



(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)



1-0038009

(51)⁸ C07D 487/14; A61P 27/16; C07D
471/14; A61K 31/55; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2017-04923

(22) 01/07/2016

(86) PCT/US2016/040612 01/07/2016

(87) WO2017/007702 12/01/2017

(30) 62/189,393 07/07/2015 US

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/07/2018 364A

(73) 1. ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

2. AUDION THERAPEUTICS (NL)

Linneausparkweg 10-2, 1098 EA Amsterdam, The Netherlands

(72) CLAY, Julia Marie (US); EDGE, Albert (US); HIPSKIND, Philip Arthur (US);

GILL, John C. (US); PATEL, Bharvin Kumar (US); VAN ES, Helmuth Hendrikus
Gerardus (NL); WROBLESKI, Aaron D. (US); ZHAO, Gaiying (CN).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT ỨC CHẾ TRUYỀN TÍN HIỆU THEO ĐƯỜNG NOTCH VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất các hợp chất, hoặc muối dược dụng của chúng, và dược phẩm chứa các hợp chất này, hoặc muối dược dụng của chúng, hữu dụng làm chất ức chế truyền tín hiệu theo đường Notch để điều trị các bệnh ung thư nhất định, chứng mất thính lực thần kinh cảm giác do mất tế bào lông thính giác, và cảm ứng sự tạo thành tế bào lông thính giác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các hợp chất, và dược phẩm chứa các hợp chất này, hữu dụng làm chất ức chế truyền tín hiệu theo đường Notch để điều trị các bệnh ung thư nhất định, chứng mất thính lực thần kinh cảm giác do mất tế bào lông thính giác, và cảm ứng sự tạo thành tế bào lông thính giác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự mất các tế bào lông cảm giác ở tai trong do tuổi tác, do phơi nhiễm với tiếng ồn, do phơi nhiễm với các tác nhân hóa học, do dùng thuốc, do bệnh, và do các rối loạn di truyền gây ra rối loạn thính lực ở nhiều người mỗi năm. Không kể đến nguyên nhân, sự chết hoặc rối loạn chức năng của các tế bào lông giác quan cơ học nằm trong cơ quan Corti của ốc tai là nguyên nhân chính gây ra chứng mất thính lực thần kinh cảm giác (sensorineural hearing loss - SNHL). Các biện pháp phòng ngừa để ngăn chặn sự mất thính lực chủ yếu giới hạn ở việc bảo vệ ngoại vi, như nút tai hoặc giảm tiếng ồn hoặc không sử dụng tai nghe. Các phép điều trị hiện có đối với SNHL chủ yếu dựa trên các công nghệ điện tử như khuếch đại âm thanh bằng máy trợ thính hoặc cấy cầu tế bào lông thông qua việc kích thích điện các tế bào thần kinh hạch xoắn sống sót bằng cách cấy ghép ốc tai. Việc sử dụng steroid, để thực hiện điều trị toàn thân hoặc điều trị trong màng nhĩ cũng đã được đề xuất đối với chứng mất thính lực thần kinh cảm giác đột ngột.

Biểu mô cảm giác ốc tai chứa các tế bào lông được làm thích ứng để phát hiện sự rung động của âm thanh, mà chuyển đổi bởi các cụm lông ở bề mặt đỉnh của tế bào lông thành xung điện và truyền đến não thông qua dây thần kinh sọ số VIII. Các tế bào lông thính giác được tạo ra trong quá trình phát triển sau nguyên phân và không được thay thế sau khi mất đi hoặc là một phần của sự thay thế tế bào bình thường ở động vật có vú. Kết quả là, SNHL do mất tế bào lông thính giác có thể chữa được. Sự phát triển tế bào lông thính giác trong thời kỳ phôi thai bao gồm quá trình biệt hóa, trong đó các tế bào biểu mô tiền cảm giác có số phận khác nhau, trở thành tế bào lông hoặc tế bào nâng đỡ, thông qua quá trình ức chế bên mà được trung gian bởi sự truyền tín hiệu Notch. Các tế bào biểu mô tiền cảm giác bị ngăn cản không biệt hóa được thành tế bào

lông bởi sự truyền tín hiệu Notch hoạt động được kích thích bởi các phối tử trên tế bào lân cận. Các tế bào này trở thành tế bào nang đỡ.

Sự truyền tín hiệu Notch là một con đường được bảo tồn qua quá trình tiến hóa mà đóng vai trò không thể thiếu trong sự phát triển và nội cân bằng mô ở động vật có vú. Các thụ thể và phối tử Notch chứa các vùng xuyên màng một lần, được biểu hiện trên bề mặt tế bào và, ví lý do này, sự truyền tín hiệu Notch đặc biệt quan trọng trong việc trung gian trao đổi giữa các tế bào lân cận biểu hiện các thụ thể và phối tử này. Có bốn loại thụ thể Notch đã biết được phát hiện ở loài gặm nhấm và người, gọi là Notch 1 đến Notch 4. Các thụ thể Notch là các protein heterodime gồm các vùng ngoại bào và nội bào mà ban đầu được tổng hợp dưới dạng polypeptit đơn. Tương tác thụ thể–phối tử khởi động một loạt quá trình phân cắt phân giải protein của polypeptit thụ thể Notch trong đó có liên quan đến hoạt tính γ -secretaza. Hoạt tính γ -secretaza phân cắt vùng nội bào của Notch từ bên trong của màng sinh chất mà di chuyển đến nhân để tạo ra phức hệ yếu tố phiên mã. Vùng nội bào của Notch (Notch intracellular domain - NICD) là dạng hoạt động của protein này. Nhiều chức năng truyền tín hiệu khác nhau của Notch bao gồm tăng sinh, biệt hóa, chết tế bào theo chương trình, tạo mạch, di trú và tự đổi mới. Những vai trò khác nhau này của sự truyền tín hiệu Notch trong quá trình phát triển và duy trì các mô bình thường có thể được hoạt hóa một cách bất thường ở các dạng ung thư khác nhau. Các chức năng sinh khối u của sự truyền tín hiệu Notch bao gồm ức chế sự chết tế bào theo chương trình và thúc đẩy tăng sinh tế bào.

γ -Secretaza đóng vai trò then chốt trong việc hoạt hóa Notch. Kết quả là, các chất ức chế γ -secretaza đã được nghiên cứu tích cực về tiềm năng ngăn chặn sự hoạt hóa thụ thể Notch để điều trị bệnh ung thư. Không có thuốc hóa liệu pháp ức chế Notch thương mại nào nổi bật dù các thử nghiệm lâm sàng vẫn đang tiếp tục.

γ -Secretaza, qua đường truyền tín hiệu Notch, cũng đóng vai trò then chốt trong sự biệt hóa tế bào tiền cảm giác. Kết quả là, các chất ức chế γ -secretaza đã được tích cực nghiên cứu về tiềm năng ngăn chặn sự hoạt hóa thụ thể Notch để điều trị SNHL. Thay vì sử dụng chất ức chế Notch bằng nhiều hệ phương pháp khác nhau để thâm nhập vào tuần hoàn hệ thống để cảm ứng sự biểu hiện atonal homolog 1 (Atoh1 hoặc Math1) ở mức gia tăng bất thường và trong khoảng thời gian kéo dài, sẽ hữu dụng và mong muốn cảm ứng sự biểu hiện Atoh1, trong môi trường ốc tai, ở mức độ và khoảng

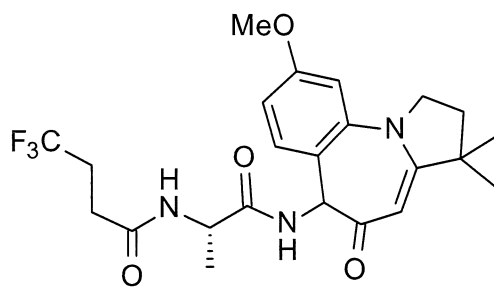
thời gian biểu hiện đúng mục đích hơn. Việc không thể điều biến Atoh1 vẫn là trở ngại đối với nghiên cứu về tế bào lông thính giác và sự phát triển các phép điều trị để tái tạo tế bào lông thính giác. Dù nghiên cứu vẫn được tiếp tục, như WO 2014/039781, không có chất ức chế Notch thương mại nào nổi bật để điều trị chứng mất thính lực thần kinh cảm giác do mất tế bào lông thính giác gây ra.

Có nhu cầu phát hiện các hợp chất có hoạt tính ức chế sự truyền tín hiệu đường Notch. Cũng có nhu cầu phát hiện các hợp chất mà ức chế sự truyền tín hiệu đường Notch nhờ hoạt tính ức chế γ -secretaza. Cũng có nhu cầu phát hiện các hợp chất với đặc điểm cấu trúc khác biệt mà có thể góp phần vào hoạt tính ức chế sự truyền tín hiệu đường Notch và ức chế γ -secretaza. Cũng có nhu cầu phát hiện các hợp chất mà cảm ứng sự biểu hiện Atoh1 bằng cách ức chế sự truyền tín hiệu đường Notch. Cũng có nhu cầu phát hiện các hợp chất thể hiện được các đặc tính hấp thụ, phân phối, chuyển hóa và bài tiết mong muốn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là giải quyết các vấn đề của giải pháp kỹ thuật đã biết và đáp ứng các nhu cầu trên đây. Cụ thể:

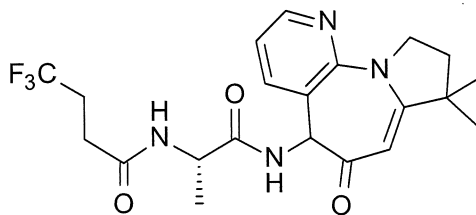
Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức:



Hợp chất 1

4,4,4-triflo-N-((2S)-1-((9-metoxo-3,3-dimetyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit, hoặc chất đồng phân gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang của nó, hoặc muối được dùng của chất bất kỳ trong số các chất này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức:



Hợp chất 2

N-((2S)-1-((8,8-dimethyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,4-triflobutan-1-amine, hoặc chất đồng phân gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang của nó, hoặc muối được dùng của chất bất kỳ trong số các chất này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất 1, hoặc chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó; hoặc hợp chất 2, hoặc chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó; hoặc muối được dùng của chất bất kỳ trong số các chất này, và chất mang được dùng.

Bản mô tả bộc lộ phương pháp điều trị bệnh ung thư mà là bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tế bào T, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho mạn tính, bệnh bạch cầu sinh tủy cấp, bệnh bạch cầu sinh tủy mạn tính, bệnh tăng sinh nguyên hồng cầu-nguyên tủy bào, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, u hắc tố, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư tuyến tụy, u nguyên bào xốp, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư gan, caxinom tế bào vảy ở miệng, bệnh ung thư da, u nguyên bào tủy, sacom mạch, sacom cơ vân, sacom mỡ, u mô bào xơ ác tính, caxinom tế bào gan, caxinom đường mật trong gan và ngoài gan, và caxinom bọc dạng tuyến ở bệnh nhân bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu điều trị hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dùng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dùng của chúng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư phổi ở bệnh nhân bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu điều trị hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dùng của

chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị chứng mất thính lực thần kinh cảm giác do mất tế bào lông thính giác gây ra ở bệnh nhân cần điều trị bao gồm bước cho bệnh nhân này sử dụng lượng hữu hiệu điều trị hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp cảm ứng sự sản sinh tế bào lông thính giác ở bệnh nhân cần cảm ứng, bao gồm bước cho bệnh nhân này sử dụng lượng hữu hiệu điều trị hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, để sử dụng trong điều trị.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, để sử dụng trong điều trị bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tế bào T, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho mạn tính, bệnh bạch cầu sinh tủy cấp, bệnh bạch cầu sinh tủy mạn tính, bệnh tăng sinh nguyên hồng cầu-nguyên tủy bào, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, u hắc tố, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư tuyến tụy, u nguyên bào xốp, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư gan, caxinom tế bào vảy ở miệng, bệnh ung thư da, u nguyên bào tủy, sacom mạch, sacom cơ vân, sacom mỡ, u mô bào xơ ác tính, caxinom tế bào gan, caxinom đường mật trong gan hoặc ngoài gan, hoặc caxinom bọc dạng tuyến.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư phổi.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng để sử dụng trong điều trị chứng mất thính lực thần kinh cảm giác do mất tế bào lông thính giác gây ra.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, để sử dụng trong việc cảm ứng sự sản sinh tế bào lông thính giác.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tế bào T, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho mạn tính, bệnh bạch cầu sinh tủy cấp, bệnh bạch cầu sinh tủy mạn tính, bệnh tăng sinh nguyên hồng cầu-nguyên tủy bào, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, u hắc tố, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư tuyến tụy, u nguyên bào xốp, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư gan, caxinom tế bào vảy ở miệng, bệnh ung thư da, u nguyên bào tủy, sacom mạch, sacom cơ vân, sacom mỡ, u mô bào xơ ác tính, caxinom tế bào gan, caxinom đường mật trong gan hoặc ngoài gan, hoặc caxinom bọc dạng tuyến.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư phổi.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, để sản xuất thuốc để điều trị chứng mất thính lực thần kinh cảm giác do mất tế bào lông thính giác gây ra.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, để sản xuất thuốc để cảm ứng sự sản sinh tế bào lông thính giác.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị chứng mất thính lực thần kinh cảm giác do mất tế bào lông thính giác gây ra ở động vật đồng hành họ chó bao gồm bước cho động vật đồng hành họ chó này sử dụng lượng hữu hiệu điều trị hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp cảm ứng sự sản sinh tế bào lông thính giác ở động vật đồng hành họ chó cần cảm ứng, bao gồm bước cho động vật đồng hành họ chó này sử dụng lượng hữu hiệu điều trị hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cụm từ “hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang của nó” chỉ hợp chất 4,4,4-triflo-N-((2S)-1-((9-methoxy-3,3-dimethyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit; hoặc chất đồng phân không đối quang 4,4,4-triflo-N-((S)-1-(((S)-9-methoxy-3,3-dimethyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit hoặc 4,4,4-triflo-N-((S)-1-(((R)-9-methoxy-3,3-dimethyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit. Tương tự, cụm từ “hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang của nó” chỉ hợp chất N-((2S)-1-((8,8-dimethyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino)-

1-oxopropan-2-yl)-4,4,4-triflobutanamit; hoặc chất đồng phân không đối quang N-((S)-1-(((S)-8,8-dimetyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,4-triflobutanamit hoặc N-((S)-1-(((R)-8,8-dimetyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,4-triflobutanamit.

Thuật ngữ “bệnh nhân” chỉ động vật có vú và “động vật có vú” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, người thời kỳ sau khi sinh. Thời kỳ sau khi sinh ở người là thời kỳ bắt đầu ngay sau khi sinh và kéo dài trong 30 ngày.

“Lượng hữu hiệu điều trị” hay “lượng hữu hiệu” nghĩa là liều hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, mà là chất đồng phân 1 hoặc chất đồng phân 2, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, mà là chất đồng phân 1 hoặc chất đồng phân 2, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc được phẩm chứa chất bất kỳ trong số các chất trên đây, cần để ức chế sự truyền tín hiệu Notch ở bệnh nhân ung thư, và tiêu diệt các tế bào ung thư đích hoặc làm chậm hoặc ngăn chặn sự tiến triển của bệnh ung thư ở bệnh nhân. Tương tự, “lượng hữu hiệu điều trị” hoặc “lượng hữu hiệu” nghĩa là liều hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, mà là chất đồng phân 1 hoặc chất đồng phân 2, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, mà là chất đồng phân 1 hoặc chất đồng phân 2, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc được phẩm chứa chất bất kỳ trong số các chất trên đây, cần để ức chế sự truyền tín hiệu Notch ở bệnh nhân mất thính lực thần kinh cảm giác do mất hoặc tổn thất tế bào lông thính giác gây ra, hoặc cảm ứng sự sản sinh tế bào lông thính giác.

“Chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của hợp chất 1, hoặc hợp chất 2” nghĩa là chất đồng phân 1 hoặc chất đồng phân 2 gần như không chứa chất đồng phân kia. Hợp chất 1 hoặc hợp chất 2 là “gần như tinh khiết về mặt chất đồng phân không đối quang” khi độ tinh khiết về mặt chất đồng phân ở vị trí số 6 của hợp chất 1 hoặc ở vị trí số 5 của hợp chất 2, là lớn hơn 90% lượng dư chất đồng phân đối ảnh. Theo một phương án, độ tinh khiết về mặt chất đồng phân là lớn hơn 95% lượng dư chất đồng phân đối ảnh ở vị trí số 6 của hợp chất 1 hoặc vị trí số 5 của hợp chất 2. Vẫn theo một phương án, độ tinh khiết về mặt chất đồng phân là lớn hơn 98% lượng dư chất đồng phân đối ảnh ở vị trí số 6 của hợp chất 1 hoặc vị trí số 5 của hợp chất 2.

Theo một phương án nữa, độ tinh khiết về mặt chất đồng phân là lớn hơn 99% lượng dư chất đồng phân đối ảnh ở vị trí số 6 của hợp chất 1 hoặc vị trí số 5 của hợp chất 2. Tất cả các chất đồng phân lập thể, bao gồm hỗn hợp đồng phân không đối quang của hợp chất 1 hoặc hợp chất 2 đều thuộc phạm vi của sáng chế.

Liều dự kiến của hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối được dụng của chúng, để điều trị bệnh ung thư nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100 mg/bệnh nhân/ngày. Liều ưu tiên được dự kiến nằm trong khoảng từ 1,0 đến 75 mg/bệnh nhân/ngày. Liều ưu tiên nhất được dự kiến nằm trong khoảng từ 2,0 đến 50 mg/bệnh nhân/ngày. Liều dự kiến của hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang của nó, hoặc muối được dụng của chúng, để điều trị chứng mất thính lực thần kinh cảm giác do mất hoặc tổn thất tế bào lông thính giác gây ra, hoặc cảm ứng sự sản sinh tế bào lông thính giác nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100 mg/bệnh nhân/ngày. Liều ưu tiên được dự kiến nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 mg/bệnh nhân/ngày. Liều ưu tiên nhất được dự kiến nằm trong khoảng từ 0,2 đến 1,0 mg/bệnh nhân/ngày.

Đối với bệnh ung thư, chứng mất thính lực thần kinh cảm giác, hoặc cảm ứng sự sản sinh tế bào lông thính giác, liều chính xác cần để điều trị cho bệnh nhân và độ dài khoảng thời gian điều trị sẽ được bác sĩ xác định qua xem xét giai đoạn và độ trầm trọng của bệnh cũng như nhu cầu cụ thể và đáp ứng của từng bệnh nhân riêng lẻ. Mặc dù được biểu thị bằng liều lượng trên cơ sở ngày, chế độ sử dụng có thể được điều chỉnh để thu được lợi ích tối ưu về mặt điều trị cho bệnh nhân và kiểm soát và cải thiện các độc tính bất kỳ liên quan đến thuốc. Ngoài liều hằng ngày, việc sử dụng hai ngày một lần (Q2D); hai ngày một lần trong khoảng thời gian năm ngày sau đó là hai ngày không sử dụng (T.I.W.); ba ngày một lần (Q3D); hoặc một tuần một lần (Q.I.W.) trong chu kỳ chia liều 21 ngày; hoặc các chế độ sử dụng khác có thể là thích hợp.

Thuật ngữ "phép điều trị," "điều trị," và "việc điều trị," bao gồm phổ can thiệp đầy đủ đối với bệnh ung thư, chứng mất thính lực thần kinh cảm giác do mất hoặc tổn thất tế bào lông thính giác gây ra, hoặc cảm ứng sự sản sinh tế bào lông thính giác, như sử dụng hoạt chất để làm nhẹ, làm chậm hoặc đảo ngược một hoặc nhiều triệu chứng và làm chậm sự tiến triển bệnh ung thư hoặc sự mất hoặc tổn thất tế bào lông thính

giác mà bệnh nhân mắc phải, hoặc cảm ứng sự sản sinh tế bào lông thính giác ở bệnh nhân.

“Động vật đồng hành họ chó” chỉ các động vật họ chó nuôi trong nhà và gây giống trong nhà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thú nuôi, chó nghiệp vụ, chó cứu hộ, chó chăn giữ vật nuôi và cho canh gia súc.

“Chứng mất thính giác,” “chứng mất thính lực thần kinh cảm giác” hoặc “mất thính lực” ở người nghĩa là ngưỡng nghe (âm thanh nhẹ nhất nghe được (cường độ) ở tần số cụ thể) ở bệnh nhân là 21 đến 40 dB đối với mức nhẹ; 41 đến 55 dB đối với mức vừa; 56 đến 70 dB đối với mức hơi nặng; 71 đến 90 dB đối với mức nặng; và 91 dB và cao hơn đối với mức rất nặng. Cường độ được kiểm tra thường nằm trong khoảng từ 0 dB đến không quá 120 dB. Các tần số được kiểm tra thường là 250, 500, 1000, 2000, 4000 và 8000 Hz. Việc đánh giá thính lực để chẩn đoán được tiến hành bằng các xét nghiệm đã biết và được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sử dụng bao gồm phương pháp đo thính lực đơn âm bao gồm xác định trị số trung bình đơn âm, đo thính lực lời bao gồm ngưỡng tiếp nhận giọng nói, phương pháp đánh giá đáp ứng thính giác thân não (ABR hay BAER), phương pháp điện đồ ốc tai qua hòm nhĩ (ECOG), và phương pháp đo âm ốc tai (OAE). Việc đánh giá đối với trẻ sơ sinh và trẻ em cũng được tiến hành bằng cách xét nghiệm đã biết và được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sử dụng bao gồm đo thính lực hành vi có hỗ trợ hình ảnh, đo thính lực đồ chơi, đo âm ốc tai (OAE), và đánh giá đáp ứng thính giác thân não.

Hợp chất theo sáng chế tốt hơn là được bào chế ở dạng dược phẩm với chất mang dược dụng và được dùng theo nhiều đường khác nhau. Để điều trị bệnh ung thư, tốt hơn nếu các dược phẩm này để dùng theo đường miệng.

Để điều trị chứng mất thính lực thần kinh cảm giác do mất hoặc tổn thất tế bào lông thính giác gây ra, hoặc cảm ứng sự sản sinh tế bào lông thính giác, dược phẩm thích hợp để dùng đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa để thực hiện việc điều trị khu trú hoặc hệ thống có thể được bào chế và sử dụng. Các chế phẩm dùng đường miệng bao gồm viên nén, viên nén được bao, viên nang cứng hoặc viên nang gelatin mềm, dung dịch, nhũ dịch hoặc hỗn dịch. Các dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được bào chế để cho phép sử dụng bao gồm các thuốc tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, trong bắp, trong màng bụng, trong màng phổi, trong xương ức, qua hòm nhĩ,

trong tai trong, hoặc thuốc tiêm trong ốc tai, hoặc dịch truyền. Các dược phẩm này có thể được bào chế để cho phép hợp chất theo sáng chế sinh khả dụng khi sử dụng dược phẩm cho bệnh nhân, hoặc được bào chế để thực hiện giải phóng có kiểm soát hoặc giải phóng kéo dài thành phần dược tính. Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua hòm nhĩ đến khoang tai giữa được ưu tiên, và sử dụng ở hốc cửa sổ tròn của tai giữa cũng được ưu tiên. Tiêm trong tai trong và tiêm trong ốc tai cũng được dự tính. Đường dùng được ưu tiên để điều trị chứng mất thính lực là tiêm qua hòm nhĩ, tuy nhiên không loại trừ các dược phẩm thích hợp để dùng theo đường dùng khác để phân phối toàn thân và có thể bao gồm các dược phẩm và chế độ liều thay thế hoặc bổ sung cho việc sử dụng cục bộ qua hòm nhĩ. Cũng ưu tiên dược phẩm phân phối cục bộ giải phóng chậm trong đó khoảng thời gian giải phóng có thể thay đổi từ ba (3) ngày đến chín mươi (90) ngày tùy thuộc vào chất dẫn phân phối, hoặc hỗn hợp các chất dẫn phân phối, trong đó hợp chất 1, hoặc chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết, hoặc muối dược dụng của chúng, được kết hợp.

Các dược phẩm, quy trình điều chế, và hệ thống phân phối để phân phối có hướng đích các thuốc là đã biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Remington: The science and practice of pharmacy (A. Gennaro, et al., eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995); Salt and Plontke, "Principles of Local Drug Delivery to the Inner Ear", *Audiol Neurotol*, 2009, (14); 350-360; Rhee, et al., "Sustained-Release Injectable Drug Delivery," *Pharmaceutical Technology, Special Issue Drug Delivery*, 01 Nov. 2010. Các dược phẩm có thể chứa chất bảo quản, chất hòa tan, chất ổn định, chất làm ẩm, chất nhũ hoá, chất làm ngọt, chất màu, chất tạo hương vị, muối để thay đổi áp suất thẩm thấu, chất đệm, chất che vị, hoặc chống oxy hoá.

Hợp chất theo sáng chế có khả năng phản ứng với một số axit hữu cơ và vô cơ để tạo ra các muối cộng axit dược dụng. Các muối dược dụng như vậy và các phương pháp thông thường để điều chế chúng là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, P. Stahl, et al., *Handbook of pharmaceutical salts: properties, selection and use*, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, January 1977.

Hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối dược dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, hoặc muối dược dụng của chúng, có thể được điều chế bằng nhiều

quy trình khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, cũng như các quy trình được mô tả sau đây. Các bước tổng hợp cụ thể có thể được kết hợp theo nhiều cách khác nhau để điều chế hợp chất 1, chất đồng phân không đối quang của nó, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân không đối quang của nó, hoặc muối được dụng của chúng.

Hợp chất 1 có tên là: 4,4,4-triflo-N-((2S)-1-((9-metoxi-3,3-dimetyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit và cũng có thể có tên là 4,4,4-triflo-N-((1S)-2-[(9-metoxi-3,3-dimetyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-pyrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-yl)amino]-1-metyl-2-oxoetyl}butanamit; và cũng có thể có tên là: butanamit, 4,4,4-triflo-N-[(1S)-1-metyl-2-oxo-2-[(2,3,5,6-tetrahydro-9-metoxi-3,3-dimetyl-5-oxo-1H-pyrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-yl)amino]etyl]-; và các tên khác có thể được sử dụng để xác định rõ ràng hợp chất 1. Các chất đồng phân không đối quang có tên là 4,4,4-triflo-N-((S)-1-(((S)-9-metoxi-3,3-dimetyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit và 4,4,4-triflo-N-((S)-1-(((R)-9-metoxi-3,3-dimetyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit. Các tên khác có thể được sử dụng để xác định rõ ràng từng chất đồng phân không đối quang.

Hợp chất 2 có tên là: N-((2S)-1-((8,8-dimetyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,4-triflobutanamit và cũng có thể có tên là N-((1S)-2-[(8,8-dimetyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino]-1-metyl-2-oxoetyl}-4,4,4-triflobutanamit; và cũng có thể có tên là: butanamit, 4,4,4-triflo-N-[(1S)-1-metyl-2-oxo-2-[(6,8,9,10-tetrahydro-8,8-dimetyl-6-oxo-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino]etyl]-; và các tên khác có thể được sử dụng để xác định rõ ràng hợp chất 2. Các chất đồng phân không đối quang có tên là N-((S)-1-(((S)-8,8-dimetyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,4-triflobutanamit và N-((S)-1-(((R)-8,8-dimetyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,4-triflobutanamit. Các tên khác có thể được sử dụng để xác định rõ ràng từng chất đồng phân không đối quang.

Cần hiểu rằng hợp chất 1 và hợp chất 2 được mô tả với một trong số hai tâm bất đối cố định. Ở đây, các định danh Cahn-Ingold-Prelog (R)- và (S)- được dùng để chỉ các chất đồng phân cụ thể. Các chất đồng phân lập thể có thể được điều chế bằng cách tổng hợp đặc hiệu lập thể bằng cách sử dụng các nguyên liệu ban đầu tinh khiết hoặc được làm giàu chất đồng phân đối ảnh. Các chất đồng phân lập thể cụ thể của các nguyên liệu ban đầu, các hợp chất trung gian, hoặc hỗn hợp racemic chứa hợp chất 1 hoặc hợp chất 2 có thể được tách bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, như các kỹ thuật nêu trong tài liệu *Stereochemistry of Organic Compounds*, E. I. Eliel and S. H. Wilen (Wiley 1994) và *Enantiomers, Racemates, và Resolutions*, J., Jacques, A. Collet, and S. H. Wilen (Wiley 1991), bao gồm phương pháp sắc ký trên các pha tĩnh bất đối, phương pháp tách bằng enzym, hoặc phương pháp kết tinh phân đoạn hoặc phương pháp sắc ký các chất đồng phân không đối quang được tạo ra cho mục đích này, như các muối đồng phân không đối quang. Nếu một hợp chất bất đối được phân lập hoặc tách thành các chất đồng phân của nó, nhưng các cấu hình lập thể tuyệt đối hoặc độ quay quang là chưa xác định, các chất đồng phân được định danh tùy ý là chất đồng phân 1 và chất đồng phân 2 tương ứng với trật tự giải hấp của từng chất trong phương pháp sắc ký bất đối và nếu phương pháp sắc ký bất đối được bắt đầu sớm trong quá trình tổng hợp, cùng cách định danh như vậy được áp dụng cho các hợp chất trung gian và hợp chất ví dụ sau đó. Trong khi tất cả các hỗn hợp chứa hợp chất theo sáng chế đều thuộc phạm vi của sáng chế, phương án ưu tiên là hợp chất 1, chất đồng phân 2, hoặc hợp chất 2, chất đồng phân 2.

Các hợp chất được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu trong quá trình tổng hợp các hợp chất theo sáng chế là đã biết rõ và, nếu chưa có bán trên thị trường thì dễ dàng tổng hợp được nhờ các tài liệu tham khảo cụ thể đã đưa ra, bằng các quy trình chuẩn mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này thường dùng hoặc có trong các tài liệu tham khảo chung.

Ví dụ về các quy trình và phương pháp đã biết bao gồm các quy trình và phương pháp được mô tả trong tài liệu tham khảo chung như *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers Inc, 1989; *Compendium of Organic Synthetic Methods*, Volumes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; *Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure*, 5th Edition, Michael B. Smith và Jerry March, Wiley Interscience, 2001; *Advanced Organic Chemistry*, 4th Edition, Part

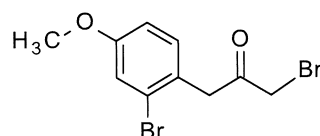
B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey and Richard J. Sundberg, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2000, etc., và các tài liệu tham khảo được việc dẫn trong đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả, các thuật ngữ sau có ý nghĩa như chỉ ra: "mAtoh1" chỉ protein atonal homolog 1 của chuột; "hAtoh 1" chỉ protein atonal homolog 1 của người; "Atoh1" chỉ gen atonal homolog 1 của người; "môi trường cơ bản" chỉ môi trường 500ml DMEM/F12 + 5ml dung dịch gốc N2 100X và 10ml dung dịch gốc B27 50X cộng với 500µl dung dịch gốc Ampixilin (1000X, 50mg/ml) và 1667µl Fungizone (300X); "bFGF" chỉ yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản; "DMEM" chỉ môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco; "DMSO" chỉ dimethylsulfoxit; "EDTA" chỉ axit etylenđiamintetraaxetic; "EGF" chỉ yếu tố sinh trưởng biểu bì; "EGTA" chỉ axit etylen glycol-bis(2-aminoetylene)-N,N,N',N'-tetraaxetic; ES/MS chỉ phương pháp phổ khối phun điện tử; "FBS" chỉ huyết thanh thai bò; "GFP" chỉ protein phát huỳnh quang xanh; "h" chỉ giờ hoặc nhiều giờ; "HBSS" chỉ dung dịch muối cân bằng Hank; "HEK" chỉ thận phôi người; "IC₅₀" chỉ nồng độ chất mà tạo ra 50% đáp ứng ức chế tối đa có thể có đối với chất đó; "IgG" chỉ globulin miễn dịch G; "Math1" chỉ gen atonal homolog 1 người; "môi trường A" chỉ 200ml môi trường cơ bản + EGF bFGF + IGF-1 + heparan sulfat lần lượt ở 20, 10, 50, và 50ng/ml; "MEM" chỉ môi trường thiết yếu tối thiểu; "min" chỉ phút; "MS" chỉ phổi khối; "N1ICD" chỉ vùng nội bào Notch1; "nGFP" chỉ protein phát huỳnh quang xanh ở nhân; "OC" chỉ cơ quan Corti; "PBS" chỉ nước muối đệm phosphat; "PBST" chỉ nước muối đệm phosphat + Tween®; "qPCR" chỉ phản ứng chuỗi polymeraza định lượng; "qRT-PCR" chỉ phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược định lượng; "rpm" chỉ số vòng trên một phút; "đệm RLT" chỉ đệm RNeasyLysis; "RT" chỉ nhiệt độ trong phòng; "Tbp" chỉ protein liên kết TATA;

Ví dụ điều chế 1

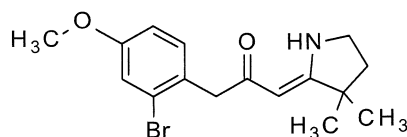
1-Bromo-3-(2-bromo-4-methoxy-phenyl)propan-2-on



Bổ sung từng giọt trimethylsilyldiazometan (118,4 mL, 236,80 mmol, 2M trong hexan) vào dung dịch có khuấy ở 0°C chứa 2-(2-bromo-4-methoxy-phenyl)axetyl clorua (52 g, 197,3 mmol) trong tetrahydrofuran (197 mL) và axetonitril (197 mL) trong nitơ. Sau 15 phút để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 2 giờ trong nitơ. Cô đặc để thu được dầu đặc màu đỏ (61 g). Bổ sung từng giọt hydro bromua (36 mL, 197 mmol, 33% trong axit axetic) vào dung dịch có khuấy ở 5°C chứa 2-(2-bromo-4-methoxy-phenyl)axetyl azit từ bước trước đó trong axit axetic (265 mL). Sau khi bổ sung, để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng trong nitơ. Sau 45 phút, ngừng phản ứng bằng nước đá/nước, (500 mL) tạo ra chất kết tủa màu nâu. Lọc các chất rắn và rửa bằng nước (100 mL) và hexan (100 mL) và làm khô trong chân không ở 45°C trong 2 giờ để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu màu cam (63,0 g, 99%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7,17-7,12 (m, 2H), 6,85 (dd, $J = 2,5, 8,5$ Hz, 1H), 4,03 (s, 2H), 3,97 (s, 2H), 3,79 (s, 3H).

Ví dụ điều chế 2

(3Z)-1-(2-Bromo-4-methoxy-phenyl)-3-(3,3-dimethylpyrrolidin-2-yliden)propan-2-on

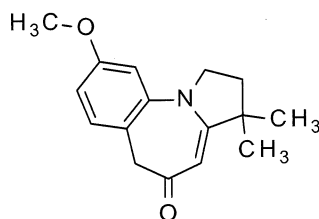


Bổ sung 3,3-dimethylpyrrolidin-2-thion (26,5 g, 205 mmol) vào huyền phù chứa hợp chất trung gian được tạo ra trong ví dụ điều chế 1, 1-bromo-3-(2-bromo-4-methoxy-phenyl)propan-2-on (60,00 g, 186 mmol), và kali iodua (31 g, 86 mmol) trong tetrahydrofuran (600 mL) ở nhiệt độ trong phòng theo một phần và khuấy trong 1 giờ. Bổ sung tert-butyl ete (200 mL), lọc các chất rắn ra và rửa nhẹ bánh lọc bằng methyl-tert-butyl ete (100 mL) để tạo ra 1-(2-bromo-4-methoxy-phenyl)-3-[(4,4-dimethyl-2,3-dihydropyrrol-1-ium-5-yl)sulfanyl]propan-2-on iodua dưới dạng chất rắn màu vàng (100 g). Bổ sung triethylamin (56 mL, 401 mmoles) và triphenylphosphin (58 g, 221 mmol) vào huyền phù chứa chất rắn này (100 g, 201 mmol) trong axetonitril (1 L), và khuấy ở 65°C trong 2,5 giờ. Bổ sung methyl tert-butyl ete (200 mL) và lọc các chất rắn ra. Làm bay hơi dịch lọc, nghiền tinh chế phần cặn bằng methyl tert-butyl ete (20 mL) và lọc các chất rắn ra (hai lần). Làm bay hơi các dịch lọc kết hợp để thu được 50 g

nguyên liệu thô. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng gradien 20-50% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ (41 g, 70%). MS (m/z): 338,0/340,0 (M⁺/M+2).

Ví dụ điều chế 3

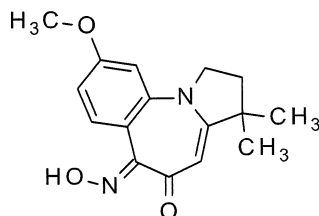
9-metoxi-3,3-dimetyl-2,3-dihydro-1H-pyrololo[1,2-A][1]benzazepin-5(6H)-on



Đuổi khí/sục bằng nitơ (x3) hỗn hợp chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 2, (3Z)-1-(2-bromo-4-metoxi-phenyl)-3-(3,3-dimethylpyrrolidin-2-yliden)propan-2-on (40,0 g, 118 mmol), paladi axetat (2,7 g, 12 mmol), xesi carbonat (77 g, 237 mmol), 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimetyl-xanthen (13,7 g, 24 mmol), và N-metyl-2-pyrrolidon (1,2 L). Đun nóng huyền phù này ở 150°C trong 4 giờ. Làm mát đến nhiệt độ trong phòng, lọc các chất rắn ra, rửa bằng etyl axetat và loại bỏ các chất rắn. Bổ sung etyl axetat (1 L) và nước (500 mL) vào dịch lọc, lọc các chất rắn ra qua đất diatomit và loại bỏ. Tách các lớp dịch lọc, chiết rửa lớp nước bằng etyl axetat (2 x 20 mL), tiếp theo là bằng diclometan (3 x 100 mL). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp hai lần bằng dung dịch nước natri bicarbonat 5%, làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 100 mL dầu màu nâu sẫm. Lọc nguyên liệu này qua tấm silic oxit, giải hấp bằng diclometan tiếp theo bằng 1% metanol/diclometan và cô đặc dịch lọc. Phân đoạn phần còn lại giữa etyl axetat và dung dịch nước natri bicarbonat 5%, chiết ngược từ nước bằng etyl axetat, làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được sản phẩm thô dưới dạng bột màu nâu sẫm. Hòa tan bột thu được trong etyl axetat (250 mL), bổ sung SiliaBond Thiol® (80 g) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Lọc các chất rắn ra, rửa bánh lọc bằng etyl axetat và diclometan, cô đặc dịch lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu nâu nhạt (19,6 g, 65%). MS (m/z): 258,0 (M+H).

Ví dụ điều chế 4

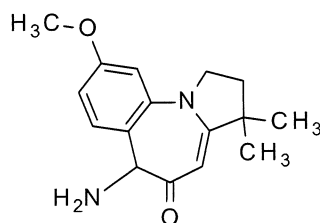
6-Hydroxyimino-9-metoxi-3,3-dimetyl-2,3-dihydro-1H-pyrol[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-on



Bổ sung kali tert-butoxit (11 g, 98 mmol) theo nhiều phần vào dung dịch có khuấy ở 0°C chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 3, 9-metoxi-3,3-dimetyl-2,3-dihydro-1H-pyrol[1,2-A][1]benzazepin-5(6H)-on (16,8 g, 65 mmol), trong tetrahydrofuran (336 mL) và khuấy trong 15 phút. Bổ sung từng giọt amyl nitrit (12,2 mL, 91 mmol) và khuấy hỗn hợp này trong 30 phút ở 0°C. Rót hỗn hợp phản ứng lên nước đá/nước (200 mL) và chiết hỗn hợp này bằng etyl axetat (2 x 200 mL). Lọc các chất rắn đã kết tinh ra, chiết từ dịch lọc bằng diclometan (2 x 100 mL). Rửa các chất hữu cơ kết hợp bằng nước muối (100 mL), làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc để tạo ra chất rắn màu nâu nhạt. Nghiền tinh chế chất rắn này bằng metyl tert-butyl ete/hexan tỷ lệ 1:1, kết hợp với chất rắn đã thu gom trước đó để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu vàng (16,5 g, 88%). MS (m/z): 287,1 (M+H).

Ví dụ điều chế 5

6-Amino-9-metoxi-3,3-dimetyl-2,3-dihydro-1H-pyrol[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-on

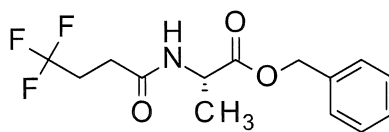


Bổ sung từng giọt axit trifloaxetic (17 mL, 231 mmol) trong 10 phút vào huyền phù có khuấy ở 5°C-10°C chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 4, 6-hydroxyimino-9-metoxi-3,3-dimetyl-2,3-dihydro-1H-pyrol[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-on (16,5 g, 58 mmol), và bụi kẽm (11,3 g, 173 mmol) trong diclometan (248

mL) sau đó để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng. Lọc hỗn hợp này qua tấm đất diatomit, rót dịch lọc qua hỗn hợp nước đá và dung dịch nước natri carbonat bão hòa (1:1, 500 mL). Lọc huyền phù thu được qua đất diatomit và rửa nhẹ tấm lọc bằng diclometan. Chiết từ lớp nước bằng diclometan (100 mL), làm khô các lớp hữu cơ kết hợp bằng natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng bột màu nâu nhạt (14,7 g, 94%). MS (m/z): 273,1 (M+H).

Ví dụ điều chế 6

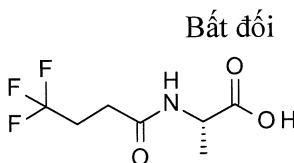
Benzyl (2S)-2-(4,4,4-triflobutanoylamino)propanoat



Bổ sung este hydroclorua của L-alanin benzyl (7 g, 32,5 mmol), diisopropyletylamin (28 mL, 162 mmol), hydroxybenzotriazol hydrat (7,5 g, 49 mmol), và 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua (9,3 g, 49 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa axit 4,4,4-triflobutyric (7,1 g, 49 mmol) trong diclometan (162 mL) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong N₂ trong 20 giờ. Ngừng phản ứng bằng dung dịch nước axit xitric 20% (150 mL), khuấy hỗn hợp này trong 5 phút, tách các lớp và chiết từ lớp nước bằng diclometan (100 mL). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng dung dịch nước natri bicarbonat bão hòa (150 mL), làm khô bằng magie sulfat, lọc và cô đặc để thu được 10,6 g chất rắn màu vàng nhạt. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng gradien 25-50% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng (9,2 g, 94%). MS (m/z): 304,2 (M+H).

Ví dụ điều chế 7

Axit (2S)-2-(4,4,4-triflobutanoylamino)propanoic

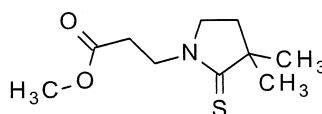


Bổ sung paladi (1,8 g, 0,8 mmol, 5% trên C) vào dung dịch có khuấy chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 6, benzyl (2S)-2-(4,4,4-

triflobutanoylamino)propanoat (8,8 g, 29 mmol), trong metanol (88 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Đuổi khí hỗn hợp này và khuấy trong hydro (bóng khí) trong 5 giờ. Lọc hỗn hợp qua đất diatomit, rửa tấm lọc bằng metanol và cô đặc dịch lọc để thu được chất rắn màu trắng. Nghiền tinh chế các chất rắn bằng diclometan và làm khô trong chân không qua đêm ở nhiệt độ trong phòng để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng (6,11 g, hiệu suất 99%). MS (m/z): 214,1 (M+H).

Ví dụ điều chế 8

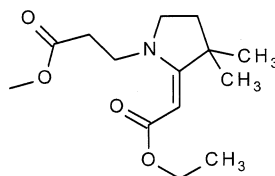
Metyl 3-(3,3-dimetyl-2-thioxopyrrolidin-1-yl)propanoat



Hòa tan 3,3-dimethylpyrrolidin-2-thion (15,7 g, 122 mmol) và metyl acrylat (12 mL, 134 mmol) trong tetrahydrofuran (100 mL) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong nitơ. Bổ sung natri hydroxit (0,8 g, 20 mmol) và khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng trong nitơ. Pha loãng bằng nước muối, chiết bằng etyl axetat, tách các lớp, rửa lớp hữu cơ bằng nước muối, làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc để tạo ra 27,5 g các chất rắn thô. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng gradien 20-50% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng (25,9 g, 99%). MS (m/z): 216,2 (M+H).

Ví dụ điều chế 9

Metyl 3-[(2Z)-2-(2-etoxy-2-oxo-etyliden)-3,3-dimetyl-pyrrolidin-1-yl]propanoat

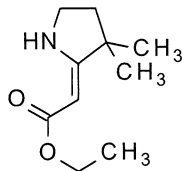


Bổ sung tetrakis(axetato)dirodi(II) (3,74 g, 8,5 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 8, metyl 3-(3,3-dimetyl-2-thioxopyrrolidin-1-yl)propanoat (41,4 g, 192 mmol), trong toluen (156 mL) và đun nóng đến 110°C trong nitơ. Bổ sung từng giọt etyldiazoaxetat (89 mL, 844 mmol) trong khoảng 18 giờ sau đó đun nóng qua đêm ở 110°C. Cô đặc và tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng 30% etyl axetat trong

hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu màu vàng (34,5 g, 67%). MS (m/z): 270,2 (M+H).

Ví dụ điều chế 10

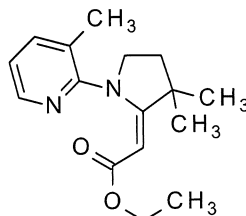
Etyl (2Z)-2-(3,3-dimethylpyrrolidin-2-yliden)axetat



Bổ sung từng giọt kali hexametyldisilazit (301 mL, 0,5 M trong toluen, 151 mmol) trong 45 phút vào dung dịch có khuấy chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 9, methyl 3-[(2Z)-2-(2-etoxy-2-oxo-etyliden)-3,3-dimethylpyrrolidin-1-yl]propanoat (33,8 g, 126 mmol), trong tetrahydrofuran (430 mL) trong nitor bằng cách sử dụng bể nước/nước đá để giữ nhiệt độ <30°C, khuấy trong 40 phút sau khi hoàn thành việc bổ sung. Ngừng phản ứng bằng dung dịch nước natri bicarbonat bão hòa (250 mL) sau đó cô đặc. Phân đoạn giữa diethyl ete và dung dịch nước muối, chiết từ lớp nước bằng etyl axetat (x 4), làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 37 g nguyên liệu. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng 10% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (9,1 g, 40%). MS (m/z): 184,2 (M+H).

Ví dụ điều chế 11

Etyl (2Z)-2-[3,3-dimethyl-1-(3-methyl-2-pyridyl)pyrrolidin-2-yliden]axetat

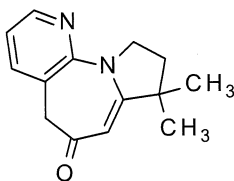


Kết hợp 2-bromo-3-methylpyridin (1,5 g, 8,7 mmol), hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 10, etyl (2Z)-2-(3,3-dimethylpyrrolidin-2-yliden)axetat (1,6 g, 8,7 mmol), và sym-dimetyletylen diamin (0,77 mL, 8,7 mmol) trong 1,4-dioxan (15 mL) trong bình phản ứng. Sục bóng khí nitor qua dung dịch này, có khuấy trong 10 phút. Bổ sung kali carbonat (3,6 g, 26 mmol) và đồng (I) iodua (0,83 g, 4,4 mmol) tắt

cả trong một lần, bịt kín và đun nóng có khuấy hỗn hợp ở 120°C trong 2 ngày Pha loăng bằng diclometan, lọc qua đất điatomit và cô đặc dịch lọc. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng gradien 5-100% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu màu vàng nhạt (1,58 g, 66%). MS (m/z): 275,0 (M+H).

Ví dụ điều chế 12

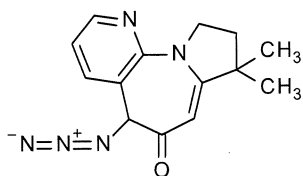
8,8-dimetyl-9,10-dihydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrrolo[1,2-a]azepin-6(8H)-on



Bổ sung natri bis(trimetylsilyl)amit (22 mL, 1M trong tetrahydrofuran, 22 mmol) bằng xi lanh vào dung dịch có khuấy chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 11, etyl (2Z)-2-[3,3-dimetyl-1-(3-metyl-2-pyridyl)pyrrolidin-2-yliden]axetat (2,88 g, 10,5 mmol), và tetrahydrofuran (60 mL) trong bình phản ứng. Bịt kín bình và đun nóng ở 70°C có khuấy trong 3 ngày. Làm mát đến nhiệt độ trong phòng, ngừng phản ứng bằng nước muối, chiết bằng etyl axetat, làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được dầu màu nâu. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng gradien 50-100% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu vàng (1,70 g, 71%). MS (m/z): 229,2 (M+H).

Ví dụ điều chế 13

6-Azido-10-aza-3,3-dimetyl-2,6-dihydro-1H-pyrrolo[1,2-a][1]benzazepin-5-on

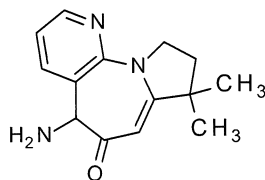


Bổ sung liti diisopropylamit (7,0 mL, 10,5 mmol, 1,5 M trong hexan) trong 10 phút vào dung dịch có khuấy ở -78°C chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 12, 8,8-dimetyl-9,10-dihydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrrolo[1,2-a]azepin-6(8H)-on (1,85 g, 8,1 mmol), trong tetrahydrofuran (50 mL) trong nitơ. Sau 30 phút bổ sung axit

axetic (2,3 mL, 41 mmol) bằng xi lanh sau đó để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng trong nitơ. Ngừng phản ứng bằng dung dịch nước natri bicarbonat bão hòa. Phân đoạn hỗn hợp này giữa nước muối và etyl axetat, tách các lớp, rửa lớp etyl axetat bằng nước muối, làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được chất rắn màu nâu. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng gradien 5-60% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,2 g, 55%). MS (m/z): 270,2 (M+H).

Ví dụ điều chế 14

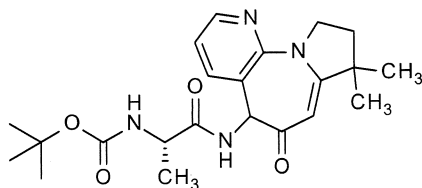
5-Amino-3,3-dimetyl-9,10-dihydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrrolo[1,2-a]azepin-6(8H) -on



Bổ sung bụi kẽm (1,2 g, 18 mmol) tiếp theo là amoni clorua (5 g, 66 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 13, 6-azido-10-aza-3,3-dimetyl-2,6-dihydro-1H-pyrrolo[1,2-a][1]benzazepin-5-on (1,2 g, 4,5 mmol), trong etanol (50 mL) và nước (15 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 1 giờ, pha loãng bằng etyl axetat, lọc các chất rắn ra và cô đặc dịch lọc. Làm treo phần còn lại giữa etyl axetat và nước muối, tách các lớp, làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng gradien 5-40% [10% amoniac 2M trong metanol/diclometan] trong diclometan để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu vàng (0,72 g, 67%). MS (m/z): 244,2 (M+H).

Ví dụ điều chế 15

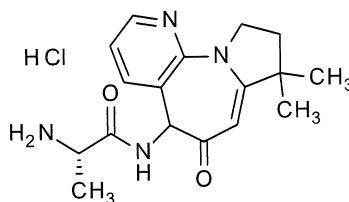
tert-Butyl N-[(1S)-2-[(10-aza-3,3-dimetyl-5-oxo-2,6-dihydro-1H-pyrrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-yl)amino]-1-metyl-2-oxo-etyl] carbamat



Bổ sung axit (2S)-2-(tert-butoxycarbonylamino)propanoic (0,69 g, 3,6 mmol), 1-hydroxybenzotriazol hydrat (0,55 g, 3,6 mmol) và diisopropyletylamin (0,67 mL, 3,9 mmol) vào dung dịch có khuấy ở 0°C chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 14, 5-amino-3,3-dimetyl-9,10-dihydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-6(8H)-on (0,72 g, 3,0 mmol), trong tetrahydrofuran (10 mL) trong nitơ. Bổ sung 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydroclorua (0,68 g, 3,6 mmol) và để cho hỗn hợp này ấm đến nhiệt độ phòng trong nitơ. Sau 2 giờ, pha loãng bằng nước và chiết bằng ethyl axetat. Rửa lớp hữu cơ bằng nước muối, làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng gradien 50-100% ethyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu vàng (1,04 g, 84%). MS (m/z): 415,0 (M+H).

Ví dụ điều chế 16

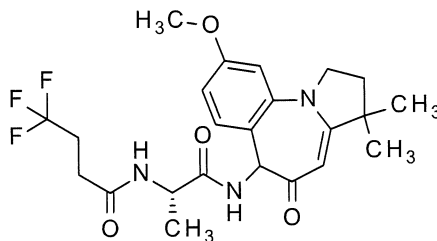
(2S)-2-Amino-N-(10-aza-3,3-dimetyl-5-oxo-2,6-dihydro-1H-pyrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-yl)propanamit hydroclorua



Bổ sung hydro clorua (12,5 mL, 50 mmol, 4M trong dioxan) vào dung dịch có khuấy chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 15 tert-butyl N-[(1S)-2-[(10-aza-3,3-dimetyl-5-oxo-2,6-dihydro-1H-pyrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-yl)amino]-1-metyl-2-oxo-etyl] carbamat (1,04 g, 2,5 mmol), trong 1,4-dioxan (40 mL) và làm ấm đến 45°C có khuấy. Khi phương pháp LC/MS cho thấy phản ứng đã hoàn thành, cô đặc để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu vàng (0,93 g, thô). MS (m/z): 315,2 (M+1).

Ví dụ 1

4,4,4-triflo-N-((2S)-1-((9-metoxi-3,3-dimetyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit



Phần 1

Chất đồng phân không đối quang 4,4,4-triflo-N-((2S)-1-((9-metoxo-3,3-dimetyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit

Bổ sung 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimit hydroclorua (12,4 g, 65 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 5, 6-Amino-9-metoxo-3,3-dimetyl-2,3-dihydro-1H-pyrol[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-on, và hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 7, axit (2S)-2-(4,4,4-triflobutanoylamino)propanoic (10,9 g, 51 mmol), trong diclometan (294 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Làm mát hỗn hợp này đến 5°C, bổ sung 1-hydroxybenzotriazol (8,75 g, 65 mmol) và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Rửa hỗn hợp này bằng nước (3 x 100 mL), làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc để tạo ra chất rắn màu tối. Nghiền tinh chế bằng metyl tert-butyl ete để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang) dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ (22,0 g, 87%). MS (m/z): 468,1 (M+H).

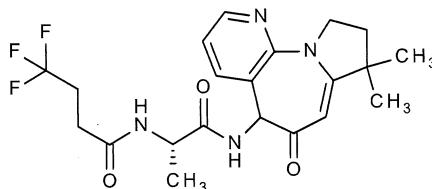
Phần 2

4,4,4-triflo-N-((2S)-1-((9-metoxo-3,3-dimetyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit, chất đồng phân 1 và 2

Tách hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang từ ví dụ 1, phần 1 trên cột Chiralpak AD giải hấp bằng 10% axetonitril/etanol (0,2% dimetyletylamin) để thu được chất đồng phân 1 (R_t =3,20 phút) dưới dạng chất rắn màu trắng (9,8 g, 38%) và chất đồng phân 2 (R_t =7,37 phút) dưới dạng chất rắn màu trắng (9,0 g, 36%). MS (m/z): 468,2 (M+H) đối với cả hai chất đồng phân.

Ví dụ 2

N-((2S)-1-((8,8-dimethyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,4-triflobutanamit



Phần 1

Chất đồng phân không đối quang N-{(1S)-2-[(8,8-dimethyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino]-1-metyl-2-oxoetyl}-4,4,4-triflobutanamit

Bổ sung axit 4,4,4-triflobutanoic (0,45 g, 3,2 mmol), 1-hydroxybenzotriazol hydrat (0,49 g, 3,2 mmol) và diisopropyletylamin (2,3 mL, 13,2 mmol) vào dung dịch có khuấy ở 0°C chứa hợp chất trung gian được tạo ra theo ví dụ điều chế 16, (2S)-2-amino-N-(10-aza-3,3-dimetyl-5-oxo-2,6-dihydro-1H-pyrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-yl)propanamit hydroclorua (0,93 g, 2,6 mmol), trong tetrahydrofuran (50 mL) trong nitơ. Bổ sung 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimidt hydroclorua (0,61 g, 3,2 mmol) và để cho hỗn hợp này ấm đến nhiệt độ phòng trong nitơ trong 16 giờ. Pha loãng bằng nước và chiết bằng etyl axetat. Rửa lớp hữu cơ bằng nước muối, làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc. Tinh chế phần còn lại bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica giải hấp bằng gradien 75-100% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang) dưới dạng chất rắn màu trắng nhò (0,82 g, 71%). MS (m/z): 439,2 (M+1).

Phần 2

N-((2S)-1-((8,8-dimetyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,4-triflobutanamit, chất đồng phân 1 và 2

Tách hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang từ ví dụ 2, phần 1 trên cột Chiralpak AD-H giải hấp bằng 15% MeOH/CO₂(khí) để thu được chất đồng phân 1 (R_t=1,60 phút) dưới dạng chất rắn màu trắng (194 mg, 24%, epime hóa thành 32% DE (diastereomeric excess - lượng dư chất đồng phân không đối quang)) và chất đồng

phân 2 ($R_t=2,31$ phút.) dưới dạng chất rắn màu trắng (469 mg, 57%). MS (m/z): 439,0 ($M+H$) đối với cả hai chất đồng phân.

Bệnh ung thư ngày càng được xác định là tập hợp các bệnh không đồng nhất mà việc khởi phát và tiến triển của chúng do chức năng bất thường của một hoặc nhiều gen điều hòa sự khôi phục ADN, độ ổn định của hệ gen, sự tăng sinh tế bào, sự chết của tế bào, sự gắn kết, sự tạo mạch, sự xâm lấn, và sự di căn trong vi môi trường tế bào và mô. Chức năng thay đổi hoặc bất thường của các gen “ung thư” có thể dẫn đến hiện tượng đa hình của ADN có trong tự nhiên, các thay đổi về số bản sao hệ gen (thông qua khuếch đại, mất đoạn, mất nhiễm sắc thể, hoặc sao chép), thay đổi về gen và cấu trúc nhiễm sắc thể (thông qua chuyển vị, đảo ngược nhiễm sắc thể, hoặc các phép sắp xếp lại khác mà dẫn đến biểu hiện gen bất thường), và các đột biến điểm. Các khối u tân sinh ung thư có thể do một chức năng gen bất thường gây ra, và do cùng chức năng gen bất thường đó duy trì, hoặc sự duy trì và tiến triển bị trầm trọng hóa bởi các chức năng gen bất thường khác.

Ngoài các trục trặc về nhiễm sắc thể di truyền đã nêu trên đây, mỗi bệnh ung thư cũng có thể bao gồm các biến đổi di truyền ngoại gen của hệ gen bao gồm sự methyl hóa ADN, sự ghi dấu hệ gen, và biến đổi histon bằng sự acetyl hóa, methyl hóa, hoặc phosphoryl hóa. Biến đổi ngoại gen có thể đóng vai trò trong việc cảm ứng và/hoặc duy trì u ác tính.

Các danh mục rộng về bất thường di truyền tế bào bệnh ung thư ở người đã được biên soạn và được duy trì trực tuyến và cập nhật thường xuyên (xem The Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer at the US National Cancer Institute (NCI) Cancer Genome Anatomy Project (CGAP). Cơ sở dữ liệu bao gồm các bất thường nhiễm sắc thể đối với ít nhất một số trong số các u ác tính theo sáng chế. Chương trình Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genome Project duy trì “Bảng điều tra gen ung thư” trực tuyến của tất cả các gen người mà có liên quan về mặt nguyên nhân đến sự sinh khối u cũng như cơ sở dữ liệu COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) về các đột biến soma bệnh ung thư ở người. Một nguồn khác chứa nhiều thông tin về các thay đổi di truyền tế bào có liên quan về mặt nguyên nhân đến các bệnh ung thư khác nhau là tài liệu Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

Việc chẩn đoán các khối u ác tính ung thư bằng cách sinh thiết, xác định kiểu hình miễn dịch và các xét nghiệm khác là đã biết và thường được sử dụng. Ngoài các công nghệ tạo băng nhiễm sắc thể có độ phân giải cao và chụp ảnh nhiễm sắc thể tiên tiến, các bất thường về nhiễm sắc thể trong các trường hợp nghi ngờ có thể được xác định bằng cách phân tích di truyền tế bào như phương pháp lai tại chỗ phát huỳnh quang (fluorescence in situ hybridization - FISH), phương pháp nhiễm sắc thể đồ, phương pháp nhiễm sắc thể đồ quang phổ (spectral karyotyping - SKY), FISH đa môi (M-FISH), phương pháp lai hệ gen so sánh (comparative genomic hybridization - CGH), phương pháp mảng đa hình nucleotit đơn (single nucleotide polymorphism arrays - SNP Chips) và các phương pháp chẩn đoán và phân tích đã biết và được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sử dụng.

Vai trò sinh khối u của Notch lần đầu tiên được thông báo ở bệnh bạch cầu tế bào T người bao gồm sự chuyển vị vùng nội bào của Notch1 vào vùng khởi đầu thụ thể β tế bào T, dẫn đến sự biểu hiện quá mức vùng nội bào Notch1 (Grabher et al, Nature Review Cancer, 2006(6):347-359; Weng et al, Science, 2004(306):269-271). Sự biểu hiện quá mức vùng nội bào của Notch1 ở các tế bào gốc tạo máu của chuột nhất gây ra cho chuột bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tế bào T tương tự như ở người. Ngoài bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tế bào T, có bằng chứng ngày càng lớn rằng các tín hiệu Notch sinh khối u ở nhiều bệnh ung thư khác thông qua nhiều cơ chế bao gồm khuếch đại thụ thể và biểu hiện quá mức các phối tử và/hoặc thụ thể bao gồm bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho mạn tính (Rosati et al, Blood, 2009(113): 856-865), bệnh bạch cầu sinh tủy cấp (Sliwa et al. Int J Clin Exp Pathol, 2014(7(3)): 882-889), bệnh bạch cầu sinh tủy mạn tính (Nakahara et al. Blood, 2010(115(14)): 2872-2881), và bệnh tăng sinh nguyên hồng cầu-nguyên tuỷ bào (Robert-Moreno et al, Leukemia, 2007(21): 1496-1503). Sự truyền tín hiệu Notch cơ bản bất thường do đột biến hoặc biểu hiện quá mức các phối tử và/hoặc thụ thể cũng liên quan đến một số khối u rắn ác tính bao gồm bệnh ung thư vú bộ ba âm tính (Stoeck et al, Cancer Discovery, 2014(4): 1154-1167), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng (Park et al. Cancer Research, 2006(66):6312-6318), u hắc tố (Gast et al. Genes, Chromosomes & Cancer, 2010(49):733-745), bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Westhoff et al. PNAS, 2009(106):22293-22298), bệnh ung thư tuyến tụy, u nguyên bào xốp, bệnh ung thư đại

trực tràng, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư gan, caxinom tế bào vảy (ở miệng), bệnh ung thư da và u nguyên bào tủy (Rangathan et al., Nature Review Cancer, 2011(11):338-351 và Supplementary information S1 (table)). Sự truyền tín hiệu Notch cơ bản bất thường do đột biến hoặc do biểu hiện quá mức các phối tử và/hoặc thụ thể cũng liên quan đến bệnh sacom mạch (Ravi et al, J Clin Oncol, 2007, (25(18S, June 20 Supplement)): Abstract 10030), sacom cơ vân (Belyea et al, Clin Cancer Res, 2011(17(23)): 7324-7336; Roma et al, Clin Cancer Res, 2011(17(3)): 505-513), sacom mỡ (J Clin Oncol, 2009, (27(15S, Supplement)): Abstract 10526), u mô bào xơ ác tính (Wang et al, Cancer Res, 2012, (72): 1013-1022), caxinom tế bào gan (Villanueva et al, Gastroenterology, 2012, (143): 1660-1669), caxinom đường mật trong gan và ngoài gan (Wu et al, Int J Exp Pathol, 2014, (7(6)): 3272-3279; Sekiya et al, J Clin Invest, 2012, (122(11)): 3914-3918; Yoon et al, World J Gastroenterol, 2011, (17(35)): 4023-4030), và caxinom bọc dạng tuyến (Bell et al, Annals of Diagnostic Pathology, 2014, (18): 10-13; Stoeck et al, Cancer Discov, 2014, (4): 1154-1167). Việc ức chế sự truyền tín hiệu Notch là đích hấp dẫn để tạo ra hiệu quả điều trị cho các bệnh nhân ung thư mà bệnh của họ do sự hoạt hóa đường truyền tín hiệu Notch cơ bản bất thường gây ra. Shih et al. Cancer Research, 2007(67)1879-1882.

Một trong số các gen xác định để phát triển tế bào lông tai trong là homolog ở động vật có vú của atonal-1 yếu tố phiên mã xoắn-cuộn-xoắn (Atohl). Sự biểu hiện Atohl ở các tế bào ốc tai là cần thiết cho sự tạo thành tế bào lông thính giác. Các tế bào biểu mô tiền cảm giác trong sự phát triển cơ quan Corti mà biểu hiện Atohl sẽ biệt hóa thành tế bào lông thính giác (Helms et al, Development 2000, (127(6)): 1185-1196), và Atohl là một trong số các dấu chuẩn sớm nhất của sự biệt hóa tế bào lông thính giác. Các tế bào nâng đỡ của cơ quan Corti duy trì khả năng phát triển các đặc tính tế bào lông bao gồm tạo lông mao (Zheng et al, Nature Neuroscience, 2000,(3(6)): 580-586; Kawamoto et al, J Neurosci, 2003, (23(11)): 4395-4400; Izumikawa et al, Nat Med, 2005, (11(3)):271-276; và chức năng tế bào lông thích hợp (Kawamoto et al, 2003).

Mỗi tế bào lông trong ốc tai được bao quanh bởi các tế bào nâng đỡ phi cảm giác mà tạo ra kết cấu nâng đỡ và nuôi dưỡng tế bào lông và hạch và thiết yếu trong việc duy trì nồng độ ion thích hợp trong cơ quan Corti thông qua sự giao tiếp giữa các

tế bào qua khe liên kết. Có hai loại tế bào lông: tế bào lông bên trong và tế bào lông bên ngoài. Các tế bào lông ốc tai

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/n/neurosci/A2251/def-item/A2515/> ở động vật có vú bao gồm người, gồm có một hàng tế bào lông bên trong và ba hàng tế bào lông bên ngoài. Các tế bào lông bên trong là các thụ thể cảm giác thực sự, và 95% sợi thần kinh thính giác mà hướng về não bắt nguồn từ tiểu quần thể này. Phần kết thúc trên các tế bào lông bên ngoài hầu hết đều từ các axon ly tâm mà bắt nguồn từ các tế bào ở não và các tế bào này có chức năng là yếu tố tiền khuếch đại âm thanh. Các tế bào nâng đỡ đóng vai trò chính trong sự sản sinh tế bào lông thính giác sau khi mất hoặc tổn thất tế bào lông thính giác. Trong quá trình phát triển, các tế bào lông và tế bào nâng đỡ phát triển từ gốc chung và sự xuất hiện của các tế bào lông truyền tín hiệu cho các tế bào xung quanh phát triển thành tế bào nâng đỡ thông qua sự ức chế tiếp xúc qua trung gian đường truyền tín hiệu Notch (Kelley, Nat Rev Neurosci, 2006, (11): 837-849.

Dựa trên khả năng chuyển biệt hóa thành các tế bào lông thính giác của các tế bào nâng đỡ, cùng với đường phát triển chung của chúng, đã giả định rằng các tế bào nâng đỡ có thể có chức năng làm gốc để tạo ra tế bào lông (Parker et al, Audiology and Neurootology, 2004, (9(2)): 72-80). Một số nghiên cứu đã chứng tỏ rằng sự ức chế chu kỳ tế bào bắc cầu trong các tế bào nâng đỡ có thể dẫn đến sự sản sinh tế bào lông thính giác ở động vật có vú (Lowenheim et al, Proc Natl Acad Sci USA, 1999, (96): 4084-4088; Torchinsky et al, J Neurocytol, 1999, (28(10-11)): 913-924; Minoda et al, Hear Res, 2007, (232): 44-51). Do đó, các tế bào nâng đỡ của động vật có vú trưởng thành giữ được khả năng chuyển biệt hóa thành tế bào lông thính giác khi chúng tự do đi vào chu trình tế bào.

Liệu pháp dùng thuốc để phục hồi các tế bào lông thính giác là cách tiếp cận mới và việc sử dụng trong hòm nhĩ vào dịch tai giữa, tốt hơn là vào hốc cửa sổ tròn, mà không cần tiêm vào ốc tai có thể cảm ứng sự biểu hiện Atoh1 một cách hiệu quả với liều điều trị và trong khoảng thời gian thích hợp để gây ra sự chuyển biệt hóa tế bào lông thính giác của các tế bào nâng đỡ trong ốc tai. Mizutani et al, Neuron, 2013, (77(1)): 58-69 thể hiện rằng việc phân phối vào tai giữa chất ức chế gama secretaza (LY411575) có thể được sử dụng để tái tạo các tế bào lông thính giác bị mất đi do chấn thương do âm thanh ở chuột nhắt và sự tạo hành các tế bào lông mới từ tế bào

nâng đỡ này dẫn đến khả năng phục hồi thính lực đáng kể, đo được. Việc này đưa ra các bằng chứng mang tính nhận thức về hiệu quả điều trị của việc ức chế sự truyền tín hiệu đường Notch đến sự sản sinh tế bào lông thính giác và sự phục hồi thính lực ở mô hình chuột nhắt, và đưa ra giải thích về mặt cơ chế (sự biệt hóa tế bào nâng đỡ thành tế bào lông thính giác) cho hiệu quả sinh lý này. Độc tính giới hạn liều được thể hiện trong quá trình sử dụng LY411575 toàn thân.

Các nghiên cứu in vitro và in vivo sau đây chứng tỏ hoạt tính và hiệu quả ức chế sự truyền tín hiệu đường Notch và của các hợp chất 1 và 2, hoặc chất đồng phân không đối quang gần như tinh khiết của nó, chống lại dòng tế bào ung thư cụ thể. Các thử nghiệm này thường được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này công nhận là chỉ thị về hoạt tính hóa liệu pháp lâm sàng trên người. Việc ức chế sự phân cắt vùng nội bào của Notch bằng γ -secretaza được cho là hữu hiệu chống lại từng thụ thể trong số các thụ thể Notch 1, Notch 2, Notch 3 và Notch 4. Các thử nghiệm chứng tỏ hoạt tính và hiệu quả ức chế sự truyền tín hiệu đường Notch có thể được tiến hành chủ yếu như sau hoặc bằng các thử nghiệm tương tự tạo ra các dữ liệu tương tự.

Thử nghiệm chụp ảnh tế bào tích tụ nhân Notch1 N1ICD

Các tế bào HEK293ΔE12 (các tế bào EK293 được xử lý kỹ thuật để biểu hiện ổn định cADN Notch1 của chuột nhắt mã hóa các axit amin 1703-2183, NP_032740.3, (protein gốc Notch 1 đầy đủ chiều dài của chuột nhắt: SEQ ID NO:1) với trình tự peptit tín hiệu gồm 23 axit amin, MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLR (SEQ ID NO:2), ở đầu tận cùng N của nó) được đưa vào đĩa ở mật độ 5000 tế bào/giếng trong đĩa 96 giếng, ủ trong môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco (DMEM) có nồng độ glucoza cao với 5% huyết thanh thai bò (FBS) ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 24 giờ. Các tế bào được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm, định liều ở 10 điểm pha loãng 1:3 trong khoảng 1000 nM đến 0,05 nM, và với nồng độ dimetyl sulfoxit (DMSO) cuối là 0,2%. Sau 24 giờ xử lý, các đĩa tế bào được xử lý tuần tự qua các bước sau: cố định tế bào bằng 100μl/giếng chất cố định PREFER™ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT); làm thấm các tế bào bằng 100μl /giếng 0,1% TRITON® X100 trong nước muối đệm phosphat (PBS) trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng; rửa 3 lần bằng 100μl/giếng PBS mỗi giếng; bổ sung 50μl/giếng kháng thể thô kháng N1ICD (vùng nội bào của Notch1), ở 1:2000 trong PBS với 1% albumin huyết thanh bò và ủ 1,5 giờ ở 37 °C; rửa 3 lần bằng 100μl/giếng PBS mỗi giếng; ủ với 50μl/giếng IgG (globulin miễn dịch G)

dê kháng thể Alexa 488 ở độ pha loãng 1:1000 trong PBS với 1 % albumin huyết thanh bò và ủ 1 giờ ở 37 °C; rửa 3 lần bằng 100µl/giếng PBS mỗi giếng và bổ sung 100µl/giếng 15 µM propidi iodua với 50µg/ml RNaseA trong 30 phút để nhuộm nhân. Các đĩa được quét bằng bào kế vi đĩa phát huỳnh quang quét laser ACUMEN EXPLORER™ (TTP LABTECH LTD) để xác định tổng số nhân tế bào/giếng và tổng diện tích nhân/giếng với huỳnh quang ở 655nm—705nm (phát xạ của ADN liên kết propidi iodua) và huỳnh quang của kháng thể liên kết với N1ICD trong vùng nhân ở 505nm—530nm. Dữ liệu đầu ra chính của thử nghiệm là tỷ lệ tổng độ phát huỳnh quang của N1ICD nhân so với tổng diện tích nhân, tín hiệu N1ICD nhân đã chuẩn hóa. Profin độc tế bào tương đối được thu thập dưới dạng % số tế bào so với tế bào đối chứng DMSO 0,2%. Kháng thể mà nhận biết Notch1 đã phân cắt hoặc N1ICD được tạo ra cho peptit tương ứng với vị trí phân cắt ở đầu tận cùng amino của Notch1 người ở Val1744. Trong các tế bào đối chứng không được xử lý, N1ICD được tạo ra từ Notch1 sẽ chuyển vị và tích tụ trong nhân. Khi các tế bào được xử lý bằng chất ức chế phân cắt Notch 1, tín hiệu của N1ICD nhân sẽ giảm. Đáp ứng nồng độ và IC₅₀ được xác định bằng cách khớp đường cong theo thuật toán logistic bốn thông số cho tín hiệu N1ICD nhân, trong khi % số tế bào được lập đồ thị trên cùng đồ thị về profin độc tế bào. Thực hiện thử nghiệm chủ yếu như được mô tả trên đây, IC₅₀ trung bình đối với hợp chất 1, chất đồng phân 2 là 0,37 nM (+/- 0,16; n=2) và hợp chất 2, chất đồng phân 2 là 1,55 nM (+/- 1,12; n=2). Không hợp chất nào ảnh hưởng đến số tế bào ở nồng độ lên đến 1000 nM. Dữ liệu này chứng tỏ mỗi hợp chất 1, chất đồng phân 2 và hợp chất 2, chất đồng phân 2 có ái lực với Notch 1 và ức chế sự tích tụ nội bào của peptit truyền tín hiệu tế bào vùng nội bào của Notch 1.

Các nghiên cứu ức chế đích in-vivo

Nghiên cứu trên động vật

Để đánh giá hiệu quả in vivo của hợp chất 1, chất đồng phân 2 và hợp chất 2, chất đồng phân 2 đến sự ức chế được lực học (PD) xử lý Notch, các nghiên cứu trên động vật được tiến hành ở chuột nhắt Balb/C không mang khối u (Charles River). Tổng số 5 chuột được sử dụng cho mỗi nhóm. Các chuột được cho ăn tùy thích bằng thức ăn bình thường. Việc điều trị được bắt đầu bằng cách sử dụng qua đường miệng (qua ống xông) hợp chất hoặc chất dẫn (1% Na-CMC trong 0,25% Tween-80) trong thể tích 0,2 mL. Ở các thời điểm đã định (4 hoặc 8 giờ sau khi sử dụng liều) sau khi

điều trị, các động vật bị giết bằng cách làm ngạt bằng CO₂ và làm trật khớp cổ. Các mô (phổi) được lấy ra và sử dụng để phân tích đáp ứng PD như được xác định bằng N1ICD bị phân cắt.

Phân tích N1ICD

Để đánh giá mức N1ICD ở phổi, khoảng 75 mg được cắt ra từ mô đông lạnh và cắt nhỏ trước khi đồng hóa (khối lượng thực tế được ghi lại). Các mẫu khối u đông lạnh được chuyển vào các ống Lysing Matrix-D™ và tạo huyền phù lại trong đệm phân giải XY được làm lạnh bằng nước đá (25 mM Tris pH 7,5, 10 µg/ml chất ức chế Trypsin/Chymotrypsin, 10 µg/ml Aprotinin, 60 mM Beta-glyxerol phosphat, 1% Triton® X-100, 10 mM NaF, 2,5 mM pyrophosphat, 150 mM NaCl, 15 mM axit etylen diamin tetra axetic (EDTA) pH 8,0, 5 mM axit etylen glycol-bis(2-aminoetylete)-N,N,N',N'-tetra axetic (EGTA) pH 8,0, 1 mM Na Vanadate, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM dithiothreitol, 1 µM microcystin LR, 10 µg/ml N-p-tosyl-L-phenylalanin clorometyl keton (TPCK), 2 mM este hydroclorua của Nα-p-tosyl-L-arginin metyl (TAME), 15 mM muối 4-nitrophenyl phosphat di(tris) (PNPP), 0,1 mM 4-(2-aminoetyl) benzensulfonyl florua hydroclorua (AEBSF), 5 mM benzamidin, 1 µM axit Okadaic) chứa 1X viên Complete (Roche Complete™ No, 11697 498 001) và 1X hỗn hợp chất ức chế proteaza (Sigma-Aldrich P8340) với tỷ lệ khối lượng : thể tích là 75 mg/ml đệm. Các mô được đồng hóa trong thiết bị đồng hóa Fast Prep FP120 (Thermo Scientific, Rockford, IL) ở tốc độ 6,0 trong 30 giây ở 4°C, sau đó là ủ 15 trên nước đá. Quy trình này được lặp lại trong tổng số 2-3 chu kỳ đến khi hoàn tất việc đồng hóa. Sản phẩm phân giải được ly tâm nhẹ trong ống ly tâm eppendorf ở 4°C ở 30.000 vòng/phút trong 15 phút để loại bỏ mảnh vụn. 400 µl dịch nổi được lấy ra và chuyển sang ống eppendorf mới và được đưa vào chu kỳ lạnh đông/làm tan. Các mẫu ly tâm nhẹ lại trong ống ly tâm eppendorf ở 4°C ở 30.000 vòng/phút trong 30 phút và 120 µl dịch nổi được thu gom để phân tích. Tổng nồng độ protein được xác định bằng cách sử dụng kit Pierce BCA Protein Assay Kit™ (Thermo Scientific, Rockford, IL) trên máy đọc đĩa Thermomax™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Các mức N1ICD được xác định bằng phương pháp ELISA N1ICD thông thường. Sản phẩm phân tích được bắt giữ bằng kháng thể đơn dòng thông thường đặc hiệu Notch1(Val1744) đã phân cắt và được phát hiện bằng kháng thể đa dòng cừu (R&D Systems, Minneapolis, MN) có SULFO-TAG™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg,

Maryland) của Notch1 đầu tận cùng C. Các sản phẩm phân giải được pha loãng 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ trong đệm phân giải ELISA Tris được làm lạnh bằng nước đá (R6OTX) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland) chứa 1X viên Complete (Roche Complete™ mini No, 11 836 153 001) và 1X hỗn hợp chất ức chế proteaza (Sigma-Aldrich P8340), và 25 μl được bổ sung vào đĩa ELISA. Thực hiện việc ủ 50 μg sản phẩm phân giải protein lysate ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ để bắt giữ sản phẩm phân giải và phát hiện kháng thể. Các đĩa được đọc trên thiết bị Sector Imager 6000™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland). N1ICD trừ đi giá trị nền được chuẩn hóa thành protein tổng số và biểu thị bằng % ức chế so với nhóm điều trị bằng chất dẫn. % Ức chế N1ICD và ý nghĩa thống kê (giá trị p) xác định bằng phương pháp Dunnett trong các khối u thu được 4 giờ sau khi sử dụng liều cuối cùng hợp chất 1, chất đồng phân 2 hoặc hợp chất 2, chất đồng phân 2 được phân tích chủ yếu như được mô tả trên đây và tổng hợp trong bảng 1.

Bảng 1.

Hợp chất	Liều dùng (mg/kg)	Thời gian (giờ) sau khi điều trị	% Ức chế N1ICD (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn SD; n=1)	Giá trị p
1, chất đồng phân 2	10	4	70 $\pm$ 12	< 0,0001
1, chất đồng phân 2	10	8	65 $\pm$ 11	< 0,0001
1, chất đồng phân 2	100	8	92 $\pm$ 3	< 0,0001
1, chất đồng phân 2	30	8	87 $\pm$ 3	< 0,0001
1, chất đồng phân 2	10	8	52 $\pm$ 31	0,0054
1, chất đồng phân 2	3	8	11 $\pm$ 13	Không có ý nghĩa
1, chất đồng phân 2	1	8	6 $\pm$ 15	Không có ý nghĩa
1, chất đồng phân 2	0,3	8	-7 $\pm$ 26	Không có ý nghĩa
2, chất đồng phân 2	10	4	65 $\pm$ 11	< 0,0001
2, chất đồng phân 2	10	8	15 $\pm$ 14	Không có ý nghĩa

Dữ liệu trong bảng 1 chứng tỏ khả năng ức chế sự phân cắt N1ICD của hợp chất 1, chất đồng phân 2 và hợp chất 2, chất đồng phân 2 trong mô phổi chuột nhắt. Dữ liệu trong bảng 1 còn cho thấy mối tương quan in vivo với dữ liệu về hoạt tính chức năng được mô tả trên đây.

Cảm ứng sự biểu hiện mAtoh1 trong cầu tai

Nói chung, việc phân lập tế bào cơ quan Corti được thực hiện vào ngày 0, chủ yếu bằng phương pháp trong tài liệu Oshima et al., *Methods Mol Biol.*, 2009; 493: 141–162. Việc nuôi cấy và nhân giống tế bào được thực hiện trong 3-4 ngày. Thực hiện đưa tế bào vào đĩa và xử lý bằng hợp chất thử nghiệm vào ngày 3 hoặc ngày 4. Thực hiện việc gắn kết và biệt hóa trong vòng 7 ngày tiếp theo. Vào ngày 10 hoặc 11, tiến hành phân giải tế bào và tách ARN. Phản ứng TaqMan qRT-PCR được tiến hành

vào ngày 12 và kết quả được phân tích vào ngày 13-15 đối với sự biểu hiện Atoh1 và Tbp1.

Phân lập các tế bào

Mô bao quanh từ phần đá của xương thái dương được lấy ra từ các chuột sơ sinh cả đực và cái từ 1 đến 4 ngày tuổi (chủng chuyển gen: nGFP điều khiển bằng mAtoh1; Lumpkin EA, et al., Gene Expr Patterns, 2003; (36): 389-95. Ốc tai hình ốc được tách ra từ hệ thống tiền đình bằng kẹp. Ở giai đoạn phát triển này, mê đạo xương chưa hoàn toàn canxi hóa và dễ dàng cắt ra bằng kẹp. Cẩn thận mở mê đạo xương của ốc tai và lấy dây chằng xoắn và cơ quan Corti gắn kết cuộn cùng với đường xoắn của trụ ốc bằng cách tháo xoắn đỉnh từ trụ ốc. Bắt đầu từ đáy, tách dây chằng xoắn từ cơ quan Corti bằng cách sử dụng kẹp chính xác.

Chuyển cơ quan Corti (OC) đã cắt vào các ống đơn 1,5 ml có nạp 850 μ l HBSS lạnh băng. Chuyển không quá 12 mô OC vào cùng ống đó. Ly tâm nhẹ nhanh các mô OC và loại bỏ HBSS. Phân tách các tế bào bằng cách bổ sung 100 μ l TrypLE™ Select đã làm ấm trước (Life Technologies) và ủ ở 37°C trong 13 phút. Ly tâm nhẹ nhanh các mô OC đã phân tách. Loại bỏ TrypLE™ Select. Bổ sung 100 μ l môi trường A (DMEM/F12, thành phần bổ sung N2 (LifeTechnologies), thành phần bổ sung B27 (LifeTechnologies), ampicilin (50 μ g/ml) và Fungizone (LifeTechnologies), EGF (20 ng/ml), bFGF (10 ng/ml), IGF-1 50 ng/ml), và heparan sulfat (50 ng/ml)). Mô đã được cắt và phân giải sau đó được nghiền bằng đầu pipet P200. Loại bỏ các thể kết tụ và mảnh vụn tế bào bất kỳ; chuyển huyền phù tế bào và rửa qua bộ lọc tế bào 70 μ m đã làm ướt trước để góp chung huyền phù tế bào vào một ống nuôi cấy mới. Rửa nhẹ các ống phân tách và bộ lọc tế bào bằng môi trường A đầy đủ và góp chung với huyền phù tế bào. Xác định mật độ tế bào bằng buồng đếm hồng cầu hoặc thiết bị Countess® (Life Technologies). Bổ sung môi trường tươi A vào huyền phù tế bào để đạt mật độ trải đĩa cuối là 1,0E5 tế bào/ml và trải đĩa vào dụng cụ nuôi cấy rất ít gắn kết, T-75 (Greiner).

Nuôi cấy trong huyền phù để nhân các cầu OC

Các tế bào đơn đã phân tách được nuôi cấy trong dụng cụ nuôi cấy rất ít gắn kết, (Greiner) trong môi trường A trong 3 đến 4 ngày trong thiết bị ủ đã làm ấm chứa 5% CO₂ ở 37°C để thu được các cầu phát triển thành dòng vô tính, gọi là các cầu thể hệ

thứ nhất, từ các tế bào nổi. Nếu các tế bào gắn với đĩa không bám dính trong thời kỳ nuôi cấy chúng có thể được tách ra bằng cách trộn nhẹ nhàng.

Nuôi cấy gắn kết và điều trị

Sau khi nuôi cấy các cầu trong 3-4 ngày, đếm cầu bằng mắt thường bằng kính hiển vi để chuẩn hóa mật độ gieo của cầu tại trong mỗi ml cho bước này. Thu gom các tế bào bằng cách ly tâm và tạo huyền phù lại các cầu trong môi trường cơ bản ở nồng độ khoảng 2000 cầu trong một ml. Gieo các cầu với thể tích 150 μ l mỗi giếng của đĩa 96 giếng đã xử lý bằng dịch nuôi cấy tế bào để thu được khoảng 300 trong mỗi giếng. Xử lý các cầu bằng các chất thử nghiệm theo bộ bốn với thể tích cuối là 200 μ l trong môi trường cơ bản (DMEM/F12, thành phần bổ sung N2 (LifeTechnologies) thành phần bổ sung B27 (LifeTechnologies), ampicilin (50 μ g/ml) và Fungizone (LifeTechnologies). Nuôi cấy các cầu đã xử lý trong 7 ngày trong thiết bị ủ có kiểm soát nhiệt độ đã làm ẩm chứa 5% CO₂, ở 37°C. Lấy môi trường ra và tiến hành chiết ARN.

Chiết ARN

Bổ sung 175 μ l đệm RLT plus (Qiagen) có bổ sung 1% Beta-mercaptoetanol vào mỗi giếng. Bổ sung 2,5 μ l chất mang ARN 4 ng/ μ l (RNeasy® Plus Micro Kit; Qiagen) được pha loãng trong đệm RLT Plus vào mỗi giếng trước khi chiết ARN. ARN tổng số được chiết bằng kit RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp cADN

Việc tổng hợp cADN được tiến hành bằng hệ thống SuperScript® III First-Strand Synthesis System (LifeTechnologies, catalogue 18080-051) theo quy trình của nhà sản xuất bằng cách sử dụng các hexamer ngẫu nhiên để tổng hợp cADN. Pha loãng cADN 50% bằng cách bổ sung 21 μ l nước siêu tinh khiết không chứa nucleaza. 5 μ l cADN đã pha loãng được sử dụng cho qPCR.

qPCR

Để định lượng sự biểu hiện các dấu chuẩn tế bào lông từ dịch nuôi cấy cầu đã xử lý, qPCR với các mẫu dò để phát hiện gen cần quan tâm mAtoh1 và gen đối chứng nội sinh được tiến hành trong một phản ứng đơn, đa màu hai màu. TaqMan Gene

Expression Master Mix (LifeTechnologies, 4369016) và mẫu dò cần quan tâm (Atoh1; Mm00476035_s1 và mẫu dò đối chứng nội sinh (Tbp1; Mm00446971_m1, LifeTechnologies) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các điều kiện được giữ không đổi đối với từng mẫu dò. Mức độ biểu hiện gen tương đối giữa các nhóm điều trị được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp $\Delta\Delta C_T$ và các số đo lặp lại được lấy trung bình. Các thử nghiệm được tiến hành theo bộ ba, ở mức tối thiểu, và được báo cáo dưới dạng trung bình tổng quát.

Bảng 2

Hợp chất	RQ ở 10 nM	RQ ở 100 nM	RQ ở 1 μ M
1, chất đồng phân 2	1,43 $\pm$ 0,17*	1,76 $\pm$ 0,17*	1,64 $\pm$ 0,13*
2, chất đồng phân 2	1,14 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,13	1,57 $\pm$ 0,11*

Dữ liệu trong bảng 2 thể hiện giá trị định lượng tương đối (RQ) về mức biểu hiện Atoh1, dấu chuẩn của sự hình thành tế bào lông, trong các cầu tai được xử lý bằng hợp chất 1, chất đồng phân 2 và hợp chất 2, chất đồng phân 2 ở ba nồng độ (10nM, 100nM và 1 μ M). Dữ liệu ($\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình, SEM) thể hiện số lần cảm ứng biểu hiện gen so với các mẫu đối chứng âm được xử lý bằng (chất mang DMSO). (*, khác biệt đáng kể so với đối chứng âm, $p < 0,05$).

Cảm ứng sự biểu hiện hAtoh1 trong các dòng tế bào khối u người

Để đánh giá hiệu lực của các hợp chất 1, chất đồng phân 2 và 2, chất đồng phân 2 về khả năng cảm ứng sự biểu hiện hAtoh1, dòng tế bào khối u người được sử dụng. Sự điều hòa tín hiệu Notch nội sinh đối với dòng tế bào này tương tự với sự điều hòa ở tai trong. Nói chung, thử nghiệm này được tiến hành theo các nguyên tắc trong tài liệu Kazanjian et al., Gastroenterology, 2010, 139(3): 918-928 và Supplementary Materials and Methods.

Nói chung, các kỹ thuật nuôi cấy tế bào chuẩn được sử dụng. Dòng tế bào ung thư tuyến đại trực tràng người với số lần cấy chuyển thấp LS174T (ATCC CL-188) được giữ trong môi trường sinh trưởng (MEM 10% FBS) được trải đĩa 10.000 tế bào trong 100 μ l môi trường thử nghiệm (MEM 1% FBS) trong mỗi giếng vào các đĩa nuôi cấy mô 96 giếng đã xử lý.

Ngày tiếp theo, tiến hành pha loãng hàng loạt 3,16 lần (half-log) các hợp chất thử nghiệm ở nồng độ gốc 10 mM (pha loãng trong 100% DMSO) để thu được mười một liều hợp chất thuốc giảm dần. Nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 10 μ M đến 0,127 nM. Sử dụng phương pháp pha loãng hàng loạt 3,16 lần với nồng độ DMSO trong mỗi giếng là 100%. Tiến hành pha loãng tiếp theo tỷ lệ 1:10 dịch pha loãng DMSO ban đầu vào môi trường thử nghiệm. Tiến hành lần pha loãng khác theo tỷ lệ 1:100 vào môi trường thử nghiệm.

100 μ l các dịch pha loãng chứa hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào từng giếng chứa tế bào và môi trường sinh trưởng và nuôi trong 72 giờ ở 37°C trong 5% CO₂.

Các tế bào được thu gom từ các đĩa vào ngày 4, và ARN được chiết và tinh chế bằng kit RNeasy® Plus 96 RNA (Qiagen) theo quy trình của nhà sản xuất.

Việc tổng hợp cADN được tiến hành bằng hệ thống SuperScript® III First-Strand Synthesis System (LifeTechnologies, 18080-051) theo quy trình của nhà sản xuất bằng cách sử dụng các hexamer ngẫu nhiên để tổng hợp cADN. Pha loãng cADN 50% bằng cách bổ sung 21 μ l nước siêu tinh khiết không chứa nucleaza. 5 μ l cADN đã pha loãng được sử dụng cho qPCR.

qPCR

Để định lượng mức biểu hiện các dấu chuẩn tế bào lông từ các giống nuôi cấy cầu đã xử lý, các mẫu dò qPCR để phát hiện sự biểu hiện hAtoh1 hoặc TBP trong một phản ứng đơn nhiều màu hai màu được thực hiện. Để đo mức biểu hiện gen tương đối với từng mẫu, TaqMan Gene Expression Master Mix (LifeTechnologies, 4369016) và mẫu dò cần quan tâm (Atoh1 người; LifeTechnologies Assay Id Hs00944192_s1) và đối chứng nội sinh (TBP người; LifeTechnologies Assay Id Hs00427620_m1) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các điều kiện được giữ không đổi đối với từng mẫu dò. Mức độ biểu hiện gen tương đối giữa các nhóm điều trị được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp $\Delta\Delta C_T$ và các số đo lặp lại được lấy trung bình.

Bốn thử nghiệm riêng rẽ được tiến hành để thu được các giá trị IC₅₀ cho từng hợp chất thử nghiệm. Giá trị IC₅₀ được xác định bằng cách khớp dữ liệu đáp ứng nồng độ vào mô hình “log(chất đối kháng) so với, đáp ứng (ba thông số)” bằng phần mềm GraphPad Prism® đối với 12 liều trong khoảng nồng độ từ 4,0E-11 đến 1,0E-6 M với

tổng số 108 điểm được phân tích đối với mỗi hợp chất. Giá trị IC_{50} đối với các hợp chất 1, chất đồng phân 2 và 2, chất đồng phân 2 được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

Hợp chất	IC_{50} nM
1, chất đồng phân 2	16,64
2, chất đồng phân 2	54,34

Dữ liệu trong bảng 3 thể hiện các giá trị IC_{50} của hợp chất 1, chất đồng phân 2 và hợp chất 2, chất đồng phân 2 như được tính toán bằng mức biểu hiện tương đối của *hAtoh1*, một dấu chuẩn của sự sản sinh tế bào lông thính giác trong thử nghiệm này.

Đáp ứng với các hợp chất trong thử nghiệm mảnh cấy cơ quan Corti

Nói chung, tiến hành nuôi cấy mảnh cấy tạo cơ quan của cơ quan Corti vào ngày 0 theo phương pháp được mô tả trong tài liệu Parker et al., *Journal of Visualized Experiments*, 2010, (36), e1685. Tiến hành nuôi cấy mảnh cấy trong 4-7 ngày ở thời điểm giống nuôi cấy được chuẩn bị để phân giải tế bào để chạy qRT-PCR, hoặc cố định mô để thử nghiệm hóa mô miễn dịch.

Tách và nuôi cấy mảnh cấy cơ quan Corti

Bọng nước và mô bao quanh từ phần đá của xương thái dương được lấy ra từ các chuột sơ sinh cả đực và cái từ 1 đến 4 ngày tuổi (chủng chuyển gen: nGFP điều khiển bằng *Atoh1*; Lumpkin EA, et al., *Gene Expr Patterns*, 2003, (36):389-95). Các cơ quan Corti được cắt trong dung dịch Hanks, dây chằng xoắn được lấy ra và các mảnh cấy được đặt lên kính dày được phủ poly-L-ornithin (0,01%, Sigma) và laminin (50 mg/ml, Becton Dickinson) để thu được sản phẩm với bề mặt ốc tai phẳng. Mỗi mảnh cấy ốc tai sau đó được đặt trong một giếng đơn của đĩa 24 giếng (Falcon) và nuôi trong DMEM (Invitrogen) với 5% huyết thanh thai bò, 5% huyết thanh ngựa, và penixilin-streptomycin (LifeTechnologies). Các hợp chất thử nghiệm được bổ sung môi trường vào ngày 0 và thay thế 2-3 ngày một lần. Tất cả các giống nuôi cấy được giữ trong thiết bị ủ đã làm ẩm chứa 5% CO_2 ở 37°C.

Phân tích sự biểu hiện gen bằng qRT-PCR

Tiến hành chiết ARN bằng cách phân giải mô mảnh cấy bằng 350µl đệm RLT Plus (Qiagen) mỗi giếng, và ARN tổng số được tinh chế bằng kit RNeasy® Plus Mini

Kit (Qiagen). Tiến hành tổng hợp cADN bằng hệ thống SuperScript® III First-Strand Synthesis System (LifeTechnologies) bằng cách sử dụng các hexame ngẫu nhiên. Để định lượng sự cảm ứng sự biểu hiện dấu chuẩn tế bào lông, qPCR được thực hiện bằng TaqMan Gene Expression Master Mix (LifeTechnologies, 4369016) và các mẫu dò để phát hiện các gen cần quan tâm (ví dụ, *hAtoh1*; Assay ID Mm00476035_s1, *Pou4f3*; Assay ID Mm04213795_s1 và *Myo7a*; Assay ID Mm01274015_m1, LifeTechnologies) và gen đối chứng nội sinh, *Tbp* (Assay ID Mm00446971_m1, LifeTechnologies). Mức độ biểu hiện gen tương đối giữa các nhóm điều trị được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp $\Delta\Delta C_T$ và các số đo lặp lại được lấy trung bình. Các thử nghiệm được tiến hành theo bộ ba, ở mức tối thiểu, và được báo cáo dưới dạng trung bình tổng quát.

Bảng 4

Hợp chất	<i>Atoh1</i>	<i>Pou4f3</i>	<i>Myo7a</i>
1, chất đồng phân 2	3,72±0,54	2,04±0,35	1,73±0,33
2, chất đồng phân 2	3,10±0,69	1,65±0,25	1,49±0,22

Dữ liệu trong bảng 4 thể hiện các giá trị định lượng tương đối (RQ) về mức biểu hiện các dấu chuẩn hình thành tế bào lông; *Atoh1*, *Pou4f3*, và *Myo7a*, trong mảnh ghép cơ quan Corti được xử lý bằng hợp chất 1, chất đồng phân 2 và hợp chất 2, chất đồng phân 2 ở 1µM. Dữ liệu (±SEM) thể hiện số lần cảm ứng mức biểu hiện gen so với các mẫu được xử lý đối chứng âm.

Nhuộm miễn dịch các tế bào lông biểu hiện *Atoh1* mới

Sau khi nuôi cấy mảnh cấy, các mô được cố định trong đĩa 24 giếng bằng 200µl Cytofix/Cytoperm (BD) trong 30 phút, rửa nhẹ bằng TritonX100 chứa PBS (PBST), và nhuộm bằng 200µl dung dịch kháng thể sơ cấp, chứa 4% huyết thanh lừa bình thường trong PBST với kháng thể dê kháng GFP (1:2500; AbCAM, ab5450) và kháng thể thỏ kháng myosin VIIa (1:1000; Proteus Bioscience #25-6790) trong 1 giờ. Sau đó, các mô được rửa kỹ bằng PBST và nhuộm bằng dung dịch kháng thể thứ cấp, gồm IgG lừa kháng dê Alexa Fluor 488 (1:1000; Invitrogen, A-11055) và IgG lừa kháng thỏ Alexa Fluor 568 (1:1000; Invitrogen, A10042) trong 1 giờ. Sau đó, các mô được rửa kỹ bằng PBST và gắn lên bản kính của kính hiển vi. Các tế bào lông riêng rẽ được nhận dạng bằng sự biểu hiện dấu chuẩn đại diện *Atoh1* GFP (xanh lá) và myosin VIIa

(đỏ), chụp ảnh, và sau đó đến trong phạm vi độ dài 100 μM ở vùng đỉnh giữa để kiểm tra sự hình thành tế bào lông mới sinh trong các mẫu thử nghiệm được xử lý bằng hợp chất trái ngược với số tế bào lông trong các mẫu không được xử lý hoặc mẫu đối chứng âm (được xử lý bằng hợp chất không có hoạt tính sinh học). Số tế bào mù được xác định trong năm thử nghiệm riêng rẽ.

Bảng 5

Hợp chất	Số tế bào lông bên ngoài (trong 100 μM)	Tỷ lệ phần trăm gia tăng
1, chất đồng phân 2	50,4 $\pm$ 4,9	14,15 $\pm$ 1,9%
2, chất đồng phân 2	55,8 $\pm$ 3,1	17,26 $\pm$ 1,2%

Dữ liệu trong bảng 5 thể hiện số tế bào lông bên ngoài trong mảnh cấy cơ quan Corti được nuôi cấy trong bốn ngày với sự có mặt của hợp chất 1, chất đồng phân 2 (n=13) hoặc hợp chất 2, chất đồng phân 2 (n=15) ở nồng độ 1 μM , và nhuộm miễn dịch để kiểm tra GFP (một dấu chuẩn Atoh1 đại diện) và myosin VIIa. Tỷ lệ phần trăm gia tăng về số tế bào lông là tương ứng với các mẫu được xử lý bằng đối chứng âm (n=18).

Phân tích sự biểu hiện gen sau thương tổn độc thần kinh

Một biến dị về nuôi cấy mảnh cấy tạo cơ quan Corti được sử dụng để mô hình hóa sự tái tạo tế bào lông đáp ứng với việc điều trị sau đó bằng hợp chất sau thương tổn độc thần kinh. Mô hình thương tổn này được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong tài liệu Korrapati et al., PLOSOne, 2013, 8(8), e73276, trong đó sự giảm 95% về số tế bào lông vùng đỉnh giữa được báo cáo. Vào ngày 0, để làm thương tổn và tiêu diệt có chọn lọc các tế bào lông trong mảnh cấy cơ quan Corti, việc xử lý aminoglycosit (gentamixin (100 μM)) được tiến hành trong 18-24 giờ. Vào ngày 1, gentamixin được lấy ra và việc điều trị bằng hợp chất 1, chất đồng phân 2 và hợp chất 2, chất đồng phân 2 ở nồng độ 5 μM bắt đầu. Việc nuôi cấy mảnh cấy tiếp tục trong tổng số 4 ngày ở thời điểm đó giống nuôi cấy được chuẩn bị cho quy trình qRT-PCR được mô tả trên đây. Thương tổn do gentamixin gây ra dễ dàng được khẳng định bằng cách quan sát bằng mắt thường giữa các giống nuôi cấy được xử lý bằng các hợp chất đối chứng âm. Tuy nhiên, các số đo định lượng cho đáp ứng với việc điều trị bằng hợp chất 1, chất đồng phân 2 và hợp chất 2, chất đồng phân 2 sau thương tổn độc thần kinh thu được bằng phương pháp qRT-PCR cho thấy sự gia tăng biểu hiện gen đối với các

dấu chuẩn tế bào lông tiền cảm giác Atoh1 và Pou4f3 và dấu chuẩn tế bào lông Myo7A.

Bảng 6

	% Cảm ứng so với cơ quan Corti bị thương tổn được điều trị đối chứng (Trung bình $\pm$ SEM; giá trị p) n = 11		
Hợp chất (5 μ M)	Atoh1	Pou4f3	Myo7A
1, chất đồng phân 2	242 $\pm$ 16; <0,0005*	114 $\pm$ 25; <0,05*	102 $\pm$ 18; 0,0522
2, chất đồng phân 2	169 $\pm$ 24; <0,05*	28 $\pm$ 11; 0,0633	52 $\pm$ 15; không có ý nghĩa

Dữ liệu trong bảng 6 thể hiện sự gia tăng tương đối về mức biểu hiện gen theo qRT-PCR của dấu chuẩn tạo tế bào lông Atoh1, Pou4f3, và Myo7a, trong các mảnh cấy cơ quan Corti được xử lý bằng hợp chất 1, chất đồng phân 2 và hợp chất 2, chất đồng phân 2 ở nồng độ 5 μ M sau thương tổn do gentamixin (100 μ M) gây ra. Dữ liệu thể hiện tỷ lệ phần trăm gia tăng mức biểu hiện gen so với các mẫu đối chứng âm với thương tổn tế bào lông do gentamixin gây ra. (*, khác biệt đáng kể so với đối chứng âm, p<0,05)

Cảm ứng dấu chuẩn tế bào lông trong giống nuôi cấy toàn bộ nang tai

Nang tai (mảnh cấy nang tai), bao gồm mê đạo xương của ốc tai và hệ thống tiền đình, được cắt ra từ chuột nhắt mới sinh 1 đến 4 ngày tuổi (chúng chuyển gen: nGFP điều khiển bằng Atoh 1; Lumpkin EA, et al., Gene Expr. Patterns, 2003, 3(4): 389-95) cả đực và cái thường theo phương pháp được mô tả trong tài liệu Parker et al., Journal of Visualized Experiments, 2010, (36), e1685. Toàn bộ nang tai được phân lập từ xương vách và giữ ex-vivo trong hệ thống nuôi cấy kiểu ống lăn trong không quá 3 ngày trong môi trường chứa DMEM, nồng độ glucoza cao, 5% FBS, 5% huyết thanh ngựa, 1 μ g/ml ampixilin.

Mảnh cấy nang tai được sử dụng để đánh giá khả năng thâm nhập của hợp chất thử nghiệm, trong nhiều chất dẫn phân phối khác nhau, vào tai trong. Thử nghiệm được tiến hành bằng chế phẩm chứa hợp chất 1, chất đồng phân 2, (7,2 mM) trong các chất dẫn khác nhau. Thể tích nhỏ (100-200 nl) được đưa trực tiếp vào hốc cửa sổ tròn

của ốc tai. Ốc tai được cắt ra, xử lý, ủ trong 1-2 giờ, sau đó đưa vào nuôi cấy lần. Sau 48 giờ, mảnh cấy nang tai được mở ra để lấy cơ quan Corti từ mê đạo xương của ốc tai và thử nghiệm bằng RT-PCR.

Chế phẩm được duy trì trong 1-2 giờ sau đó rửa trôi bằng môi trường nuôi cấy. Mảnh cấy nang tai sau đó được nuôi cấy trong 48 giờ trong môi trường không xử lý. Ốc tai được mở ra và toàn bộ cơ quan Corti sau đó được cắt ra và chuẩn bị cho RT-PCR định lượng để xác định mức biểu hiện dấu chuẩn tế bào lông Atoh1 (như đã mô tả trong thử nghiệm về mảnh cấy cơ quan Corti trên đây). Bảng 7 thể hiện mức cảm ứng Atoh1 trong chất dẫn phân phối đã định. Sự điều hòa tăng Atoh1 bởi hợp chất 1, chất đồng phân 2, trong tất cả các chế phẩm (2-3 lần, n = 12-17) được xác định so với các mảnh cấy nang tai được điều trị bằng đối chứng chỉ chứa chất dẫn sau 48 giờ trong giống nuôi cấy.

Bảng 7: Biểu hiện gen Atoh1 (RT-PCR)

	45-70% PEG (Polyetylen glycol 400)	10% Poloxame (Pluronic® F108)	20% Poloxame (Pluronic® F108)	1-2% Axit hyaluronic
Trạng thái lỏng	Lỏng nhót	Lỏng nhót	Gel	Gel
Độ hòa tan của hợp chất thử nghiệm	Dung dịch trong suốt	Huyền phù	Huyền phù	Huyền phù
Số lần cảm ứng trung bình	2,933	2,398	2,612	2,459
SEM	0,3193	0,2653	0,4441	0,2567
Giá trị P	<0,0001	0,0002	0,0019	0,0001

Khả năng hấp thu hợp chất thử nghiệm qua dịch bao in vivo vào tai trong

Các chuột lang Hartley cái bạch tạng (Charles River, France) được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin trước khi 70 µl hợp chất 1, chất đồng phân 2, trong các chế phẩm được mô tả trên đây cho thử nghiệm nuôi cấy nang tai toàn phần được bơm theo đường qua hòm nhĩ để hoàn toàn nạp vào tai giữa. Các mẫu dịch bao (dịch tai trong) được chiết ra ở thời điểm 0,5, 1, 6, 24 và 48 giờ sau khi bơm và thử nghiệm bằng LCMS (n = 5) về nồng độ hợp chất thử nghiệm. Bảng 8 thể hiện hợp chất thử nghiệm hấp thụ vào tai trong sau khi dùng qua hòm nhĩ vào tai giữa với các chất dẫn phân phối này.

Bảng 8: Mức dịch bao in vivo

	70% PEG (Polyetylen glycol 400)	10% Poloxame (Pluronic® F108)	20% Poloxame (Pluronic® F108)	1% Axit hyaluronic
C _{max} (μM) ±SEM	327,1 ± 93	753,0 ± 306	1926,2 ± 493	187,3 ± 113
Thời gian đạt C _{max}	1 giờ	30 phút	30 phút	1 giờ
% Hợp chất thử nghiệm được sử dụng có trong dịch bao	1,04	2,39	6,11	0,59
R bình phương	0,5262	0,7640	0,5600	0,4229
AUC (μmol.giờ.L ⁻¹)	1451	7002	8634	2711

Trình tự axit amin

SEQ ID NO:1 (protein gốc Notch 1 của chuột nhắt; đầy đủ chiều dài)

MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLRCSQPSGTCLNGGRCEVANGTEACVCSGAFV
GQRCQDSNPCLSTPCKNAGTCHVVDHGGTVDYACSCPLGFSGPLCLTPLDNA
CLANPCRNGGTCDLLTLTEYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNPCANGGQCLP
FESSYICRPPGFHGPTRQDVNECSQNPGLCRHGGTCHNEIGSYRCACRATH
TGPHCELPYVPCSPSPCQNGGTCTPTGDTTHECACLPGFAGQNCENVDDCPG
NNCKNGGACVDGVNTYNCRCPPPEWTGQYCTEDVDECQLMPNACQNGGTCH
NTHGGYNCVCVNGWTGEDCSENIDDCASAACFQGATCHDRVASFYCECPHG
RTGLLCHLNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPACSQDVDECA
LGANPCEHAGKCLNTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECISNPCQNDATCLDQ
IGEFQCICMPGYEGVYCEINTDECASSPCLHNGHCMDKINEFQCQCPKGFNGH
LCQYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDPDPC
HYGSCKDGVATFTCLCQPGYTGHHCETNINECHSQPCRHGGTCQDRDNSYLC
LCLKGTTGPNCENLDDCASNPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMCNVNID
ECAGSPCHNGGTCEGDGIAGFTCRCPEGYHDPTCLSEVNECNSNPCIHGACRDG
LNGYKCDCAPGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCREGFS
GPNCQTNINECASNPCLNQGTCIDDVAGYKCNCPYPYTGATCEVVLAPCATSP
CKNSGVCKESEDYESFSCVCPTGWQGGQTCEVDINECVKSPCRHGASCQNTNG
SYRCLCQAGYTGRNCESDIDDCRPNPCHNGGSGCTDGINAFCDCLPGFQGAFC
EEDINECASNPCQNGANCTDCVDSYTCTCPVGFNGIHCENNTPDCTESSCFNG

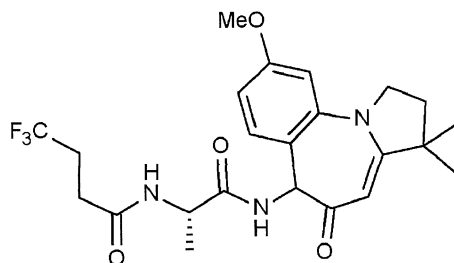
GTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQYDVNECDSRPCLHGGTCQDSYGTYKCTCP
 QGYTGLNCQNLVRWCDSAPCKNGGRCWQNTNTQYHCECRSGWTGVNCDVLS
 VSCEVAAQKRIGDVTLLCQHGGGLCVDEGDKHYCHCQAGYTGSYCEDEVDEC
 SPNPCQNGATCTDYLGGFSCCKVAGYHGSNCSEEINECLSQPCQNGGTCIDL
 NSYKCS CPRGTQGVHCEINVDDCHPPLDPASRSPKCFNNGTCVDQVGGYTCT
 CPPGFVGERCEGDVNECLSNPCDPRGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCES
 VINGCRGKPKNGGVCASANTARGFICRCPAGFEGATCENDARTCGSLRCL
 NGGTCISGPRSPTCLCLGSFTGPECQFPASSPCVGSNPCYNQGTCEPTSENPFYR
 CLCPAKFNGLLCHILDYSFTGGAGRDIPPPQIEEACELPECQVDAGNKVCNLQC
 NNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSDQNSAGCLFD
 GFDCQLTEGQCNP LYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPER
 LAAGTLVLVLLPPDQLRNNSFHFLREL SHVLHTNVVFKRDAQQGQMIFPYY
 GHEEELRKHPIKRSTVGWATSSLLPGTSGGRQRRELDPMDIRGSIVYLEIDNRQ
 CVQSSSQCFQSATDVAAFLGALASLGS LNIPYKIEAVKSEPVEPPLPSQLHLMY
 VAAAAFVLLFFVGC GVLLSRKR RRQH GQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGED
 SVGLKPLKNASDGALMDDNQNEWGDEDLETKKFRFEPPVVL PDLSDQTDHR
 QWTQQHLDAADLRMSAMAPTPPQGEVDADCMDVNVRGPDGFTPLMIASCSG
 GGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAK
 RLLEASADANIQDNMGRTP LHA AVSADAQGVFQILLRN RATDLDARMHDGT
 TPLIL AARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDL GK SALHWA AA VNNVDA AVVL
 LKNGANKDMQNNKEETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDRLPR
 DIAQERMHHDIVRLLD EYNLVRSPQLHG TALGGTPTLSPTLCSPNGYLG NLKS
 ATQGKKARKPSTKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSSMLSPVDSL
 ESPHGYLSDVASPPLLSPFQQSPSMPLSHLP GMPDTHLGISHLNVA AKPEMAA
 LAGGSRLAFEP PPPRLSHLPVASSASTVLSTNGTGAMNFTVGAPASLNGQCEW
 LPRLQNGMVPSQYNPLRPGVTPGTLSTQAAGLQHSMMGPLHSSLSTNTLSPIIY
 QGLPNTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQLQPQNLQPPSQPHLSVSSAANGHLGR
 SFLSGEPSQADVQPLGPSSLPVHTILPQESQALPTSLPSSMVPPMTTTQFLTPPSQ
 HSYSSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTSPESPQDQWSSSSPHSNISDWSEGISSPPTT
 MPSQITHIPEAFK

SEQ ID NO:2 (peptit tín hiệu)

MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLR

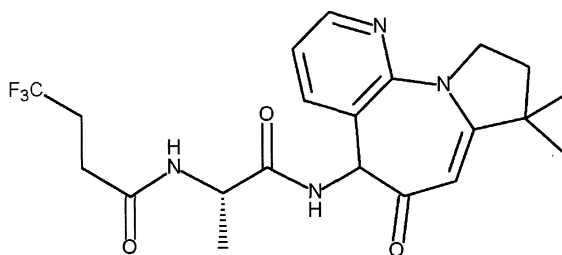
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất 4,4,4-triflo-N-((2S)-1-((9-metoxy-3,3-dimetyl-5-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-benzo[f]pyrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)butanamit có công thức:



chất đồng phân không đối quang của nó với độ tinh khiết về mặt chất đồng phân ở vị trí số 6 lớn hơn 90% lượng dư chất đồng phân đối ảnh, hoặc muối được dụng của chất bất kỳ trong số chúng.

2. Hợp chất N-((2S)-1-((8,8-dimetyl-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-f]pyrolo[1,2-a]azepin-5-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,4-triflobutanamit có công thức:



chất đồng phân không đối quang của nó với độ tinh khiết về mặt chất đồng phân ở vị trí số 5 lớn hơn 90% lượng dư chất đồng phân đối ảnh, hoặc muối được dụng của chất bất kỳ trong số chúng.

3. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, hoặc chất đồng phân không đối quang của nó theo điểm 1 hoặc 2, hoặc muối được dụng của nó, và chất mang được dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company
Audion Therapeutics

<120> HỢP CHẤT ỨC CHẾ TRUYỀN TÍN HIỆU THEO ĐƯỜNG NOTCH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

<130> X20729

<150> 62/189,393

<151> 2015-07-07

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2531

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met	Pro	Arg	Leu	Leu	Thr	Pro	Leu	Leu	Cys	Leu	Thr	Leu	Leu	Pro	Ala
1				5					10					15	

Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	Leu	Arg	Cys	Ser	Gln	Pro	Ser	Gly	Thr	Cys	Leu
			20				25						30		

Asn	Gly	Gly	Arg	Cys	Glu	Val	Ala	Asn	Gly	Thr	Glu	Ala	Cys	Val	Cys
		35					40					45			

Ser	Gly	Ala	Phe	Val	Gly	Gln	Arg	Cys	Gln	Asp	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu
	50						55				60				

Ser	Thr	Pro	Cys	Lys	Asn	Ala	Gly	Thr	Cys	His	Val	Val	Asp	His	Gly
65					70					75					80

Gly	Thr	Val	Asp	Tyr	Ala	Cys	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Phe	Ser	Gly	Pro
				85					90					95	

Leu	Cys	Leu	Thr	Pro	Leu	Asp	Asn	Ala	Cys	Leu	Ala	Asn	Pro	Cys	Arg
			100					105					110		

Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Asp	Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Glu	Tyr	Lys	Cys	Arg
		115					120					125			

Cys	Pro	Pro	Gly	Trp	Ser	Gly	Lys	Ser	Cys	Gln	Gln	Ala	Asp	Pro	Cys
	130						135				140				

Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ser
 145 150 155 160
 Ser Tyr Ile Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe His Gly Pro Thr Cys Arg
 165 170 175
 Gln Asp Val Asn Glu Cys Ser Gln Asn Pro Gly Leu Cys Arg His Gly
 180 185 190
 Gly Thr Cys His Asn Glu Ile Gly Ser Tyr Arg Cys Ala Cys Arg Ala
 195 200 205
 Thr His Thr Gly Pro His Cys Glu Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro
 210 215 220
 Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Arg Pro Thr Gly Asp Thr Thr
 225 230 235 240
 His Glu Cys Ala Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Gln Asn Cys Glu Glu
 245 250 255
 Asn Val Asp Asp Cys Pro Gly Asn Asn Cys Lys Asn Gly Gly Ala Cys
 260 265 270
 Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Glu Trp Thr
 275 280 285
 Gly Gln Tyr Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Met Pro Asn
 290 295 300
 Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys His Asn Thr His Gly Gly Tyr Asn
 305 310 315 320
 Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Asn Ile
 325 330 335
 Asp Asp Cys Ala Ser Ala Ala Cys Phe Gln Gly Ala Thr Cys His Asp
 340 345 350
 Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys Glu Cys Pro His Gly Arg Thr Gly Leu
 355 360 365
 Leu Cys His Leu Asn Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys Asn Glu Gly
 370 375 380

Ser Asn Cys Asp Thr Asn Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys Thr Cys
385 390 395 400

Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys
405 410 415

Ala Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Leu Asn Thr
420 425 430

Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg
435 440 445

Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Ile Ser Asn Pro Cys Gln Asn Asp
450 455 460

Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro
465 470 475 480

Gly Tyr Glu Gly Val Tyr Cys Glu Ile Asn Thr Asp Glu Cys Ala Ser
485 490 495

Ser Pro Cys Leu His Asn Gly His Cys Met Asp Lys Ile Asn Glu Phe
500 505 510

Gln Cys Gln Cys Pro Lys Gly Phe Asn Gly His Leu Cys Gln Tyr Asp
515 520 525

Val Asp Glu Cys Ala Ser Thr Pro Cys Lys Asn Gly Ala Lys Cys Leu
530 535 540

Asp Gly Pro Asn Thr Tyr Thr Cys Val Cys Thr Glu Gly Tyr Thr Gly
545 550 555 560

Thr His Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Asp Pro Asp Pro Cys His
565 570 575

Tyr Gly Ser Cys Lys Asp Gly Val Ala Thr Phe Thr Cys Leu Cys Gln
580 585 590

Pro Gly Tyr Thr Gly His His Cys Glu Thr Asn Ile Asn Glu Cys His
595 600 605

Ser Gln Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Arg Asp Asn Ser
610 615 620

Tyr Leu Cys Leu Cys Leu Lys Gly Thr Thr Gly Pro Asn Cys Glu Ile
 625 630 635 640
 Asn Leu Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Asp Ser Gly Thr Cys Leu
 645 650 655
 Asp Lys Ile Asp Gly Tyr Glu Cys Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr Gly
 660 665 670
 Ser Met Cys Asn Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala Gly Ser Pro Cys His
 675 680 685
 Asn Gly Gly Thr Cys Glu Asp Gly Ile Ala Gly Phe Thr Cys Arg Cys
 690 695 700
 Pro Glu Gly Tyr His Asp Pro Thr Cys Leu Ser Glu Val Asn Glu Cys
 705 710 715 720
 Asn Ser Asn Pro Cys Ile His Gly Ala Cys Arg Asp Gly Leu Asn Gly
 725 730 735
 Tyr Lys Cys Asp Cys Ala Pro Gly Trp Ser Gly Thr Asn Cys Asp Ile
 740 745 750
 Asn Asn Asn Glu Cys Glu Ser Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys
 755 760 765
 Lys Asp Met Thr Ser Gly Tyr Val Cys Thr Cys Arg Glu Gly Phe Ser
 770 775 780
 Gly Pro Asn Cys Gln Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys
 785 790 795 800
 Leu Asn Gln Gly Thr Cys Ile Asp Asp Val Ala Gly Tyr Lys Cys Asn
 805 810 815
 Cys Pro Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Cys Glu Val Val Leu Ala Pro
 820 825 830
 Cys Ala Thr Ser Pro Cys Lys Asn Ser Gly Val Cys Lys Glu Ser Glu
 835 840 845
 Asp Tyr Glu Ser Phe Ser Cys Val Cys Pro Thr Gly Trp Gln Gly Gln
 850 855 860

Thr Cys Glu Val Asp Ile Asn Glu Cys Val Lys Ser Pro Cys Arg His
865 870 875 880

Gly Ala Ser Cys Gln Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Gln
885 890 895

Ala Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Glu Ser Asp Ile Asp Asp Cys Arg
900 905 910

Pro Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Gly Ile Asn Thr
915 920 925

Ala Phe Cys Asp Cys Leu Pro Gly Phe Gln Gly Ala Phe Cys Glu Glu
930 935 940

Asp Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala Asn Cys
945 950 955 960

Thr Asp Cys Val Asp Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Val Gly Phe Asn
965 970 975

Gly Ile His Cys Glu Asn Asn Thr Pro Asp Cys Thr Glu Ser Ser Cys
980 985 990

Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser Phe Thr Cys Leu
995 1000 1005

Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Cys Gln Tyr Asp Val Asn
1010 1015 1020

Glu Cys Asp Ser Arg Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys Gln Asp
1025 1030 1035

Ser Tyr Gly Thr Tyr Lys Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Gly
1040 1045 1050

Leu Asn Cys Gln Asn Leu Val Arg Trp Cys Asp Ser Ala Pro Cys
1055 1060 1065

Lys Asn Gly Gly Arg Cys Trp Gln Thr Asn Thr Gln Tyr His Cys
1070 1075 1080

Glu Cys Arg Ser Gly Trp Thr Gly Val Asn Cys Asp Val Leu Ser
1085 1090 1095

Val	Ser	Cys	Glu	Val	Ala	Ala	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Asp	Val	Thr
1100						1105					1110			
Leu	Leu	Cys	Gln	His	Gly	Gly	Leu	Cys	Val	Asp	Glu	Gly	Asp	Lys
1115						1120					1125			
His	Tyr	Cys	His	Cys	Gln	Ala	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Tyr	Cys	Glu
1130						1135					1140			
Asp	Glu	Val	Asp	Glu	Cys	Ser	Pro	Asn	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Ala
1145						1150					1155			
Thr	Cys	Thr	Asp	Tyr	Leu	Gly	Gly	Phe	Ser	Cys	Lys	Cys	Val	Ala
1160						1165					1170			
Gly	Tyr	His	Gly	Ser	Asn	Cys	Ser	Glu	Glu	Ile	Asn	Glu	Cys	Leu
1175						1180					1185			
Ser	Gln	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn
1190						1195					1200			
Ser	Tyr	Lys	Cys	Ser	Cys	Pro	Arg	Gly	Thr	Gln	Gly	Val	His	Cys
1205						1210					1215			
Glu	Ile	Asn	Val	Asp	Asp	Cys	His	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Ala	Ser
1220						1225					1230			
Arg	Ser	Pro	Lys	Cys	Phe	Asn	Asn	Gly	Thr	Cys	Val	Asp	Gln	Val
1235						1240					1245			
Gly	Gly	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Val	Gly	Glu	Arg
1250						1255					1260			
Cys	Glu	Gly	Asp	Val	Asn	Glu	Cys	Leu	Ser	Asn	Pro	Cys	Asp	Pro
1265						1270					1275			
Arg	Gly	Thr	Gln	Asn	Cys	Val	Gln	Arg	Val	Asn	Asp	Phe	His	Cys
1280						1285					1290			
Glu	Cys	Arg	Ala	Gly	His	Thr	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Ser	Val	Ile
1295						1300					1305			
Asn	Gly	Cys	Arg	Gly	Lys	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Val	Cys	Ala
1310						1315					1320			

Val	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Arg	Gly	Phe	Ile	Cys	Arg	Cys	Pro	Ala
	1325					1330					1335			
Gly	Phe	Glu	Gly	Ala	Thr	Cys	Glu	Asn	Asp	Ala	Arg	Thr	Cys	Gly
	1340					1345					1350			
Ser	Leu	Arg	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ile	Ser	Gly	Pro	Arg
	1355					1360					1365			
Ser	Pro	Thr	Cys	Leu	Cys	Leu	Gly	Ser	Phe	Thr	Gly	Pro	Glu	Cys
	1370					1375					1380			
Gln	Phe	Pro	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Val	Gly	Ser	Asn	Pro	Cys	Tyr
	1385					1390					1395			
Asn	Gln	Gly	Thr	Cys	Glu	Pro	Thr	Ser	Glu	Asn	Pro	Phe	Tyr	Arg
	1400					1405					1410			
Cys	Leu	Cys	Pro	Ala	Lys	Phe	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	His	Ile	Leu
	1415					1420					1425			
Asp	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Arg	Asp	Ile	Pro	Pro	Pro
	1430					1435					1440			
Gln	Ile	Glu	Glu	Ala	Cys	Glu	Leu	Pro	Glu	Cys	Gln	Val	Asp	Ala
	1445					1450					1455			
Gly	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Leu	Gln	Cys	Asn	Asn	His	Ala	Cys	Gly
	1460					1465					1470			
Trp	Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser	Leu	Asn	Phe	Asn	Asp	Pro	Trp	Lys
	1475					1480					1485			
Asn	Cys	Thr	Gln	Ser	Leu	Gln	Cys	Trp	Lys	Tyr	Phe	Ser	Asp	Gly
	1490					1495					1500			
His	Cys	Asp	Ser	Gln	Cys	Asn	Ser	Ala	Gly	Cys	Leu	Phe	Asp	Gly
	1505					1510					1515			
Phe	Asp	Cys	Gln	Leu	Thr	Glu	Gly	Gln	Cys	Asn	Pro	Leu	Tyr	Asp
	1520					1525					1530			
Gln	Tyr	Cys	Lys	Asp	His	Phe	Ser	Asp	Gly	His	Cys	Asp	Gln	Gly
	1535					1540					1545			

Cys	Asn	Ser	Ala	Glu	Cys	Glu	Trp	Asp	Gly	Leu	Asp	Cys	Ala	Glu
1550						1555					1560			
His	Val	Pro	Glu	Arg	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Val
1565						1570					1575			
Leu	Leu	Pro	Pro	Asp	Gln	Leu	Arg	Asn	Asn	Ser	Phe	His	Phe	Leu
1580						1585					1590			
Arg	Glu	Leu	Ser	His	Val	Leu	His	Thr	Asn	Val	Val	Phe	Lys	Arg
1595						1600					1605			
Asp	Ala	Gln	Gly	Gln	Gln	Met	Ile	Phe	Pro	Tyr	Tyr	Gly	His	Glu
1610						1615					1620			
Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	His	Pro	Ile	Lys	Arg	Ser	Thr	Val	Gly	Trp
1625						1630					1635			
Ala	Thr	Ser	Ser	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Arg	Gln	Arg
1640						1645					1650			
Arg	Glu	Leu	Asp	Pro	Met	Asp	Ile	Arg	Gly	Ser	Ile	Val	Tyr	Leu
1655						1660					1665			
Glu	Ile	Asp	Asn	Arg	Gln	Cys	Val	Gln	Ser	Ser	Ser	Gln	Cys	Phe
1670						1675					1680			
Gln	Ser	Ala	Thr	Asp	Val	Ala	Ala	Phe	Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Ser
1685						1690					1695			
Leu	Gly	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ile	Glu	Ala	Val	Lys	Ser
1700						1705					1710			
Glu	Pro	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Pro	Ser	Gln	Leu	His	Leu	Met	Tyr
1715						1720					1725			
Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Cys	Gly
1730						1735					1740			
Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Lys	Arg	Arg	Arg	Gln	His	Gly	Gln	Leu	Trp
1745						1750					1755			
Phe	Pro	Glu	Gly	Phe	Lys	Val	Ser	Glu	Ala	Ser	Lys	Lys	Lys	Arg
1760						1765					1770			

Arg	Glu	Pro	Leu	Gly	Glu	Asp	Ser	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Lys
1775						1780					1785			
Asn	Ala	Ser	Asp	Gly	Ala	Leu	Met	Asp	Asp	Asn	Gln	Asn	Glu	Trp
1790						1795					1800			
Gly	Asp	Glu	Asp	Leu	Glu	Thr	Lys	Lys	Phe	Arg	Phe	Glu	Glu	Pro
1805						1810					1815			
Val	Val	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Asp	Gln	Thr	Asp	His	Arg	Gln	Trp
1820						1825					1830			
Thr	Gln	Gln	His	Leu	Asp	Ala	Ala	Asp	Leu	Arg	Met	Ser	Ala	Met
1835						1840					1845			
Ala	Pro	Thr	Pro	Pro	Gln	Gly	Glu	Val	Asp	Ala	Asp	Cys	Met	Asp
1850						1855					1860			
Val	Asn	Val	Arg	Gly	Pro	Asp	Gly	Phe	Thr	Pro	Leu	Met	Ile	Ala
1865						1870					1875			
Ser	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Gly	Asn	Ser	Glu	Glu	Glu
1880						1885					1890			
Glu	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Ile	Ser	Asp	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ala
1895						1900					1905			
Ser	Leu	His	Asn	Gln	Thr	Asp	Arg	Thr	Gly	Glu	Thr	Ala	Leu	His
1910						1915					1920			
Leu	Ala	Ala	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ser	Asp	Ala	Ala	Lys	Arg	Leu	Leu
1925						1930					1935			
Glu	Ala	Ser	Ala	Asp	Ala	Asn	Ile	Gln	Asp	Asn	Met	Gly	Arg	Thr
1940						1945					1950			
Pro	Leu	His	Ala	Ala	Val	Ser	Ala	Asp	Ala	Gln	Gly	Val	Phe	Gln
1955						1960					1965			
Ile	Leu	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Thr	Asp	Leu	Asp	Ala	Arg	Met	His
1970						1975					1980			
Asp	Gly	Thr	Thr	Pro	Leu	Ile	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Glu
1985						1990					1995			

Gly	Met	Leu	Glu	Asp	Leu	Ile	Asn	Ser	His	Ala	Asp	Val	Asn	Ala
2000						2005					2010			
Val	Asp	Asp	Leu	Gly	Lys	Ser	Ala	Leu	His	Trp	Ala	Ala	Ala	Val
2015						2020					2025			
Asn	Asn	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Ala	Asn
2030						2035					2040			
Lys	Asp	Met	Gln	Asn	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu	Ala
2045						2050					2055			
Ala	Arg	Glu	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Leu	Leu	Asp	His
2060						2065					2070			
Phe	Ala	Asn	Arg	Asp	Ile	Thr	Asp	His	Met	Asp	Arg	Leu	Pro	Arg
2075						2080					2085			
Asp	Ile	Ala	Gln	Glu	Arg	Met	His	His	Asp	Ile	Val	Arg	Leu	Leu
2090						2095					2100			
Asp	Glu	Tyr	Asn	Leu	Val	Arg	Ser	Pro	Gln	Leu	His	Gly	Thr	Ala
2105						2110					2115			
Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Thr	Leu	Cys	Ser	Pro	Asn
2120						2125					2130			
Gly	Tyr	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Ser	Ala	Thr	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala
2135						2140					2145			
Arg	Lys	Pro	Ser	Thr	Lys	Gly	Leu	Ala	Cys	Gly	Ser	Lys	Glu	Ala
2150						2155					2160			
Lys	Asp	Leu	Lys	Ala	Arg	Arg	Lys	Lys	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Gly
2165						2170					2175			
Cys	Leu	Leu	Asp	Ser	Ser	Ser	Met	Leu	Ser	Pro	Val	Asp	Ser	Leu
2180						2185					2190			
Glu	Ser	Pro	His	Gly	Tyr	Leu	Ser	Asp	Val	Ala	Ser	Pro	Pro	Leu
2195						2200					2205			
Leu	Pro	Ser	Pro	Phe	Gln	Gln	Ser	Pro	Ser	Met	Pro	Leu	Ser	His
2210						2215					2220			

Leu	Pro	Gly	Met	Pro	Asp	Thr	His	Leu	Gly	Ile	Ser	His	Leu	Asn
2225						2230					2235			
Val	Ala	Ala	Lys	Pro	Glu	Met	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Arg
2240						2245					2250			
Leu	Ala	Phe	Glu	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Leu	Ser	His	Leu	Pro	Val
2255						2260					2265			
Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Val	Leu	Ser	Thr	Asn	Gly	Thr	Gly	Ala
2270						2275					2280			
Met	Asn	Phe	Thr	Val	Gly	Ala	Pro	Ala	Ser	Leu	Asn	Gly	Gln	Cys
2285						2290					2295			
Glu	Trp	Leu	Pro	Arg	Leu	Gln	Asn	Gly	Met	Val	Pro	Ser	Gln	Tyr
2300						2305					2310			
Asn	Pro	Leu	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr	Gln
2315						2320					2325			
Ala	Ala	Gly	Leu	Gln	His	Ser	Met	Met	Gly	Pro	Leu	His	Ser	Ser
2330						2335					2340			
Leu	Ser	Thr	Asn	Thr	Leu	Ser	Pro	Ile	Ile	Tyr	Gln	Gly	Leu	Pro
2345						2350					2355			
Asn	Thr	Arg	Leu	Ala	Thr	Gln	Pro	His	Leu	Val	Gln	Thr	Gln	Gln
2360						2365					2370			
Val	Gln	Pro	Gln	Asn	Leu	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Leu	Gln	Pro
2375						2380					2385			
Pro	Ser	Gln	Pro	His	Leu	Ser	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Asn	Gly	His
2390						2395					2400			
Leu	Gly	Arg	Ser	Phe	Leu	Ser	Gly	Glu	Pro	Ser	Gln	Ala	Asp	Val
2405						2410					2415			
Gln	Pro	Leu	Gly	Pro	Ser	Ser	Leu	Pro	Val	His	Thr	Ile	Leu	Pro
2420						2425					2430			
Gln	Glu	Ser	Gln	Ala	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	Ser	Met	Val
2435						2440					2445			

Pro Pro Met Thr Thr Thr Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His
 2450 2455 2460

Ser Tyr Ser Ser Ser Pro Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu
 2465 2470 2475

Gln Val Pro Glu His Pro Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro
 2480 2485 2490

Asp Gln Trp Ser Ser Ser Ser Pro His Ser Asn Ile Ser Asp Trp
 2495 2500 2505

Ser Glu Gly Ile Ser Ser Pro Pro Thr Thr Met Pro Ser Gln Ile
 2510 2515 2520

Thr His Ile Pro Glu Ala Phe Lys
 2525 2530

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

Met Pro Arg Leu Leu Thr Pro Leu Leu Cys Leu Thr Leu Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Gly Leu Arg
 20