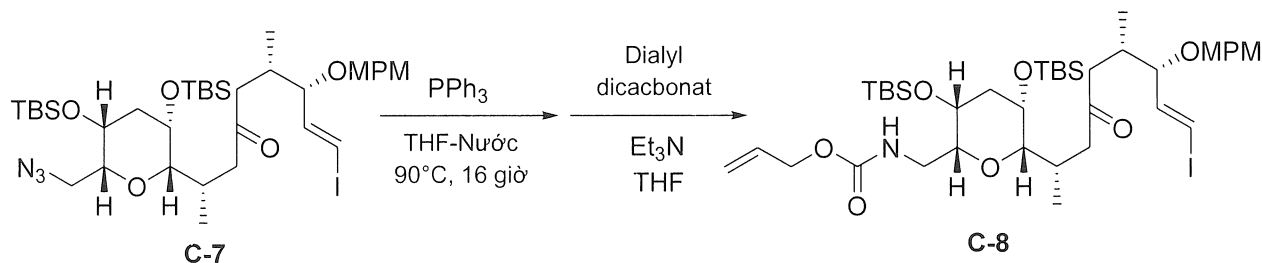
Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **C-6**: ((2R,3R,5S,6S)-3,5-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-6-((2S,6S,7S,E)-9-iodo-7-((4-metoxymetyl)oxy)-6-metyl-4-oxonon-8-en-2-yl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)metyl 4-metylbenzensulfonat (560mg, 0,59mmol) được mô tả trong Ví dụ 14 trong DMSO (5,6ml) ở nhiệt độ 20°C được cho thêm natri azit (385mg, 5,92mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 85°C. Sau 2 giờ, natri azit (100mg, 1,54mmol) được cho thêm vào hỗn hợp phản ứng, sau đó hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ 85°C trong 14 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng EtOAc và tôi bằng H₂O, sau đó các lớp được tách ra. Các chất chiết hữu cơ được rửa lần lượt bằng nước và nước muối. Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng Na₂SO₄, được lọc và cô dưới áp suất giảm để thu được phần cặn thô. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 15% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **C-7**, 298mg, hiệu suất 62%).

¹H NMR (500 MHz, CLOROFOM-*d*) δ ppm 0,03 (s, 3 H) 0,06 (s, 3 H) 0,07 (s, 3 H) 0,10 (s, 3 H) 0,84 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 0,85 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 0,91 (s, 9 H) 0,92 (s, 9 H) 1,86 (dt, J=15,0, 4,7 Hz, 1 H) 1,98 (dt, J=15,0, 2,9 Hz, 1 H) 2,19 - 2,32 (m, 3 H) 2,41 - 2,49 (m, 1 H) 2,58 (d, J=12,7 Hz, 1 H) 2,94 (dd, J=16,6, 2,9 Hz, 1 H) 2,98 (dd, J=8,8, 2,0 Hz, 1 H) 3,02 (dd, J=12,7, 2,9 Hz, 1 H) 3,47 (dt, J=8,8, 2,7 Hz, 1 H) 3,49 - 3,54 (m, 1 H) 3,63 (dd, J=12,7, 8,8 Hz, 1 H) 3,69 - 3,73 (m, 1 H) 3,81 (s, 3H) 3,83 - 3,88 (m, 1 H) 4,26 (d, J=11,7 Hz, 1 H) 4,50 (d, J=11,7 Hz, 1 H) 6,26 (d, J=14,6 Hz, 1 H) 6,42 (dd, J=14,6,

7,8 Hz, 1 H) 6,87 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,22 (d, J=8,8 Hz, 2 H).

Ví dụ 16:

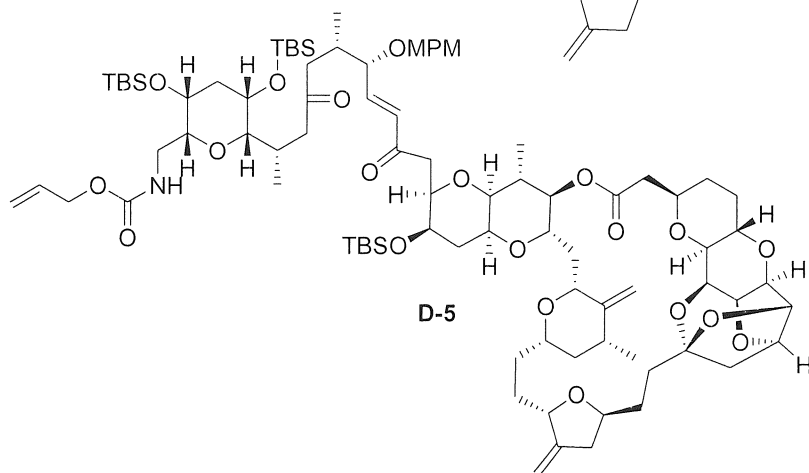
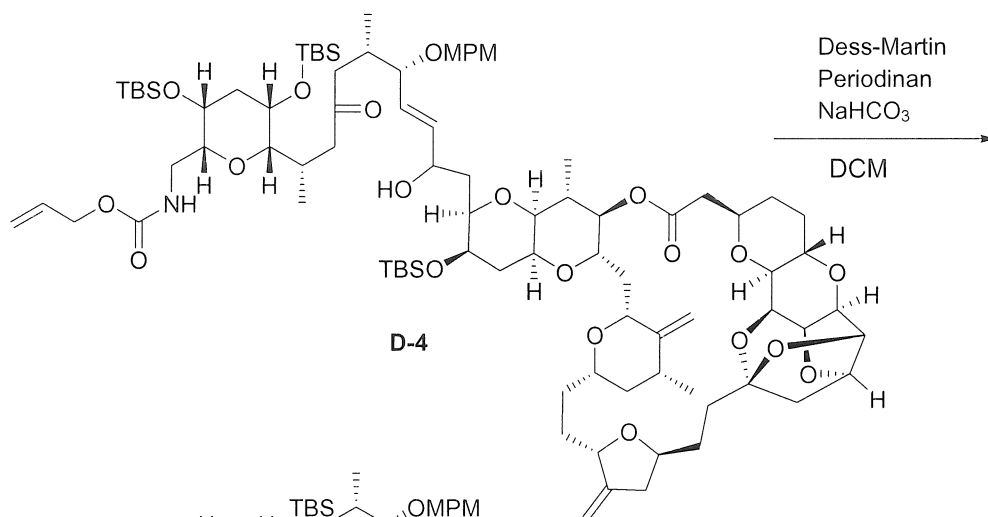
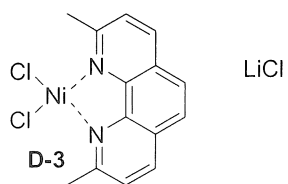
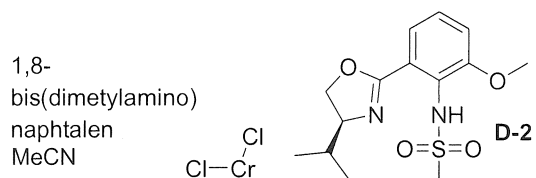
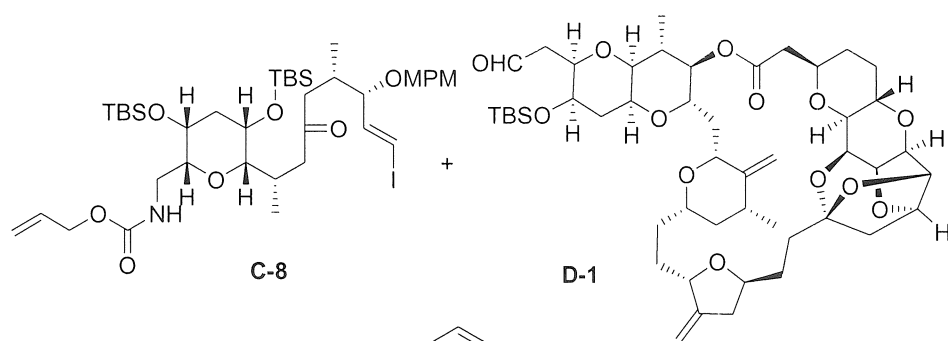
((((2R,3R,5S,6S)-3,5-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-6-((2S,6S,7S,E)-9-iodo-7-((4-metoxymethyl)oxy)-6-metyl-4-oxonon-8-en-2-yl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)metyl) carbamat (hợp chất có công thức **C-8**)

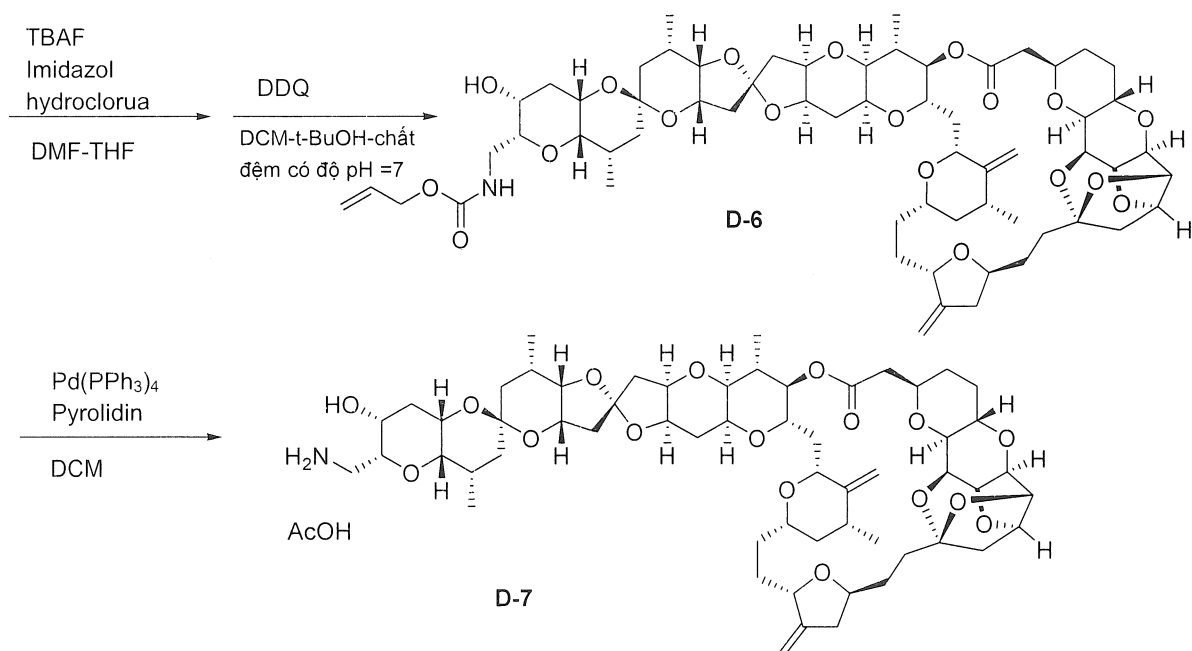


Dung dịch chứa hợp chất có công thức **C-7**: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(azidometyl)-3,5-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9-iodo-7-((4-metoxymethyl)oxy)-6-metylnon-8-en-4-on (298mg, 0,37mmol) được mô tả trong Ví dụ 15 trong THF (10ml) và nước (1,0ml) ở nhiệt độ 20°C được cho thêm triphenylphosphin (1437mg, 5,478mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 70°C trong 1,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được cô dưới áp suất giảm để thu được amin thô. Dung dịch chứa amin thô thu được trên đây trong THF (10ml) ở nhiệt độ 5°C được cho thêm Et₃N (0,51ml, 3,66mmol) và diallyl dicacbonat (341mg, 1,83mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Hỗn hợp phản ứng được cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 0% đến 25% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **C-8**, 300mg, hiệu suất 94%).

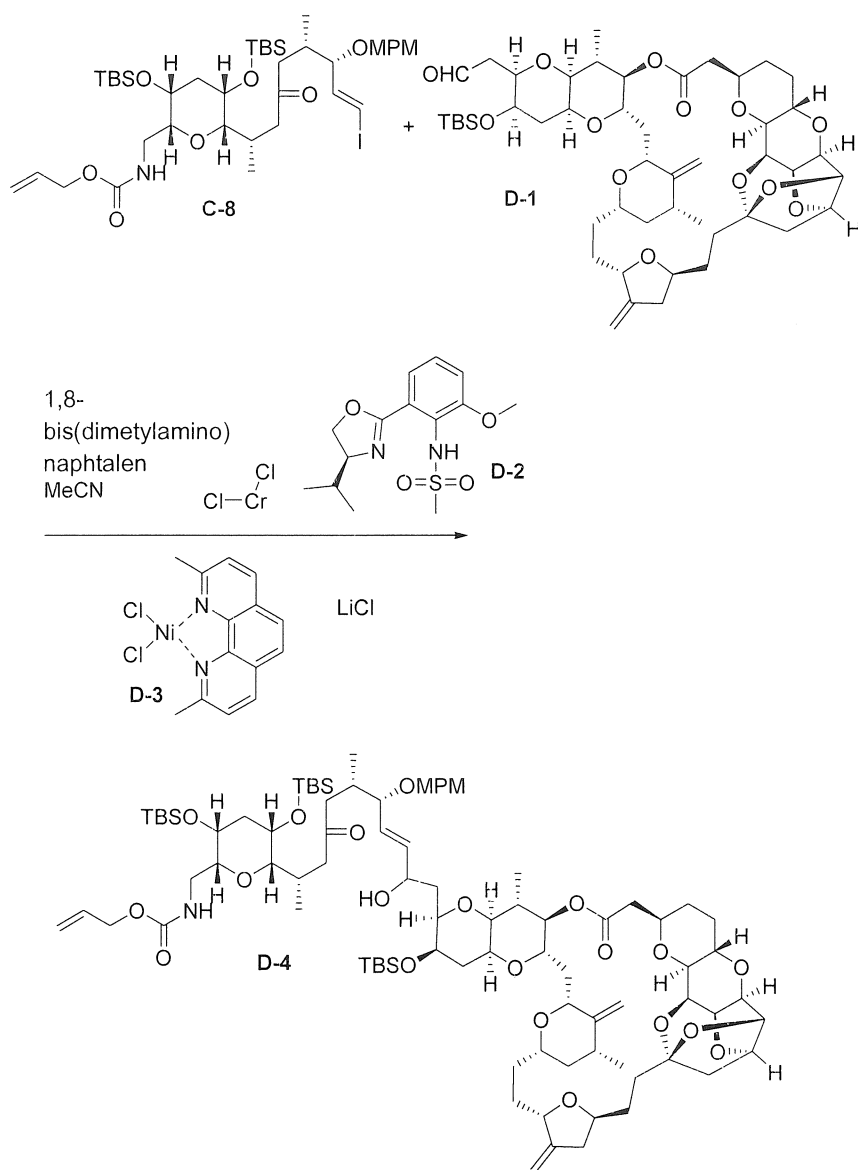
¹H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,05 - 0,07 (m, 9 H) 0,11 (s, 3 H) 0,85 (d, J=6,3 Hz, 3 H) 0,87 (d, J=6,3 Hz, 3 H) 0,90 (s, 9 H) 0,93 (s, 9 H) 1,80 (dt, J=15,0, 4,4 Hz, 1 H) 1,96 (dt, J=15,0, 2,8 Hz, 1 H) 2,16 - 2,29 (m, 2 H) 2,32 - 2,39 (m, 1 H) 2,53 - 2,60 (m, 3 H) 2,86 (d, J=7,3 Hz, 1 H) 3,04 - 3,11 (m, 1 H) 3,30 - 3,34 (m, 1 H) 3,38 - 3,48 (m, 1 H) 3,58 (t, J=7,1 Hz, 1 H) 3,70 - 3,76 (m, 1 H) 3,80 (s, 3 H) 3,81 - 3,84 (m, 1 H) 4,25 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 4,46 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 4,53 - 4,63 (m, 2 H) 5,19 (dd, J=10,7, 1,5 Hz, 1 H) 5,32 (d, J=17,1 Hz, 1 H) 5,47 (d, J=6,8 Hz, 1 H) 5,88 - 5,99 (m, 1 H) 6,28 (d, J=14,6 Hz, 1 H) 6,43 (dd, J=14,6, 7,8 Hz, 1 H) 6,87 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,21 (d, J=8,8 Hz, 2 H). ESI-MS (m/z): 896,34 [M+Na]⁺

Sơ đồ D; Điều chế hợp chất có công thức D-7



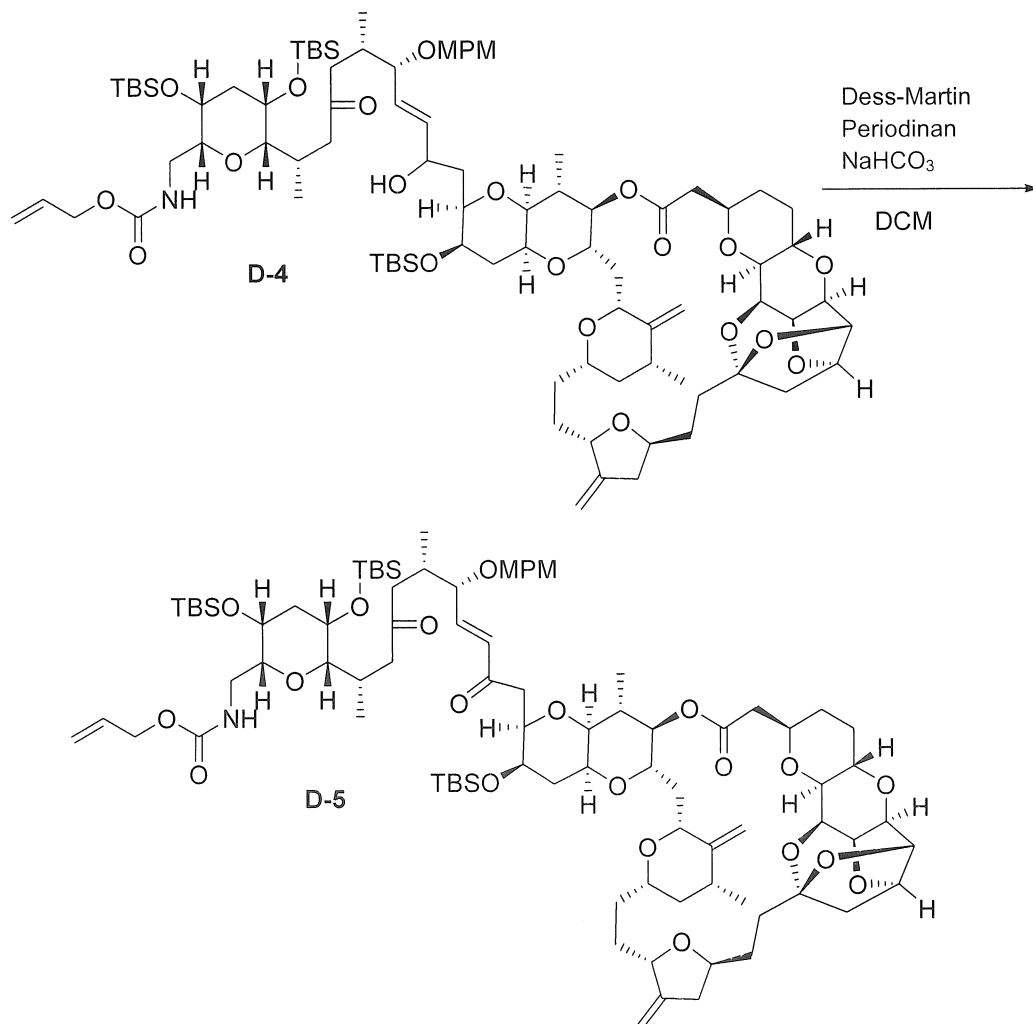


Ví dụ 17: Hợp chất có công thức D-4



Trong môi trường nito (trong hộp găng tay), dung dịch chứa hợp chất có công thức **D-2**: (S)-N-(2-(4-isopropyl-4,5-dihydrooxazol-2-yl)-6-metoxyphenyl) metansulfonamit (155mg, 0,497mmol) thu được bằng phương pháp theo tài liệu Organic Letters (2002), 4 (25), 4431-4434 (CAS No; 546141-34-8) và 1,8-bis(dimethylamino)naphtalen (107mg, 0,497mmol) trong MeCN (0,75ml) được cho thêm crom(II) clorua (55,5mg, 0,452mmol) và sau đó hỗn hợp tạo thành được khuấy trong hộp găng tay ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch màu xanh lá cây tạo thành được cho thêm vào hỗn hợp chứa hợp chất có công thức **C-8**: alyl (((2R,3R,5S,6S)-3,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-((2S,6S,7S,E)-9-iodo-7-((4-metoxybenzyl)oxy)-6-metyl-4-oxonon-8-en-2-yl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)metyl) carbamat (99,0mg, 0,113mmol) được mô tả trong Ví dụ 16, hợp chất có công thức **D-1** (80,0mg, 0,09mmol) thu được bằng phương pháp theo tài liệu: *Journal of the American Chemical Society* (1992), 114 (8), 3162-3164 (CAS No; 157322-23-1), hợp chất có công thức **D-3**: diclo(2,9-dimetyl-1,10-phenanthrolin)niken (0,46mg, 1,36 μ mol) thu được bằng phương pháp theo tài liệu: *Journal of the American Chemical Society* (2009), 131(42), 15387 - 15393 (CAS No; 21361-04-6) và lithi clorua (3,83mg, 0,09mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong hộp găng tay ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được lấy ra khỏi hộp găng tay, pha loãng bằng ete dietyl-EtOAc (5,0ml - 5,0ml), tiếp đó Florisil[®] (1600mg, 15,94mmol) (CAS No; 1343-88-0) được cho thêm vào hỗn hợp này. Sau đó, hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp này được lọc (Celite[®]), rửa bằng EtOAc/heptan = 2/1, sau đó phần nước lọc được cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel bằng cách sử dụng 3% đến 55% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **D-4**, 140mg, hiệu suất 95%).

Ví dụ 18: Hợp chất có công thức **D-5**

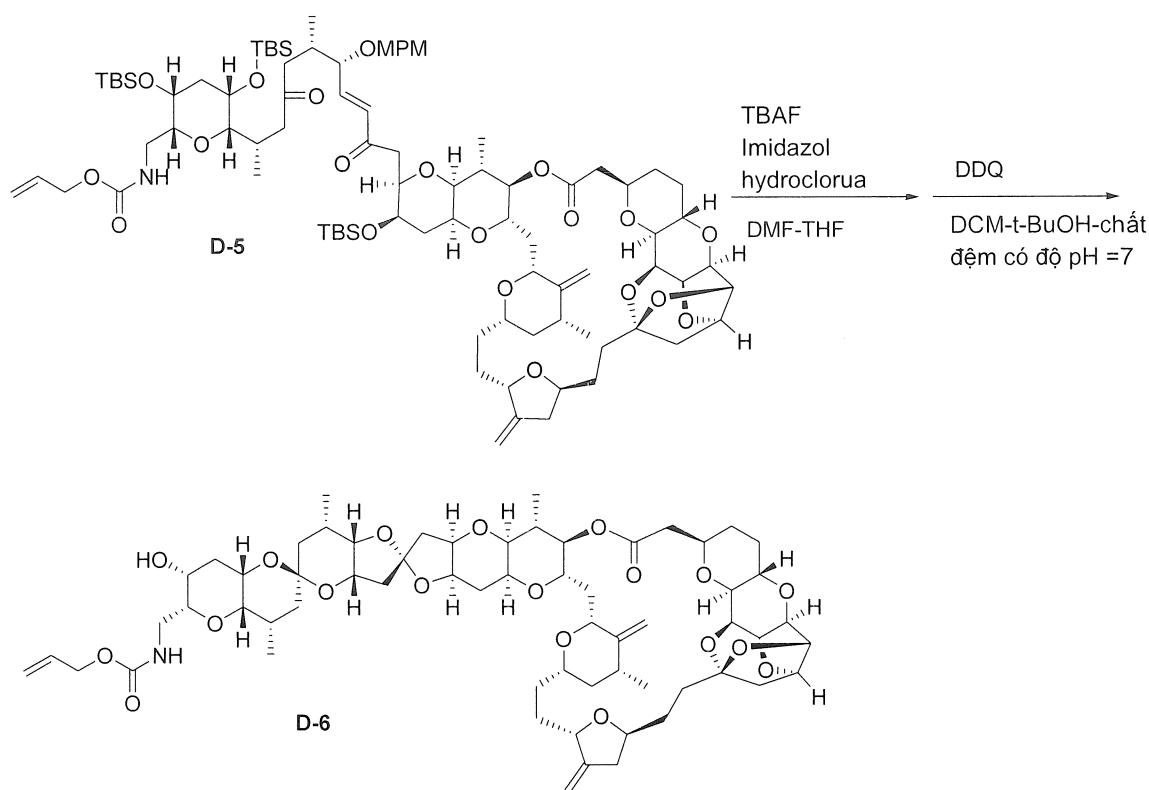


Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **D-4** (140mg, 0,09mmol) được mô tả trong Ví dụ 17 trong DCM (5,0ml) ở nhiệt độ 5°C được cho thêm NaHCO₃ (28,8mg, 0,34mmol) và Dess-Martin periodinane (72,7mg, 0,17mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng DCM và tôi bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa và dung dịch Na₂SO₃ bão hòa, và sau đó các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng DCM. Các chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô bằng Na₂SO₄, được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cận này trên silicagel bằng cách sử dụng 2% đến 60% EtOAc/heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **D-5**, 120mg, 86%).

¹H NMR (500 MHz, BENZENE-*d*₆) δ ppm 0,01 - 0,05 (m, 9 H) 0,10 - 0,12 (m, 6 H) 0,15 (s, 3 H) 0,76 (d, J=6,1 Hz, 3 H) 0,96 (s, 9 H) 1,02 (s, 9 H) 1,04 (s, 9 H) 0,95 - 1,10 (m, 7H) 1,20 (d, J=7,3 Hz, 3 H) 1,31 - 1,37 (m, 3 H) 1,41 (dd, J=12,8, 4,9 Hz, 1 H) 1,40 - 1,58 (m, 4 H) 1,59 - 1,64 (m, 1 H) 1,69 - 1,89 (m, 3H) 1,90 - 1,99 (m, 2 H) 2,02 - 2,25 (m, 8 H) 2,26 - 2,48 (m, 6 H) 2,49 - 2,70 (m, 6 H) 2,71 - 2,84 (m, 2 H) 3,00 - 3,07

(m, 1 H) 3,12 - 3,30 (m, 4 H) 3,36 (s, 3 H) 3,40 (br.s, 1 H) 3,44 - 3,53 (m, 2 H) 3,65 (dd, J=6,4, 4,0 Hz, 1 H) 3,69 - 3,84 (m, 4H) 3,86 - 4,03 (m, 4H) 4,07 - 4,17 (m, 3 H) 4,27 - 4,29 (m, 1H) 4,27 (d, J=11,0 Hz, 1H) 4,48 - 4,58 (m, 1 H) 4,49 (d, J=11,0 Hz, 1H) 4,65 - 4,70 (m, 2 H) 4,68 (d, J=5,5 Hz, 1H) 4,74 - 4,86 (m, 2H) 4,78 (s, 1H) 4,93 (s, 1 H) 5,05 (d, J=10,4 Hz, 1 H) 5,09 (br. s., 1 H) 5,19 (br. s., 1 H) 5,30 (dd, J=17,1, 1,2 Hz, 1 H) 5,82 (d, J=8,0 Hz, 1 H) 5,86 - 5,96 (m, 1 H) 6,46 (d, J=15,9 Hz, 1 H) 6,84 - 6,92 (m, 3 H) 7,31 (d, J=8,6 Hz, 2 H).

Ví dụ 19: Hợp chất có công thức **D-6**



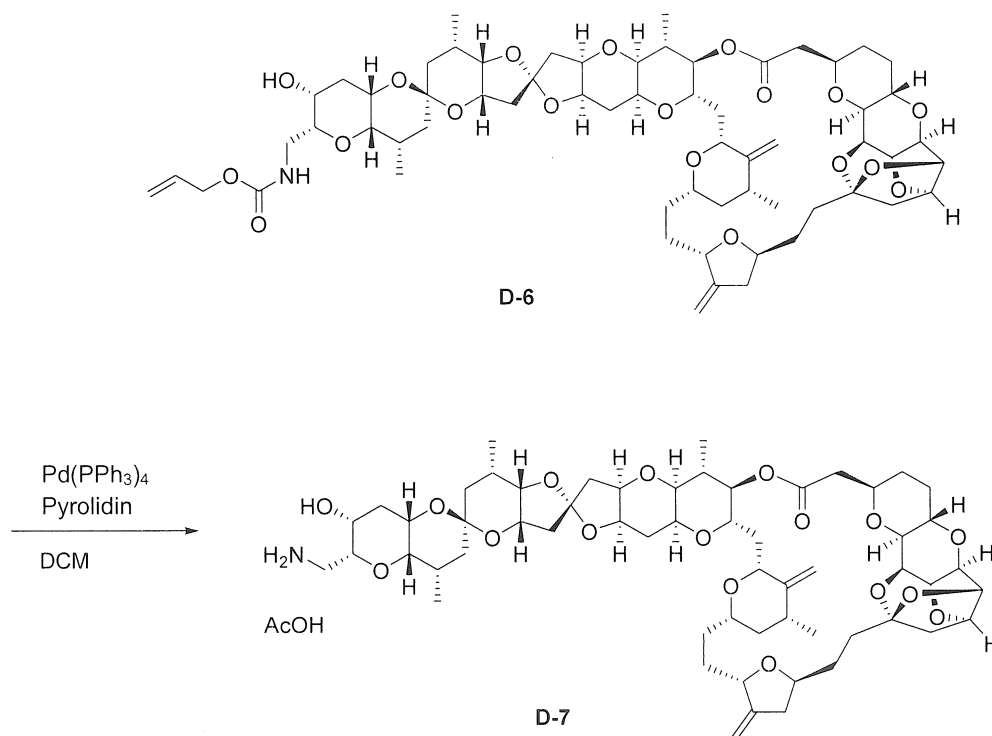
Imidazol hydrochlorua (155mg, 1,48mmol) được hòa tan trong DMF (2,9ml) để thu được dung dịch imidazol hydrochlorua 0,5M trong DMF. 1,0ml dung dịch này được trộn với 1,0ml TBAF (1,0M, dung dịch THF) để thu được dung dịch đã trộn sơ bộ của TBAF 0,5M và imidazol hydrochlorua 0,25M trong THF-DMF (1:1). Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **D-5** (80,0mg, 0,05mmol) được mô tả trong Ví dụ 18 trong DMF (7,0ml) ở nhiệt độ 20°C được cho thêm 0,588ml dung dịch đã trộn sơ bộ của TBAF (0,5M) và imidazol hydrochlorua (0,25M) trong THF-DMF (1:1) điều chế được trên đây. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 14 giờ. 1,6g CaCO₃ và 4,0g Dowex[®] 50WX8 (dạng hydro, rây cỡ 200-400, SIGMA-ALDRICH) được cho thêm vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau đó, hỗn hợp này được pha loãng bằng EtOAc, tiếp đó được lọc (Celite[®]), rửa

bằng EtOAc. Phần nước lọc được cô dưới áp suất giảm để thu được phần cặn thô. 1000mg CaCO₃ và 2,25g Dowex[®] 50WX8 được cho thêm vào dung dịch EtOAc (6,0ml) chứa phần cặn thô. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2,5 giờ. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng bằng EtOAc, được lọc (Celite[®]), rửa bằng EtOAc. Phần nước lọc được cô dưới áp suất giảm để thu được phần cặn thô (63,0mg). Dung dịch chứa phần cặn thô (63,0mg) thu được trên đây trong DCM (6,0ml), t-BuOH (0,6ml) và dung dịch đệm phosphat độ pH = 7 (0,6ml, 1/15M) ở nhiệt độ trong phòng được cho thêm DDQ (111mg, 0,49mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 45 phút. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa, sau đó pha loãng bằng DCM và các lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng DCM (3 lần). Các chất chiết hữu cơ kết hợp được làm khô bằng Na₂SO₄, được lọc và cô dưới áp suất giảm. Sắc ký nhanh phần cặn này trên silicagel NH bằng cách sử dụng 10% đến 100% EtOAc/heptan, sau đó sử dụng 10% MeOH/ EtOAc thu được hợp chất nêu ở đề mục này gần như tinh khiết (hợp chất có công thức **D-6**, 15,0mg, 27%).

¹H NMR (500 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 0,97 (d, J=7,0 Hz, 3 H) 0,97 (d, J=7,0 Hz, 3 H) 1,00 - 1,02 (m, 1 H) 1,05 (d, J=7,3 Hz, 3 H) 1,09 (d, J=6,3 Hz, 3 H) 1,31 - 1,45 (m, 6H) 1,46 - 1,63 (m, 5H) 1,64 - 1,75 (m, 3 H) 1,80 - 1,86 (m, 2 H) 1,87 - 1,93 (m, 2 H) 1,94 - 2,11 (m, 9H) 2,13 - 2,27 (m, 8H) 2,33 (d, J=2,4 Hz, 2 H) 2,39 (dd, J=13,4, 6,1 Hz, 1 H) 2,44 (dd, J=17,6, 2,0 Hz, 1 H) 2,55 (dd, J=17,6, 9,3 Hz, 1 H) 2,75 - 2,84 (m, 1 H) 2,97 (dd, J=9,3, 2,0 Hz, 1 H) 3,21 (dd, J=6,6, 4,6 Hz, 1 H) 3,32 (m, 1 H) 3,41 - 3,46 (m, 1 H) 3,57 (br. s., 1 H) 3,60 (d, J=11,7 Hz, 1 H) 3,67 - 3,74 (m, 2 H) 3,78 (br. s., 1 H) 3,86 - 3,90 (m, 2 H) 3,97 (d, J=2,4 Hz, 1 H) 4,02 - 4,11 (m, 4 H) 4,17 (dd, J=6,6, 4,6 Hz, 1 H) 4,23 (dd, J=11,5, 2,2 Hz, 1 H) 4,29 (br.s, 1 H) 4,31 (td, J=9,3, 3,9 Hz, 1 H) 4,44 (d, J=10,2 Hz, 1 H) 4,51 (d, J=5,4 Hz, 2 H) 4,59 (t, J=4,9 Hz, 1 H) 4,61 (dd, J=7,3, 4,9 Hz, 1 H) 4,69 (t, J=4,6 Hz, 1 H) 4,80 (s, 1 H) 4,85 - 4,87 (m, 1 H) 5,01 (s, 1 H) 5,05 (s, 1 H) 5,16 (dd, J=10,7, 1,0 Hz, 1 H) 5,28 (dd, J=17,1, 2,0 Hz, 1 H) 5,92 (m, 1 H). ESI-MS (m/z): 1172,57 [M+Na]⁺

Ví dụ 20:

Hợp chất có công thức **D-7**



Trong môi trường nitơ, dung dịch chứa hợp chất có công thức **D-6** (15,0mg, 0,013mmol) được mô tả trong Ví dụ 19, pyrolidin (10,8μl, 0,13mmol) trong DCM (2,0ml) ở nhiệt độ trong phòng được cho thêm tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) (7,53mg, 6,52μmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng này được cô dưới áp suất giảm. Tinh chế nhanh phân cận trên silicagel NH bằng cách sử dụng 50% EtOAc/heptan, sau đó sử dụng 0% đến 20% MeOH/EtOAc để thu được sản phẩm gần như tinh khiết. Sản phẩm gần như tinh khiết thu được được tinh chế bằng phương pháp HPLC để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (hợp chất có công thức **D-7**, 7,0mg, 47%, thời gian duy trì = 13,8 phút).

Các điều kiện HPLC:

Cột: YMC Pak Pro C18 (20mm × 250mm)

Chiều dài bước sóng phát hiện: 200nm

Nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng

Pha động: MeCN-nước (AcOH 0,05%)

Tốc độ dòng: 8ml/phút

Dung dịch rửa giải:

MeCN/nước 25% (iso, 2 phút), sau đó

MeCN/nước từ 25% đến 60% (Gradien, 20 phút)

^1H NMR (500 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 0,99 (d, $J=6,7$ Hz, 3 H) 1,00 - 1,03 (m, 1 H) 1,04 (d, $J=7,3$ Hz, 3 H) 1,06 (d, $J=7,3$ Hz, 3 H) 1,10 (d, $J=6,1$ Hz, 3 H) 1,29 - 1,63 (m, 10 H) 1,65 - 1,78 (m, 3 H) 1,79 - 1,89 (m, 2 H) 1,92 - 2,12 (m, 10 H) 1,93 (s, 3 H) 2,13 - 2,36 (m, 9 H) 2,41 (dd, $J=13,5$, 6,1 Hz, 1 H) 2,45 (dd, $J=17,6$, 2,2 Hz, 1 H) 2,56 (dd, $J=17,6$, 9,8 Hz, 1 H) 2,75 - 2,84 (m, 1 H) 2,98 (dd, $J=9,8$, 1,8 Hz, 1 H) 3,12 (dd, $J=12,8$, 3,7 Hz, 1 H) 3,22 (dd, $J=6,4$, 4,6 Hz, 1 H) 3,26 (dd, $J=13,2$, 7,8 Hz, 1 H) 3,39 (d, $J=1,8$ Hz, 1 H) 3,61 (d, $J=12,8$ Hz, 1 H) 3,63 - 3,68 (m, 2 H) 3,68 - 3,76 (m, 2 H) 3,81 - 3,94 (m, 3 H) 4,00 (d, $J=2,5$ Hz, 1 H) 4,03 - 4,15 (m, 4 H) 4,18 (dd, $J=6,4$, 4,6 Hz, 1 H) 4,25 (ddd, $J=11,0$, 4,3, 1,8 Hz, 1 H) 4,27 - 4,36 (m, 2 H) 4,46 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H) 4,57 - 4,65 (m, 2 H) 4,70 (t, $J=4,6$ Hz, 1 H) 4,81 (d, $J=1,2$ Hz, 1 H) 5,02 (br. s, 1 H) 5,06 (d, $J=1,8$ Hz, 1 H). ESI-MS (m/z): 1066,96 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1090,19 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Hợp chất có công thức (1) (dạng muối tự do của hợp chất có công thức **D-7**): ^1H NMR (600 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 0,98 (d, $J=7,2$ Hz, 3 H) 1,00 (d, $J=6,8$ Hz, 3 H) 1,02 (m, 1 H) 1,05 (d, $J=6,8$ Hz, 3 H) 1,09 (d, $J=6,4$ Hz, 3 H) 1,28 - 1,45 (m, 5 H) 1,46 - 1,59 (m, 4 H) 1,57 - 1,63 (m, 1 H) 1,65 - 1,71 (m, 1 H) 1,70 - 1,75 (m, 2 H) 1,79 - 1,86 (m, 2 H) 1,91 (dt, $J=14,9$, 3,1 Hz, 1 H) 1,94 - 2,11 (m, 8 H) 2,14 - 2,34 (m, 9 H) 2,39 (dd, $J=13,2$, 6,0 Hz, 1 H) 2,44 (dd, $J=17,4$, 1,9 Hz, 1 H) 2,56 (dd, $J=17,6$, 9,6 Hz, 1 H) 2,69 (dd, $J=13,2$, 4,2 Hz, 1 H) 2,79 (ddq, $J=15,9$, 7,6, 2,0 Hz, 1 H) 2,92 (dd, $J=13,2$, 8,3 Hz, 1 H) 2,97 (dd, $J=9,6$, 1,7 Hz, 1 H) 3,21 (dd, $J=6,4$, 4,9 Hz, 1 H) 3,29 (m, 1 H) 3,34 (dd, $J=8,3$, 4,15 Hz, 1 H) 3,58 (br. s., 1 H) 3,60 (br.d, $J=11,3$ Hz, 1 H) 3,68 - 3,73 (m, 2 H) 3,80 (br. s., 1 H) 3,84 - 3,90 (m, 2 H) 3,98 (d, $J=2,3$ Hz, 1 H) 4,03 - 4,13 (m, 4 H) 4,17 (dd, $J=6,4$, 4,9 Hz, 1 H) 4,24 (ddd, $J=11,3$, 4,5, 1,5 Hz, 1 H) 4,29 (dd, $J=4,0$, 1,9 Hz, 1 H) 4,32 (td, $J=10,2$, 4,2 Hz, 1 H) 4,44 (br. d, $J=11,0$ Hz, 1 H) 4,59 (t, $J=4,5$ Hz, 1 H) 4,62 (dd, $J=7,4$, 4,7 Hz, 1 H) 4,69 (t, $J=4,7$ Hz, 1 H) 4,80 (br. s., 1 H) 4,87 (s, 1 H) 5,00 (br. s., 1 H) 5,05 (br.d, $J=1,1$ Hz, 1 H)

ESI-MS (m/z): 1066,57 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1088,55 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Các ví dụ thử nghiệm được lý

Thông tin chung

Các hợp chất Halichondrin tự nhiên và các hợp chất được cải biến của chúng là đã biết trong các tài liệu chuyên ngành (ví dụ, xem tài liệu: D. Uemura *et al.* “Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge” *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985); Marc Litaudon *et al.* “Antitumor Polyether Macrolides: New and Hemisynthetic Halichondrins from the New Zealand Deep-Water Sponge *Lissodendoryx* sp.” *J. Org. Chem.*, 1997, 62, 1868-1871). Tuy nhiên, phần lớn hợp chất

trong số chúng không có sẵn trên thị trường. Ví dụ, Tiến sĩ Uemura và các đồng tác đã phân lập 12,5mg Halichondrin B, 35,0mg norhalichondrin A và 17,2mg homohalichondrin A tối đa từ 600kg *Halichondria okadai* Kadota (ví dụ, xem tài liệu: D. Uemura *et al.* “Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge” *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985)). Trong số các hợp chất Halichondrin tự nhiên, Halichondrin B có hoạt tính kháng u mạnh nhất đối với các tế bào u melanin *in vitro* và có hoạt tính ở mức cao đối với bệnh bạch cầu L-1210 *in vivo* (ví dụ, xem tài liệu: D. Uemura *et al.* “Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge” *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985)). Halichondrin C cũng có hoạt tính trong nhiều mô hình *in vivo* khác nhau nhưng không bền trong dung dịch nước so với Halichondrin B. Norhalichondrin B có hoạt tính yếu hơn nhiều so với Halichondrin B không chỉ *in vitro* mà còn cả *in vivo*, ví dụ, xem tài liệu: D. Uemura *et al.* “Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge” *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985)). Các thử nghiệm được lý sau đây sử dụng Halichondrin B (Hali-B) làm hợp chất tham chiếu, nếu cần.

Ví dụ thử nghiệm được lý 1. Thử nghiệm ức chế sự phát triển của tế bào FaDu

Trong thử nghiệm này, hoạt tính ức chế sự phát triển của các hợp chất thử nghiệm trong dòng tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) của người FaDu được xác định. Các tế bào FaDu được duy trì trong môi trường RPMI-1640 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 187-02021) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS: Nichirei, 12D168), và penicillin và streptomycin trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Cho 75μl hỗn dịch tế bào FaDu được điều chỉnh đến nồng độ 4×10⁴ tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ (Becton, Dickinson and Company, 353219), và các tế bào này được ủ qua đêm trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Vào ngày tiếp theo, 25μl hợp chất có công thức (1) hoặc Halichondrin B trong các hệ pha loãng ba lần được tạo hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy được cho thêm vào mỗi lỗ, và sản phẩm tạo thành được ủ trong 3 ngày trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Sau đó, khả năng sống của tế bào được xác định bằng thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo® (Promega) với thiết bị đọc EnVision 2103 Multilabel (Perkin–Elmer, Wellesley, MA). Giá trị của các lỗ chứa tế bào mà không cho thêm hợp chất thử nghiệm được xác định là 100% và giá trị của các lỗ không chứa tế bào được xác định là 0%. Nồng độ cần thiết của hợp chất thử nghiệm để ức chế sự phát triển của tế bào 50% (nghĩa là giá trị IC₅₀) được tính toán và thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

	FaDu
Hợp chất thử nghiệm	(IC ₅₀ (nM))
Halichondrin B	0,124
Hợp chất có công thức (1)	0,0714

Ví dụ thử nghiệm được lý 2. Thử nghiệm ức chế sự phát triển của tế bào MDA-MB231

Trong thử nghiệm này, hoạt tính ức chế sự phát triển của hợp chất thử nghiệm với dòng tế bào ung thư vú ở người MDA-MB231 được xác định. Các tế bào MDA-MB231 được duy trì trong môi trường Eagle được cải biến bởi Dulbecco (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 044-29765) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS: Nichirei, 12D168), và penicillin và streptomycin trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Cho 75µl hỗn dịch tế bào MDA-MB231 được điều chỉnh đến nồng độ 4×10⁴ tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ (Becton, Dickinson and Company, 353219), và các tế bào này được ủ qua đêm trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Vào ngày tiếp theo, 25µl hợp chất có công thức (1) hoặc Halichondrin B trong các hệ pha loãng ba lần được tạo hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy được cho thêm vào mỗi lỗ, và sản phẩm tạo thành được ủ trong 3 ngày trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Sau đó, khả năng sống của tế bào được xác định bằng thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo[®] (Promega) với thiết bị đọc EnVision 2103 Multilabel (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Giá trị của các lỗ chứa tế bào mà không cho thêm hợp chất thử nghiệm được xác định là 100% và giá trị của các lỗ không chứa tế bào được xác định là 0%. Nồng độ của hợp chất thử nghiệm cần thiết để ức chế sự phát triển của tế bào 50% (nghĩa là giá trị IC₅₀) được tính toán và được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

	MDA-MB231
Hợp chất thử nghiệm	(IC ₅₀ (nM))
Halichondrin B	1,000
Hợp chất có công thức (1)	0,109

Ví dụ thử nghiệm được lý 3. Thử nghiệm ức chế sự phát triển của tế bào HCC1954

Trong thử nghiệm này, hoạt tính ức chế sự phát triển của các hợp chất thử nghiệm trong dòng tế bào ung thư vú ở người HCC1954 được xác định. Các tế bào HCC1954 được duy trì trong môi trường RPMI-1640 được cải biến để chứa L-glutamin 2mM,

HEPES 10mM, natri pyruvat 1mM, glucoza 4500 mg/l, và natri bicarbonat 1500 mg/l (ATCC 30-2001) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS: Nichirei, 12D168), và penicillin và streptomycin trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Cho 75μl hỗn dịch tế bào HCC1954 được điều chỉnh đến nồng độ 4×10^4 tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ (Becton, Dickinson and Company, 353219), và các tế bào này được ủ qua đêm trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Vào ngày tiếp theo, 25μl hợp chất có công thức (1) hoặc Halichondrin B trong các hệ pha loãng ba lần được tạo hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy được cho thêm vào mỗi lỗ, và sản phẩm tạo thành được ủ trong 3 ngày trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Sau đó, khả năng sống của tế bào được xác định bằng thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo[®] (Promega) với thiết bị đọc EnVision 2103 Multilabel (Perkin–Elmer, Wellesley, MA). Giá trị của các lỗ chứa tế bào mà không cho thêm hợp chất thử nghiệm được xác định là 100% và giá trị của các lỗ không chứa tế bào được xác định là 0%. Nồng độ cần thiết của hợp chất thử nghiệm để ức chế sự phát triển của tế bào 50% (nghĩa là giá trị IC₅₀) được tính toán và được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

	HCC1954
Hợp chất thử nghiệm	(IC ₅₀ (nM))
Halichondrin B	0,154
Hợp chất có công thức (1)	0,0668

Ví dụ thử nghiệm được lý 4. Hiệu quả kháng u trong mô hình mô ghép khác loài tế bào FaDu dưới da ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn

Dòng tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) của người FaDu, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin và streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ $4,8 \times 10^7$ tế bào/ml bằng dung dịch nước muối cân bằng Hanks để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100μl vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 7 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan Inc.). 9 ngày sau khi cấy tế bào, đường kính ngắn nhất và đường kính dài nhất của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (calip DigimaticTM, Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo các công thức sau đây:

Thể tích khối u (mm³) = Đường kính dài nhất (mm) × Đường kính ngắn nhất (mm) × Đường kính ngắn nhất (mm)/2

Thể tích khối u tương đối (relative tumor volume: RTV) = Thể tích khối u (ngày X) / Thể tích khối u (ngày đầu tiên)

Mức độ thoái triển khối u (%) = $(1 - \text{RTV nhỏ nhất}) \times 100$

Dựa vào thể tích khối u thu được vào ngày sử dụng thứ nhất, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Mỗi hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Ngay trước khi sử dụng, dung dịch gốc được pha loãng trong nước muối với hydroxypropyl- β -cyclodextrin 100 μ M. Mỗi mẫu đánh giá được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều dung nạp tối đa (maximum tolerable dose: MTD). Thử nghiệm này được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 4 con được chia nhóm ngẫu nhiên. Mức độ thoái triển khối u (%) của mỗi hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

Hợp chất thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Mức độ thoái triển khối u (%)
Halichondrin B	0,05	0
Hợp chất có công thức (1)	0,2	43

Ví dụ thử nghiệm được lý 5. Hoạt tính kháng u đối với tế bào OSC-19 trong mô hình mô ghép khác loài dưới da ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn

Dòng tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) của người OSC-19, đã được nuôi cấy trong môi trường DMEM/Ham's F-12 (1:1) chứa FBS 10%, và penicillin và streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 1×10^8 tế bào/ml bằng PBS để tạo ra hỗn dịch tế bào, và hỗn dịch này được trộn với MatrigelTM (BD Bioscience, #366237) theo tỷ lệ 1:1 để tạo ra hỗn dịch tế bào với nồng độ 5×10^7 tế bào/ml. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100 μ l vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 5 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan, Inc.). 6 ngày sau khi cấy tế bào, đường kính ngắn nhất và đường kính dài nhất của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (calip DigimaticTM, Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo các công thức sau đây:

Thể tích khối u (mm^3) = Đường kính dài nhất (mm) $\times$ Đường kính ngắn nhất (mm) $\times$ Đường kính ngắn nhất (mm) / 2

Thể tích khối u tương đối (RTV) = Thể tích khối u (ngày X) / Thể tích khối u (ngày thứ nhất)

$$\text{Mức độ thoái triển khối u (\%)} = (1 - \text{RTV nhỏ nhất}) \times 100$$

Dựa vào thể tích khối u thu được vào ngày sử dụng thứ nhất, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm này được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 6 con. Hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong nước muối và được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều dùng nằm trong khoảng từ 0,06 mg/kg đến 0,18 mg/kg mỗi tuần một lần trong 2 tuần (Q7D×2 liệu trình). Mức độ thoái triển khối u (%) của mỗi liều dùng thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5

Hợp chất thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Mức độ thoái triển khối u (%)
Hợp chất có công thức (1)	0,06	59
Hợp chất có công thức (1)	0,18	90

Ví dụ thử nghiệm được lý 6. Hoạt tính kháng u đối với tế bào HCC1806 trong mô hình mô ghép khác loài dưới da ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn

Dòng tế bào ung thư vú của người HCC1806, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin và streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 1×10^8 tế bào/ml bằng PBS để tạo ra hỗn dịch tế bào, và hỗn dịch này được trộn với Matrigel™ (BD Bioscience, #366237) theo tỷ lệ 1:1 để tạo ra hỗn dịch tế bào với nồng độ 5×10^7 tế bào/ml. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100µl vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhất trần, 5 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan, Inc.). 12 ngày sau khi cấy tế bào, đường kính ngắn nhất và đường kính dài nhất của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (calip Digimatic™, Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo các công thức sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{Đường kính dài nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} / 2$$

$$\text{Thể tích khối u tương đối (RTV)} = \text{Thể tích khối u (ngày X)} / \text{Thể tích khối u (ngày thứ nhất)}$$

$$\text{Mức độ thoái triển khối u (\%)} = (1 - \text{RTV nhỏ nhất}) \times 100$$

Dựa vào thể tích khối u thu được vào ngày sử dụng thứ nhất, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm này được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 6 con. Hợp chất

thử nghiệm được hòa tan trong nước muối và được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều 0,18 mg/kg mỗi tuần một lần trong 2 tuần (Q7D×2 liệu trình). Mức độ thoái triển khối u (%) của hợp chất có công thức (1) được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Hợp chất thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Mức độ thoái triển khối u (%)
Hợp chất có công thức (1)	0,18	90

Ví dụ thử nghiệm được lý 7. Hiệu quả kháng u trong mô hình mô ghép khác loài tế bào FaDu dưới da kết hợp với cetuximab ở chuột

Dòng tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) của người FaDu, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin và streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 5×10^7 tế bào/ml bằng dung dịch nước muối cân bằng Hanks để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100µl vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trắng, 7 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan Inc.). 10 ngày sau khi cấy tế bào, đường kính ngắn nhất và đường kính dài nhất của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (calip Digimatic™, Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo các công thức sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{Đường kính dài nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} / 2$$

$$\text{Thể tích khối u tương đối (RTV)} = \text{Thể tích khối u (ngày X)} / \text{Thể tích khối u (ngày thứ nhất)}$$

$$\text{Mức độ thoái triển khối u vào ngày 35 (\%)} = (1 - \text{RTV vào ngày 35}) \times 100$$

Dựa vào thể tích khối u thu được vào ngày sử dụng thứ nhất, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Mỗi hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Ngay trước khi sử dụng, dung dịch gốc được pha loãng trong nước muối với hydroxypropyl-β-cyclodextrin 100µM. Mỗi hợp chất thử nghiệm được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều dùng nằm trong khoảng từ 1/4 MTD đến 1/2 MTD kết hợp với cetuximab (Erbix, Merck Serono Co., Ltd.). Thử nghiệm này được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 4 con được chia ngẫu nhiên. Mức độ thoái triển khối u vào ngày 35 (%) của mỗi hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7

Hợp chất thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Cetuximab (mg/kg)	Mức độ thoái triển khối u vào ngày 35 (%)
-	-	20	-242
Halichondrin B	0,0125	20	-38
	0,025	20	-2
Hợp chất có công thức (1)	0,05	20	38
	0,1	20	60

Ví dụ thử nghiệm được lý 8. Hoạt tính kháng u trong mô hình mô ghép khác loài tế bào KPL-4 dưới da kết hợp với trastuzumab ở chuột

Dòng tế bào ung thư vú dương tính với HER-2 của người KPL-4, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin và streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 1×10^8 tế bào/ml bằng dung dịch nước muối cân bằng Hanks để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100 μ l vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trắng, 7 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan, Inc.). 16 ngày sau khi cấy tế bào, đường kính ngắn nhất và đường kính dài nhất của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (Digimatic™ caliper, Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo các công thức sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{Đường kính dài nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} / 2$$

$$\text{Thể tích khối u tương đối (RTV)} = \text{Thể tích khối u (ngày X)} / \text{Thể tích khối u (ngày thứ nhất)}$$

$$\text{Mức độ thoái triển khối u (\%)} = (1 - \text{RTV nhỏ nhất}) \times 100$$

Dựa vào thể tích khối u thu được vào ngày sử dụng thứ nhất, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm này được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 6 con. Mỗi hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Ngay trước khi sử dụng, dung dịch gốc được pha loãng trong nước muối. Hợp chất thử nghiệm được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều 0,09 mg/kg hoặc 0,18 mg/kg kết hợp với trastuzumab (Herceptin, Genentech, Inc.). Mức độ thoái triển khối u của hợp chất có công thức (1) được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8

Hợp chất thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Trastuzumab (mg/kg)	Mức độ thoái triển khối u (%)
-	-	10	0
Hợp chất có công thức (1)	0,09	-	43
	0,09	10	83
	0,18	-	87
	0,18	10	100

Ví dụ thử nghiệm được lý 9. Hiệu quả đối với mạch dương tính với CD31 trong mô hình tế bào FaDu được cấy dưới da ở chuột

Dòng tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) của người FaDu, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin và streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 5×10^7 tế bào/ml bằng PBS để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100 μ l vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 7 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan, Inc.). 10 ngày sau khi cấy tế bào, hợp chất thử nghiệm trong nước muối với hydroxypropyl- β -cyclodextrin 100 μ M được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều dùng từ 1/2 MTD đến MTD. Thử nghiệm này được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 3 con. 5 ngày sau khi sử dụng, các khối u được lấy ra và được cố định bằng chất cố định IHC Zinc (BD Pharmingen) ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ. Các mô đã gắn trong parafin được cắt thành đoạn (3 μ m), được gắn trên các phiến kính có điện tích dương, và để khô trong không khí. Tiến hành nhuộm hóa mô miễn dịch CD31 bằng cách sử dụng thiết bị nhuộm tự động Ventana, model Discover XT (Roche Diagnostics) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các lát cắt được khử parafin hóa, xử lý và các kháng nguyên được thu hồi bằng CC1 (Ventana Medical Systems). Các phiến kính được phong bế bằng chất phong bế A và chất phong bế B (kit phong bế biotin nội sinh, Roche Diagnostics). Kháng thể của chuột nhắt kháng IgG CD31 của chuột thường (Dianova GmbH) được sử dụng với lượng 2 μ g/ml. Các lát cắt được ủ với kháng thể trong 6 giờ, sau đó ủ trong 32 phút với kháng thể kháng IgG của chuột nhắt được biotinyl hóa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) với lượng 2,2 μ g/ml. Việc phát hiện được thực hiện với Streptavidin-HRP D trong 16 phút, sau đó ủ với DAB D và DAB H₂O₂ D (kit DABMap, Ventana Medical Systems, Inc) trong 8 phút. Các phiến kính được nhuộm tương phản bằng Hematoxylin II (Roche Diagnostics) trong 16 phút, sau đó ủ với chất

phản ứng Bluing trong 4 phút. Các lát cắt được loại nước trong etanol phân đoạn, được loại chất béo trong khi thay thế xylen và được phủ bằng DPX (Merck KGaA).

Các phiên kính đã nhuộm miễn dịch được quét bằng cách sử dụng hệ thống chụp ảnh phiên kính tự động Vectra 2 (Perkin Elmer Inc.). Số lượng mạch máu trong toàn bộ khối u được định lượng bằng cách đếm số lượng đối tượng dương tính với CD31 bằng cách sử dụng chương trình phần mềm inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Diện tích vùng khối u được xác định bằng cách đánh giá diện tích nhuộm bằng hematoxylin bằng cách sử dụng chương trình phần mềm inForm 2 (PerkinElmer Inc.) Số lượng mạch máu được chuẩn hóa theo diện tích của vùng khối u. Tỷ lệ của số lượng mạch máu tăng lên ở nhóm sử dụng liệu hợp chất thử nghiệm được tính toán theo công thức dưới đây và được thể hiện trong Bảng 9.

Tỷ lệ của số lượng mạch máu tăng lên (%) = ((số lượng mạch máu của nhóm sử dụng liệu hợp chất thử nghiệm — số lượng mạch máu của nhóm đối chứng)/số lượng mạch máu của nhóm đối chứng) $\times 100$

Bảng 9

Hợp chất thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Tỷ lệ của số lượng mạch máu tăng lên (%)
Halichondrin B	0,025	31
	0,05	39
Hợp chất có công thức (1)	0,10	69
	0,20	154

Ví dụ thử nghiệm được lý 10. Hiệu quả đối với CAF dương tính với α -SMA trong mô hình tế bào FaDu được cấy dưới da

Dòng tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) của người FaDu, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin và streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 5×10^7 tế bào/ml bằng PBS để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100 μ l vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 5 đến 6 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan, Inc.). 10 ngày sau khi cấy tế bào, hợp chất thử nghiệm trong nước muối với hydroxypropyl- β -cyclodextrin 100 μ M được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều 1/2 MTD và MTD. Thử nghiệm này được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 3 con. 2 ngày sau khi sử dụng, các khối u được lấy ra và được cố

định bằng chất cố định IHC Zinc (BD Pharmingen) ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ. Các mô đã gắn trong parafin được cắt thành đoạn (3µm), được gắn trên các phiến kính có điện tích dương, và để khô trong không khí trong 6 giờ. Tiến hành nhuộm hóa mô miễn dịch α -SMA bằng cách sử dụng thiết bị nhuộm tự động Ventana model Discover XT (Roche Diagnostics). Các lát cắt được khử parafin hóa, xử lý và các kháng nguyên được thu hồi bằng các chất đệm độc quyền, EZPrep và CC1 (Ventana Medical Systems). Kháng thể đơn dòng của chuột kháng α -SMA được liên hợp với phosphatasa kiềm (dòng 1A4, Sigma) được sử dụng với lượng 5 µg/ml. Các lát cắt được ủ với kháng thể trong 6 giờ. Việc phát hiện được thực hiện với kit RedMap (Ventana Medical Systems, Inc). Các lát cắt được loại nước trong etanol phân đoạn, được loại chất béo trong khi thay thế xylen và được phủ bằng DPX (Merck KGaA). Các lát cắt khối u lần lượt được khử parafin hóa và được nhuộm bằng hematoxylin của Mayer (Muto Pure Chemicals) trong 1 phút. Các lát cắt được loại nước trong etanol phân đoạn, được loại chất béo trong khi thay thế xylen và được phủ bằng DPX (Merck KGaA).

Các lát cắt đã nhuộm miễn dịch được quét bằng cách sử dụng Hệ thống chụp ảnh phiến kính tự động Vectra 2 (Perkin Elmer Inc.). Diện tích của vùng dương tính với α -SMA trong toàn bộ khối u được định lượng bằng cách đếm đối tượng dương tính với α -SMA bằng cách sử dụng chương trình phần mềm inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Diện tích của vùng khối u được xác định bằng cách đánh giá diện tích nhuộm bằng hematoxylin bằng cách sử dụng chương trình phần mềm inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Diện tích của vùng dương tính với α -SMA được chuẩn hóa theo diện tích của vùng khối u. Tỷ lệ ức chế của diện tích dương tính với α -SMA của nhóm sử dụng liều của hợp chất thử nghiệm được tính toán theo công thức dưới đây, và được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10

Hợp chất thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Tỷ lệ ức chế của diện tích dương tính với α -SMA (%)
Halichondrin B	0,025	7
	0,05	3
Hợp chất có công thức (1)	0,10	21
	0,20	28

Tỷ lệ ức chế của diện tích dương tính với α -SMA (%) = - ((diện tích dương tính với α -SMA của nhóm sử dụng liều của hợp chất thử nghiệm - diện tích dương tính với α -SMA của nhóm đối chứng)/diện tích dương tính với α -SMA của nhóm đối chứng) $\times 100$

Ví dụ thử nghiệm được lý 11. Mô hình chuột được cấy tế bào HSC-2 cùng chỗ

Các tế bào HSC-2-Luc đã tải nạp Luciferaza được tạo ra bằng cách chuyển gen qua trung gian retrovirus. Trước tiên, mảnh ADN mã hóa luciferaza của đom đóm thu được từ plasmit của gen tăng cường pGL3 (GenBank#:U47297), và được tách dòng phụ thành vector retrovirus pCX4pur (GenBank#: AB086386). Sau đó, các retrovirus tái tổ hợp không có tế bào hỗ trợ được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm vector biểu hiện retrovirus trên đây cùng với các plasmit pGP và pE-Ampho (Takara Bio; Shiga, Nhật Bản), thành các tế bào 293T (ATCC; Manassas, Mỹ). Tiếp đó, các tế bào HSC-2 được gây nhiễm bằng các retrovirus tái tổ hợp, và được nuôi cấy trong hai tuần với sự có mặt của puromycin (2 μ g/ml). Các tế bào đã gây nhiễm được chọn từ quần thể tăng sinh đa dòng của môi trường nuôi cấy.

Trong khi gây mê, dòng tế bào SCCHN của người, HSC-2-Luc được cấy vào lưỡi chuột nhắt trần, chuột cái (1×10^6 tế bào trong 50 μ l PBS), 6 tuần tuổi (chuột CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj; Charles River, Inc.; Shizuoka, Nhật Bản). 7 ngày sau khi cấy, thể tích khối u được phân tích bằng cách sử dụng tín hiệu phát huỳnh quang sinh học từ các tế bào HSC-2-Luc. Để chụp hình ảnh phát huỳnh quang sinh học, 0,1ml D-luciferin 15 mg/ml (Promega, Madison, WI) được tiêm qua đường trong màng bụng vào chuột nhắt trần trong khi gây mê bằng isoflurane 1% đến 2% dạng hít. Tín hiệu phát huỳnh quang sinh học được theo dõi bằng cách sử dụng dây phổ IVIS (PerkinElmer, Waltham, MA), gồm camera ghép điện tích được làm nguội, có độ nhạy cao. Chương trình phần mềm chụp ảnh trực tiếp (PerkinElmer, Waltham, MA) được sử dụng để tạo lưới dữ liệu hình ảnh và tích hợp tín hiệu phát huỳnh quang sinh học toàn phần trong mỗi vùng quan tâm (region-of-interest: ROI). Tất cả các hình ảnh phát huỳnh quang sinh học thu được với sự tiếp xúc 1 giây. Các số liệu được phân tích bằng cách sử dụng tổng lượng phát tán thông lượng photon (photon/giây) trong vùng ROI.

Dựa trên cơ sở tổng lượng phát tán thông lượng photon thu được vào ngày sử dụng thứ nhất, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của tổng lượng phát tán thông lượng photon gần như bằng nhau giữa các nhóm. Hợp chất có công thức (1) hoặc cisplatin được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch có hoặc không có cetuximab (Erbix, Merck Serono Co., Ltd.) một lần mỗi tuần trong 3 tuần (Q7D $\times$ 3 liệu trình). Hai thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng quy trình giống hệt và tất cả các số liệu từ các thử nghiệm được thu thập. Mỗi nhóm gồm 16 con chuột.

Các dữ liệu hình ảnh cho thấy rằng việc điều trị chỉ bằng hợp chất có công thức (1) và cetuximab làm giảm rõ ràng tín hiệu phát huỳnh quang sinh học ở tất cả các con

chuột sau ngày 14 (Fig.6A và Fig.6B). Thời gian sống trung bình (median survival time: MST) được tính toán từ mỗi nhóm điều trị theo giá trị trung bình của số ngày đến khi chuột chết. Khoảng thời gian sống tăng lên (Increase Life Span: ILS) được tính toán theo công thức sau: $ILS (\%) = (MST \text{ của các con chuột được điều trị bằng hợp chất thử nghiệm} - MST \text{ của các con chuột đối chứng}) / MST \text{ của các con chuột đối chứng} \times 100$. ILS (%) của mỗi hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 11.

Bảng 11

Hợp chất thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Cetuximab (mg/kg)	ILS (%)
-	-	5	231
Cisplatin	5	-	0
	5	5	150
Hợp chất có công thức (1)	0,09	-	238
	0,09	5	>1150

Ví dụ thử nghiệm được lý 12. Mô hình mô ghép khác loài tế bào FaDu dưới da (s.c.) kết hợp với xạ trị

Các tế bào FaDu-Luc được tải nạp Luciferaza được tạo ra bằng cách chuyển gen qua trung gian retrovirus. Trước tiên, mảnh ADN mã hóa luciferaza của đom đóm thu được từ plasmit của gen tăng cường GL3 (GenBank#:U47297), và được tách dòng phụ thành vectơ retrovirus pCX4pur (GenBank#: AB086386). Sau đó, các retrovirus tái tổ hợp không có tế bào hỗ trợ được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm vectơ biểu hiện retrovirus trên đây cùng với các plasmit pGP và pE-Ampho (Takara Bio; Shiga, Nhật Bản), thành các tế bào 293T (ATCC; Manassas, Mỹ). Tiếp theo, các tế bào FaDu được gây nhiễm bằng các retrovirus tái tổ hợp, và được nuôi cấy trong hai tuần với sự có mặt của puromycin (2 µg/ml). Các tế bào đã gây nhiễm được chọn từ quần thể tăng sinh đa dòng của môi trường nuôi cấy.

Dòng tế bào SCCHN đã tải nạp luciferaza của người FaDu-Luc, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin và streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 5×10^7 tế bào/ml bằng dung dịch nước muối cân bằng Hanks để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100µl vào phần dưới da vùng đùi phải của chuột nhắt trần, 6 tuần tuổi (CAN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan, Inc.). 13 ngày sau khi cấy tế bào, thể tích khối u được phân tích

bằng cách sử dụng tín hiệu phát huỳnh quang sinh học từ các tế bào FaDu-Luc. Để chụp hình ảnh phát huỳnh quang sinh học, 0,1ml D-luciferin 15 mg/ml (Promega, Madison, WI) được tiêm qua đường trong màng bụng vào chuột nhắt trần trong khi gây mê bằng isoflurane 1% đến 2% dạng hít. Tín hiệu phát huỳnh quang sinh học được theo dõi bằng cách sử dụng dãy phổ IVIS (PerkinElmer, Waltham, MA), gồm camera ghép điện tích được làm nguội, có độ nhạy cao. Phần mềm chụp ảnh trực tiếp (PerkinElmer, Waltham, MA) được sử dụng để tạo lưới các dữ liệu hình ảnh và tích hợp tín hiệu phát huỳnh quang sinh học toàn phần trong mỗi vùng quan tâm (ROI). Thu được tất cả các hình ảnh phát huỳnh quang sinh học với sự tiếp xúc trong 1 giây. Các số liệu được phân tích bằng cách sử dụng tổng lượng phát tán thông lượng photon (photon/giây) trong vùng ROI. Tổng lượng phát tán thông lượng photon được tính toán theo các công thức tính toán sau đây:

Mức độ phát huỳnh quang sinh học tương đối = Tổng lượng phát tán thông lượng photon (ngày X) / Tổng lượng phát tán thông lượng photon (ngày thứ nhất)

Mức độ thoái triển khối u (%) = $(1 - \text{mức độ phát huỳnh quang sinh học tương đối nhỏ nhất}) \times 100$

Dựa trên tổng lượng phát tán thông lượng photon thu được vào ngày sử dụng thứ nhất, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của tổng lượng phát tán thông lượng photon gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm này được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 6 con. Hợp chất có công thức (1) được sử dụng bằng tiêm vào tĩnh mạch đuôi vào ngày 1 và ngày 8. Tiến hành việc chiếu xạ 18 Gy vào ngày 4 và ngày 11. Mức độ thoái triển khối u của hợp chất có công thức (1) được thể hiện trong Bảng 12.

Bảng 12

Hợp chất thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Chiếu xạ (Gy)	Mức độ thoái triển khối u (%)
-	-	18	16
Hợp chất có công thức (1)	0,09	-	0
	0,09	18	97

Ví dụ thử nghiệm được lý 13. Hoạt tính kháng u trong mô hình đồng gen tế bào CT26 dưới da kết hợp với kháng thể kháng mPD-1 ở chuột

Dòng tế bào caxinom ruột kết không biệt hóa của chuột CT26, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin và streptomycin, được điều

chỉnh đến nồng độ 2×10^7 tế bào/ml bằng dung dịch nước muối cân bằng Hanks để tạo ra hỗn dịch tế bào. Vào ngày 1, hỗn dịch tế bào được cấy với thể tích 100 μ l vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột BALB/c, 6 tuần tuổi (BALB/cAnNCrIcrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan, Inc.). 2 ngày sau khi cấy tế bào, chuột được chia ngẫu nhiên thành bốn nhóm và mỗi nhóm gồm 8 con. Đường kính ngắn nhất và đường kính dài nhất của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (calip Digimatic™, Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo công thức sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{Đường kính dài nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} / 2$$

$$T/C = (\text{thể tích khối u trung bình của nhóm được điều trị}) / (\text{thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng})$$

$$\text{Mức độ ức chế sự phát triển của khối u (\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

Hợp chất thử nghiệm được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều 0,09 mg/kg vào ngày 3 và ngày 11. Kháng thể kháng mPD-1 (BE0146, Bio X Cell) được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều 10 mg/kg vào các ngày 3, 7, 11, và 15. Mức độ ức chế sự phát triển của khối u vào ngày 15 (%) của mỗi hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 13.

Bảng 13

Hợp chất thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Kháng thể kháng mPD-1 (mg/kg)	Mức độ ức chế sự phát triển của khối u vào ngày 15 (%)
-	-	10	32
Hợp chất có công thức (1)	0,09	-	30
	0,09	10	62

Ví dụ thử nghiệm được lý 14. Hiệu quả đối với sự polyme hóa tubulin *in vitro* (Fig.10A)

Kit thử nghiệm sự polyme hóa tubulin được mua từ Cytoskeleton, Inc. (Cat.# BK011P). Kit này được đựng trong 1 chai chứa protein tubulin dạng đông khô nhanh được tinh chế từ não lợn, 3 ống chứa GTP dạng đông khô nhanh, 2 chai chứa chất đệm thử nghiệm dạng đông khô nhanh, và 1 chai chứa chất đệm tubulin glyxerol. Chất đệm thử nghiệm được điều chế bằng cách hòa tan các chất trong 10ml nước đã tiệt trùng và

khử ion hóa. Dung dịch này chứa muối sesquinati piperazin-*N,N'*-bis[axit 2-etanesulfonic] 80 mmol/l, magie clorua 2,0 mmol/l, axit etylen glycol-bis(2-amino-etyl ete) *N,N,N',N'*-tetra-axetic 0,5 mmol/l, độ pH = 6,9, và chất chỉ thị phát huỳnh quang 10 μ mol/l. Chất đệm này được bảo quản ở nhiệt độ -70°C cho đến khi sử dụng. Chất đệm tubulin glyxerol gồm muối piperazin-*N,N'*-bis[axit 2-etansulfonic] sesquinati 80 mmol/l, magie clorua 2,0 mmol/l, axit etylen glycol-bis(2-amino-etyl ete) *N,N,N',N'*-tetra-axetic 0,5 mmol/l, và glyxerol 60% theo thể tích, độ pH = 6,9. Chất đệm này được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi sử dụng. Dung dịch gốc GTP được điều chế bằng cách hòa tan các thành phần của mỗi ống trong 100 μ l nước đã tiệt trùng và khử ion để đạt được nồng độ GTP 100 mmol/l. Các phần phân ước của dung dịch gốc này được bảo quản ở nhiệt độ -70°C cho đến khi sử dụng. Dung dịch gốc tubulin (10 mg/ml) được điều chế bằng cách hòa tan bột tubulin khi cho thêm 1,1ml hỗn hợp của chất đệm thử nghiệm và dung dịch gốc GTP (100:1, theo thể tích). Các phần phân ước được đông lạnh trong nitơ lỏng, và sau đó được bảo quản ở nhiệt độ -70°C cho đến khi sử dụng.

Trong thử nghiệm polyme hóa tubulin, hỗn hợp phản ứng được điều chế bằng cách trộn lẫn 820 μ l chất đệm thử nghiệm, 17,6 μ l dung dịch gốc GTP, và 600 μ l chất đệm tubulin glyxerol. Hỗn hợp phản ứng (1015 μ l) được kết hợp với 240 μ l dung dịch gốc tubulin. Dung dịch này được gọi là hỗn hợp phản ứng tubulin và được sử dụng để xác định các lỗ thử nghiệm và lỗ đối chứng. Hỗn hợp phản ứng không có tubulin được điều chế bằng cách trộn lẫn 89,85 μ l hỗn hợp phản ứng và 21,25 μ l chất đệm thử nghiệm dùng để xác định các lỗ trống. Dung dịch hợp chất có công thức (1) (6,25–100 μ mol/l; nồng độ cuối 0,625–10 μ mol/l), hoặc chất dẫn thuốc được cho thêm vào các lỗ riêng biệt của đĩa vi chuẩn nửa diện tích có 96 lỗ với lượng 5 μ l. Hỗn hợp phản ứng có tubulin hoặc hỗn hợp phản ứng không có tubulin được cho thêm vào mỗi lỗ của đĩa này với lượng 45 μ l. Mức độ phát huỳnh quang ở bước sóng 460nm (bước sóng kích thích 360nm) được xác định ở thời điểm mỗi 2 phút trong 90 phút bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa SpectraMax[®] M5e (Molecular Devices). Sự polyme hóa tubulin diễn ra sau khi tăng cường mức độ phát huỳnh quang do đưa chất chỉ thị phát huỳnh quang vào vi ống khi sự polyme hóa xuất hiện. Thử nghiệm này được thực hiện hai lần. Thử nghiệm này đã chứng minh rằng hợp chất có công thức (1) ức chế sự polyme hóa tubulin theo cách phụ thuộc nồng độ. Cường độ phát huỳnh quang ở mỗi thời điểm được tính toán theo công thức sau:

Cường độ phát huỳnh quang = kết quả đo mức độ phát huỳnh quang trung bình của các lỗ thử nghiệm hoặc các lỗ đối chứng – kết quả đo mức độ phát huỳnh quang trung bình của các lỗ trống; lỗ trống: có chất dẫn thuốc mà không có tubulin; lỗ đối chứng: có chất dẫn

thuốc và tubulin; thử nghiệm: có các hợp chất và tubulin.

Ví dụ thử nghiệm được lý 15. Thử nghiệm động lực học vi ống trên cơ sở tế bào (Fig.10B)

Thử nghiệm động lực học vi ống (microtubule: MT) trên cơ sở tế bào được tiến hành với dòng tế bào sacôm xương U2OS-EB3-AG, trong đó protein dung hợp của EB3 (vi ống bổ sung protein gắn kết ở đầu) và Azami-Green (EB3-AG) được biểu hiện ổn định. Các tế bào U2OS-EB3-AG được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin-streptomycin, ở nhiệt độ 37°C trong môi trường ẩm chứa 5% CO₂. Động lực học MT trong các tế bào gan có thể được quan sát bằng mắt thường theo sự di chuyển của cấu trúc tương tự comet của các tế bào EB3-AG. Các tế bào U2OS-EB3-AG được dàn mỏng trên các đĩa nuôi cấy có nền là thủy tinh (đĩa EZVIEW, AGC Techno Glass, Nhật Bản) được điều trị bằng hợp chất có công thức (1) với nồng độ được chỉ định và động lực học vi ống được theo dõi bằng cách chụp hình ảnh theo thời gian bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang với vật kính được ngâm trong dầu có độ phóng đại 60 lần (BZ-X710, KEYENCE, Nhật Bản). Các hình ảnh vẫn ở các thời điểm quy định được thể hiện trên Fig.10B. Các hình ảnh quan sát với độ phóng đại cao hơn của các vùng được ngăn riêng được thể hiện ở cửa vào. Khi được điều trị bằng hợp chất có công thức (1) với liều 0,5nM (giá trị IC₅₀ của hoạt tính chống tăng sinh ở các tế bào U2OS-EB3-AG), cấu trúc tương tự comet trở nên khó quan sát ở thời điểm khoảng 60 phút sau khi cho thêm hợp chất này. Các kết quả này chứng minh rõ ràng là hợp chất có công thức (1) có khả năng ức chế động lực học MT.

Ví dụ thử nghiệm được lý 16. Hoạt tính chống tăng sinh *in vitro* (Fig.11)

Các thử nghiệm chống tăng sinh *in vitro* đối với hợp chất có công thức (1) được tiến hành bằng cách sử dụng nhóm nhỏ của các dòng tế bào ung thư bao gồm caxinom tế bào có vảy của người ở thực quản (OE21, TE-8), caxinom tuyến thực quản của người (OE33), và sacôm tử cung của người (MES-SA, MES-SA-Dx5-Rx1). Tất cả các dòng tế bào được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin-streptomycin (môi trường nuôi cấy), trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Cho 75µl hỗn dịch tế bào được điều chỉnh đến nồng độ 4×10⁴ tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ (Becton, Dickinson and Company, 353219), và các tế bào này được ủ qua đêm trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Vào ngày tiếp theo, 25µl hợp chất có công thức (1) trong các hệ pha loãng ba lần được tạo hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy được cho thêm vào mỗi lỗ, và sản phẩm tạo thành được ủ trong 72 giờ trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Khả năng sống của tế bào được xác định bằng thử nghiệm khả năng sống của tế

bào phát quang CellTiter-Glo® (Promega) với thiết bị đọc 2013 EnVision™ Multilabel (Perkin–Elmer, Wellesley, MA). Giá trị của các lỗ chứa tế bào mà không cho thêm hợp chất thử nghiệm được xác định là 100% và giá trị của các lỗ không chứa tế bào được xác định là 0%. Nồng độ cần thiết của hợp chất có công thức (1) để ức chế sự phát triển của tế bào 50% (nghĩa là giá trị IC₅₀) được tính toán và được thể hiện trên Fig.11. Tính miễn cảm P-gp được tính toán theo tỷ lệ của giá trị IC₅₀ trong các tế bào MES-SA-Dx5-Rx1, biểu hiện quá mức P-gp, với giá trị IC₅₀ trong các tế bào MES-SA.

Ví dụ thử nghiệm được lý 17. Hiệu quả kháng u trong mô hình mô ghép khác loài tế bào KPL-4 ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn; Hiệu quả kháng u trong mô hình mô ghép khác loài tế bào COLO-704 ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn (Fig.12)

Dòng tế bào ung thư vú dương tính với HER-2 của người KPL-4, đã được nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa FBS 10%, và penicillin-streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 1×10^8 tế bào/ml bằng dung dịch nước muối cân bằng Hanks để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100μl vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 8 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan Inc.). 11 ngày sau khi cấy tế bào (ngày 1), đường kính ngắn nhất và đường kính dài nhất của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (Digimatic™ caliper, Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo các công thức sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{Đường kính dài nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} / 2$$

$$\text{Thể tích khối u tương đối (RTV)} = \text{Thể tích khối u (ngày X)} / \text{Thể tích khối u (ngày thứ nhất)}$$

$$\text{Trọng lượng cơ thể tương đối (RBW)} = \text{trọng lượng cơ thể (ngày X)} / \text{Trọng lượng cơ thể (ngày thứ nhất)}$$

Dựa vào thể tích khối u thu được vào ngày 1, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 6 con. Hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Ngay trước khi sử dụng, dung dịch gốc được pha loãng bằng nước muối. Hợp chất thử nghiệm trong nước muối được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch một lần hàng tuần với liều 20μg/kg, 60μg/kg, hoặc 180μg/kg trong 2 tuần (vào ngày 1 và ngày 8). Quan sát được mức độ thoái triển khối u ở các nhóm được điều trị với liều 60μg/kg và 180μg/kg, và việc sử

dụng với liều 180 µg/kg loại trừ hoàn toàn các khối u của mô ghép khác loài ở tất cả các con chuột vào ngày 15.

Dòng tế bào ung thư buồng trứng của người COLO-704, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin-streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 1×10^8 tế bào/ml bằng dung dịch nước muối cân bằng Hank để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100µl vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 5 tuần tuổi (CAnN.Cg- Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan Inc.). 9 ngày sau khi cấy tế bào (ngày 1), đường kính ngắn nhất và đường kính dài nhất của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (Digimatic™ caliper, Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo các công thức sau đây:

Thể tích khối u (mm^3) = Đường kính dài nhất (mm) $\times$ Đường kính ngắn nhất (mm) $\times$ Đường kính ngắn nhất (mm)/2

Thể tích khối u tương đối (RTV) = Thể tích khối u (ngày X) / Thể tích khối u (ngày thứ nhất)

Trọng lượng cơ thể tương đối (RBW) = Trọng lượng cơ thể (ngày X) / Trọng lượng cơ thể (ngày thứ nhất)

Dựa vào thể tích khối u thu được vào ngày 1, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 6 con. Hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Ngay trước khi sử dụng, dung dịch gốc được pha loãng bằng nước muối. Hợp chất thử nghiệm trong nước muối được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch một lần hàng tuần với liều 20µg/kg, 60µg/kg, hoặc 180µg/kg trong 2 tuần (vào ngày 1 và ngày 8). Việc điều trị bằng hợp chất này làm thoái triển khối u với liều 180µg/kg và làm chậm sự phát triển của khối u với liều 60µg/kg. Việc sử dụng với liều 180µg/kg loại trừ hoàn toàn các khối u mô ghép khác loài ở tất cả các con chuột vào ngày 22.

Ví dụ thử nghiệm được lý 18. Hiệu quả đối với mạch dương tính với CD31 trong mô hình cấy tế bào FaDu dưới da ở chuột (Fig.13)

Dòng tế bào axinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) của người FaDu, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin-streptomycin (môi trường nuôi cấy), được điều chỉnh đến nồng độ 5×10^7 tế bào/ml bằng môi trường

nuôi cấy để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100 μ l vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 6 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan, Inc.). 10 ngày sau khi cấy tế bào, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm này được tiến hành đối với các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 con chuột. Mỗi hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Ngay trước khi sử dụng, dung dịch gốc được pha loãng bằng nước muối. Hợp chất thử nghiệm trong nước muối được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều 20 μ g/kg, 60 μ g/kg, hoặc 180 μ g/kg. 5 ngày sau khi sử dụng một lần, các khối u được lấy ra và được cố định bằng chất cố định IHC Zinc (BD Pharmingen) ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ. Các mô đã gắn trong parafin được cắt thành đoạn (3 μ m), được gắn trên các phiến kính có điện tích dương, và để khô trong không khí. Tiến hành nhuộm hóa mô miễn dịch CD31 bằng cách sử dụng thiết bị nhuộm tự động Ventana model Discover XT (Roche Diagnostics) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các lát cắt được khử parafin hóa, xử lý và các kháng nguyên được thu hồi bằng CC1 (Ventana Medical Systems). Các phiến kính được phong bế bằng chất phong bế A và chất phong bế B (Kit phong bế biotin nội sinh, Roche Diagnostics). Kháng thể của chuột nhắt kháng IgG CD31 của chuột thường (Dianova GmbH) được sử dụng với liều 2 μ g/ml. Các lát cắt được ủ với kháng thể trong 6 giờ, sau đó ủ trong 32 phút với kháng thể kháng IgG của chuột nhắt được biotinyl hóa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) với liều 2,2 μ g/ml. Việc phát hiện được thực hiện với Streptavidin-HRP D trong 16 phút, sau đó ủ với DAB D và DAB H₂O₂ D (kit DABMap, Ventana Medical Systems, Inc.) trong 8 phút. Các phiến kính được nhuộm tương phản bằng Hematoxylin II (Roche Diagnostics) trong 16 phút, sau đó ủ với chất phản ứng Bluing trong 4 phút. Các lát cắt được loại nước trong etanol phân đoạn, được loại chất béo trong khi thay thế xylen và được phủ bằng DPX® (Merck KGaA). Các lát cắt đã nhuộm miễn dịch được quét bằng cách sử dụng Hệ thống chụp hình ảnh phiến kính tự động Vectra® 2 (Perkin Elmer Inc.). Số lượng mạch máu trong toàn bộ khối u được định lượng bằng cách đếm số lượng đối tượng dương tính với CD31 bằng cách sử dụng chương trình phần mềm inForm 2 (PerkinElmer Inc.) Diện tích của vùng khối u được xác định bằng cách đánh giá diện tích nhuộm bằng hematoxylin bằng cách sử dụng chương trình phần mềm inForm 2 (PerkinElmer Inc.) Số lượng mạch máu được chuẩn hóa theo diện tích của vùng khối u. Việc sử dụng một lần hợp chất thử nghiệm với liều 20, 60, và 180 μ g/kg làm tăng số lượng mạch máu của khối u. Tỷ lệ của số lượng mạch máu trong nhóm sử dụng liều của hợp chất thử nghiệm được so sánh với nhóm không được điều trị được tính toán theo công thức dưới đây:

Tỷ lệ mạch máu của khối u = số lượng mạch máu của nhóm sử dụng liệu của hợp chất thử nghiệm/số lượng mạch máu của nhóm không điều trị)

Ví dụ thử nghiệm được lý 19. Hiệu quả đối với CAF dương tính với α -SMA trong mô hình cấy tế bào FaDu dưới da ở chuột (Fig.14)

Dòng tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) của người FaDu, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin-streptomycin (môi trường nuôi cấy), được điều chỉnh đến nồng độ 5×10^7 tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100 μ l vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 6 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan, Inc.). 10 ngày sau khi cấy tế bào, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm được tiến hành đối với các nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Mỗi hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Ngay trước khi sử dụng, dung dịch gốc được pha loãng bằng nước muối. Hợp chất thử nghiệm trong nước muối được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều 20 μ g/kg, 60 μ g/kg, hoặc 180 μ g/kg. 2 ngày hoặc 5 ngày sau khi sử dụng một lần, các khối u được lấy ra và được cố định bằng chất cố định IHC Zinc (BD Pharmingen) ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ. Các mô đã gắn trong parafin được cắt thành đoạn (3 μ m), được gắn trên các phiến kính có điện tích dương, và để khô trong không khí. Các lát cắt được khử parafin hóa, xử lý và các kháng nguyên được thu hồi bằng cách sử dụng vi sóng với EDTA 1mM ở độ pH = 6,0. Các lát cắt được phong bế bằng BSA 1% trong TBS. Kháng thể đơn dòng của chuột kháng α -SMA được liên hợp với phosphatase kiềm (dòng 1A4, Sigma) được sử dụng với liều 5 μ g/ml. Các lát cắt được ủ với kháng thể trong 2,5 giờ. Việc phát hiện được thực hiện với kit cơ chất Fast red II (Nichirei Bioscience Inc.). Các lát cắt được nhuộm tương phản bằng Hematoxylin của Mayer (Muto Pure Chemicals) trong 50 giây. Các lát cắt được loại nước trong ethanol phân đoạn, được loại chất béo trong khi thay thế xylen và được phủ bằng DPX (Merck KGaA). Các phiến kính đã nhuộm miễn dịch được quét bằng cách sử dụng hệ thống chụp ảnh phiến kính tự động Vectra 2 (Perkin Elmer Inc.). Diện tích của vùng dương tính với α -SMA trong toàn bộ khối u được định lượng bằng cách đếm đối tượng dương tính với α -SMA bằng cách sử dụng chương trình phần mềm inForm 2 (PerkinElmer Inc.) Diện tích của vùng khối u được xác định bằng cách đánh giá diện tích nhuộm bằng hematoxylin bằng cách sử dụng chương trình phần mềm inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Diện tích của vùng dương tính với α -SMA được chuẩn hóa theo diện tích của vùng khối

u. Việc sử dụng một lần hợp chất thử nghiệm làm giảm đáng kể diện tích dương tính với α -SMA với các liều 60 và 180 μ g/kg vào ngày 3 và với liều 180 μ g/kg vào ngày 6. Tỷ lệ ức chế của diện tích dương tính với α -SMA của nhóm sử dụng liều của hợp chất thử nghiệm được tính toán theo công thức dưới đây:

Tỷ lệ α -SMA = diện tích α -SMA của nhóm sử dụng liều của hợp chất thử nghiệm/điện tích vùng α -SMA của nhóm không được điều trị

Ví dụ thử nghiệm được lý 20. Hiệu quả đối với Tenascin-C và EDA-fibronectin trong mô hình cấy tế bào FaDu dưới da ở chuột (Fig.15)

Dòng tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) của người FaDu, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin-streptomycin (môi trường nuôi cấy), được điều chỉnh đến nồng độ 5×10^7 tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100 μ l vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 6 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrIj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan, Inc.). 10 ngày sau khi cấy tế bào, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 5 con. Hợp chất có công thức (1) được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Hợp chất có công thức (1) (180 μ g/kg) và Cetuximab (CTX, Erbitux[®], Merck Serono Co. Ltd.) (10mg/kg) được pha loãng bằng nước muối và được tiêm qua đường tĩnh mạch vào ngày 1. 5 ngày sau khi sử dụng một lần, các khối u được lấy ra và được cố định bằng chất cố định IHC Zinc (BD Pharmingen) ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ. Các mô đã gắn trong parafin được cắt thành đoạn (3 μ m), được gắn trên các phiến kính có điện tích dương, và để khô trong không khí. Các lát cắt được khử parafin hóa, xử lý và các kháng nguyên được thu hồi bằng cách sử dụng vi sóng với EDTA 1mM ở độ pH = 6,0 đối với Tenascin-C. Đối với EDA-fibronectin, không cần tiến hành quá trình thu hồi các kháng nguyên. Các lát cắt được ủ với dung dịch phong bế BLOXALL (Vector Labs) trong 10 phút để phong bế peroxidaza nội sinh, và ủ với chất phản ứng phong bế Ig của chuột (Vector Labs) trong 1 giờ, và sau đó ủ với huyết thanh ngựa bình thường 2,5% trong 30 phút. Để nhuộm hóa mô miễn dịch Tenascin-C, kháng thể đơn dòng của chuột kháng Tenascin-C (dòng 4C8MS, IBL) được sử dụng với lượng 5 μ g/ml. Các lát cắt được ủ với kháng thể qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Để nhuộm hóa mô miễn dịch EDA-fibronectin, kháng thể đơn dòng của chuột kháng EDA- fibronectin (dòng IST-9, Abcam) được sử dụng với lượng 1,5 μ g/ml. Các lát cắt được ủ với kháng thể

trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Việc phát hiện được thực hiện với chuột trên kit polyme Peroxidaza ImmPRESS™ của chuột (Vector Labs). Các lát cắt được nhuộm tương phản bằng Hematoxylin của Mayer (Muto Pure Chemicals) trong 50 giây. Các lát cắt được loại nước trong etanol phân đoạn, được loại chất béo trong khi thay thế xylen và được phủ bằng DPX (Merck KGaA). Các phiến kính đã nhuộm miễn dịch được quét bằng cách sử dụng Hệ thống chụp ảnh phiến kính tự động Vectra 2 (Perkin Elmer Inc.). Mức độ biểu hiện của cả Tenascin-C và ED-A fibronectin được giảm đi ở các khối u được điều trị bằng hợp chất có công thức (1) và CTX so với các khối u đối chứng.

Ví dụ thử nghiệm được lý 21. Hiệu quả kháng u trong mô hình mô ghép khác loài tế bào FaDu dưới da kết hợp với cetuximab ở chuột (Fig.16)

Dòng tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (SCCHN) của người FaDu, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin-streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 5×10^7 tế bào/ml bằng dung dịch nước muối cân bằng Hanks để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100μl vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột không có tuyến ức (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, 7 tuần tuổi, Charles River Japan Inc.). 10 ngày sau khi cấy tế bào (ngày 1), chiều dài và chiều rộng của khối u ở mỗi con chuột được đo bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo công thức sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{Đường kính dài nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} / 2$$

$$\text{Thể tích khối u tương đối (RTV)} = \text{Thể tích khối u (ngày X)} / \text{Thể tích khối u (ngày thứ nhất)}$$

Dựa vào thể tích TV, chuột được chia nhóm ngẫu nhiên (ngày 1). Mỗi nhóm gồm 6 con chuột. Hợp chất có công thức (1) được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Hợp chất có công thức (1) (20, 60, hoặc 180μg/kg) và Cetuximab (CTX, Erbitux®, Merck Serono Co., Ltd.) (10mg/kg) được pha loãng bằng nước muối và được tiêm qua đường trong tĩnh mạch vào ngày 1. Sự thay đổi về thể tích RTV của mỗi nhóm được thể hiện trên Fig.16. Với các liều dùng 180μg/kg và 60μg/kg, hiệu quả kháng u của hợp chất có công thức (1) với CTX là cao hơn so với hiệu quả kháng u của liệu pháp đơn CTX về mức độ thoái triển khối u. Hiệu quả kháng u của hợp chất có công thức (1) với liều 20μg/kg kết hợp với CTX có xu hướng cao hơn so với hiệu

quả kháng u của liệu pháp đơn CTX.

Ví dụ thử nghiệm được lý 22. Hiệu quả kháng u trong mô hình mô ghép khác loài sacôm mô mềm ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn (Fig.17)

Tế bào MES-SA

Dòng tế bào sacôm tử cung của người MES-SA, đã được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, và penicillin-streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ 2×10^8 tế bào/ml bằng dung dịch nước muối cân bằng Hanks để tạo ra hỗn dịch tế bào, và hỗn dịch này được trộn với Geltrex® (Thermo Fisher Scientific Inc., #A1413202) theo tỷ lệ 1:1 để tạo ra hỗn dịch tế bào với nồng độ 1×10^8 tế bào/ml. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100µl vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 6 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan Inc.). 6 ngày sau khi cấy tế bào (ngày 1), đường kính ngắn nhất và đường kính dài nhất của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (Digimatic™ caliper, Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo các công thức sau đây:

Thể tích khối u (mm^3) = Đường kính dài nhất (mm) $\times$ Đường kính ngắn nhất (mm) $\times$ Đường kính ngắn nhất (mm)/2

Thể tích khối u tương đối (RTV) = Thể tích khối u (ngày X) / Thể tích khối u (ngày thứ nhất)

Dựa vào thể tích khối u thu được vào ngày 1, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm này được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 6 con. Hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Ngay trước khi sử dụng, dung dịch gốc được pha loãng bằng nước muối. Hợp chất thử nghiệm trong nước muối được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch một lần hàng tuần với liều 180µg/kg trong 2 tuần (vào ngày 1 và ngày 8). Quan sát được hoạt tính kháng u với sự làm chậm mức độ phát triển của khối u ở nhóm được điều trị.

Tế bào HT-1080

Dòng tế bào sacôm sợi của người HT-1080, đã được nuôi cấy trong môi trường E-MEM chứa FBS 10%, NEAA và các chất kháng sinh được điều chỉnh đến nồng độ 3×10^7 tế bào/ml bằng môi trường để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100µl vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột không có tuyến ức (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, 6 tuần tuổi, Charles River Japan Inc.). 6 ngày sau

khi cấy tế bào (ngày 1), chiều dài và chiều rộng của khối u ở mỗi con chuột được đo bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo công thức sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{Đường kính dài nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} / 2$$

$$\text{Thể tích khối u tương đối (RTV)} = \text{Thể tích khối u (ngày X)} / \text{Thể tích khối u (ngày thứ nhất)}$$

Dựa vào thể tích TV, các con chuột được chia nhóm theo cách ngẫu nhiên (ngày 1). Mỗi nhóm gồm 6 con. Hợp chất có công thức (1) được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Hợp chất có công thức (1) (180 µg/kg) được pha loãng bằng nước muối và được tiêm qua đường trong tĩnh mạch vào ngày 1 và ngày 8. Sự thay đổi về RTV của mỗi nhóm được thể hiện trên Fig.17. Quan sát được hoạt tính kháng u với sự thoái triển khối u ở nhóm được điều trị.

Tế bào CTG-2041

Các mảnh khối u của sacôm mạch ở người CTG-2041 được cấy dưới da (s.c.) vào sườn trái của chuột cái. Sự phát triển của khối u được theo dõi hai lần mỗi tuần bằng cách sử dụng calip kỹ thuật số để tính toán thể tích khối u theo công thức sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{Đường kính dài nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} / 2$$

$$\text{Thể tích khối u tương đối (RTV)} = \text{Thể tích khối u (ngày X)} / \text{Thể tích khối u (ngày thứ nhất)}$$

Khi thể tích các khối u đạt đến khoảng 200 mm³, các con chuột được ghép nhóm theo thể tích khối u thành nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng và việc dùng liều được bắt đầu vào ngày 1. Mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Hợp chất có công thức (1) được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Hợp chất có công thức (1) (100µg/kg) được pha loãng trong nước muối và được tiêm qua đường trong tĩnh mạch vào ngày 1 và ngày 8. Sự thay đổi về thể tích RTV của mỗi nhóm được thể hiện trên Fig.17. Quan sát được hoạt tính kháng u với sự thoái triển khối u ở nhóm được điều trị.

Ví dụ thử nghiệm được lý 23. Hiệu quả kháng u trong mô hình mô ghép khác loài bệnh sacôm ung thư màng trong tử cung ở chuột dưới dạng liệu pháp đơn (Fig.18)

Tế bào HEC-108

Dòng tế bào ung thư màng trong tử cung của người HEC-108, đã được nuôi cấy trong môi trường E-MEM chứa FBS 15% và các chất kháng sinh được điều chỉnh đến nồng độ $7,14 \times 10^7$ tế bào/ml bằng môi trường để tạo ra hỗn dịch tế bào. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 150 μ l vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột không có tuyến ức (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, 6 tuần tuổi, Charles River Japan Inc.). 13 ngày sau khi cấy tế bào (ngày 1), chiều dài và chiều rộng của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo công thức sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{Đường kính dài nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} / 2$$

$$\text{Thể tích khối u tương đối (RTV)} = \text{Thể tích khối u (ngày X)} / \text{Thể tích khối u (ngày thứ nhất)}$$

Dựa vào thể tích TV, các con chuột được chia nhóm theo cách ngẫu nhiên (ngày 1). Mỗi nhóm gồm 6 con chuột. Hợp chất có công thức (1) được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Hợp chất có công thức (1) (180 μ g/kg) được pha loãng trong nước muối và được tiêm qua đường trong tĩnh mạch vào ngày 1 và ngày 8. Sự thay đổi về thể tích RTV của mỗi nhóm được thể hiện trên Fig.18. Quan sát được hoạt tính kháng u với sự làm chậm mức độ phát triển của khối ở nhóm được điều trị.

Tế bào AN3CA

Dòng tế bào ung thư màng trong tử cung của người AN3CA, đã được nuôi cấy trong môi trường E-MEM chứa FBS 10%, và penicillin-streptomycin, được điều chỉnh đến nồng độ $1,4 \times 10^8$ tế bào/ml bằng dung dịch nước muối cân bằng Hanks' Balanced để tạo ra hỗn dịch tế bào, và hỗn dịch này được trộn với Geltrex[®] (Thermo Fisher Scientific Inc., #A1413202) theo tỷ lệ 1:1 để tạo ra hỗn dịch tế bào với nồng độ 7×10^7 tế bào/ml. Hỗn dịch tế bào này được cấy với thể tích 100 μ l vào phần dưới da vùng sườn phải của chuột nhắt trần, 6 tuần tuổi (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, chuột cái, Charles River Laboratories Japan Inc.). 12 ngày sau khi cấy tế bào (ngày 1), đường kính ngắn nhất và đường kính dài nhất của khối u ở mỗi con chuột được xác định bằng cách sử dụng calip điện tử kỹ thuật số (calip Digimatic[™], Mitutoyo Corporation), để tính toán thể tích khối u theo các công thức sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \text{Đường kính dài nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} \times \text{Đường kính ngắn nhất (mm)} / 2$$

Thể tích khối u tương đối (RTV) = Thể tích khối u (ngày X) / Thể tích khối u (ngày thứ nhất)

Dựa vào thể tích khối u thu được vào ngày 1, chuột được chia nhóm sao cho giá trị trung bình của thể tích khối u gần như bằng nhau giữa các nhóm. Thử nghiệm được tiến hành đối với các nhóm chuột, mỗi nhóm gồm 5 con. Hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong DMSO và dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh trước khi sử dụng. Ngay trước khi sử dụng, dung dịch gốc được pha loãng bằng nước muối. Hợp chất thử nghiệm trong nước muối được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch một lần hàng tuần với liều 180µg/kg trong 2 tuần (vào ngày 1 và ngày 8). Quan sát được hoạt tính kháng u với sự thoái triển khối u ở nhóm được điều trị.

Ví dụ thử nghiệm được lý 24. Thử nghiệm ức chế sự phát triển của tế bào NCI-N87 và MKN-28

Trong thử nghiệm này, hoạt tính ức chế sự phát triển trong các dòng tế bào ung thư dạ dày của người NCI-N87 và MKN-28 của hợp chất thử nghiệm được đánh giá tương ứng. Các tế bào NCI-N87 và MKN-28 được duy trì trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, penicillin và streptomycin trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Cho 100µl hỗn dịch tế bào NCI-N87 hoặc MKN-28 được điều chỉnh đến nồng độ 3×10⁴ tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ (Becton, Dickinson and Company, 353219), và các tế bào này được ủ qua đêm trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Vào ngày tiếp theo, 100µl hợp chất có công thức (1) hoặc Halichondrin B trong các hệ pha loãng ba lần được tạo hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy được cho thêm vào mỗi lỗ, và sản phẩm tạo thành được ủ trong 3 ngày trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Khả năng sống của tế bào được xác định bằng thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo[®] (Promega) với thiết bị đọc EnVision 2103 Multilabel (Perkin–Elmer, Wellesley, MA). Giá trị của các lỗ chứa tế bào mà không cho thêm các hợp chất thử nghiệm được xác định là 100% và giá trị của các lỗ không chứa tế bào được xác định là 0%. Nồng độ cần thiết của hợp chất thử nghiệm để ức chế sự phát triển của tế bào 50% (nghĩa là giá trị IC₅₀) được tính toán và được thể hiện trong Bảng 14.

Bảng 14

	NCI-N87	MKN-28
Hợp chất thử nghiệm	(IC ₅₀ (nM))	(IC ₅₀ (nM))
Halichondrin B	0,007	0,017

Hợp chất có công thức (1)	0,002	0,015
---------------------------	-------	-------

Ví dụ thử nghiệm được lý 25. Thử nghiệm ức chế sự phát triển của tế bào HuTu 80

Trong thử nghiệm này, hoạt tính ức chế sự phát triển của hợp chất thử nghiệm đối với dòng tế bào ung thư ruột non của người HuTu 80, được phân lập từ mô tá tràng được đánh giá. Các tế bào HuTu 80 được duy trì trong môi trường EMEM chứa FBS 10%, penicillin và streptomycin trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Cho 100µl hỗn dịch tế bào HuTu80 được điều chỉnh đến nồng độ 3×10^4 tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ (Becton, Dickinson and Company, 353219), và các tế bào này được ủ qua đêm trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Vào ngày tiếp theo, 100µl hợp chất có công thức (1) hoặc Halichondrin B trong các hệ pha loãng ba lần được tạo hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy được cho thêm vào mỗi lỗ, và sản phẩm tạo thành được ủ trong 3 ngày trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Khả năng sống của tế bào được xác định bằng thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo® (Promega) bằng thiết bị đọc EnVision 2103 Multilabel (Perkin–Elmer, Wellesley, MA). Giá trị của các lỗ chứa tế bào mà không cho thêm các hợp chất thử nghiệm được xác định là 100% và giá trị của các lỗ không chứa tế bào được xác định là 0%. Nồng độ của các hợp chất thử nghiệm cần thiết để ức chế sự phát triển của tế bào 50% (nghĩa là giá trị IC₅₀) được tính toán và được thể hiện trên Bảng 15.

Bảng 15

	HuTu 80
Hợp chất thử nghiệm	(IC ₅₀ (nM))
Halichondrin B	0,031
Hợp chất có công thức (1)	0,019

Ví dụ thử nghiệm được lý 26. Thử nghiệm ức chế sự phát triển của tế bào SW780

Trong thử nghiệm này, hoạt tính ức chế sự phát triển dòng tế bào ung thư tế bào chuyển tiếp của người SW780 của các hợp chất thử nghiệm được xác định. Các tế bào SW780 được duy trì trong môi trường RPMI-1640 chứa FBS 10%, penicillin, và streptomycin trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Cho 100µl hỗn dịch tế bào SW780 được điều chỉnh đến nồng độ 3×10^4 tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ (Becton, Dickinson and Company, 353219), và các tế bào này được ủ qua đêm trong tủ

áp 5% CO₂ (37°C). Vào ngày tiếp theo, 100µl hợp chất có công thức (1) hoặc Halichondrin B trong các hệ pha loãng ba lần được tạo hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy được cho thêm vào mỗi lỗ, và sản phẩm tạo thành được ủ trong 3 ngày trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Khả năng sống của tế bào được xác định bằng thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo[®] (Promega) với thiết bị đọc EnVision 2103 Multilabel (Perkin–Elmer, Wellesley, MA). Giá trị của các lỗ chứa tế bào mà không cho thêm hợp chất thử nghiệm được xác định là 100% và giá trị của các lỗ không chứa tế bào được xác định là 0%. Nồng độ cần thiết của các hợp chất thử nghiệm để ức chế sự phát triển của tế bào 50% (nghĩa là giá trị IC₅₀) được tính toán và được thể hiện trong Bảng 16.

Bảng 16

	SW780
Hợp chất thử nghiệm	(IC ₅₀ (nM))
Halichondrin B	0,032
Hợp chất có công thức (1)	0,017

Ví dụ thử nghiệm được lý 27. Thử nghiệm ức chế sự phát triển của tế bào HS-SY-II

Trong thử nghiệm này, hoạt tính ức chế sự phát triển dòng tế bào sacôm hoạt dịch của người HS-SY-II của các hợp chất thử nghiệm được đánh giá. Các tế bào SH-SY-II được duy trì trong môi trường DMEM chứa FBS 10%, penicillin, và streptomycin trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Cho 100µl hỗn dịch tế bào HS-SY-II được điều chỉnh đến nồng độ 3×10⁴ tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ (Becton, Dickinson and Company, 353219), và các tế bào này được ủ qua đêm trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Vào ngày tiếp theo, 100µl hợp chất có công thức (1) hoặc Halichondrin B trong các hệ pha loãng ba lần được tạo hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy được cho thêm vào mỗi lỗ, và sản phẩm tạo thành được ủ trong 3 ngày trong tủ áp 5% CO₂ (37°C). Khả năng sống của tế bào được xác định bằng thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo[®] (Promega) với thiết bị đọc kết quả EnVision 2103 Multilabel (Perkin–Elmer, Wellesley, MA). Giá trị của các lỗ chứa tế bào mà không cho thêm hợp chất thử nghiệm được xác định là 100% và giá trị của các lỗ không chứa tế bào được xác định là 0%. Nồng độ cần thiết của các hợp chất thử nghiệm để ức chế sự phát triển của tế bào 50% (nghĩa là giá trị IC₅₀) được tính toán và được thể hiện trong Bảng 17.

Bảng 17

	HS-SY-II
Hợp chất thử nghiệm	(IC ₅₀ (nM))
Halichondrin B	0,010
Hợp chất có công thức (1)	0,002

Các phương án tương đương và phạm vi

Trong phần yêu cầu bảo hộ, các mạo từ như “a,” “an,” và “the” có thể có nghĩa là một hoặc nhiều hơn một, trừ khi được chỉ rõ theo nghĩa trái ngược hoặc rõ ràng theo cách khác so với ngữ cảnh. Phần yêu cầu bảo hộ hoặc phần mô tả bao gồm thuật ngữ “hoặc” ở giữa một hoặc nhiều thành phần của một nhóm được cho là đáp ứng nếu một, nhiều hơn một, hoặc tất cả các thành viên của nhóm này có mặt trong đó, được sử dụng trong đó, hoặc có liên quan theo cách khác với một sản phẩm hoặc quy trình cho trước, trừ khi được chỉ rõ theo nghĩa trái ngược hoặc rõ ràng theo cách khác so với ngữ cảnh. Sáng chế bao gồm các phương án trong đó một thành viên chính xác của nhóm có mặt trong đó, được sử dụng trong đó, có liên quan theo cách khác với một sản phẩm hoặc quy trình cho trước. Sáng chế bao gồm cả các phương án trong đó nhiều hơn một, hoặc tất cả các thành viên của nhóm này có mặt trong đó, được sử dụng trong đó, có liên quan theo cách khác với một sản phẩm hoặc quy trình cho trước.

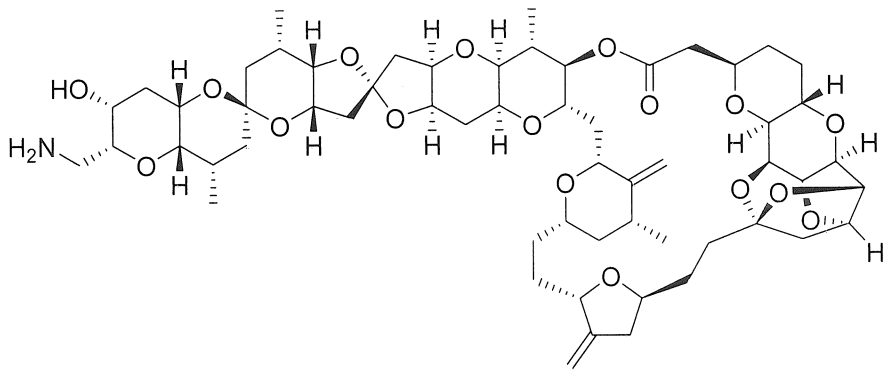
Ngoài ra, sáng chế bao gồm tất cả các thay đổi, cái biến, và hoán vị trong đó một hoặc nhiều giới hạn, nguyên tố, mệnh đề, và thuật ngữ mô tả từ một hoặc nhiều điểm yêu cầu bảo hộ đã liệt kê được đưa vào điểm yêu cầu bảo hộ khác. Ví dụ, điểm yêu cầu bảo hộ bất kỳ phụ thuộc vào điểm yêu cầu bảo hộ khác có thể được cải biến để bao gồm một hoặc nhiều giới hạn được tìm thấy trong điểm yêu cầu bảo hộ khác bất kỳ phụ thuộc vào chính điểm yêu cầu bảo hộ cơ sở này. Khi các nguyên tố có mặt dưới dạng danh sách liệt kê, ví dụ, ở dạng nhóm Markush, mỗi nhóm phụ của các nguyên tố này cũng được bộc lộ, và (các) nguyên tố bất kỳ có thể được loại bỏ ra khỏi nhóm này. Nói chung, cần hiểu rằng khi sáng chế hoặc các khía cạnh của sáng chế được đề cập là bao gồm các nguyên tố hoặc dấu hiệu cụ thể, một số phương án của sáng chế hoặc các khía cạnh của sáng chế gồm hoặc chủ yếu bao gồm các nguyên tố và/hoặc các dấu hiệu này. Để đơn giản hóa, các phương án này không được nêu cụ thể trong phần mô tả ở đây. Cũng cần lưu ý rằng các thuật ngữ “bao gồm” và “chứa” được dự định theo nghĩa không hạn chế và cho phép bổ sung các nguyên tố hoặc bước khác. Khi các khoảng được thể hiện, các điểm đầu mút cũng được bao gồm trong đó. Hơn nữa, trừ khi được chỉ rõ theo nghĩa trái ngược hoặc rõ ràng theo cách khác so với ngữ cảnh và sự hiểu biết của một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, các

giá trị được thể hiện dưới dạng khoảng có thể thừa nhận giá trị cụ thể bất kỳ hoặc khoảng giá trị nhỏ nằm trong các khoảng nêu trên trong các phương án khác nhau của sáng chế, đến giá trị một phần mười đơn vị của giới hạn dưới của khoảng này, nếu ngữ cảnh không chỉ rõ theo cách khác.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết hoặc có thể xác định nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể được mô tả ở đây mà không cần sử dụng nhiều thử nghiệm thông thường. Phạm vi của các phương án này được mô tả ở đây được dự định là không làm giới hạn phần mô tả trên đây đúng hơn là như được nêu trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có thể tiến hành nhiều thay đổi và cải biến với phần mô tả này mà vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế, như được xác định trong phần yêu cầu bảo hộ sau đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức sau:



hoặc muối dược dụng của nó.

2. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc muối dược dụng của nó, trong chất mang dược dụng.

1/20

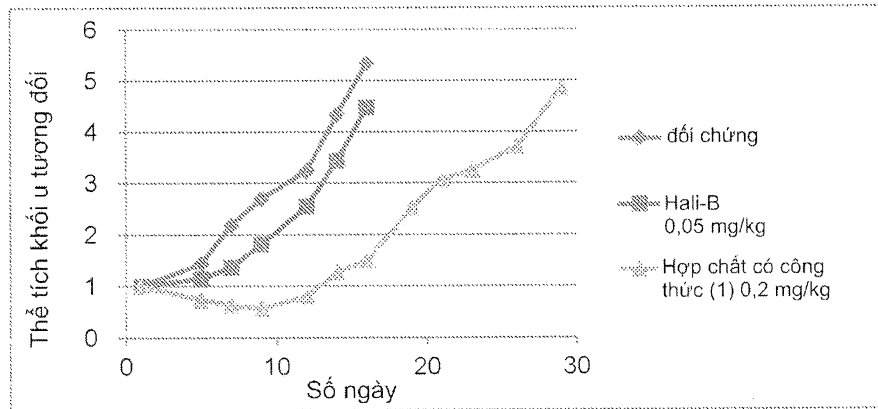


Fig.1

2/20

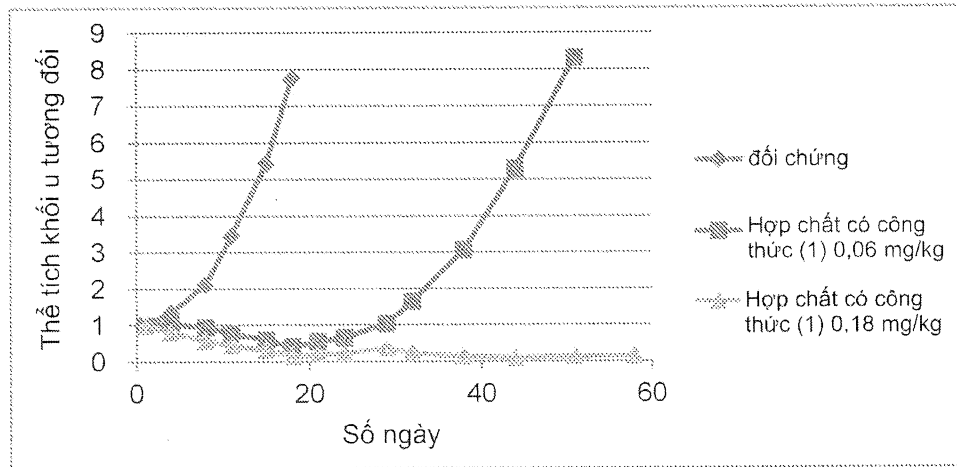


Fig.2

3/20

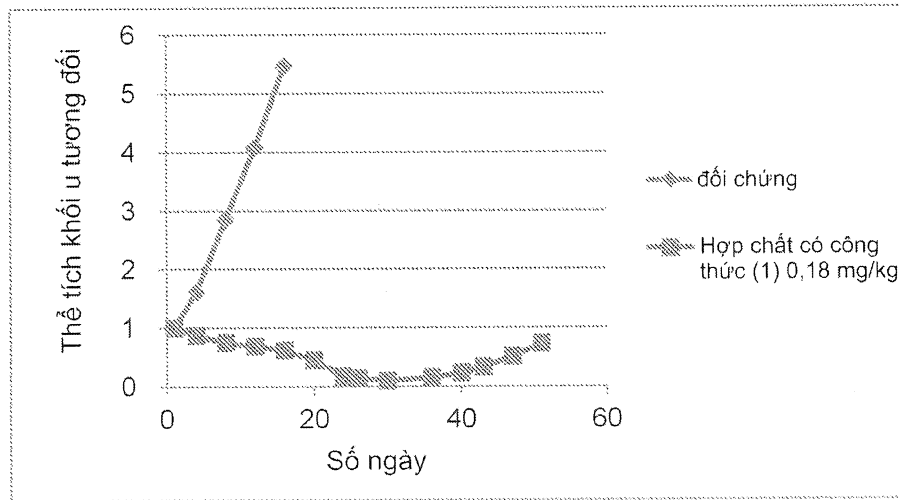


Fig.3

4/20

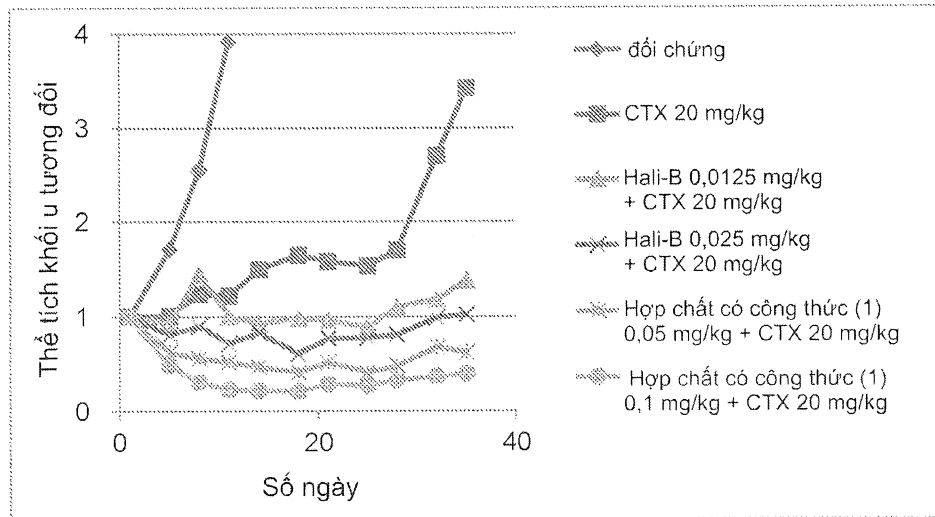


Fig.4

5/20

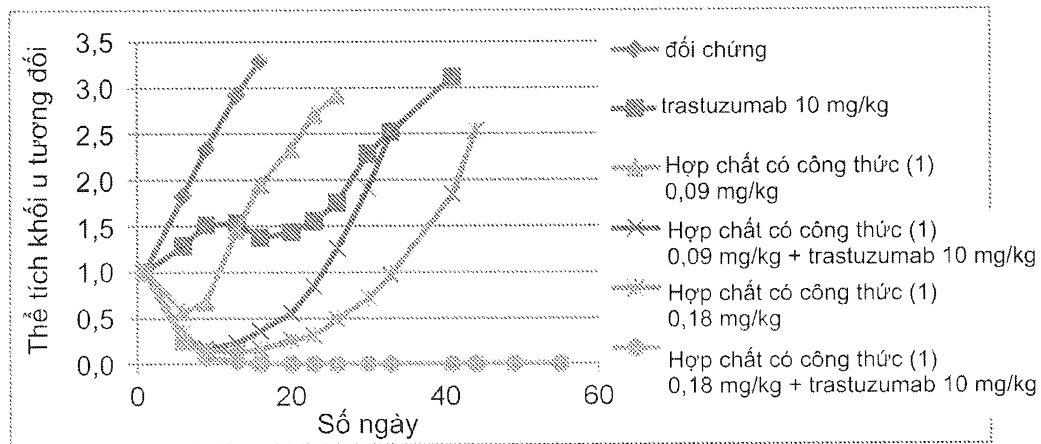


Fig.5

6/20

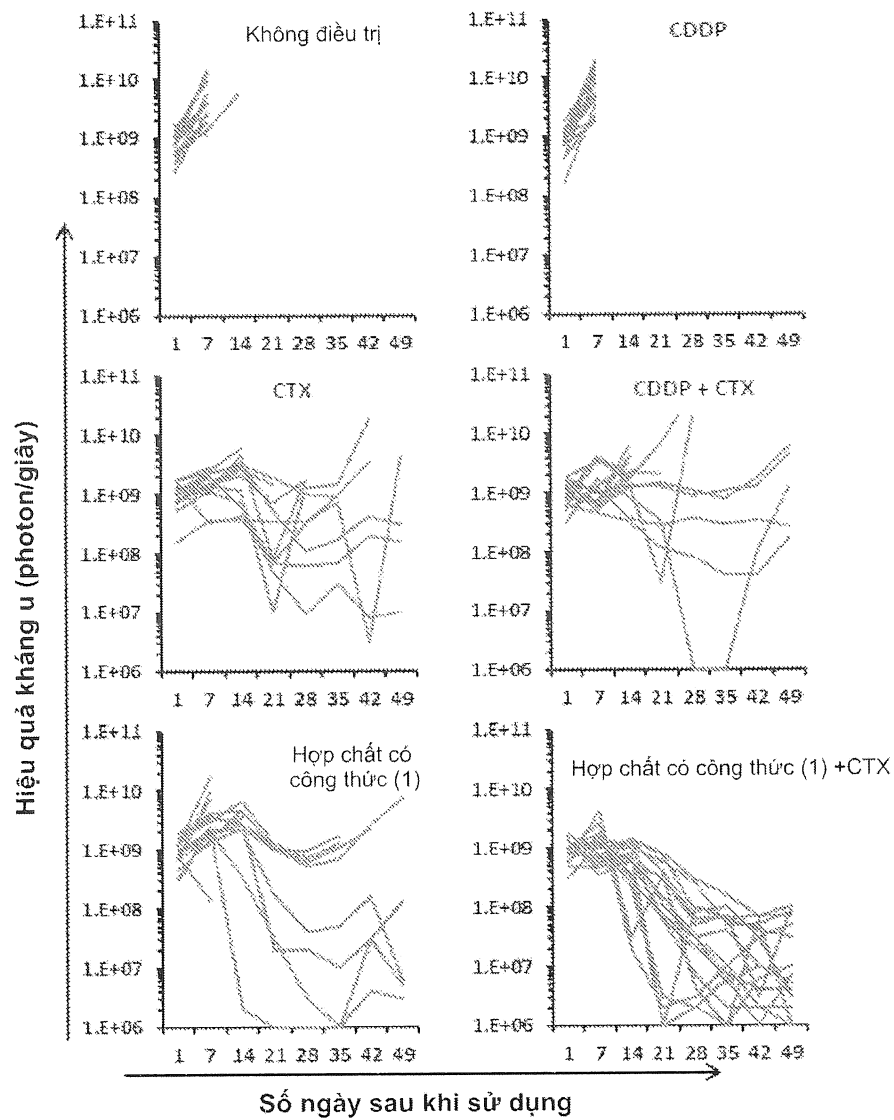


Fig.6A

7/20

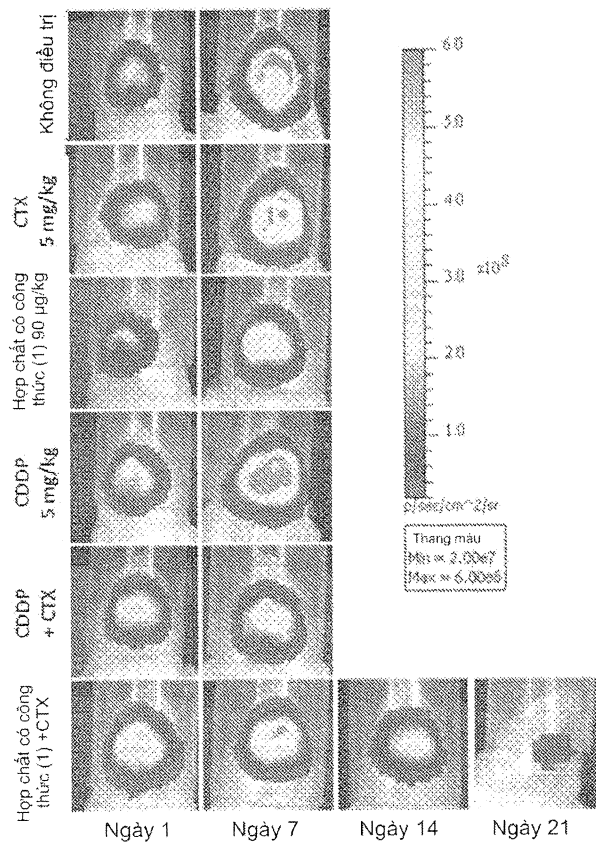
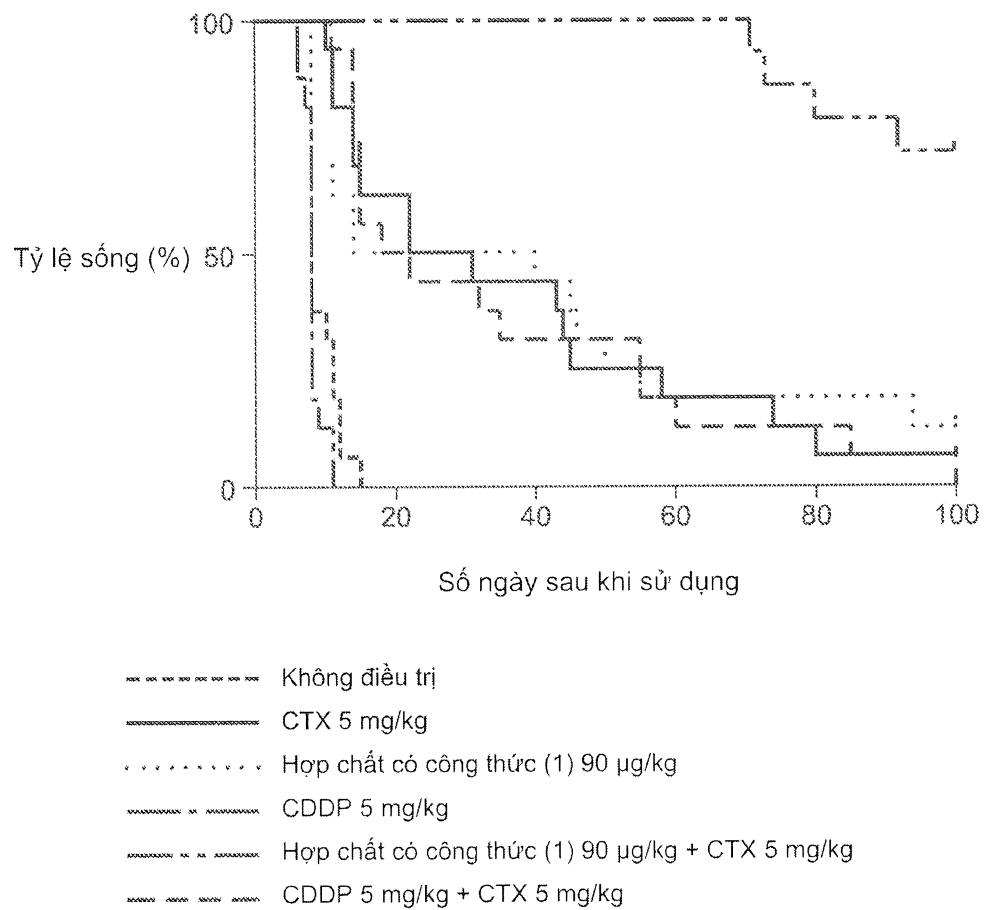


Fig.6B

8/20

**Fig.7A**

9/20

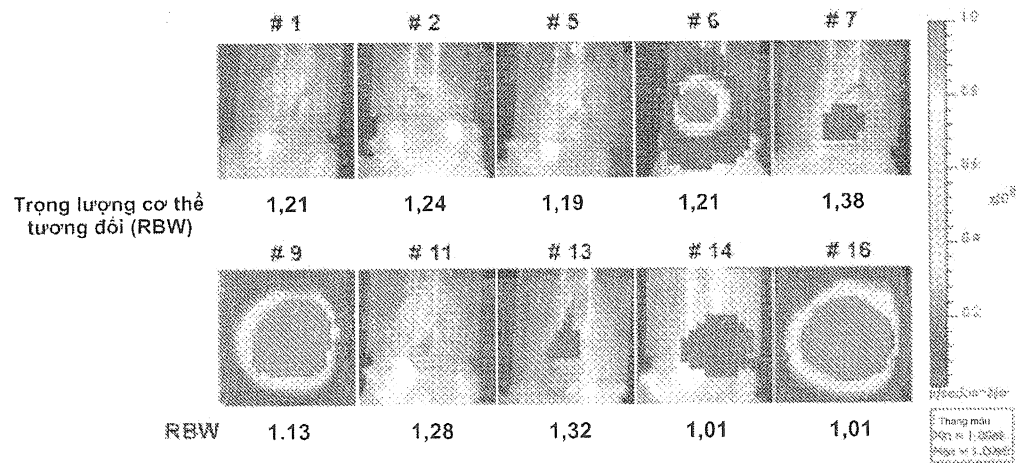


Fig.7B

10/20

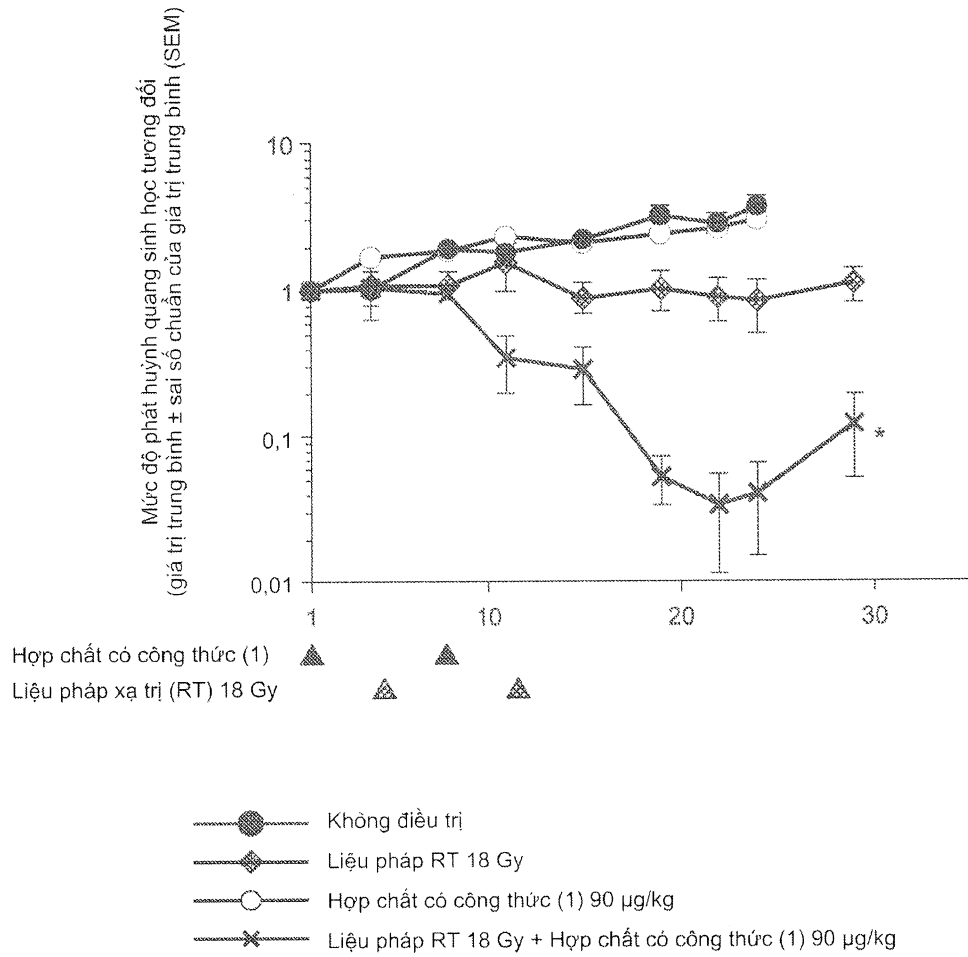


Fig.8A

11/20

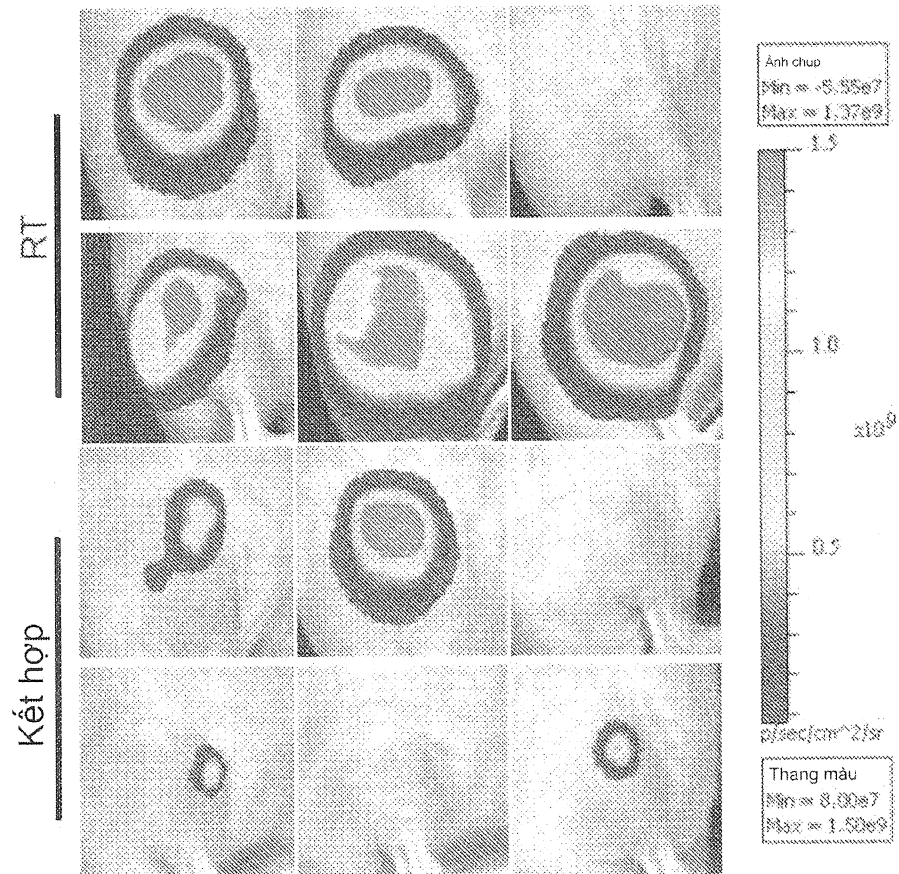


Fig.8B

12/20

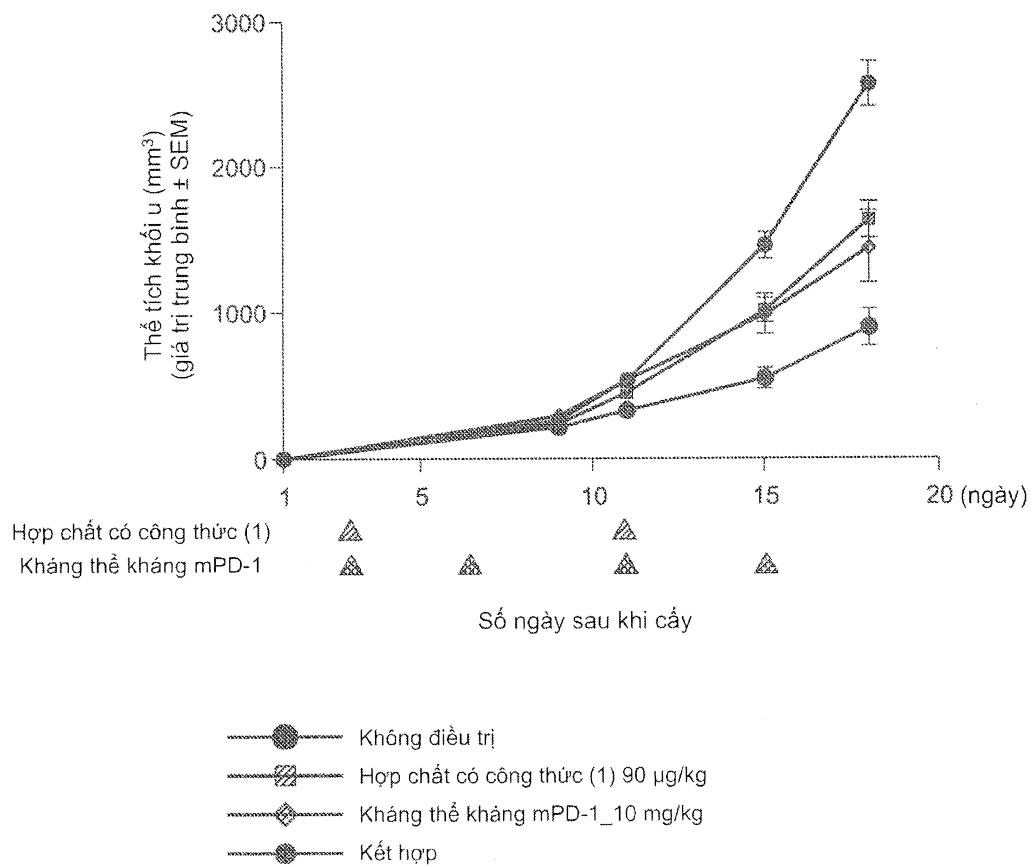


Fig.9

13/20

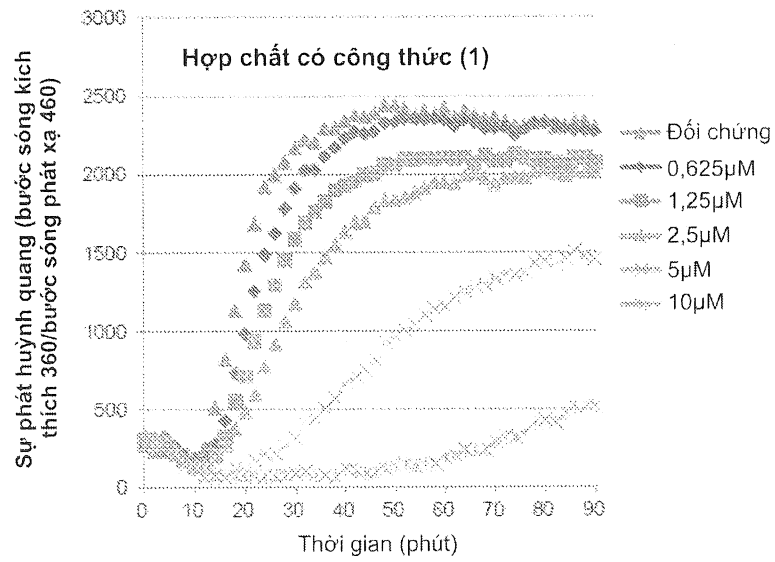


Fig.10A

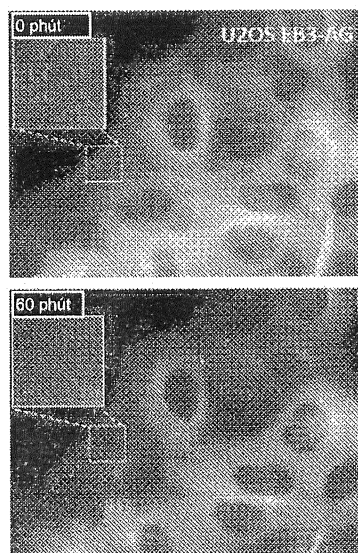
Hợp chất có công thức (1): 0,5nM (IC_{50})

Fig.10B

14/20

Nồng độ ức chế sự phát triển của tế bào <i>in vitro</i> IC ₅₀ (nM)						
Hợp chất	Bệnh ung thư thực quản			Bệnh sarcoma tử cung		Tính miễn cảm P-gp
	OE21	OE33	TE-8	MES-SA	MES-SA/Dx6-Rx1	
Hợp chất có công thức (1)	0,061	0,29	0,095	0,070	8,7	12,3

Fig.11

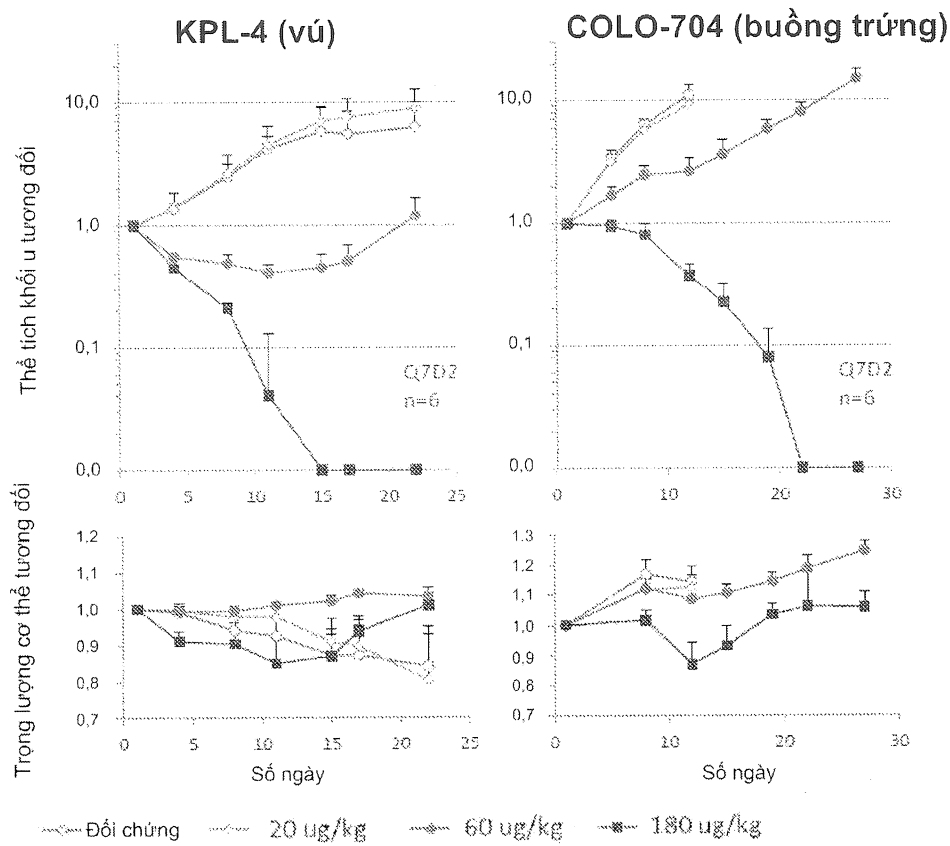


Fig.12

15/20

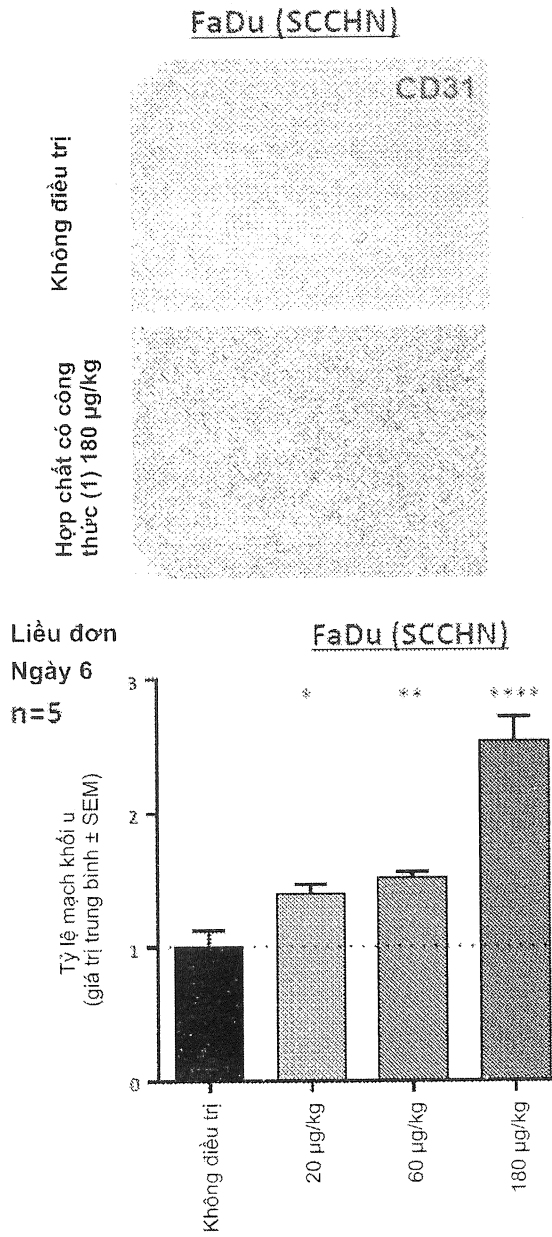


Fig.13

16/20

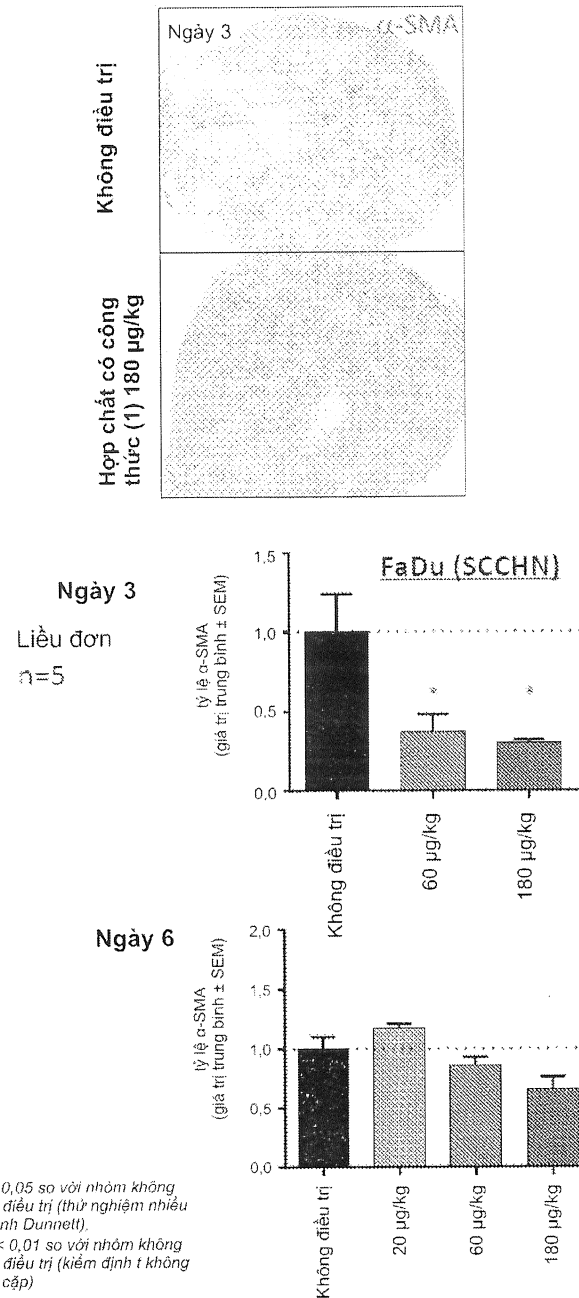


Fig.14

17/20

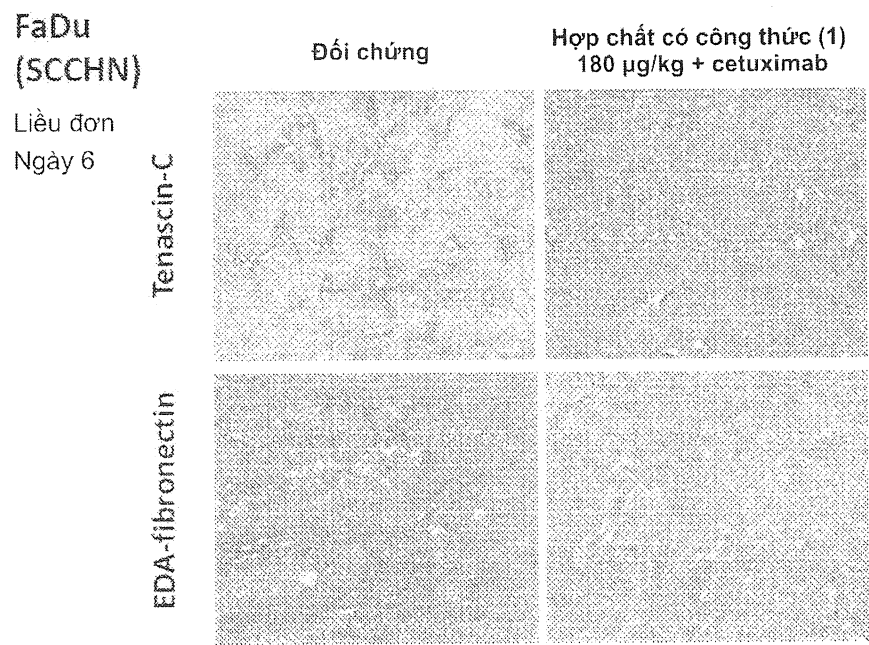


Fig.15

18/20

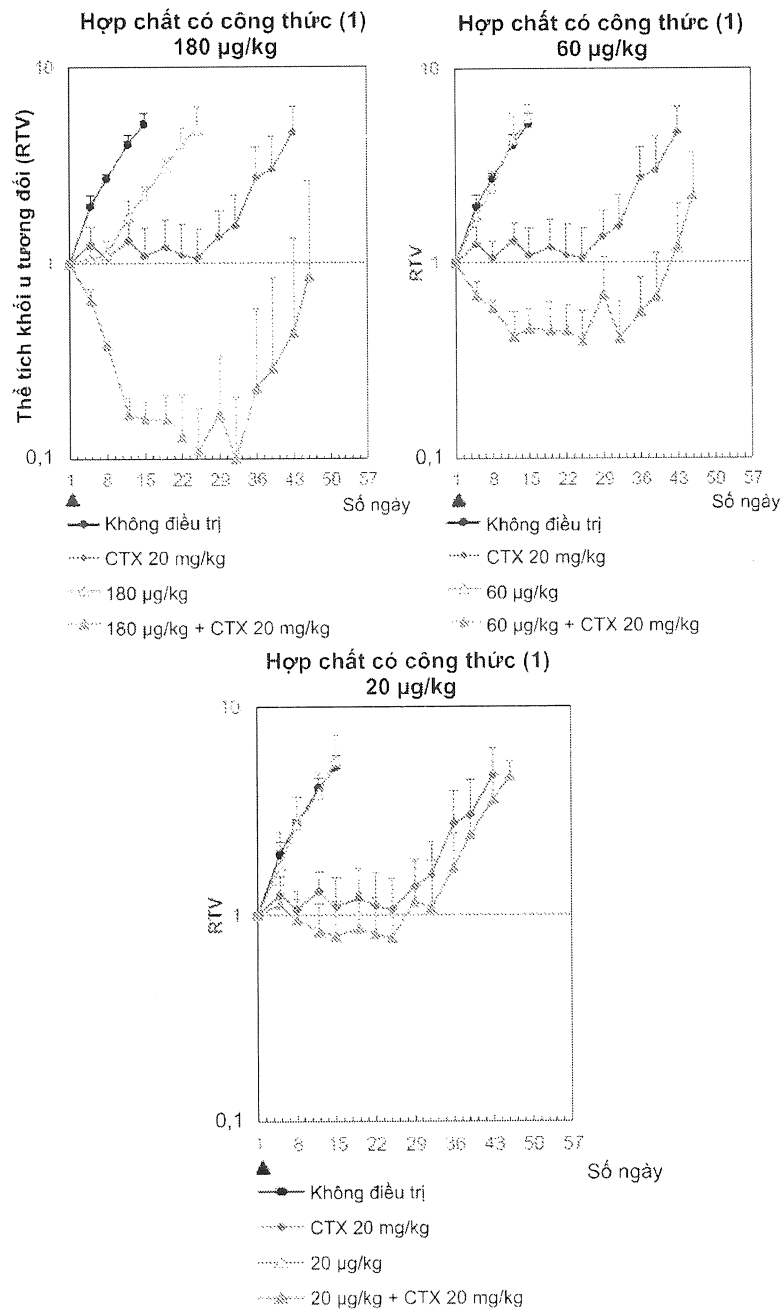


Fig.16

19/20

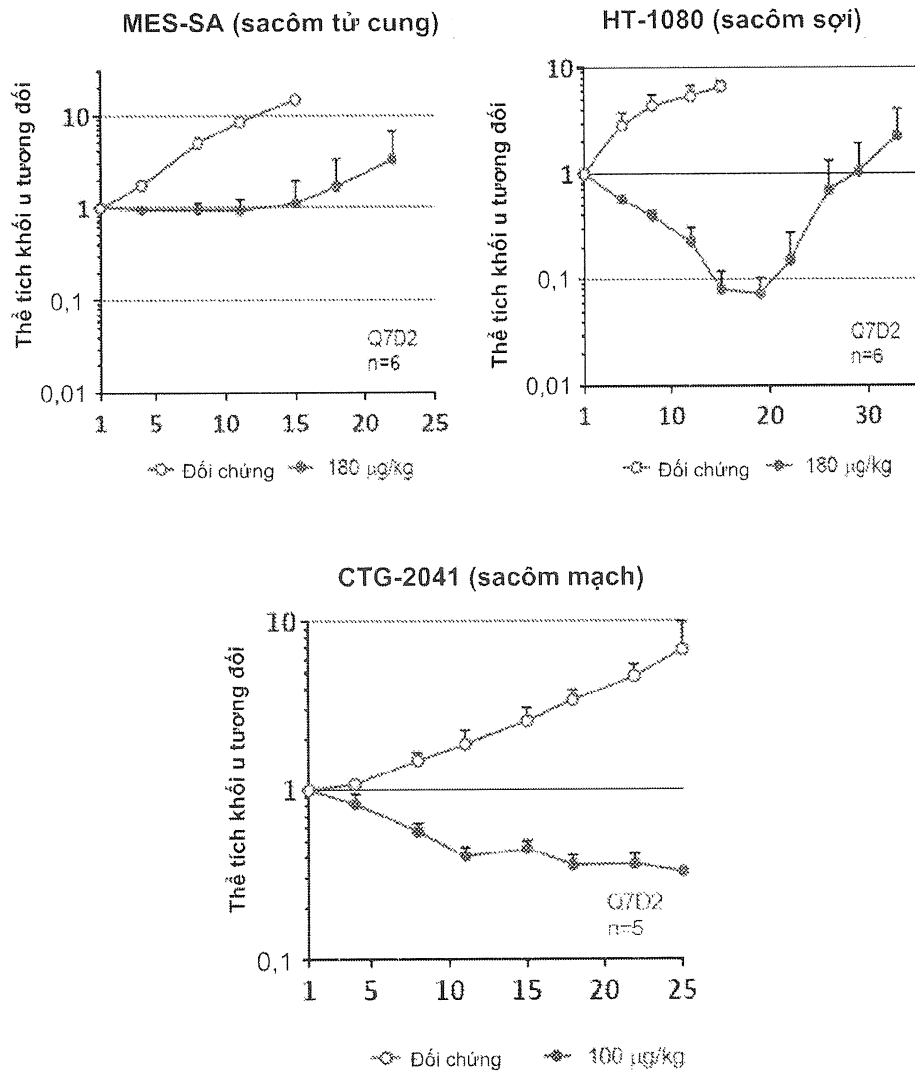


Fig.17

20/20

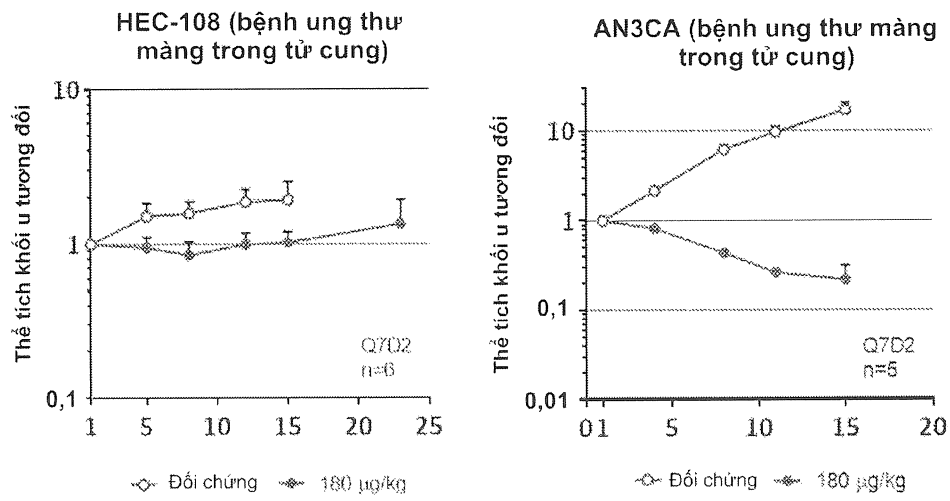


Fig.18