



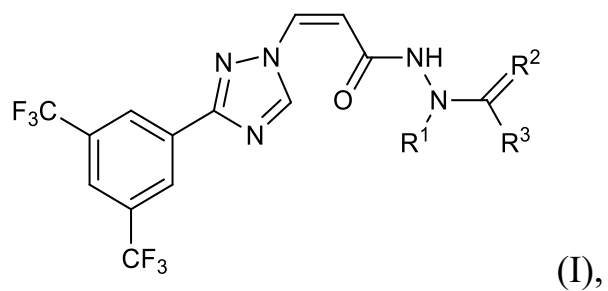
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0042431
(51)⁷ C07D 403/12; C07D 413/12; C07D (13) B
249/08

(21) 1-2018-03344 (22) 09/05/2013
(62) 1-2014-04067
(86) PCT/US2013/040404 09/05/2013 (87) WO2013/170068 14/11/2013
(30) 61/644,802 09/05/2012 US; 61/798,188 15/03/2013 US
(45) 27/01/2025 442 (43) 25/10/2018 367A
(73) Biogen MA Inc. (US)
225 Binney Street, Cambridge, Massachusetts 02142, United States of America.
(72) SHECHTER, Sharon (IL); SHACHAM, Sharon (IL); MCCAULEY, Dilara (US);
BALOGLU, Erkan (US); SANDANAYAKA, Vincent, P. (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM VÀ DƯỢC PHẨM DẠNG LIỀU DÙNG QUA ĐƯỜNG MIỆNG
CHỨA HỢP CHẤT CÓ TÁC DỤNG ĐIỀU BIẾN VẬN CHUYỂN TRONG NHÂN

(21) 1-2018-03344

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I):



và muối dược dụng của nó, dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I), để điều trị nhiều loại rối loạn khác nhau có liên quan đến hoạt tính CRM1.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất làm chất điều biến vận chuyển trong nhân và được phẩm chứa hợp chất này để điều trị các rối loạn có liên quan đến hoạt tính CRM1.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào khối u máu rắn ác tính ở người khu trú nhiều protein gây ung thư, protein ức chế khối u, và chất điều hòa chu kỳ tế bào trong tế bào bất thường (Cronshaw et al, 2004, Falini et al 2006). Ví dụ, các phép đột biến p53 nhất định dẫn đến sự khu trú trong tế bào chất nhiều hơn trong nhân. Điều này dẫn đến sự mất điều hòa sinh trưởng bình thường, thay vì chức năng ức chế khối u nguyên vẹn. Ở các khối u khác, p53 kiểu hoang dại bị cô lập trong tế bào chất hoặc nhanh chóng bị suy biến, và lại dẫn đến sự mất chức năng ức chế của nó. Việc phục hồi sự khu trú trong nhân thích hợp của protein chức năng p53 có thể làm cho các đặc tính của tế bào khối u trở lại bình thường (Cai et al, 2008; Hoshino et al 2008; Lain et al 1999a; Lain et al 1999b; Smart et al 1999), có thể phục hồi các tế bào ung thư thành các tác nhân phá hủy ADN (Cai et al, 2008), và có thể dẫn đến sự suy thoái của khối u đã hình thành (Sharpless & DePinho 2007, Xue et al, 2007). Dữ liệu tương tự thu được đối với các protein ức chế khối u khác như forkhead (Turner và Sullivan 2008) và c-Abl (Vignari và Wang 2001). Ngoài ra, sự khu trú bất thường của một số protein ức chế khối u và điều hòa sinh trưởng có thể có liên quan đến sinh bệnh học của các bệnh tự miễn (Davis 2007, Nakahara 2009). Sự ức chế CRM1 có thể có ứng dụng đặc biệt đáng quan tâm trong các hội chứng ung thư gia đình (ví dụ, hội chứng Li-Fraumeni do mất một alen p53, hội chứng ung thư BRCA1 hoặc 2), trong đó các protein ức chế khối u đặc hiệu (protein ức chế khối u - TSP) bị mất hoặc hoạt động bất thường và trong đó mức TSP tăng bằng cách sử dụng chất ức chế CRM1 toàn thân (hoặc khu trú) có thể giúp phục hồi chức năng ức chế khối u bình thường.

Các protein và ARN cụ thể được đưa vào và ra khỏi nhân bằng các phân tử vận chuyển chuyên biệt, chúng được xếp vào nhóm phân tử vận chuyển vào (importin) nếu chúng vận chuyển các phân tử vào trong nhân, và nhóm phân tử vận chuyển ra

(exportin) nếu chúng vận chuyển các phân tử ra khỏi nhân (Terry et al, 2007; Sorokin et al 2007). Các protein được vận chuyển vào hoặc ra khỏi nhân chứa các trình tự nhập vào/khu trú (nuclear import/localization sequence - NLS) hoặc ra (nuclear export sequence - NES) khỏi nhân mà cho phép chúng tương tác với các phân tử vận chuyển tương ứng. Thụ thể duy trì vùng nhiễm sắc thể 1 (Chromosomal Region Maintenance 1 - CRM1), còn gọi là exportin-1 hoặc Xpo1, là exportin chính.

Sự biểu hiện quá mức CRM1 đã được báo cáo ở một số khối u, bao gồm ung thư buồng trứng ở người (Noske et al, 2008), ung thư cổ tử cung (van der Watt et al, 2009), ung thư tuyến tụy (Huang et al, 2009), caxinom tế bào gan (Pascale et al, 2005) và sacom xương (Yao et al, 2009) và có liên quan độc lập với với kết quả lâm sàng xấu ở các loại khối u này.

Sự ức chế CRM1 ngăn chặn sự di cư của các protein ức chế khối u và/hoặc các yếu tố điều hòa sinh trưởng như p53, c-Abl, p21, p27, pRB, BRCA1, Ikb, ICp27, E2F4, KLF5, YAP1, ZAP, KLF5, HDAC4, HDAC5 hoặc protein forkhead (ví dụ FOXO3a) từ nhân mà có liên quan đến sự biểu hiện gen, tăng sinh tế bào, sự tạo mạch và ngoại di truyền. Các chất ức chế CRM1 đã cho thấy là gây ra sự chết tế bào theo chương trình trong các tế bào ung thư ngay cả khi có mặt các dấu hiệu gây ung thư hoạt hóa hoặc kích thích sinh trưởng, trong khi không tác động đến tế bào bình thường (không bị biến đổi). Hầu hết các nghiên cứu về sự ức chế CRM1 đã sử dụng chất ức chế CRM1 Leptomycin B (LMB) sản phẩm tự nhiên. Bản thân LMB có độc tính cao đối với các tế bào ung thư, nhưng khả năng kém trong chống chịu độc tố dạ dày ruột đáng kể ở động vật (Roberts et al, 1986) và người (Newlands et al, 1996). Việc tạo dẫn xuất của LMB để cải thiện các đặc tính giống thuốc tạo ra các hợp chất mà duy trì được hoạt tính chống khối u và được dung nạp tốt hơn trong các mô hình khối u động vật (Yang et al, 2007, Yang et al, 2008, Mutka et al, 2009). Do đó, các chất ức chế vận chuyển ra ngoài nhân có thể có tác dụng có lợi trong các rối loạn ung thư và rối loạn tăng sinh khác. Tuy nhiên, cho đến nay, các chất ức chế CRM1 phân tử nhỏ, giống thuốc để sử dụng in vitro và in vivo là không phổ biến.

Ngoài các protein ức chế khối u, CRM1 cũng vận chuyển một số protein quan trọng có liên quan đến nhiều quá trình viêm. Các protein này bao gồm Ikb, NF-kB, Cox-2, RXR α , Commd1, HIF1, HMGB1, FOXO, FOXP và các protein khác. Họ yếu tố nhân kappa B (NF-kB/rel) của yếu tố hoạt hóa phiên mã, được gọi tên theo phát

hiện rằng nó điều khiển sự biểu hiện gen globulin miễn dịch kappa, điều hòa sự biểu hiện ARN thông tin (mRNA) của nhiều gen khác nhau liên quan đến viêm, tăng sinh, miễn dịch và sự sống sót của tế bào. Trong các điều kiện cơ bản, chất ức chế protein của NF- κ B, gọi là I κ B, liên kết với NF- κ B trong nhân và phức I κ B-NF- κ B bất hoạt chức năng phiên mã của NF- κ B. Khi đáp ứng với kích thích viêm, I κ B phân ly từ phức I κ B-NF- κ B, giải phóng NF- κ B và khôi phục hoạt tính phiên mã tiềm tàng của nó. Nhiều dấu hiệu hoạt hóa NF- κ B cũng có hoạt tính như vậy bằng cách hướng I κ B đến phân giải protein (sự phosphoryl hóa I κ B làm cho nó được “đánh dấu” để ubiquitin hóa và sau đó phân giải protein). Phức I κ Ba-NF- κ B nhân có thể được xuất ra tế bào chất bằng CRM1, tại đó nó phân ly và NF- κ B có thể được hoạt hóa lại. I κ B đã ubiquitin hóa cũng có thể phân ly từ phức NF- κ B, khôi phục hoạt tính phiên mã của NF- κ B. Sự ức chế CRM1 do xuất bạch cầu trung tính và tế bào giống đại thực bào người (U937) bởi LMB gây ra không chỉ dẫn đến sự tích tụ phức I κ Ba-NF- κ B nhân, không hoạt động phiên mã mà còn ngăn chặn sự hoạt hóa NF- κ B ban đầu ngay cả khi kích thích tế bào (Ghosh 2008, Huang 2000). Trong một nghiên cứu khác, việc điều trị bằng IL-1 β bị ức chế bởi LMB gây ra liên kết ADN của NF- κ B (bước đầu tiên trong hoạt hóa sự phiên mã của NF- κ B), sự biểu hiện IL-8 và sự biểu hiện phân tử kết dính giữa các tế bào trong các tế bào nội mô mao mạch phổi (Walsh 2008). COMMD1 là yếu tố ức chế nhân khác của cả hoạt tính phiên mã của NF- κ B và yếu tố cảm ứng tình trạng thiếu oxy 1 (hypoxia-inducible factor 1 - HIF1). Việc ngăn chặn sự xuất ra ngoài nhân của COMMD1 bằng cách ức chế CRM1 làm tăng ức chế hoạt tính phiên mã của NF- κ B và HIF1 (Muller 2009).

CRM1 cũng tham gia vận chuyển thụ thể Retinoid X α (RXR α). RXR α được biểu hiện ở mức cao trong gan và đóng vai trò trung tâm trong điều hòa quá trình chuyển hóa và cân bằng nội mô của axit mật, cholesterol, axit béo, steroid và chất lạ sinh học (xenobiotic). Trong quá trình viêm gan, mức RXR α nhân giảm đáng kể, chủ yếu do sự xuất RXR α ra khỏi nhân do viêm bởi CRM1. Lep B có khả năng ngăn chặn IL-1 β gây ra sự gia tăng mức RXR α trong tế bào chất ở tế bào có nguồn gốc từ gan người (Zimmerman 2006).

Vai trò của sự xuất khẩu ra ngoài nhân bởi CRM1 trong việc tạo tín hiệu NF- κ B, HIF-1 và RXR α cho thấy rằng việc ngăn chặn sự xuất khẩu ra ngoài nhân có thể có lợi trong nhiều quá trình viêm ở nhiều mô và cơ quan bao gồm hệ tuần hoàn (viêm mạch,

viêm động mạch, đau đa cơ do thấp khớp, xơ vữa động mạch), da (xem trên đây), thấp khớp (viêm khớp dạng thấp và các dạng viêm khớp có liên quan, viêm khớp vảy nến, bệnh khớp cột sống, bệnh khớp do vi tinh thể, lupus ban đỏ hệ thống, bệnh mô liên kết hỗn hợp, hội chứng viêm cơ, viêm da cơ, viêm cơ thể vùi, bệnh mô liên kết không biệt hóa, hội chứng Sjogren, xơ cứng bì và hội chứng trùng lấp, v.v.).

Sự ức chế CRM1 ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen bằng cách ức chế/hoạt hóa một loạt các yếu tố phiên mã như ICp27, E2F4, KLF5, YAP1, ZAP.

Sự ức chế CRM1 có hiệu quả tiềm tàng trong điều trị đối với nhiều hội chứng ở da bao gồm các bệnh da do viêm (viêm da cơ địa, viêm da dị ứng, viêm da do hóa chất, bệnh vảy nến), thương tổn do ánh nắng (thương tổn do tia cực tím/UV), và các tình trạng viêm nhiễm. Sự ức chế CRM1, được nghiên cứu kỹ nhất với LMB, thể hiện hiệu quả tối thiểu trên các tế bào sừng (keratin) bình thường, và có hoạt tính chống viêm trên các tế bào sừng bị kích thích bằng UV, TNF α , hoặc các kích thích viêm khác (Kobayashi & Shinkai 2005, Kannan & Jaiswal 2006). Sự ức chế CRM1 cũng điều chỉnh tăng hoạt tính NRF2 (nuclear factor erythroid-related factor 2 – yếu tố liên quan đến erythroid yếu tố nhân 2), mà bảo vệ các tế bào sừng (Schafer et al, 2010, Kannan & Jaiswal 2006) và các loại tế bào khác (Wang et al, 2009) khỏi sự tổn thương do oxy hóa. LMB bao gồm sự chết tế bào theo chương trình ở các tế bào sừng bị nhiễm các chủng papillomavirus gây ung thư ở người (human papillomavirus - HPV) như HPV16, nhưng không ở các tế bào sừng không bị nhiễm (Jolly et al, 2009).

CRM1 cũng làm trung gian vận chuyển các protein bảo vệ thần kinh quan trọng mà có thể hữu dụng trong các bệnh thoái hóa thần kinh bao gồm bệnh Parkinson (PD), bệnh Alzheimer, và bệnh xơ cứng teo cơ một bên. Ví dụ, (1) thúc đẩy sự giữ lại trong nhân các yếu tố điều hòa bảo vệ thần kinh quan trọng như NRF2 (Wang 2009), FOXA2 (Kittappa et al, 2007), lưu lại trong tế bào thần kinh và/hoặc bằng cách (2) ức chế hoạt tính phiên mã của NF κ B bằng cách cô lập I κ B vào trong nhân ở các tế bào thần kinh đệm, sự ức chế CRM1 có thể làm làm chậm hoặc ngăn chặn sự chết tế bào thần kinh được phát hiện trong một số rối loạn. Cũng có bằng chứng cho thấy sự liên quan giữa tăng sinh tế bào thần kinh đệm bất thường và mức CRM1 hoặc chức năng CRM1 bất thường (Shen 2008).

Trạng thái nguyên vẹn khi xuất khỏi nhân, chủ yếu qua trung gian CRM1, cũng cần thiết để nhiều virus hoàn thiện. Các virus mà quá trình xuất khỏi nhân, và/hoặc bản

thân CRM1, có liên quan đến chu kỳ sống của chúng bao gồm virus suy giảm miễn dịch ở người (human immunodeficiency virus - HIV), adenovirus, simian retrovirus typ 1, virus gây bệnh Borna, virus cúm (các chủng thông thường cũng như H1N1 và H5N1 ở chim), virus viêm gan B (HBV) và viêm gan C (HCV), papillomavirus ở người (HPV), virus hợp bào hô hấp (respiratory syncytial virus - RSV), virus Dungee, coronavirus gây hội chứng suy hô hấp cấp (Severe Acute Respiratory Syndrome), virus sốt vàng, virus West Nile, virus herpes simplex (HSV), cytomegalovirus (CMV), và polyomavirus tế bào Merkel (MCV). (Bhuvanakantham 2010, Cohen 2010, Whittaker 1998). Có thể dự đoán rằng các tình trạng nhiễm virus khác dựa trên trạng thái xuất khỏi nhân nguyên vẹn sẽ được khám phá trong tương lai gần.

Protein HIV-1 Rev, mà di chuyển qua thể nhân và lưu thông giữa nhân và tế bào chất, tạo thuận lợi cho việc xuất các bản sao không ghép nối và ghép nối đơn của HIV chứa ARN yếu tố đáp ứng Rev (Rev Response Elements - RRE) theo đường xuất qua trung gian CRM1. Sự ức chế vận chuyển ARN qua trung gian Rev bằng cách sử dụng chất ức chế CRM1 như LepB hoặc PKF050-638 có thể làm ngừng quá trình phiên mã của HIV-1, ức chế sự sản xuất các virion HIV-1 mới, và nhờ đó làm giảm mức HIV-1 (Pollard 1998, Daelemans 2002).

Virus Dengue (DENV) là tác nhân gây ra bệnh virus lây truyền qua động vật chân khớp, sốt dengue (dengue fever - DF), loại nghiêm trọng hơn và dễ gây tử vong hơn là sốt xuất huyết dengue (dengue hemorrhagic fever - DHF). DHF là kết quả của đáp ứng viêm quá mức với DENV. NS5 là protein lớn nhất và được bảo tồn nhất của DENV. CRM1 điều hòa sự vận chuyển NS5 từ nhân đến tế bào chất, nơi mà hầu hết chức năng của NS5 được phát huy. Sự ức chế xuất NS5 qua trung gian CRM1 làm thay đổi động học của sự sản sinh virus và giảm mức cảm ứng chemokine viêm interleukin-8 (IL-8), đề ra một đường hướng mới cho việc điều trị bệnh do DENV và các flavivirus quan trọng trong y học khác bao gồm virus viêm gan C gây ra (Rawlinson 2009).

Các protein liên kết ARN được mã hóa bởi virus khác mà sử dụng CRM1 để ra khỏi nhân bao gồm protein vỏ của HSV typ 1 (VP13/14, hoặc hUL47), protein pp65 của CMV người, protein của SARS Coronavirus ORF 3b, và protein nền RSV (M) (Williams 2008, Sanchez 2007, Freundt 2009, Ghildyal 2009).

Thú vị là, nhiều virus trong số đó có liên quan đến các loại bệnh ung thư cụ thể ở người bao gồm caxinom tế bào gan (HCC) do nhiễm HBV hoặc HCV mạn tính, ung

thư cổ tử cung do HPV, và caxinom tế bào Merkel có liên quan đến MCV. Chất ức chế CRM1 do đó có thể có tác dụng có lợi trên cả quá trình nhiễm virus lẫn quá trình biến nạp gây ung thư của các virus này.

CRM1 kiểm soát sự định khu trong nhân và do đó kiểm soát hoạt tính của nhiều enzyme chuyển hóa ADN bao gồm histon deacetylaza (HDAC), histon acetyltransferaza (HAT), và histon methyltransferaza (HMT). Sự kìm hãm sự phì đại tế bào cơ tim bằng chất ức chế CRM1 không thuận nghịch đã được chứng minh và được cho là có liên quan đến sự lưu lại trong nhân (và có hoạt tính) của HDAC 5, enzym đã biết là kìm hãm chương trình di truyền bệnh phì đại (Monovich et al, 2009). Do đó, sự ức chế CRM1 có thể có tác dụng có lợi trong các hội chứng phì đại, bao gồm các dạng suy tim sung huyết và bệnh lý cơ tim phì đại nhất định.

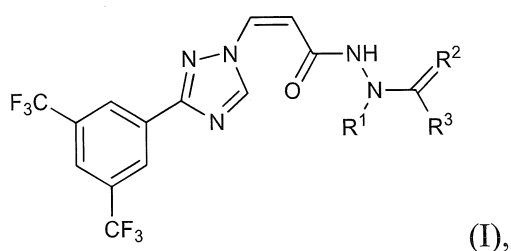
CRM1 cũng đã được biết là có liên quan đến nhiều rối loạn khác. Rối loạn Leber, một rối loạn di truyền đặc trưng bởi sự thoái hóa tế bào hạch thần kinh võng mạc và mất thị lực, có liên quan đến sự không hoạt động của CRM1 (Gupta N 2008). Cũng có bằng chứng cho thấy mối liên quan giữa các rối loạn thoái hóa thần kinh và các bất thường trong vận chuyển ở nhân.

Từ những vấn đề nêu trên, có nhu cầu phát hiện các hợp chất điều biến sự vận chuyển trong nhân.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất, và muối được dụng của chúng, hữu dụng làm chất điều biến vận chuyển trong nhân, được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế để điều trị nhiều loại rối loạn khác nhau. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các chất điều biến vận chuyển trong nhân, và các muối được dụng và/hoặc chế phẩm chứa chúng, tạo ra sự phơi nhiễm in vivo mong muốn như được xác định bằng AUC ở chuột trong khi đó thể hiện mức độ thâm nhập não thấp hơn so với các chất điều biến khác.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức chung (I):



hoặc muối được dụng của nó, trong đó mỗi biến được xác định và mô tả trong bản mô tả.

Các hợp chất theo sáng chế và dược phẩm chứa chúng hữu dụng để điều trị nhiều loại bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý khác nhau, có liên quan đến các đáp ứng tế bào bất thường do sự vận chuyển trong nhân không đúng gây ra. Các bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý này bao gồm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý được mô tả trong bản mô tả.

Các hợp chất theo sáng chế cũng hữu dụng để nghiên cứu sự điều biến vận chuyển trong nhân trong các quá trình sinh học và bệnh học; nghiên cứu các đường truyền tín hiệu nội bào qua trung gian các kinaza; và đánh giá so sánh các chất điều biến vận chuyển trong nhân mới.

Những điều nêu trên sẽ trở nên rõ ràng nhờ phần mô tả cụ thể các phương án làm ví dụ theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là đồ thị thể hiện thể tích khối u trung bình theo thời gian, và thể hiện thể tích trung bình nhóm của các khối u ghép khác loại Z-138 trên chuột được điều trị bằng chất dẫn, 80mg/kg xyclophosphamit, 15mg/kg hợp chất 2 hoặc 7,5mg/kg Hợp chất 2 (các vạch sai số là giá trị trung bình của sai số chuẩn (SEM) cho từng nhóm).

FIG. 2 là đồ thị thể hiện thể tích trung bình của khối u theo thời gian, và thể hiện thể tích trung bình nhóm của các khối u ghép khác loại A549 trên chuột được điều trị bằng chất dẫn, 5mg/kg xisplatin, 10mg/kg hợp chất 2 hoặc 5mg/kg hợp chất 2 (các vạch sai số là giá trị trung bình của sai số chuẩn (SEM) cho từng nhóm).

FIG. 3A là đồ thị thể hiện tổng số điểm viêm khớp theo thời gian, và thể hiện điểm viêm khớp lâm sàng của chuột đực bị viêm khớp BALB/c do kháng thể kháng collagen gây ra được điều trị bằng chất dẫn, dexamethason, 4mg/kg Hợp chất 2 hoặc 7.5mg/kg Hợp chất 2 trong khoảng thời gian quan sát 12-ngày (¥ = nhóm điều trị bằng dexamethason khác đáng kể so với nhóm điều trị bằng chất dẫn; # = 7,5mg/kg nhóm điều trị bằng hợp chất 2 khác đáng kể so với nhóm điều trị bằng chất dẫn; † = 4mg/kg nhóm điều trị bằng hợp chất 2 khác đáng kể so với nhóm điều trị bằng chất dẫn).

FIG. 3B là đồ thị thể hiện độ dày chân sau theo thời gian, và thể hiện độ dày chân sau trung bình nhóm của chuột đực bị viêm khớp BALB/c do kháng thể kháng collagen

gây ra được điều trị bằng chất dẫn, dexamethason, 4mg/kg hợp chất 2 hoặc 7,5mg/kg hợp chất 2 trong khoảng thời gian quan sát 12-ngày (¥ = nhóm điều trị bằng dexamethason khác đáng kể so với nhóm điều trị bằng chất dẫn; # = 7,5mg/kg nhóm điều trị bằng hợp chất 2 khác đáng kể so với nhóm điều trị bằng chất dẫn; † = 4mg/kg nhóm điều trị bằng hợp chất 2 khác đáng kể so với nhóm điều trị bằng chất dẫn).

FIG. 4A là đồ thị thể hiện độ sưng khớp theo thời gian, và thể hiện độ sưng khớp đo được theo thang điểm từ 0 đến 4 ở chuột cống tự nhiên và chuột cống được điều trị theo mô hình CIA, bằng đối chứng dương, hoặc bằng hợp chất 2.

FIG. 4B là đồ thị thể hiện điểm lâm sàng dưới dạng hàm của thời gian, và thể hiện điểm viêm khớp lâm sàng của chuột cống tự nhiên và chuột cống được điều trị theo mô hình CIA, bằng đối chứng dương, hoặc bằng hợp chất 2.

FIG. 5 là hình ảnh đại diện của từng nhóm điều trị theo mô hình CIA, và thể hiện mô bệnh học chân sau của chuột cống tự nhiên và chuột cống được điều trị theo mô hình, bằng đối chứng dương, hoặc bằng hợp chất 2.

FIG. 6A là đồ thị thể hiện độ dày tai theo thời gian, và thể hiện độ dày tai trái trung bình nhóm của chuột BALB/c cái được điều trị bằng chất dẫn, PMA và chất dẫn, PMA và hợp chất 2 hoặc PMA và betamethason.

FIG. 6B là đồ thị thể hiện độ dày tai theo thời gian, và thể hiện độ dày tai phải trung bình nhóm của chuột cái BALB/c được điều trị bằng chất dẫn, PMA và chất dẫn, PMA và hợp chất 2 hoặc PMA và betamethason.

FIG. 6C là đồ thị thể hiện diễn biến của bệnh theo thời gian, và thể hiện diễn biến của bệnh ở tai trái trung bình nhóm của chuột cái BALB/c được điều trị bằng chất dẫn, PMA và chất dẫn, PMA và hợp chất 2 hoặc PMA và betamethason.

FIG. 6D là đồ thị thể hiện diễn biến của bệnh theo thời gian, và thể hiện diễn biến của bệnh ở tai phải trung bình nhóm của chuột cái BALB/c được điều trị bằng chất dẫn, PMA và chất dẫn, PMA và hợp chất 2 hoặc PMA và betamethason.

FIG. 7A là đồ thị thể hiện chỉ số diễn biến của bệnh theo thời gian, và thể hiện diễn biến của bệnh ở chuột đực BALB/c được điều trị bằng chất dẫn, IMQ và chất dẫn, IMQ và 1 μ M hợp chất 2, hoặc IMQ và 10mg/kg xyclophosphamit trước khi dùng IMQ.

FIG. 7B là đồ thị thể hiện chỉ số diễn biến của bệnh theo thời gian, và thể hiện diễn biến của bệnh ở chuột BALB/c đực được điều trị bằng chất dẫn, IMQ và chất dẫn, IMQ và 1 μ M hợp chất 2, hoặc IMQ và 10mg/kg xyclophosphamit sau khi dùng IMQ.

FIG. 8A là đồ thị thể hiện độ tiêu thụ thức ăn tích lũy theo thời gian, và thể hiện độ tiêu thụ thức ăn tích lũy của chuột cống Zucker gầy và chuột cống Zucker béo phì được điều trị bằng chất dẫn (VEH), 1,5mg/kg hợp chất hoặc 3,0mg/kg hợp chất 2.

FIG. 8B là đồ thị thể hiện độ tiêu thụ thức ăn trung bình theo thời gian, và thể hiện độ tiêu thụ thức ăn trung bình của chuột cống Zucker gầy và chuột cống Zucker béo phì được điều trị bằng chất dẫn (VEH), 1,5mg/kg hợp chất hoặc 3,0mg/kg hợp chất 2.

FIG. 9 đồ thị dạng cột mô tả sự thay đổi thể trọng dưới dạng phần trăm theo thời gian, và thể hiện sự thay đổi thể trọng theo phần trăm của chuột cống Zucker gầy và chuột cống Zucker béo phì được điều trị bằng chất dẫn (VEH), 1,5mg/kg hợp chất hoặc 3,0mg/kg hợp chất 2 trong quá trình điều trị (các ngày nghiên cứu 10 và 17) và giá đoạn thanh thải (ngày nghiên cứu 24) của thử nghiệm.

FIG. 10A là đồ thị mức độ tiêu thụ thức ăn tích lũy theo thời gian, và mức độ tiêu thụ thức ăn tích lũy của chuột cống được cho ăn thức ăn bình thường và chuột cống được cho ăn thức ăn giàu béo và được điều trị bằng chất dẫn, 1,5mg/kg hợp chất hoặc 3,0mg/kg hợp chất 2 trong các giai đoạn đường cơ sở, điều trị và thanh thải của nghiên cứu.

FIG. 10B là đồ thị thể trọng trung bình theo thời gian, và thể hiện thể trọng trung bình của chuột cống được cho ăn thức ăn bình thường và chuột cống được cho ăn thức ăn giàu béo và được điều trị bằng chất dẫn, 1,5mg/kg hợp chất hoặc 3,0mg/kg hợp chất 2 trong các giai đoạn đường cơ sở, điều trị và thanh thải của nghiên cứu.

FIG. 11 là đồ thị dạng cột mô tả phần trăm thay đổi thể trọng theo thời gian, và thể hiện phần trăm thay đổi thể trọng của chuột cống được cho ăn thức ăn bình thường và chuột cống được cho ăn thức ăn giàu béo và được điều trị bằng chất dẫn, 1,5mg/kg hợp chất hoặc 3,0mg/kg hợp chất 2.

FIG. 12A là đồ thị thể hiện mức biểu hiện Nrf2 trong các điều kiện khác nhau, bao gồm điều kiện bất hoạt.

FIG. 12B là đồ thị thể hiện mức biểu hiện NQO1 trong các điều kiện khác nhau, bao gồm điều kiện bất hoạt.

FIG. 12C là đồ thị thể hiện mức biểu hiện EPHX1 trong các điều kiện khác nhau, bao gồm điều kiện bất hoạt.

FIG. 13A là đồ thị dạng cột mô tả số lần thay đổi mức biểu hiện ARN thông tin COX-2, và thể hiện rằng hợp chất 1 không ảnh hưởng đến sự phiên mã COX-2. Phép phân tích mức biểu hiện ARN thông tin COX-2 bằng qRT-PCR của tế bào HeLa không được điều trị (đối chứng) được so sánh với các tế bào HeLa được điều trị bằng 10 μ M hợp chất 1, 20 ng/ml TNF α , hoặc 10 μ M hợp chất 1 + 20 ng/ml TNF α .

FIG. 13B là đồ thị cường độ biểu hiện protein COX-2, và thể hiện rằng hợp chất 1 ức chế sự biểu hiện protein COX-2 cảm ứng bằng TNF α .

FIG. 14A là hình ảnh các tế bào được điều trị bằng DMSO, 20 ng/mL TNF α , hoặc hợp chất 1 + 20 ng/mL TNF α , và thể hiện sự định khu của nhiều protein vận chuyển CRM1 liên quan đến viêm khác nhau.

FIG. 14B là hình ảnh các tế bào được điều trị bằng DMSO, 20 ng/mL TNF α , hoặc hợp chất 1 + 20 ng/mL TNF α , và thể hiện sự định khu của I κ B, NF κ B, NRF2, PPAR γ và RXR α .

FIG. 15A là đồ thị thể hiện khả năng đạt mức nền trong thử nghiệm MWM dưới dạng hàm của thời gian, và thể hiện hiệu quả điều trị vờ, điều trị đối chứng, điều trị bằng progesteron và các liều hợp chất 1 thay đổi đến khả năng đạt mức nền của chuột nhắt trong giai đoạn thu thập kết quả của thử nghiệm MWM (dữ liệu biểu thị giá trị trung bình $\pm$ SEM).

FIG. 15B là đồ thị thể hiện nồng độ xytokin, và thể hiện nồng độ của một số xytokin trong huyết tương của chuột cống.

FIG. 15C là ảnh chụp toàn bộ não của các động vật bị thương tổn vờ (nhóm phẫu thuật vờ), CCI + chất dẫn (Đối chứng), hoặc CCI + hợp chất 1 (6mg/kg), và thể hiện kết quả kiểm tra định tính bằng mắt thường toàn bộ não trước khi cắt bằng thiết bị cắt mô tế bào. Việc kiểm tra cho thấy không có (0 trong số 4) động vật nào thuộc nhóm phẫu thuật vờ thể hiện thương tổn ở mô vỏ não trung gian phía sau. Trái ngược hoàn toàn, cả bốn mẫu đối chứng CCI thể hiện thương tổn đối xứng nghiêm trọng giới hạn trong vùng này của vỏ não. Các động vật CCI được cho sử dụng hợp chất 1 thể hiện mức thương tổn từ trung bình đến thấp. Đáng lưu ý, não thể hiện thương tổn nghiêm trọng nhất trong nhóm sử dụng hợp chất 1 không gây ấn tượng bằng tất cả các não trong nhóm đối chứng CCI.

FIG. 15D là ảnh chụp hiển vi có độ phóng đại thấp của nhãn đánh dấu NeuN của vùng vỏ não sau và vùng vỏ não trước của nhóm động vật điều trị bằng giả dược (nhóm phẫu thuật vờ), nhóm điều trị bằng CCI + chất dẫn (đối chứng), và nhóm điều trị bằng CCI + hợp chất 1 (KPT).

FIG. 15E là ảnh chụp hiển vi của nhãn đánh dấu miễn dịch huỳnh quang của IgG và TNF α chuột ở nhóm động vật điều trị vờ (nhóm phẫu thuật vờ), nhóm điều trị bằng CCI + chất dẫn (đối chứng), và nhóm điều trị bằng CCI + hợp chất 1 (KPT).

FIG. 16A là đồ thị thể hiện điểm lâm sàng dưới dạng hàm của thời gian, và thể hiện điểm viêm khớp lâm sàng của chuột cống Lewis cái tự nhiên, chuột cống Lewis cái viêm khớp đối chứng, hoặc chuột cống Lewis cái viêm khớp được điều trị bằng hợp chất 2.

FIG. 16B là đồ thị mức độ sưng khớp dưới dạng hàm của thời gian, và thể hiện mức độ sưng khớp đo được theo thang điểm 0-4 ở chuột cống Lewis cái tự nhiên, chuột cống Lewis cái viêm khớp đối chứng, hoặc chuột cống Lewis cái viêm khớp được điều trị bằng hợp chất 2.

FIG. 17A là đồ thị mật độ khoáng trong xương (bone mineral density - BMD) của xương cổ chân của chuột cống Lewis cái tự nhiên, chuột cống Lewis cái viêm khớp đối chứng, hoặc chuột cống Lewis cái viêm khớp được điều trị bằng hợp chất 2.

FIG. 17B là hình ảnh chụp micro CT ba chiều chân sau của chuột cống Lewis cái tự nhiên, chuột cống Lewis cái viêm khớp đối chứng, hoặc chuột cống Lewis cái viêm khớp được điều trị bằng hợp chất 2.

FIG. 17C là đồ thị thể hiện nồng độ IL-1 β trong hoạt dịch dưới dạng hàm của thời gian, và thể hiện nồng độ IL-1 β trong hoạt dịch thu được từ chuột cống nhóm A (tự nhiên), nhóm B (đối chứng) và nhóm C (hợp chất 2 ở nồng độ 5mg/kg hai ngày một lần) vào ngày 21 và 27 của nghiên cứu CIA số 2.

FIG. 17D là đồ thị thể hiện nồng độ IL-6 trong hoạt dịch dưới dạng hàm của thời gian, và thể hiện nồng độ IL-6 trong hoạt dịch thu được từ chuột cống thuộc nhóm A (tự nhiên), nhóm B (đối chứng) và nhóm C (hợp chất 2 ở nồng độ 5mg/kg hai ngày một lần) vào các ngày 21 và 27 của nghiên cứu CIA số 2.

FIG. 17E là đồ thị thể hiện nồng độ MCP-1 trong hoạt dịch dưới dạng hàm của thời gian, và thể hiện nồng độ MCP-1 trong hoạt dịch thu được từ chuột cống thuộc

nhóm A (tự nhiên), nhóm B (đối chứng) và nhóm C (hợp chất 2 với nồng độ 5mg/kg hai ngày một lần) vào các ngày 21 và 27 của nghiên cứu CIA số 2.

FIG. 17F là đồ thị thể hiện nồng độ CRP trong hoạt dịch dưới dạng hàm của thời gian, và thể hiện nồng độ CRP trong hoạt dịch thu được từ chuột cống thuộc nhóm A (tự nhiên), nhóm B (đối chứng) và nhóm C (hợp chất 2 với nồng độ 5mg/kg hai ngày một lần) vào các ngày 21 và 27 của nghiên cứu CIA số 2.

FIG. 17G là đồ thị thể hiện nồng độ IL-1 β trong huyết thanh dưới dạng hàm của thời gian, và thể hiện nồng độ IL-1 β trong các mẫu huyết thanh chuột thu được từ chuột cống thuộc nhóm A (tự nhiên), nhóm B (đối chứng) và nhóm C (hợp chất 2 với nồng độ 5mg/kg hai ngày một lần) vào các ngày 15, 21 và 27 của nghiên cứu CIA số 2.

FIG. 18A là giản đồ mô tả mô hình chuột EAE được cảm ứng bằng MOG ở chuột nhắt cái được mô tả trong bản mô tả.

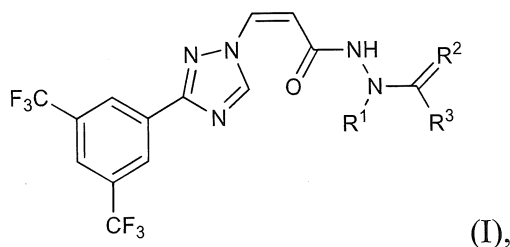
FIG. 18B là đồ thị điểm lâm sàng dưới dạng hàm của ngày thử nghiệm, và thể hiện hiệu quả điều trị bằng chất dẫn, điều trị bằng dexamethason và điều trị bằng hợp chất 1 đến điểm lâm sàng của chuột nhắt cái trong mô hình chuột EAE được cảm ứng bằng MOG được mô tả trong bản mô tả.

FIG. 19 ảnh chụp các vết thương được điều trị khu trú hoặc hệ thống bằng hợp chất 1 hoặc chất dẫn thích hợp của nó, và thể hiện kết quả đánh giá hình thái vết thương được thực hiện vào ngày thứ 5 sau khi bị thương.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các hợp chất theo sáng chế

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I):



hoặc muối được dụng của nó, trong đó:

R¹ được chọn từ hydro và C₁-C₄ alkyl;

R² được chọn từ O và S; và

R^3 được chọn từ $-N(R^4)-(C_3-C_6 \text{ xycloalkyl})$, $-C_1-C_6 \text{ alkyl}$, $-(C_0-C_4 \text{ alkylen})$ -heteroxyclyl, và $-(C_0-C_4 \text{ alkylen})$ -heteroaryl, trong đó phần alkyl, alkylen, heteroxyclyl, hoặc heteroaryl bất kỳ của R^3 tùy ý và độc lập được thế; và

R^4 được chọn từ hydro và $C_1-C_4 \text{ alkyl}$.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ nhất, R^1 được chọn từ hydro và metyl. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ nhất, R^1 là hydro. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ nhất, R^2 là O. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai của phương án này.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ nhất, R^2 là S. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ ba của phương án này.

Theo khía cạnh thứ năm của phương án thứ nhất, R^4 là hydro.

Theo khía cạnh thứ sáu của phương án thứ nhất, R^3 được chọn từ $-N(R^4)-(C_3-C_6 \text{ xycloalkyl})$, $-C_3-C_6 \text{ alkyl}$, $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})$ -heteroxyclyl, và $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})$ -heteroaryl, trong đó phần alkyl hoặc alkylen bất kỳ của R^3 tùy ý được thế bằng $-N(R^5)_2$, trong đó mỗi R^5 độc lập được chọn từ hydro và $C_1-C_4 \text{ alkyl}$; phần heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 bao gồm ít nhất một nguyên tử nitơ trong vòng; và phần heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 tùy ý được thế bằng $C_1-C_4 \text{ alkyl}$. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ năm của phương án này.

Theo khía cạnh thứ bảy của phương án thứ nhất, R^3 được chọn từ $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH\text{-xyclopropyl}$, $-(CH_2)_{0-1}\text{-pyrazinyl}$, piperidinyl, hydroxypiperidinyl, N-methylpiperidinyl, $-CH_2\text{-morpholin-4-yl}$, và metylpyrazolyl. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ sáu của phương án này.

Theo khía cạnh thứ tám của phương án thứ nhất, R^3 được chọn từ $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH\text{-xyclopropyl}$, $-(CH_2)_{0-1}\text{-pyrazin-2-yl}$, piperidin-3-yl, $-CH_2\text{-morpholin-4-yl}$, và 5-metyl-1-H-pyrazol-4-yl. Các biến còn lại như được mô tả

trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ năm của phương án này.

Theo khía cạnh thứ chín của phương án thứ nhất, R^3 được chọn từ $-C(CH_3)_3$, $-NH$ -xyclopropyl, $-CH_2$ -pyrazin-2-yl, $-pyrazin-2-yl$, $-CH_2$ -morpholin-4-yl, và 5-metyl-1-H-pyrazol-4-yl. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ năm của phương án này.

Theo phương án thứ hai, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^3 được chọn từ $-N(R^4)-(C_3-C_6 \text{ xycloalkyl})$, $-C_3-C_6 \text{ alkyl}$, $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})$ -heteroxyclyl, và $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})$ -heteroaryl, trong đó: phần alkyl hoặc alkylen bất kỳ của R^3 tùy ý được thế bằng $-N(R^5)_2$, trong đó mỗi R^5 độc lập được chọn từ hydro và $C_1-C_4 \text{ alkyl}$;

phần heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 chứa ít nhất một nguyên tử nitơ trong vòng; và

phần heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 tùy ý được thế bằng $C_1-C_4 \text{ alkyl}$.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ hai, R^3 được chọn từ $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH$ -xyclopropyl, $-(CH_2)_{0-1}$ -pyrazinyl, piperidinyl, hydroxypiperidinyl, N-metylpiperidinyl, $-CH_2$ -morpholin-4-yl, và metylpyrazolyl.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ hai, R^3 được chọn từ $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH$ -xyclopropyl, $-(CH_2)_{0-1}$ -pyrazin-2-yl, piperidin-3-yl, $-CH_2$ -morpholin-4-yl, và 5-metyl-1-H-pyrazol-4-yl.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ hai, R^3 được chọn từ $-C(CH_3)_3$, $-NH$ -xyclopropyl, $-CH_2$ -pyrazin-2-yl, $-pyrazin-2-yl$, $-CH_2$ -morpholin-4-yl, và 5-metyl-1-H-pyrazol-4-yl.

Theo phương án thứ ba, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^3 được chọn từ $-N(R^4)-(C_3-C_6 \text{ xycloalkyl})$, $-C_3-C_6 \text{ alkyl}$, $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})$ -heteroxyclyl, và $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})$ -heteroaryl, trong đó:

phần alkyl hoặc alkylen bất kỳ của R^3 bất kỳ tùy ý và độc lập được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm gồm oxo và $-N(R^5)_2$, trong đó mỗi R^5 độc lập được chọn từ hydro và $C_1-C_4 \text{ alkyl}$;

phần heterocyclyl bất kỳ của R^3 bao gồm ít nhất một nguyên tử nitơ trong vòng, và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phân tử thế được chọn từ nhóm gồm C_1 - C_4 alkyl và oxo; và

phần heteroaryl bất kỳ của R^3 bao gồm ít nhất một nguyên tử nitơ trong vòng và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều C_1 - C_4 alkyl. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ năm của phương án thứ nhất này.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ ba, R^3 là $-(C_0$ - C_1 alkylen)-heterocyclyl. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ năm của phương án thứ nhất này.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ ba, R^3 là $-(C_0$ - C_1 alkylen)-heterocyclyl, trong đó heterocyclyl được chọn từ pyrazinyl, piperidinyl, morpholinyl, và pyrazolyl. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ năm của phương án thứ nhất này.

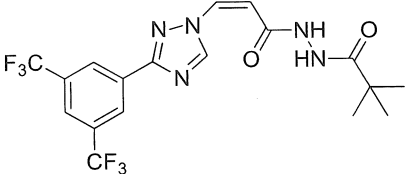
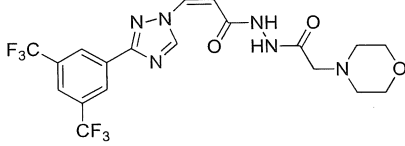
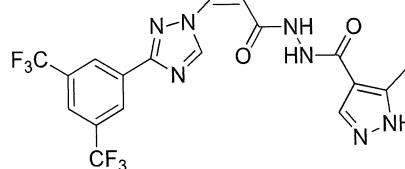
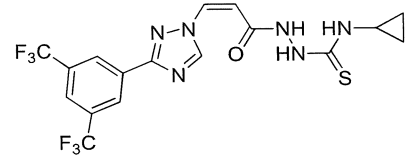
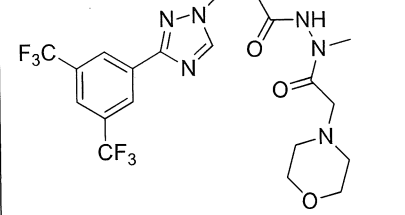
Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ ba, R^3 là $-(C_0$ - C_1 alkylen)-heterocyclyl, trong đó heterocyclyl là morpholinyl. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ năm của phương án thứ nhất này.

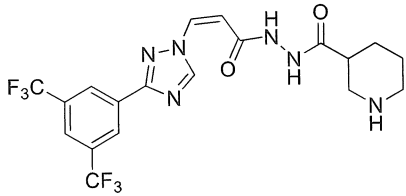
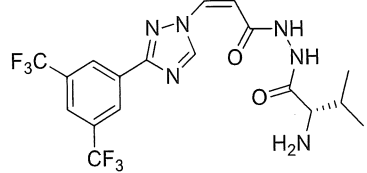
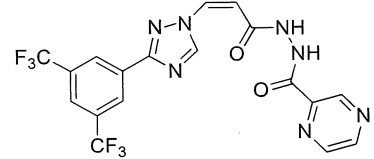
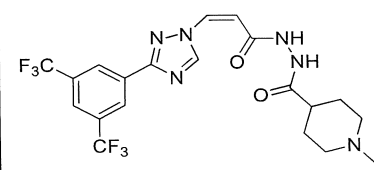
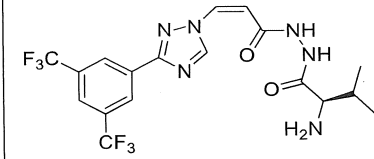
Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ ba, R^3 là $-(C_1$ alkylen)-heterocyclyl. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ năm của phương án thứ nhất này.

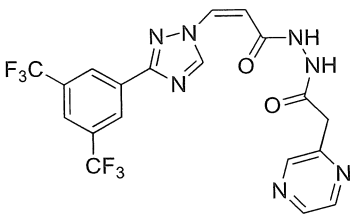
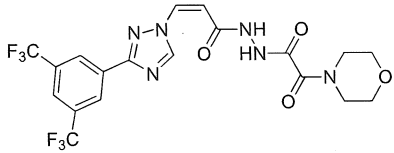
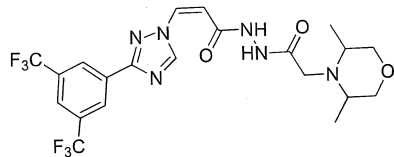
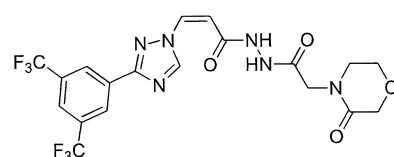
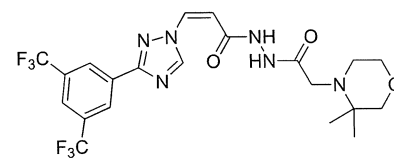
Theo khía cạnh thứ năm của phương án thứ ba, R^3 là $-(C_1$ alkylen)-morpholinyl. Các biến còn lại như được mô tả trong phương án thứ nhất, hoặc các khía cạnh từ thứ nhất đến thứ năm của phương án thứ nhất này.

Các hợp chất có công thức (I) làm ví dụ được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Các hợp chất có công thức (I) làm ví dụ

Hợp chất số	Công thức cấu trúc của hợp chất	Dữ liệu vật lý (^1H NMR và LCMS ($\text{M}+\text{H}^+$))
1		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,35 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,48-7,50 (d, J =8 Hz, 1H), 6,00-6,03 (d, J =12 Hz, 1H), 1,15 (s, 9H), LCMS theo tính toán: 450,36, phát hiện: 450,19 (thời gian lưu 2,89 phút, độ tinh khiết: 94,5%),
2		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,56 (s, 1H), 9,94 (s, 1H), 9,61 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,28 (s, 2H), 7,48-7,51 (d, J =10,8 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J =10,4 Hz, 1H), 3,60-3,62 (t, 4H), 3,08 (s, 2H), LCMS theo tính toán: 493,38, phát hiện: 493,24 (thời gian lưu 2,29 phút, độ tinh khiết: 99,48%)
3		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 13,01 (bs, 1H), 10,47 (bs, 1H), 10,03 (s, 1H), 9,70 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,97 (bs, 1H), 7,51-7,54 (d, J =10,8 Hz, 1H), 6,06-6,08 (d, J =10,4 Hz, 1H), 2,41 (s, 3H), LCMS theo tính toán: 474,34, phát hiện: 474,14 (thời gian lưu 2,51 phút, độ tinh khiết: 99,88%)
4		^1H NMR (400 MHz, MeOD, ppm) δ = 9,67 (s, 1H), 8,66 (s, 2H), 8,09 (s, 1H), 7,44-7,47 (d, J =10,8 Hz, 1H), 6,02 (m, 1H), 4,64 (s, 1H), 3,33 (m, 1H), 2,88 (m, 1H), 0,91 (m, 2H), 0,79 (m, 2H), LCMS theo tính toán for: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_6\text{OS}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 465,40, phát hiện: 465,19 (thời gian lưu 2,78 phút, độ tinh khiết: 99,63%)
5		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ = 10,36 (s, 1H), 9,10 (s, 1H), 8,53 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,32-7,34 (d, J =10,0 Hz, 1H), 6,05-6,07 (d, J =10,0 Hz, 1H), 3,56 (s, 4H), 3,10 (s, 3H), 3,05 (s, 2H), 2,51 (s, 4H), LCMS theo tính toán for: $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 507,41, phát hiện: 507,24 (thời gian lưu 2,40 phút, độ tinh khiết: 99,61%)

6		^1H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 9,73 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,41-7,44 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 5,98-6,00 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 2,91 (d, 1H), 2,81 (d, 1H), 2,34-2,58 (m, 4H), 1,77 (m, 1H), 1,54 (m, 2H), 1,34 (m, 1H), 1,23 (s, 2H), LCMS theo tính toán: 477,38, phát hiện: 477,24 (thời gian lưu 2,38 phút, độ tinh khiết: 95,46%),
7		^1H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 10,88 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,31 (s, 1H), 8,24 (s, 2H), 7,53-7,56 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 6,06-6,09 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 3,69 (s, 1H), 2,13 (m, 1H), 1,01 (d, 6H), LCMS theo tính toán: 465,37, phát hiện: 465,24 (thời gian lưu 2,45 phút, độ tinh khiết: 95,19%)
8		^1H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 10,95 (s, 1H), 10,82 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 9,22 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,56-7,53 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 6,10-6,08 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), LCMS theo tính toán: 472,32, phát hiện: 472,14 (thời gian lưu 2,68 phút, độ tinh khiết: 93,5%)
9		^1H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 10,61 (s, 1H), 10,26 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,52-7,49 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 6,02-6,05 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 3,38 (m, 3H), 2,91 (m, 2H), 2,70 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,76 (m, 2H), LCMS theo tính toán: 491,41, phát hiện: 491,24 (thời gian lưu 2,28 phút, độ tinh khiết: 99,97%)
10		^1H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 10,88 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,31 (s, 1H), 8,24 (s, 2H), 7,53-7,56 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 6,06-6,09 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 3,69 (s, 1H), 2,13 (m, 1H), 1,01 (d, 6H), LCMS theo tính toán: 465,37, phát hiện: 465,24 (thời gian lưu 2,45 phút, độ tinh khiết: 95,19%)

11		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 10,69 (s, 1H), 10,54 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,58 (m, 2H), 8,56 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, <i>J</i> =10,8 Hz, 1H), 6,01-6,04 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 3,84 (s, 2H), LCMS theo tính toán: 486,35, phát hiện: 486,29 (thời gian lưu 2,49 phút, độ tinh khiết: 99,96%)
12		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10,70-10,88 (m, 2H), 9,56 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,52-7,55 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 6,0-6,03 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 3,51-3,64 (m, 8H), LCMS <i>m/z</i> 507,25 [M+H] ⁺ , <i>t</i> _R = 2,012 phút
13		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10,58 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,54-8,56 (m, 2H), 8,25-8,30 (m, 1H), 7,49-7,51 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 6,01-6,04 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 3,44-3,57 (m, 2H), 3,28-3,34 (m, 2H), 3,21 (s, 1H), 3,15 (s, 1H), 2,84-2,88 (m, 2H), 0,93-1,04 (m, 6H): LCMS <i>m/z</i> 521,18 [M+H] ⁺ , <i>t</i> _R 1,898 phút
14		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10,33 (bs, 2H), 9,63 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,50-7,52 (d, <i>J</i> = 8 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, <i>J</i> = 8 Hz, 1H), 4,08-4,12 (m, 4H), 3,85-3,87 (m, 2H), 3,41-3,44 (m, 2H), LCMS <i>m/z</i> 507,13 [M+H] ⁺ , <i>t</i> _R 1,950 phút
15		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10,55 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 3,65-3,67 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 2H), 3,08 (bs, 2H), 2,55-2,58 (m, 2H), 0,96 (s, 6H), LCMS <i>m/z</i> 521,18 [M+H] ⁺ , <i>t</i> _R 1,937 phút

Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế được chọn từ hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất từ 1 đến 11. Theo một khía cạnh của các phương án này, hợp chất được chọn từ hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất 1, 2, 3, 4, 8 và 11.

Dược động học (Pharmacokinetics - PK) đóng vai trò ngày càng quan trọng trong khám phá và phát triển thuốc. Dược động học là nghiên cứu định lượng khóa thời gian

của sự hấp thụ, phân phối, chuyển hóa và/hoặc bài tiết thuốc. Khi thuốc được sử dụng, nó phân phối nhanh chóng từ vị trí sử dụng vào hệ tuần hoàn máu. Một số đo phạm vi phân phối của tác nhân trị liệu là diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết tương theo thời gian (area under the plasma concentration-time curve - AUC), được tính theo nồng độ cuối đo được (AUC_t) và ngoại suy đến vô cùng (AUC_{inf}). Do đó, AUC thường được sử dụng làm thước đo định lượng độ phơi nhiễm với thuốc.

Nói chung, độ phơi nhiễm với tác nhân trị liệu cao hơn, thì hiệu quả của tác nhân sẽ cao hơn. Tuy nhiên, độ phơi nhiễm với tác nhân trị liệu cao có thể có những tác dụng có hại đến các mô nhất định như não. Trong khi hàng rào máu-não (blood-brain barrier - BBB), một mạng lưới bảo vệ bao gồm kết cấu chặt chẽ giữa các tế bào nội mạc, hạn chế sự khuếch tán của các phân tử ưa nước và/hoặc các phân tử lớn, thuốc với AUC cao vẫn có thể thâm nhập BBB và/hoặc dịch não tủy. Sự thâm nhập này thường không mong muốn và có thể dẫn đến các tác dụng phụ không mong muốn. Các nỗ lực khám phá thuốc mới gần đây hướng sự quan tâm đến, một phần, độ cân bằng giữa độ phơi nhiễm thuốc tối đa (tức là AUC) trong khi tối thiểu hóa sự thâm nhập não.

Tỷ lệ não so với huyết tương (B:P) là dùng để định lượng sự phân bố tương đối tác nhân điều trị trong mô não so với trong hệ tuần hoàn. Tỷ lệ này là chỉ thị độ thâm nhập não của tác nhân điều trị đã cho. Tỷ lệ não so với huyết tương cao được ưu tiên khi hướng đến các bệnh khu trú trong hệ thần kinh trung ương (central nervous system - CNS), bao gồm các bệnh trong não và dịch não tủy. Tuy nhiên, tỷ lệ não so với huyết tương thấp hơn thường được ưu tiên với các tác nhân điều trị không hướng đến CNS để giảm độ thâm nhập não để tránh các tác dụng phụ tiềm tàng. Do đó, tỷ lệ não so với huyết tương thấp được ưu tiên để tránh sự tích tụ không mong muốn của tác nhân điều trị trong mô não và mô CNS.

Như được thể hiện chi tiết hơn trong phần ví dụ thực hiện sáng chế, các hợp chất theo sáng chế thể hiện AUC cao hơn và/hoặc tỷ lệ B:P thấp hơn so với các chất ức chế vận chuyển trong nhân khác, như các chất được bộc lộ trong đơn Mỹ số 13/041,377 của cùng chủ đơn, nộp ngày 05/03/2011 và công bố đơn US 2009/0275607 vào ngày 10/11/2011. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I), trong đó hợp chất này có $<1\mu\text{M}$ (nhỏ hơn $1\mu\text{M}$) hoạt tính xuất ra ngoài nhân, AUC_{inf}

lớn hơn khoảng 3500; và tỷ lệ B:P nhỏ hơn khoảng 2.5 khi cho chuột nhất dùng liều 10mg/kg po.

Các dấu hiệu kỹ thuật mới theo sáng chế sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này khi nghiên cứu phần mô tả chi tiết sáng chế sau đây. Tuy nhiên, cần hiểu rằng phần mô tả chi tiết sáng chế và các ví dụ cụ thể được đưa ra, khi chỉ rõ các phương án nhất định theo sáng chế, chỉ nhằm mục đích minh họa vì các thay đổi và cải biến trong tinh thần và phạm vi của sáng chế cũng đã rõ ràng với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực từ phần mô tả chi tiết và các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

Hợp chất và định nghĩa

Các hợp chất theo sáng chế bao gồm các hợp chất được mô tả chung trên đây, và được minh học tiếp bằng các lớp, phân lớp, và loại bậc lộ trong bản mô tả. Như được sử dụng trong bản mô tả, các định nghĩa sau sẽ được áp dụng trừ khi được chỉ định khác. Theo mục đích của sáng chế, các nguyên tố hóa học được xác định theo Bảng tuần hoàn các nguyên tố, phiên bản CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. Additionally, các quy tắc chung của hóa học hữu cơ được mô tả trong “Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, và “March’s Advanced Organic Chemistry”, 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp bằng cách viện dẫn.

Trừ khi được chỉ định khác trong bản mô tả, dạng pháp được sử dụng trong bản mô tả thường tuân theo các ví dụ và quy tắc đưa ra trong tài liệu Nomenclature of Organic Chemistry, mục A, B, C, D, E, F, và H, Pergamon Press, Oxford, 1979, được kết hợp bằng cách viện dẫn tên cấu trúc hóa học làm ví dụ và quy tắc đặt tên cấu trúc hóa học trong tài liệu này. Tùy ý, tên hợp chất có thể được đặt bằng chương trình đặt tên hóa học: ACD/ChemSketch, Version 5.09/September 2001, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada.

Các hợp chất theo sáng chế có thể có tâm bất đối, trục không đối xứng, và mặt phẳng không đối xứng (ví dụ, như được mô tả trong tài liệu: E. L. Eliel and S. Wilen, Stereo-chemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, New York, 1994, pages 1119-1190), và có thể là các racemat, hỗn hợp racemic, và chất đồng phân

không đối quang hoặc chất đồng phân đối ảnh riêng rẽ, với tất cả các chất đồng phân có thể có và hỗn hợp của chúng, bao gồm chất đồng phân quang học, cũn bao gồm trong sáng chế.

Thuật ngữ “halo” hoặc “halogen” như được sử dụng trong bản mô tả chỉ halogen và bao gồm, ví dụ, và nhưng không chỉ giới hạn ở, flo, clo, brom, iot và các chất tương tự, ở cả dạng phóng xạ và dạng không phóng xạ.

Thuật ngữ “alkyl” như được sử dụng trong bản mô tả, trừ khi được chỉ định khác, chỉ các gốc hydrocacbon hóa trị một mạch thẳng hoặc mạch nhánh, thường là C_1 - C_{12} , tốt hơn là C_1 - C_6 . Chẳng hạn, “ C_1 - C_6 alkyl” chỉ gốc hydrocacbon hóa trị một mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6). Ví dụ về các nhóm alkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metyl, etyl, propyl, isopropyl, và t-butyl.

Cần hiểu rằng các phần tử thể và mô hình thể trên hợp chất theo sáng chế có thể được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để tạo ra các hợp chất ổn định về mặt hóa học và có thể dễ dàng được tổng hợp bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực, cũng như các phương pháp đưa ra dưới đây. Nói chung, thuật ngữ “được thế” khi đngs sau thuật ngữ “tùy ý” hoặc không, có nghĩa là một hoặc nhiều hydro của gốc xác định được thay thế bằng phần tử thể thích hợp. Trừ khi được chỉ định khác, “nhóm tùy ý được thế” có thể có phần tử thể thích hợp ở từng vị trí thể được của nhóm, khi có nhiều hơn một vị trí trong cấu trúc bất kỳ đã cho được thế bằng nhiều hơn một phần tử thể được chọn từ các nhóm xác định, phần tử thể có thể cùng loại hoặc khác loại ở từng vị trí. Theo cách khác, “nhóm tùy ý được thế” có thể không được thế.

Các tổ hợp phần tử thể theo sáng chế tốt hơn là tạo ra các hợp chất bền hoặc khả dụng về mặt hóa học. Nếu bản thân phần tử thể được thế bằng nhiều hơn một nhóm, cần hiểu rằng các nhóm này có thể trên cùng một nguyên tử cacbon hoặc trên các nguyên tử cacbon khác nhau, miễn là tạo ra cấu trúc bền. Thuật ngữ “bền” như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ hợp chất gần như không thay đổi khi đưa vào các điều kiện cho phép sản xuất, phát hiện, và, theo các phương án nhất định, thu hồi, tinh chế, và sử dụng chúng cho một hoặc nhiều mục đích bộc lộ trong bản mô tả.

Các phần tử thể hóa trị một thích hợp trên nguyên tử cacbon có thể thế được của “nhóm tùy ý được thế” độc lập là halogen; $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$; $-O(CH_2)_{0-4}R^\circ$,

$-\text{O}-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{CH}(\text{OR}^\circ)_2$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SR}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{Ph}$, mà có thể được thế bằng R° ; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ có thể được thế bằng R° ; $-\text{CH}=\text{CHPh}$, có thể được thế bằng R° ; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{-pyridyl}$ mà có thể được thế bằng R° ; $-\text{NO}_2$; $-\text{CN}$; $-\text{N}_3$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{S})\text{R}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{S})\text{NR}^\circ_2$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{S})\text{R}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{SR}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OSiR}^\circ_3$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{OC}(\text{O})(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SR}^\circ$; $\text{SC}(\text{S})\text{SR}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SC}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$; $-\text{C}(\text{S})\text{NR}^\circ_2$; $-\text{C}(\text{S})\text{SR}^\circ$; $-\text{SC}(\text{S})\text{SR}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$; $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{OR}^\circ)\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{NOR}^\circ)\text{R}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SSR}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{S}(\text{O})_2\text{OR}^\circ$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\circ_2$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{S}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\circ_2$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; $-\text{N}(\text{OR}^\circ)\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{NH})\text{NR}^\circ_2$; $-\text{P}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; $-\text{P}(\text{O})\text{R}^\circ_2$; $-\text{OP}(\text{O})\text{R}^\circ_2$; $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^\circ)_2$; SiR°_3 ; $-(\text{C}_{1-4}\text{ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh})\text{O}-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; hoặc $-(\text{C}_{1-4}\text{ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh})\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$, trong đó mỗi R° có thể được thế như xác định dưới đây và độc lập là hydro, C_{1-6} béo, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$, $-\text{CH}_2$ -(vòng heteroaryl 5-6 cạnh), hoặc vòng no 5-6 cạnh, không no một phần, hoặc vòng aryl có 0-4 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nitơ, oxy, và lưu huỳnh, hoặc, bất kể xác định trên đây, hai R° độc lập, cùng với (các) nguyên tử xen kẽ chúng, tạo ra vòng no 3-12 cạnh, không no một phần, hoặc vòng đơn aryl hoặc vòng đôi có 0-4 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nitơ, oxy, và lưu huỳnh, có thể được thế như xác định dưới đây.

Các phần tử thế hóa trị một thích hợp trên R° (hoặc vòng được tạo ra từ hai R° độc lập cùng với các nguyên tử xen kẽ chúng), độc lập là halogen, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{R}^\bullet$, $-(\text{haloR}^\bullet)$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{OR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{CH}(\text{OR}^\bullet)_2$; $-\text{O}(\text{haloR}^\bullet)$, $-\text{CN}$, $-\text{N}_3$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{R}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{SR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{SH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NHR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NR}^\bullet_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SiR}^\bullet_3$, $-\text{OSiR}^\bullet_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{SR}^\bullet$, $-(\text{C}_{1-4}\text{ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh})\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, hoặc $-\text{SSR}^\bullet$ trong đó mỗi $\text{R}^\bullet$ không được thế hoặc nếu đứng sau “halo” chỉ được thế bằng một hoặc nhiều halogen, và độc lập được chọn từ C_{1-4} béo, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$, hoặc vòng 5-6 cạnh no, không no một phần, hoặc vòng aryl có 0-4 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ

nitơ, oxy, và lưu huỳnh. Các phần tử thể hóa trị hai thích hợp trên nguyên tử cacbon no của R° bao gồm $=O$ và $=S$.

Các phần tử thể hóa trị hai thích hợp trên nguyên tử cacbon no của “nhóm tùy ý được thể” bao gồm: $=O$, $=S$, $=NNR^*$, $=NNHC(O)R^*$, $=NNHC(O)OR^*$, $=NNHS(O)_2R^*$, $=NR^*$, $=NOR^*$, $-O(C(R^*_2))_{2-3}O-$, và $-S(C(R^*_2))_{2-3}S-$, trong đó mỗi R^* độc lập được chọn từ hydro, C_{1-6} béo mà có thể được thể như xác định dưới đây, hoặc vòng 5–6 cạnh no không được thể, không no một phần, hoặc vòng aryl có 0–4 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nitơ, oxy, và lưu huỳnh. Các phần tử thể hóa trị hai thích hợp mà có thể liên kết với các cacbon lân cận thể được của “nhóm tùy ý được thể” bao gồm: $-O(CR^*_2)_{2-3}O-$, trong đó mỗi R^* độc lập được chọn từ hydro, C_{1-6} béo mà có thể được thể như xác định dưới đây, hoặc vòng 5–6 cạnh no không được thể, không no một phần, hoặc vòng aryl có 0–4 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nitơ, oxy, và lưu huỳnh.

Các phần tử thể thích hợp trên nhóm béo của $R^\bullet$ bao gồm halogen, $-R^\bullet$, $-(haloR^\bullet)$, $-OH$, $-OR^\bullet$, $-O(haloR^\bullet)$, $-CN$, $-C(O)OH$, $-C(O)OR^\bullet$, $-NH_2$, $-NHR^\bullet$, $-NR^\bullet_2$, và $-NO_2$, trong đó mỗi $R^\bullet$ không được thể hoặc khi đứng sau “halo” chỉ được thể bằng một hoặc nhiều halogen, và độc lập là C_{1-4} béo, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, hoặc vòng 5–6 cạnh no, không no một phần, hoặc vòng aryl có 0–4 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nitơ, oxy, và lưu huỳnh.

Các phần tử thể thích hợp trên nitơ thể được của “nhóm tùy ý được thể” bao gồm $-R^\dagger$, $-NR^\dagger_2$, $-C(O)R^\dagger$, $-C(O)OR^\dagger$, $-C(O)C(O)R^\dagger$, $-C(O)CH_2C(O)R^\dagger$, $-S(O)_2R^\dagger$, $-S(O)_2NR^\dagger_2$, $-C(S)NR^\dagger_2$, $-C(NH)NR^\dagger_2$, và $-N(R^\dagger)S(O)_2R^\dagger$; trong đó mỗi $R^\dagger$ độc lập là hydro, C_{1-6} béo mà có thể được thể như xác định dưới đây, $-OPh$ không được thể, hoặc vòng 5–6 cạnh no không được thể, không no một phần, hoặc vòng aryl có 0–4 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nitơ, oxy, và lưu huỳnh, hoặc, bất kể xác định trên đây, hai $R^\dagger$ độc lập, cùng với (các) nguyên tử xen kẽ chúng tạo thành vòng 3–12 cạnh no không được thể, không no một phần, hoặc vòng đơn hoặc vòng đôi aryl có 0–4 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nitơ, oxy, và lưu huỳnh.

Các phần tử thể thích hợp trên nhóm béo của $R^\dagger$ độc lập là halogen, $-R^\bullet$, $-(haloR^\bullet)$, $-OH$, $-OR^\bullet$, $-O(haloR^\bullet)$, $-CN$, $-C(O)OH$, $-C(O)OR^\bullet$, $-NH_2$, $-NHR^\bullet$, $-NR^\bullet_2$, hoặc $-NO_2$, trong đó mỗi $R^\bullet$ không được thể hoặc nếu đứng sau “halo” chỉ được thể bằng một hoặc nhiều halogen, và độc lập là C_{1-4} béo, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, hoặc

vòng 5–6–cạnh no, không no một phần, hoặc vòng aryl có 0–4 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nitơ, oxy, và lưu huỳnh.

Các phần tử thế được ưu tiên trên heteroaryl có thể được chọn từ nhóm gồm -OH, -SH, nitro, halogen, amino, xyano, C₁-C₁₂ alkyl, C₂-C₁₂ alkenyl, C₂-C₁₂ alkynyl, C₁-C₁₂ alkoxy, C₁-C₁₂ haloalkyl, C₁-C₁₂ haloalkoxy và C₁-C₁₂ alkyl sulfanyl. Các phần tử thế được ưu tiên trên alkyl, alkylen và heteroxyclyl bao gồm các phần tử thế được ưu tiên trên heteroaryl và oxo. Theo một phương án, phần tử thế trên alkyl, alkylen, heteroxyclyl hoặc heteroaryl là nhóm amino có công thức -N(R⁵)₂, trong đó mỗi R⁵ độc lập được chọn từ hydro và C₁-C₄ alkyl.

Các phần tử thế trên alkyl, alkylen, heteroxyclyl và heteroaryl có thể được chọn từ -OH, -SH, nitro, halogen, amino, xyano, C₁-C₁₂ alkyl, C₂-C₁₂ alkenyl, nhóm C₂-C₁₂ alkynyl, C₁-C₁₂ alkoxy, C₁-C₁₂ haloalkyl, C₁-C₁₂ haloalkoxy và C₁-C₁₂ alkyl sulfanyl. Theo một phương án, phần tử thế là nhóm amino có công thức -N(R⁵)₂, trong đó mỗi R⁵ độc lập được chọn từ hydro và C₁-C₄ alkyl.

Thuật ngữ "xycloalkyl", như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ hydrocacbon vòng no, tức là các hợp chất trong đó tất cả các nguyên tử trong vòng đều là cacbon. Ví dụ về xycloalkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, và xycloheptyl. Theo một số phương án, xycloalkyl có thể tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ -OH, -SH, halogen, amino, nitro, xyano, C₁-C₁₂ alkyl, C₂-C₁₂ alkenyl hoặc nhóm C₂-C₁₂ alkynyl, C₁-C₁₂ alkoxy, C₁-C₁₂ haloalkyl, và C₁-C₁₂ haloalkoxy.

Thuật ngữ "heteroaryl", như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ các nhóm thơm chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại (O, S, hoặc N). Nhóm heteroaryl có thể là một vòng hoặc nhiều vòng, ví dụ vòng heteroaryl một vòng ngưng tụ với một hoặc nhiều nhóm vòng cacbon thơm hoặc các nhóm heteroaryl một vòng khác. Các nhóm heteroaryl theo sáng chế cũng có thể bao gồm các hệ vòng được thế bằng một hoặc nhiều gốc oxo. Ví dụ về các nhóm heteroaryl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, pyridinyl, pyridazinyl, imidazolyl, pyrimidinyl, pyrazolyl, triazolyl, pyrazinyl, quinolyl, isoquinolyl, tetrazolyl, furyl, thienyl, isoxazolyl, thiazolyl, oxazolyl, isothiazolyl, pyrrolyl, quinolinyl, isoquinolinyl, indolyl, benzimidazolyl, benzofuranyl, cinnolinyl, indazolyl, indolizinyl, phthalazinyl, pyridazinyl, triazinyl, isoindolyl, purinyl, oxadiazolyl, thiazolyl, thiadiazolyl, furazanyl, benzofurazanyl,

benzothiophenyl, benzotriazolyl, benzothiazolyl, benzoxazolyl, quinazolinyl, quinoxalinyl, naphthyridinyl, dihydroquinolyl, tetrahydroquinolyl, dihydroisoquinolyl, tetrahydroisoquinolyl, benzofuryl, furopyridinyl, pyrolopyrimidinyl, và azaindolyl.

Các nhóm heteroaryl nêu trên có thể có gắn C hoặc N (nếu được). Chẳng hạn, nhóm thu được từ pyrol có thể là pyrol-1-yl (gắn N) hoặc pyrol-3-yl (gắn C).

“Heteroxyclyl” chỉ vòng 4-13 cạnh no hoặc không no béo chứa 1, 2, 3, 4 hoặc 5 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ N, O hoặc S. Khi một nguyên tử khác loại là S, nó có thể tùy ý có thêm 1 hoặc 2 oxy (tức là -S(O)- hoặc -S(O)₂-). Heteroxyclyl có thể là một vòng, hai vòng ngưng tụ, hai vòng có cầu nối, hai vòng xoắn hoặc nhiều vòng.

“Oxo” chỉ =O.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “alkenyl” chỉ hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh không đóng vòng no có 2 đến 12 nguyên tử cacbon và có ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon. Các nhóm alkenyl có thể tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “alkynyl” chỉ hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh không đóng vòng no có 2 đến 12 nguyên tử cacbon và có ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon. Các nhóm alkynyl có thể tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “alkylen” chỉ nhóm alkyl có hai điểm gắn kết với các thành phần khác của hợp chất. Ví dụ không hạn chế về nhóm alkylen bao gồm metylen (-CH₂-), etylen (-CH₂CH₂-), n-propylen (-CH₂CH₂CH₂-), isopropylen (-CH₂CH(CH₃)-), và các nhóm tương tự. Các nhóm alkylen có thể tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế.

Thuật ngữ “haloalkyl”, như được sử dụng trong bản mô tả, bao gồm alkyl được thế bằng một hoặc nhiều F, Cl, Br, hoặc I, trong đó alkyl như được xác định trên đây.

Thuật ngữ “alkoxy”, như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ nhóm “alkyl-O-”, trong đó alkyl như được xác định trên đây. Ví dụ về nhóm alkoxy bao gồm nhóm metoxy hoặc nhóm etoxy.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “muối được dụng” chỉ các muối mà, trong phạm vi của xem xét y tế, thích hợp để sử dụng tiếp xúc với các mô của người và động vật bậc thấp hơn mà không có các đáp ứng độc, kích ứng, dị ứng quá

mức và tương tự, và tương ứng với tỷ lệ lợi ích/rủi ro chấp hợp lý. Các muối được dụng là đã biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, S. M. Berge và các đồng tác giả mô tả chi tiết các muối được dụng trong tài liệu J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1–19, được kết hợp bằng cách viện dẫn. Muối được dụng của các hợp chất theo sáng chế bao gồm các muối thu được từ các axit và bazơ vô cơ và hữu cơ thích hợp. Ví dụ về muối cộng axit được dụng không độc là các muối có nhóm amino được tạo ra từ các axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit phosphoric, axit sulfuric và axit percloric hoặc từ các axit hữu cơ như axit axetic, axit trifloaxetic (axit 2,2,2-trifloaxetic), axit oxalic, axit maleic, axit tartric, axit xitric, axit succinic hoặc axit malonic hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp khác dùng trong lĩnh vực này như trao đổi ion. Các muối được dụng khác bao gồm muối adipat, alginat, ascorbat, aspartat, benzenesulfonat, benzoat, bisulfat, borat, butyrat, camphorat, camphorsulfonat, xitrat, xyclopentanepropionat, digluconat, dodexylsulfat, etansulfonat, format, fumarat, glucoheptonat, glyxerophosphat, gluconat, hemisulfat, heptanoat, hexanoat, hydroiodua, 2-hydroxy-etansulfonat, lactobionat, lactat, laurat, lauryl sulfat, malat, maleat, malonat, metansulfonat, 2-naphtalenesulfonat, nicotinat, nitrat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, pectinat, persulfat, 3-phenylpropionat, phosphat, pivalat, propionat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, thioxyanat, p-toluensulfonat, trifloaxetat (2,2,2-trifloaxetat), undecanoat, valerat, và các muối tương tự.

Các muối thu được từ bazơ thích hợp bao gồm muối kim loại kiềm, muối kim loại kiềm thổ, muối amoni và muối $N^+(C_{1-4}alkyl)_4$. Các muối kim loại kiềm hoặc kiềm thổ bao gồm muối natri, lithi, kali, canxi, magie, và các muối tương tự. Các muối được dụng khác bao gồm, nếu thích hợp, muối amoni không độc, amoni bậc bốn, và các cation amin được tạo ra bằng cách sử dụng ion đổi như halua, hydroxit, carboxylat, sulfat, phosphat, nitrat, alkyl sulfonat bậc thấp và aryl sulfonat.

Trừ khi được chỉ định khác, các cấu trúc minh học trong bản mô tả cũng bao gồm tất cả các dạng đồng phân (ví dụ, đồng phân đối ảnh, đồng phân không đối quang, và đồng phân hình học (hoặc cấu hình riêng)) của cấu trúc đó; ví dụ, các dạng cấu hình R và S cho từng tâm bất đối, các chất đồng phân liên kết kép Z và E, và các chất đồng phân cấu hình riêng Z và E. Do đó, các chất đồng phân hóa học lập thể đơn cũng như các hỗn hợp đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang, và đồng phân hình học (hoặc conformational) của các hợp chất này đều thuộc phạm vi của sáng chế. Trừ

khi được chỉ định khác, các dạng đồng phân hỗ biến của hợp chất theo sáng chế thuộc phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, trừ khi được chỉ định khác, các cấu trúc minh họa trong bản mô tả cũng bao gồm các hợp chất chỉ khác ở sự có mặt của một hoặc nhiều nguyên tử được làm giàu bằng đồng vị. Ví dụ, các hợp chất có cấu trúc này bao gồm các thay thế hydro bởi đơteri hoặc triti, hoặc thay thế cacbon bằng cacbon được làm giàu bằng ^{13}C - hoặc ^{14}C thuộc phạm vi của sáng chế. Các hợp chất này hữu dụng, ví dụ, là các công cụ phân tích, làm mẫu dò trong các thử nghiệm sinh học, hoặc làm tác nhân điều trị theo sáng chế.

Thuật ngữ “muối được dụng” chỉ muối cộng axit hoặc muối cộng bazơ tương thích với việc điều trị cho bệnh nhân.

Theo một số phương án, các axit cô cơ làm ví dụ mà tạo ra muối thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các muối của axit clohydric, bromhydric, sulfuric và phosphoric và muối kim loại axit như natri monohydro orthophosphat và kali hydro sulfat. Các axit hữu cơ làm ví dụ mà tạo ra các muối thích hợp bao gồm axit mono-, di- và tricarboxylic. Ví dụ về các axit này, ví dụ, axit axetic, axit trifloaxetic axit (2,2,2-trifloaxetic), axit glycolic, axit lactic, axit pyruvic, axit malonic, axit succinic, axit glutaric, axit fumaric, axit malic, axit tartaric, axit xitric, axit ascorbic, axit maleic, axit hydroxymaleic, axit benzoic, axit hydroxybenzoic, axit phenylaxetic, axit xinamic, axit salixylic, axit 2-phenoxybenzoic, axit p-toluensulfonic và các axit sulfonic khác như axit metansulfonic và axit 2-hydroxyetansulfonic. Các muối của mono- hoặc di-axit có thể được tạo ra, và các muối như vậy có thể tồn tại ở dạng hydrat hóa, solvat hóa hoặc gần như khan. Nói chung, các muối cộng axit của các hợp chất này thường tan trong nước và các dung môi hữu cơ ưa nước khác nhau, và thường có điểm nóng chảy cao hơn so với các dạng bazơ tự do của chúng. Các muối được dụng khác ví dụ oxalat có thể được dùng ví dụ để phân tách hợp chất có công thức (I) để dùng trong phòng thí nghiệm, hoặc để chuyển hóa tiếp thành muối cộng axit được dụng.

“Muối cộng bazơ được dụng” là muối cộng bazơ hữu cơ hoặc vô cơ không độc của các hợp chất axit có công thức (I) hoặc chất trung gian bất kỳ của chúng. Các bazơ cô cơ làm ví dụ mà có thể tạo ra muối thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hydroxit lithi, natri, kali, canxi, magie hoặc bari. Các bazơ hữu cơ làm ví dụ mà tạo ra muối thích hợp bao gồm các amin béo, vòng béo hoặc thơm như metylamin, trimetyl amin và picolin hoặc amoniac. Việc chọn muối thích hợp có thể quan trọng để

chức este, nếu có, tại vị trí nào đó trong phân tử không bị hydro hóa. Các tiêu chuẩn chọn muối thích hợp sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ.

Các muối cộng axit của hợp chất có công thức (I) hầu hết được tạo ra từ các axit được dụng, và bao gồm ví dụ các muối tạo ra từ axit vô cơ, ví dụ axit clohydric, axit sulphuric hoặc axit phosphoric và axit hữu cơ ví dụ axit succinic, axit maleic, axit axetic, axit trifloaxetic hoặc axit fumaric. Các muối không được dụng khác ví dụ muối oxalate có thể được sử dụng ví dụ để phân tách hợp chất có công thức (I) để sử dụng trong phòng thí nghiệm, hoặc để chuyển hóa tiếp thành muối cộng axit được dụng. Các muối cộng bazơ (như muối natri, kali và amoni), solvat và hydrat của hợp chất theo sáng chế cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Việc chuyển hóa hợp chất muối nhất định thành hợp chất muối mong muốn thực hiện bằng các kỹ thuật chuẩn, đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ.

Thuật ngữ “chất đồng phân lập thể” là thuật ngữ chung để gọi các chất đồng phân của các phân tử riêng rẽ chỉ khác nhau về hướng nguyên tử của chúng trong không gian. Bao gồm các chất đồng phân là ảnh qua gương (chất đồng phân đối ảnh), các chất đồng phân hình học (cis/trans) và các chất đồng phân của hợp chất với nhiều hơn một tâm bất đối mà không phải ảnh qua gương của nhau (chất đồng phân không đối quang).

Thuật ngữ “điều trị” hoặc “việc điều trị” chỉ việc làm thuyên giảm các triệu chứng, loại bỏ nguyên nhân của triệu chứng tạm thời hoặc vĩnh viễn, hoặc để ngăn ngừa hoặc làm chậm các biểu hiện của triệu chứng gọi là rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu điều trị” chỉ lượng hợp chất hữu hiệu để điều trị hoặc giảm bớt mức độ nghiêm trọng của một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý.

Khi thể hiện các yếu tố bộc lộ trong bản mô tả, các mạo từ “một” xác định và không xác định, và “đã nêu” chỉ một hoặc nhiều yếu tố. Thuật ngữ “chứa”, “có”, “bao gồm” được dùng theo nghĩa mở và chỉ việc có thể có thêm các yếu tố khác ngoài các yếu tố được liệt kê.

Sử dụng, dạng bào chế và cấp thuốc

Dược phẩm

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất theo sáng chế hoặc dẫn xuất dược dụng của nó và chất mang, tá dược, hoặc chất dẫn dược dụng. Lượng hợp chất trong dược phẩm theo sáng chế hữu hiệu để ức chế đáng kể CRM1, trong mẫu sinh học hoặc trên bệnh nhân. Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được bào chế để sử dụng cho bệnh nhân khi cần dược phẩm này. Thuật ngữ “bệnh nhân”, như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ động vật. Theo một số phương án, động vật là động vật có vú. Theo các phương án nhất định, bệnh nhân là bệnh nhân thú y (tức là, bệnh nhân động vật có vú không phải người). Theo một số phương án, bệnh nhân là chó. Theo các phương án khác, bệnh nhân là người.

Thuật ngữ “chất mang, tá dược, hoặc chất dẫn dược dụng” chỉ chất mang, tá dược, hoặc chất dẫn không độc mà không ảnh hưởng đến dược tính của hợp chất cùng bào chế với nó. Các chất mang, tá dược hoặc chất dẫn dược dụng mà có thể được sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất trao đổi ion, nhôm, nhôm stearat, lexithin, các protein huyết thanh, như albumin huyết thanh người, các chất đệm như phosphat, glyxin, axit sorbic, kali sorbat, các hỗn hợp glycerit từng phần của axit béo thực vật, nước, muối hoặc chất điện ly, như protamin sulfat, dinatri hydro phosphat, kali hydro phosphat, natri clorua, muối kẽm, silic oxit keo, magie trisilicat, polyvinyl pyrrolidon, các chất nền xenluloza, polyetylen glycol, natri carboxymetylxenluloza, polyacrylat, sáp, các polyme khối polyetylen-polyoxypropylen khối, polyetyleneglycol và chất béo len.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng đường uống, ngoài đường tiêu hóa (bao gồm dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch và trong da), bằng cách phun hít, dùng khu trú, đường trực tràng, đường mũi, đường uống, đường âm đạo hoặc qua bao cấy. Theo một số phương án, các hợp chất hoặc dược phẩm được đề cập đến được sử dụng trong tĩnh mạch và/hoặc trong màng bụng.

Thuật ngữ “trong màng bụng” như được sử dụng trong bản mô tả bao gồm dưới da, trong tĩnh mạch, trong bắp, nội nhãn, trong thủy tinh thể, trong khớp, trong hoạt dịch, trong xương ức, trong bao, trong gan, trong màng bụng, trong thương tổn và trọng sọ bằng kỹ thuật tiêm hoặc truyền. Tốt hơn, nếu dược phẩm được sử dụng đường uống, dưới da, trong màng bụng hoặc trong tĩnh mạch. Các dạng tiêm vô trùng của

được phẩm theo sáng chế có thể là hỗn dịch trong nước hoặc trong dầu. Các hỗn dịch này có thể được bào chế theo các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng chất phân tán hoặc chất làm ẩm và chất tạo hỗn dịch thích hợp. Dược phẩm dạng tiêm vột rung cũng có thể là dung dịch tiêm hoặc hỗn dịch tiêm vô trùng trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, dung dịch trong 1,3-butandiol. Trong số các chất dẫn và dung môi được dùng, có thể dùng nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, các dầu nền vô trùng thường được sử dụng làm dung môi hoặc môi trường tạo hỗn dịch.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng đường uống ở dạng liều bất kỳ dùng đường uống bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, viên nang, viên nén, hỗn dịch hoặc dung dịch nước. Trong trường hợp dùng viên nén đường uống, các chất mang thường được sử dụng bao gồm lactoza và tinh bột ngô. Các chất làm trơn, như magie stearat, cũng thường được bổ sung. Để dùng dạng viên nang đường uống, các chất pha loãng hữu dụng bao gồm lactoza và tinh bột ngô khô. Khi cần dùng hỗn dịch nước đường uống, thành phần hoạt tính được kết hợp với chất nhũ hóa và chất tạo hỗn dịch. Nếu muốn, cũng có thể bổ sung các chất làm ngọt, tạo hương hoặc tạo màu. Theo một số phương án, dạng bào chế dùng đường uống đã đề cập đến được bào chế để giải phóng tức thời hoặc giải phóng chậm. Theo một số phương án, dược phẩm thích hợp để dùng trong má hoặc dưới lưỡi, bao gồm viên nén, viên ngậm dẹt và viên ngậm. Hợp chất được đề cập đến cũng có thể ở dạng bao vi nang.

Theo cách khác, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng thuốc đạn để dùng đường trực tràng. Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được dùng khu trú, đặc biệt khi đích điều trị bao gồm những vùng hoặc cơ quan dễ tiếp cận bằng cách đưa vào cục bộ, bao gồm các bệnh về mắt, da, hoặc ống tiêu hóa dưới. Các dạng bào chế dùng khu trú thích hợp đối với từng vùng hoặc từng cơ quan.

Việc dùng khu trú ở ống tiêu hóa dưới có thể thực hiện bằng dạng thuốc đạn dùng trực tràng (xem dưới đây) hoặc dạng thụt thích hợp. Cũng có thể sử dụng miếng dán khu trú qua da.

Để dùng cho mắt, dược phẩm được đề cập đến có thể được bào chế dưới dạng vi hỗn dịch hoặc thuốc mỡ như mỡ.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được dùng dạng sol khí hoặc hít qua đường mũi.

Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế được bào chế để sử dụng trong màng bụng.

Lượng hợp chất theo sáng chế có thể được kết hợp với vật liệu mang để tạo ra dạng liều đơn dược phẩm sẽ thay đổi tùy theo cơ thể chủ cần điều trị, đường sử dụng cụ thể. Theo một phương án, các dược phẩm được đề cập đến cần được bào chế sao cho liều chất ức chế nằm trong khoảng 0,01 - 100mg/kg thể trọng/ngày có thể được dùng cho bệnh nhân chỉ định dùng dược phẩm này. Theo một phương án khác, liều nằm trong khoảng từ 0,5 đến khoảng 100mg/kg thể trọng, hoặc nằm trong khoảng từ 1 mg đến 1000 mg/liều, từ 4 đến 120 giờ một lần, hoặc theo yêu cầu của từng loại thuốc cụ thể. Thông thường, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng khoảng 1 đến 6 lần một ngày.

Cần hiểu rằng các liều và phác đồ điều trị cụ thể đối với bệnh nhân cụ thể bất kỳ sẽ tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm hoạt tính của hợp chất cụ thể được dùng, độ tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe chung, giới tính, chế độ ăn, thời gian sử dụng, tốc độ bài tiết, thuốc dùng kèm, và đánh giá của bác sĩ điều trị và độ nghiêm trọng của bệnh cụ thể cần điều trị. Lượng hợp chất theo sáng chế trong dược phẩm cũng sẽ tùy thuộc vào hợp chất cụ thể trong dược phẩm.

Khi tình trạng bệnh của bệnh nhân đã có tiến triển, có thể dùng liều duy trì của hợp chất, dược phẩm hoặc dược phẩm phối hợp theo sáng chế, nếu cần. Tiếp theo, liều hoặc tần suất sử dụng, hoặc cả hai có thể giảm, theo các triệu chứng, đến mức mà tình trạng tiến triển được duy trì khi các triệu chứng đã được làm thuyên giảm đến mức mong muốn. Tuy nhiên, bệnh nhân có thể cần điều trị không liên tục dài hạn khi có tái phát bất kỳ của triệu chứng.

Sử dụng hợp chất và dược phẩm

Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả thường hữu dụng để ức chế CRM1 và do đó hữu dụng để điều trị một hoặc nhiều rối loạn có liên quan đến hoạt tính của CRM1. Do đó, bản mô tả mô tả phương pháp điều trị rối loạn qua trung gian CRM1 bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng hợp chất theo sáng chế, hoặc dược phẩm chứa hợp chất này khi cần. Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả cũng có thể được dùng cho tế bào trong môi trường, ví dụ in vitro hoặc ex vivo,

hoặc cho đối tượng, ví dụ, in vivo, để điều trị, ngăn ngừa, và/hoặc chẩn đoán nhiều rối loạn khác nhau, bao gồm các rối loạn được mô tả dưới đây.

Hoạt tính của hợp chất dùng trong sáng chế làm chất ức chế CRM1 có thể được thử nghiệm in vitro, in vivo hoặc trong dòng tế bào. Các điều kiện chi tiết để thử nghiệm hợp chất dùng trong sáng chế làm chất ức chế CRM1 được nêu trong các ví dụ dưới đây.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý “qua trung gian CRM1”, như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ bệnh hoặc tình trạng bệnh trong đó CRM1 đã biết là có vai trò nhất định. Theo đó, bản mô tả bộc lộ việc điều trị hoặc giảm bớt mức độ nghiêm trọng của một hoặc nhiều bệnh trong đó CRM1 đã biết là có vai trò nhất định. Bản mô tả cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh có liên quan đến mức biểu hiện hoặc hoạt tính của các protein p53, p73, p21, pRB, p27, IκB, NFκB, c-Abl, FOXO, COX-2, hoặc HDAC (histon deacetylaza) ở đối tượng bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất được mô tả trong bản mô tả. Bản mô tả cũng mô tả phương pháp điều trị hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được chọn từ rối loạn tăng sinh (ví dụ, bệnh ung thư), rối loạn viêm, rối loạn tự miễn, nhiễm virus, rối loạn nhãn khoa hoặc rối loạn thoái hóa thần kinh trong đó phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng hợp chất hoặc được phẩm theo sáng chế khi cần. Bản mô tả cũng mô tả phương pháp điều trị hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh ung thư. Ví dụ cụ thể về các rối loạn nêu trên được nêu chi tiết dưới đây.

Các bệnh ung thư có thể điều trị được bằng các hợp chất theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh máu ác tính (bệnh bạch cầu, u lympho, u tủy bao gồm các hội chứng đa u tủy, loạn sản tủy và tăng sinh tủy) và các khối u rắn (caxinom như caxinom tuyến tiền liệt, caxinom vú, caxinom phổi, caxinom đại tràng, caxinom tụy, caxinom trực tràng, caxinom buồng trứng cũng như caxinom mô mềm và sácôm xương, và u mô đệm). Ung thư vú (Breast cancer - BC) có thể bao gồm ung thư vú dạng cơ sở (basal-like breast cancer - BLBC), ung thư vú thể bộ ba âm tính (triple negative breast cancer - TNBC) và ung thư vú ở cả dạng BLBC và TNBC. Ngoài ra, ung thư vú có thể bao gồm caxinom thùy hoặc ống xâm lấn hoặc không xâm lấn, caxinom ống vú, caxinom dạng tủy ở vú, caxinom dịch nhầy ở vú, caxinom dạng

nhú ở vú, caxinom dạng rây ở vú, ung thư vú ở nam giới, ung thư vú tái phát hoặc di căn, u vú dạng lá và bệnh Paget ở núm vú.

Các rối loạn viêm điều trị được bằng các hợp chất theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, bệnh khớp thoái hóa, luput ban đỏ hệ thống, xơ cứng toàn thân, hội chứng viêm mạch (mạch nhỏ, vừa và lớn), xơ vữa động mạch, bệnh viêm ruột, hội chứng kích ứng ruột, bệnh Crohn, viêm đại tràng niêm dịch, viêm loét đại tràng, viêm dạ dày, nhiễm trùng máu, bệnh vẩy nến và các rối loạn viêm da khác (như chàm, viêm da dị ứng, viêm da tiếp xúc, mề đay, xơ cứng bì, và bệnh da với các thành phần viêm cấp, bệnh pemphigus, bệnh dạng pemphigus, viêm da dị ứng), và các hội chứng mề đay.

Các bệnh virus điều trị được bằng các hợp chất theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, viêm họng sốt cấp tính, sốt viêm họng-kết mạc, viêm kết-giác mạc dịch, viêm dạ dày ruột trẻ em, các bệnh nhiễm virus Cocksackie, tăng bạch cầu đơn nhân nhiễm trùng, u lympho Burkitt, viêm gan cấp tính, viêm gan mạn tính, xơ gan, caxinom tế bào gan, nhiễm HSV-1 nguyên phát (ví dụ, viêm nước-miệng ở trẻ em, viêm amidan và viêm họng ở người lớn, viêm kết-giác mạc), nhiễm HSV-1 âm ỉ (ví dụ, lở môi và lở miệng), nhiễm HSV-2 nguyên phát, nhiễm HSV-2 âm ỉ, viêm màng não vô khuẩn, tăng bạch cầu đơn nhân nhiễm khuẩn, bệnh thể vùi cự bào, sacom Kaposi, bệnh tăng sản bạch huyết Castleman, u lympho tràn dịch nguyên phát, bệnh AIDS, cúm, hội chứng Reye, bệnh sởi, viêm não tùy hậu nhiễm, viêm tuyến mang tai (Mumps), thương tổn biểu mô tăng sản (ví dụ, mụn cóc thông thường, mụn cóc dẹt, mụn cóc bàn chân và mụn cóc ở bộ phận sinh dục, u nhú thanh quản, loạn sản thượng bì dạng mụn cóc), caxinom cổ tử cung, caxinom tế bào vảy, bệnh bạch hầu thanh quản, viêm phổi, viêm phế quản, cảm lạnh, viêm tùy xám, bệnh dại, hội chứng giống cúm, viêm phế quản phổi nghiêm trọng, bệnh sởi Đức, rubella bẩm sinh, thủy đậu, và bệnh zona herpes. Các bệnh virus điều trị được bằng các hợp chất theo sáng chế cũng có thể bao gồm các tình trạng nhiễm virus mạn tính, bao gồm viêm gan B và viêm gan C.

Ví dụ về các rối loạn nhãn khoa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phù hoàng điểm (phù hoàng điểm do đái tháo đường và không do đái tháo đường), thoái hóa điểm vàng loại khô và ướt do lão hóa, thoái hóa điểm vàng dạng đĩa do lão hóa, phù hoàng điểm dạng nang, phù mi mắt, phù võng mạc, bệnh võng mạc do đái tháo đường, bệnh màng mạch-võng mạc, bệnh hoàng điểm tân mạch, tăng nhãn áp tân

mạch, viêm màng bồ đào, viêm mống mắt, viêm mạch võng mạc, viêm nội nhãn, viêm toàn nhãn, viêm mắt lan tỏa, viêm màng mạch, viêm biểu mô sắc tố võng mạc, viêm kết mạc, viêm thể mi, viêm củng mạc, viêm thượng củng mạc, viêm dây thần kinh thị giác, viêm dây thần kinh thị giác sau nhãn cầu, viêm giác mạc, viêm bờ mi, bong võng mạc xuất tiết, loét giác mạc, loét kết mạc, viêm giác mạc hình đồng tiền mạn tính, bệnh nhãn khoa liên quan đến giảm oxy huyết hoặc thiếu máu cục bộ, bệnh võng mạc trẻ sinh non, bệnh võng mạc đái tháo đường tăng sinh, bệnh màng mạch polyp, tăng sinh mạch máu võng mạc, thuyên tắc động mạch võng mạc, thuyên tắc tĩnh mạch võng mạc, bệnh Coats, bệnh võng mạc-dịch kính xuất tiết di truyền, bệnh vô mạch (bệnh Takayasu), bệnh Eales, hội chứng kháng thể kháng phospholipit, bệnh võng mạc bạch cầu, hội chứng tăng độ nhớt máu, bệnh macroglobulin huyết, bệnh võng mạc liên quan đến interferon, bệnh võng mạc do tăng huyết áp, bệnh võng mạc do chiếu xạ, thiếu hụt tế bào mầm biểu mô võng mạc hoặc đục thủy tinh thể.

Các bệnh thoái hóa thần kinh có thể điều trị được bằng hợp chất có công thức (I) bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, và bệnh Huntington, và bệnh xơ cứng teo cơ một bên (bệnh ALS/Lou Gehrig).

Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả cũng có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn sinh trưởng và xơ hóa mô bất thường bao gồm bệnh cơ tim giãn, bệnh cơ tim phì đại, bệnh cơ tim hạn chế, xơ hóa phổi, xơ gan, viêm cầu thận, bệnh thận đa nang (polycystic kidney disorder - PKD) và các rối loạn thận khác.

Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả cũng có thể được sử dụng để điều trị rối loạn có liên quan đến mức độ tiêu thụ thức ăn như bệnh béo phì và bệnh hấu ăn.

Theo một phương án khác, các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả cũng có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa dị ứng và các rối loạn hô hấp, bao gồm hen, viêm phế quản, xơ hóa phổi, viêm mũi dị ứng, nhiễm độc oxy, bệnh khí thũng, viêm phế quản mạn tính, hội chứng suy hô hấp cấp tiên triển, và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính bất kỳ (chronic obstructive bệnh phổi - COPD).

Theo một số phương án, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến hoạt tính CRM1 là loạn dưỡng cơ, viêm khớp, ví dụ, viêm xương khớp và viêm khớp dạng thấp, viêm cột sống dính khớp, thương tổn não, thương tổn tủy sống, nhiễm trùng máu, bệnh thấp, xơ vữa động mạch do ung thư, đái tháo đường typ 1, đái tháo đường typ 2,

bệnh thận vàng da, tăng nhãn áp, bệnh vồng mạc, lão hóa, đau đầu, đau, hội chứng đau từng vùng phức tạp, phì đại tim, chứng lãng phí cơ, các rối loạn dị hóa, bệnh béo phì, thai chậm phát triển, tăng cholesterol huyết, bệnh tim, suy tim mạn tính, thiếu máu cục bộ/tái tưới máu, đột quỵ, phình mạch não, đau thắt ngực, bệnh phổi, xơ nang, thương tổn phổi do axit, tăng áp phổi, hen, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, hội chứng Sjogren, bệnh màng trong, bệnh thận, bệnh cầu thận, bệnh gan do rượu, bệnh ruột, lạc nội mạc tử cung ở phúc mạc, bệnh da, viêm xoang mũi, u trung biểu mô, loạn sản ngoại bì giảm tiết mồ hôi kèm theo suy giảm miễn dịch, bệnh Behcet, bệnh nhiễm sắc tố đậm dề, lao, hen, bệnh Crohn, viêm đại tràng, dị ứng mắt, viêm ruột thừa, bệnh Paget, viêm tụy, viêm nướu răng, lạc nội mạc tử cung, bệnh viêm ruột, bệnh viêm phổi, bệnh do silic oxit gây ra, chứng ngủ ngáy, bệnh AIDS, nhiễm HIV-1, các bệnh tự miễn, hội chứng kháng phospholipit, bệnh luput, viêm thận luput, sốt Địa trung hải di truyền, hội chứng sốt từng đợt di truyền, bệnh căng thẳng tâm lý, bệnh thần kinh, bệnh đa thần kinh dạng tinh bột, bệnh viêm thần kinh, bệnh Parkinson, đa xơ cứng, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, bệnh Huntington, đục thủy tinh thể, hoặc mất thính lực.

Theo các phương án khác, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến hoạt tính CRM1 là thương tổn ở đầu, viêm màng bồ đào, đau do viêm, hen do dị ứng, hen không do dị ứng, viêm cầu thận, viêm loét đại tràng, viêm ruột hoại tử, tăng globulin miễn dịch D trong máu kèm sốt hồi quy (HIDS), hội chứng theo định kỳ có liên quan đến thụ thể TNF (TNF receptor associated periodic syndrome - TRAPS), hội chứng theo định kỳ có liên quan đến cryopyrin, hội chứng Muckle-Wells (thoái hóa tinh bột, điếc, mày đay), mày đay vào mùa lạnh di truyền, bệnh viêm đa cơ quan khởi phát sơ sinh (neonatal onset multisystem inflammatory disease - NOMID), sốt định kỳ, viêm miệng áp-tơ, viêm họng và viêm hạch (hội chứng PFAPA), hội chứng Blau, viêm khớp nhiễm khuẩn sinh mủ, viêm da mủ hoại thư, mụn trứng cá (PAPA), thiếu hụt chất đối kháng thụ thể interleukin-1 (deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist - DIRA), xuất huyết dưới màng nhện, bệnh thận đa nang, cấy ghép, ghép tạng, ghép mô, hội chứng loạn sản tủy, viêm do kích ứng, viêm do kích ứng thực vật, viêm do thường xuân độc/dầu sơn ta, viêm do kích ứng hóa học, viêm do ong đốt, viêm do côn trùng cắn, chấy ngứa, bỏng, viêm da, nhiễm độc huyết do nội độc tố, thương tổn phổi, hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển, viêm gan do rượu, hoặc thương tổn thận do nhiễm ký sinh trùng.

Bản mô tả cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) để sản xuất thuốc để điều trị bệnh có liên quan đến mức biểu hiện hoặc hoạt tính của các protein p53, p73, p21, pRB, p27, I κ B, NF κ B, c-Abl, FOXO, COX-2 hoặc HDAC ở đối tượng. Bản mô tả cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư và/hoặc rối loạn ung thư, sự tạo mạch, rối loạn miễn dịch, rối loạn và/hoặc bệnh viêm, rối loạn và/hoặc bệnh ngoại di truyền, do hormon, bệnh do virus, rối loạn và/hoặc bệnh thoái hóa thần kinh, chấn thương, và rối loạn nhãn khoa bất kỳ.

Bản mô tả cũng mô tả phương pháp ức chế CRM1 trong mẫu sinh học bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với, hoặc cho bệnh nhân sử dụng muối được dùng của hợp chất có công thức (I), hoặc được phẩm chứa nó.

Rối loạn ung thư

Hợp chất hoặc dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị rối loạn ung thư. “Rối loạn ung thư” là bệnh hoặc rối loạn đặc trưng bởi các tế bào có khả năng tự sinh trưởng hoặc sao chép, ví dụ, trạng thái hoặc tình trạng bất thường đặc trưng bởi sự tăng sinh tế bào. Ví dụ về các rối loạn ung thư bao gồm: caxinom, sacom, rối loạn di căn, ví dụ, khối u bắt nguồn từ tuyến tiền liệt, não, xương, kết tràng, phổi, vú, buồng trứng, và gan, rối loạn ung thư tạo máu, ví dụ, bệnh bạch cầu, u lympho, u tủy và các rối loạn tương bào ác tính, và các khối u di căn. Các bệnh ung thư phổ biến bao gồm: ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư kết tràng, ung thư phổi, ung thư gan, và ung thư tuyến tụy. Việc điều trị bằng hợp chất có thể với lượng hữu hiệu để cải thiện ít nhất một triệu chứng của rối loạn ung thư, ví dụ, giảm tăng sinh tế bào, giảm khối lượng u, v.v..

Các phương pháp được bộc lộ hữu dụng để ngăn ngừa và điều trị bệnh ung thư, bao gồm ví dụ, các khối u rắn, khối u mô mềm, và di căn của các khối u này, cũng như các hội chứng ung thư di truyền như hội chứng Li Fraumeni, hội chứng ung thư buồng trứng-vú di truyền (đột biến BRCA1 hoặc BRAC2), và các hội chứng khác. Các phương pháp được bộc lộ cũng hữu dụng để điều trị các bệnh ung thư không rắn. Ví dụ về các khối u rắn bao gồm u ác tính (ví dụ, sacom, adenocaxinom, và caxinom) của các hệ cơ quan khác nhau, như ở phổi, vú, cơ quan lympho, dạ dày-ruột (ví dụ, kết tràng), và ống niệu dục (ví dụ, u thận, biểu mô, hoặc tinh hoàn), họng, tuyến tiền liệt,

và buồng trứng. Ví dụ về adenocaxinom bao gồm ung thư kết-trực tràng, caxinom tế bào thận, ung thư gan, caxinom tế bào không nhỏ ở phổi, và ung thư ruột non.

Ví dụ về các bệnh ung thư được mô tả bởi Viện ung thư quốc gia (National Cancer Institute) bao gồm: bệnh bạch cầu lympho bào cấp ở người lớn, bệnh bạch cầu lympho bào cấp ở trẻ em; bệnh bạch cầu tủy cấp ở người lớn; caxinom biểu mô vò thượng thận; caxinom biểu mô vò thượng thận ở trẻ em; u lympho liên quan đến bệnh AIDS; u ác tính liên quan đến bệnh AIDS; ung thư hậu môn; u não tế bào hình sao, ở tiểu não trẻ em; u não tế bào hình sao, ở não trẻ em; ung thư ống mật, ngoài gan; ung thư bang quang; ung thư bang quang ở trẻ em; ung thư xương, sacom xương/u mô bào sợi ác tính; u thần kinh đệm tế bào não ở trẻ em; u não ở người lớn; u não, u thần kinh đệm tế bào não ở trẻ em; u não, u não tế bào hình sao, ở tiểu não trẻ em; u não, u não tế bào hình sao ở não/u thần kinh đệm ác tính ở trẻ em; u não, u màng não thất ở trẻ em; u não, u nguyên tủy bào ở trẻ em; u não, u thần kinh ngoại bì nguyên thủy bán cầu não ở trẻ em; u não, u thần kinh đệm đường thị giác và vùng dưới đồi ở trẻ em; u não ở trẻ em (loại khác); ung thư vú; ung thư vú và thời kỳ thai nghén; ung thư vú, ở trẻ em; ung thư vú ở nam giới; u tuyến/ung thư phế quản, ở trẻ em; khối u ung thư, ở trẻ em; ung thư dạ dày-ruột; caxinom vò thượng thận; caxinom tế bào tiểu đảo; caxinom không rõ căn nguyên; u lympho hệ thần kinh trung ương, nguyên phát; u não tế bào hình sao ở tiểu não trẻ em; u não tế bào hình sao ở não/u thần kinh đệm ác tính, ở trẻ em; ung thư cổ tử cung; các bệnh ung thư ở trẻ em; bệnh bạch cầu lympho bào cấp; bệnh bạch cầu nguyên bào tủy mạn tính; rối loạn tăng sinh tủy mạn tính; Sacom tế bào sáng bao gân; ung thư kết tràng; ung thư kết-trực tràng ở trẻ em; u lympho tế bào T ở da; ung thư nội mạc tử cung; u màng não thất ở trẻ em; ung thư biểu mô buồng trứng; ung thư thực quản; ung thư thực quản ở trẻ em; khối u thuộc họ Ewing; u tế bào mầm ngoại sọ ở trẻ em; u tế bào mầm ngoại tuyến sinh dục; ung thư ống mật ngoài gan; ung thư mắt, u hắc tố trong mắt; ung thư mắt, u nguyên bào võng mạc; ung thư túi mật; ung thư dạ dày; ung thư dạ dày ở trẻ em; khối u ung thư dạ dày ruột; u tế bào mầm, ngoại sọ, ở trẻ em; u tế bào mầm, ngoại tuyến sinh dục; u tế bào mầm, buồng trứng; u nguyên bào nuôi do thai nghén; u thần kinh đệm, ở trẻ em, u não; u thần kinh đệm, ở trẻ em, đường nhãn lực và vùng dưới đồi; bệnh bạch cầu tế bào tóc; ung thư đầu và cổ; ung thư tế bào gan, ở người lớn (nguyên phát); ung thư tế bào gan, ở trẻ em (nguyên phát); u lympho Hodgkin, ở người lớn; Hodgkin, ở trẻ em; u lympho Hodgkin

thời kỳ thai nghén; ung thư hạ họng; u thần kinh đệm vùng dưới đồi và đường nhãn lực, ở trẻ em; u hắc tố trong mắt; caxinom tế bào tiểu đảo (tuyến tụy nội tiết); sacom Kaposi; ung thư thận; ung thư thanh quản; ung thư thanh quản, ở trẻ em; bệnh bạch cầu, nguyên bào lympho cấp, ở người lớn; bệnh bạch cầu, nguyên bào lympho cấp, ở trẻ em; bệnh bạch cầu tủy cấp, ở người lớn; bệnh bạch cầu tủy cấp ở trẻ em; bệnh bạch cầu, lympho bào mạn tính; bệnh bạch cầu nguyên tủy bào mạn tính; bệnh bạch cầu, tế bào tóc; ung thư môi và khoang miệng; ung thư gan, ở người lớn (nguyên phát); ung thư gan, ở trẻ em (nguyên phát); ung thư phổi, tế bào không nhỏ; ung thư phổi, tế bào nhỏ; bệnh bạch cầu nguyên bào lympho, ở người lớn cấp tính; bệnh bạch cầu nguyên bào lympho, ở trẻ em cấp tính; bệnh bạch cầu lympho bào, mạn tính; u lympho, có liên quan đến bệnh AIDS; u lympho, hệ thần kinh trung ương (nguyên phát); u lympho, tế bào T ở da; u lympho Hodgkin, ở người lớn; u lympho Hodgkin, ở trẻ em; u lympho Hodgkin thời kỳ thai nghén; u lympho không Hodgkin ở người lớn; u lympho không Hodgkin ở trẻ em; u lympho không Hodgkin thời kỳ thai nghén; u lympho nguyên phát hệ thần kinh trung ương; bệnh macroglobulin huyết Waldenstrom; ung thư vú ở đàn ông; u trung biểu mô ác tính, ở người lớn; u trung biểu mô ác tính, ở trẻ em; u tuyến ức ác tính; u nguyên tủy bào, ở trẻ em; u hắc tố; u hắc tố nội nhãn; caxinom tế bào Merkel; u trung biểu mô, ác tính; ung thư cổ tế bào vảy di căn không rõ căn nguyên; hội chứng đa u tuyến nội tiết, ở trẻ em; đa u tủy/ung thư tương bào; u sùi dạng nấm; hội chứng loạn sản tủy; bệnh bạch cầu nguyên tủy bào, mạn tính; bệnh bạch cầu tủy, ở trẻ em cấp tính; đa u hắc tố; rối loạn tăng sinh tủy, mạn tính; ung thư khoang mũi và xung quanh mũi; ung thư mũi họng; ung thư mũi họng, ở trẻ em; u nguyên bào thần kinh; u lympho không Hodgkin, ở người lớn; u lympho không Hodgkin, ở trẻ em; u lympho không Hodgkin thời kỳ thai nghén; ung thư phổi tế bào không nhỏ; ung thư miệng, ở trẻ em; ung thư khoang miệng và môi; ung thư vòm họng; sacom xương/u mô bào sợi ác tính của xương; ung thư buồng trứng, ở trẻ em; ung thư biểu mô buồng trứng; u tế bào mầm buồng trứng; u ác tính buồng trứng thấp tiềm tàng; ung thư tuyến tụy; ung thư tuyến tụy, ở trẻ em; ung thư tuyến tụy, tế bào tiểu đảo; ung thư xoang cạnh mũi và khoang mũi; ung thư tuyến cận giáp; ung thư dương vật; u tế bào ưa crom; u thần kinh ngoại bì nguyên thủy bán cầu não và tuyến yên, ở trẻ em; u tuyến yên; ung thư tương bào/đa u tủy; u nguyên bào màng phổi - phổi; ung thư vú thời kỳ thai nghén; u lympho Hodgkin thời kỳ thai nghén; u lympho không Hodgkin thời kỳ

thai nghén; u lympho hệ thần kinh trung ương nguyên phát; ung thư gan nguyên phát, ở người lớn; ung thư gan nguyên phát, ở trẻ em; ung thư tuyến tiền liệt; ung thư trực tràng; ung thư tế bào thận; ung thư tế bào thận, ở trẻ em; ung thư tế bào chuyển tiếp chậu thận và tử cung; u nguyên bào võng mạc; sacom cơ vân, ở trẻ em; ung thư tuyến nước bọt; ung thư tuyến nước bọt, ở trẻ em; sacom, khối u thuộc họ Ewing; sacom Kaposi; sacom (sacom xương)/u mô bào sợi ác tính của xương; sacom, sacom cơ vân, ở trẻ em; sacom, mô mềm, ở người lớn; sacom, mô mềm, ở trẻ em; hội chứng Sezary; ung thư da; ung thư da, ở trẻ em; ung thư da (u hắc tố); caxinom da, tế bào Merkel; ung thư phổi tế bào nhỏ; ung thư ruột non; sacom mô mềm, ở người lớn; sacom mô mềm ở trẻ em; ung thư cổ tế bào vảy không rõ căn nguyên, di căn; ung thư dạ dày; ung thư dạ dày, ở trẻ em; u thần kinh ngoại bì nguyên thủy bán cầu não, ở trẻ em; u lympho tế bào T, ở da; ung thư tinh hoàn; u tuyến ức, ở trẻ em; u tuyến ức, ác tính; ung thư tuyến giáp; ung thư tuyến giáp, ở trẻ em; ung thư tế bào chuyển tiếp chậu thận và tử cung; u nguyên bào nuôi, thời kỳ thai nghén; ung thư không rõ vị trí khởi phát ở trẻ em; các bệnh ung thư không phổ biến ở trẻ em; ung thư tế bào chuyển tiếp tử cung và chậu thận; ung thư niệu đạo; sacom tử cung; ung thư âm đạo; u thần kinh đệm đường nhãn lực và vùng dưới đồi, ở trẻ em; ung thư âm hộ; Macroglobulin huyết Waldenström; và u Wilms.

Các ví dụ tiếp theo về bệnh ung thư bao gồm u lympho tế bào B lớn lan tỏa (diffuse large B cell lymphoma - DLBCL) và u lympho tế bào vỏ (mantle cell lymphoma - MCL).

Tình trạng di căn của các bệnh ung thư nêu trên cũng có thể được điều trị hoặc ngăn ngừa bằng cách phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả.

Liệu pháp kết hợp

Theo một số phương án, hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả được sử dụng kèm với tác nhân điều trị hoặc phương pháp điều trị “thứ hai” khác. Việc chọn tác nhân điều trị thứ hai có thể từ tác nhân bất kỳ thường dùng trong liệu pháp đơn lẻ để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý đã nêu. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “dùng kèm” và các thuật ngữ liên quan chỉ việc sử dụng đồng thời hoặc nối tiếp các tác nhân điều trị theo sáng chế. Ví dụ, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng kèm

với tác nhân điều trị khác đồng thời hoặc nối tiếp nhau theo các dạng liều đơn vị riêng rẽ hoặc cùng trong một dạng liều đơn vị duy nhất. Theo đó, sáng chế đề cập đến dạng liều đơn vị duy nhất chứa hợp chất có công thức (I), tác nhân điều trị bổ sung, và chất mang, tá dược, hoặc chất dẫn được dụng.

Theo một phương án của sáng chế, nếu tác nhân điều trị thứ hai được dùng cho đối tượng, lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế nhỏ hơn lượng hữu hiệu của nó khi không dùng tác nhân điều trị thứ hai. Theo một phương án khác, lượng hữu hiệu của tác nhân điều trị thứ hai nhỏ hơn lượng hữu hiệu của nó khi không dùng kèm hợp chất theo sáng chế. Theo cách này, các tác dụng phụ không mong muốn có liên quan đến liều cao của tác nhân điều trị có thể được giảm thiểu. Các ưu điểm tiềm năng khác (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở của thiện chế độ liều và/hoặc giảm giá thành thuốc) sẽ rõ ràng với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tác nhân bổ sung có thể được dùng riêng, như một phần của chế độ đa liều, so với các hợp chất theo sáng chế. Theo cách khác, các tác nhân điều trị có thể chứa trong cùng dạng liều đơn, được trộn với các hợp chất theo sáng chế trong một chế phẩm duy nhất.

Liệu pháp kết hợp trị bệnh ung thư

Theo một số phương án, hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả được dùng cùng với phương pháp điều trị bệnh ung thư bổ sung. Ví dụ về các phương pháp điều trị bệnh ung thư bổ sung bao gồm, ví dụ: hóa liệu pháp, các liệu pháp hướng đích như liệu pháp kháng thể, chất ức chế kinaza, liệu pháp miễn dịch, và liệu pháp hormon, liệu pháp ngoại di truyền, chất ức chế proteosom, và liệu pháp chống tạo mạch. Ví dụ về từng phương pháp điều trị này được giới thiệu dưới đây. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “tổ hợp”, “được kết hợp” và các thuật ngữ liên quan chỉ việc sử dụng đồng thời hoặc nối tiếp các tác nhân điều trị theo sáng chế. Ví dụ, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng kèm với tác nhân điều trị khác đồng thời hoặc nối tiếp nhau trong các dạng liều đơn vị riêng rẽ hoặc cùng nhau trong một dạng liều đơn vị duy nhất. Theo đó, sáng chế đề cập đến dạng liều đơn vị duy nhất chứa hợp chất theo sáng chế, tác nhân điều trị bổ sung, và chất mang, tá dược, hoặc chất dẫn được dụng.

Lượng của cả hợp chất theo sáng chế và tác nhân điều trị bổ sung (trong các được phẩm chứa tác nhân điều trị bổ sung được mô tả trên đây) mà có thể được kết hợp với chất mang để tạo ra dạng liều đơn sẽ thay đổi tùy theo cơ thể chủ cần điều trị và đường

dùng cụ thể. Tốt hơn, nếu được phẩm theo sáng chế được bào chế sao cho liều hợp chất theo sáng chế nằm trong khoảng 0,01 - 100mg/kg thể trọng/ngày có thể được sử dụng.

Hóa liệu pháp

Theo một số phương án, hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả được dùng kèm với hóa liệu pháp. Hóa liệu pháp là phương pháp điều trị bệnh ung thư bằng thuốc mà có thể phá hủy các tế bào ung thư. “Hóa liệu pháp” thường chỉ các thuốc độc tế bào tác động đến các tế bào đang phân chia nhanh chóng nói chung, trái với liệu pháp hướng đích. Các thuốc dùng trong hóa liệu pháp cản trở sự phân chia tế bào theo nhiều cách có thể có, ví dụ, sự nhân đôi ADN hoặc sự phân tách các nhiễm sắc thể mới tạo thành. Hầu hết các dạng hóa liệu pháp hướng đến tất cả các tế bào đang phân chia nhanh chóng và không đặc hiệu với tế bào ung thư, mặc dù có thể có một số mức độ đặc hiệu từ việc nhiều tế bào ung thư không thể phục hồi ADN hư hỏng, trong khi các tế bào bình thường thường có thể.

Ví dụ về tác nhân điều trị hóa học được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư bao gồm, ví dụ, các chất chống chuyển hóa (ví dụ, axit folic, purin, và dẫn xuất pyrimidin) và tác nhân alkyl hóa (ví dụ, nitơ mù tạt, nitrosoure, platin, alkyl sulfonat, hydrazin, triazen, aziridin, độc tố thoi, tác nhân độc tế bào, chất ức chế topoisomeraza và các chất khác). Ví dụ về các tác nhân bao gồm Aclarubixin, Actinomycin, Alitretinoin, Altretamin, Aminopterin, axit Aminolevulinic, Amrubixin, Amsacrin, Anagrelit Arsen trioxit, Asparaginaza, Atrasentan, Belotecan, Bexaroten, Bendamustin, Bleomycin, Bortezomib, Busulfan, Camptothecin, Capecitabin, Carboplatin, Carboquone, Carmofur, Carmustin, Celecoxib, Chlorambucil, Chlormethin, Xisplatin, Cladribin, Clofarabin, Crisantaspas, Xyclophosphamid, Cytarabin, Dacarbazin, Dactinomycin, Daunorubicin, Decitabin, Demecolxin, Doxetaxel, Doxorubicin, Efaproxiral, Elesclomol, Elsamitruxin, Enoxitabin, Epirubicin, Estramustin, Etoposid, Floxuridin, Fludarabin, Fluorouracil (5FU), Fotemustin, Gemxitabin, viên cấy Gliadel, Hydroxycarbamid, Hydroxyurea, Idarubicin, Ifosfamid, Irinotecan, Irofulven, Ixabepilone, Larotaxel, Leucovorin, Liposomal doxorubicin, Liposomal daunorubicin, Lonidamin, Lomustin, Lucanthone, Mannosulfan, Masoprocol, Melphalan, Mercaptopurin, Mesna, Methotrexat, Metyl aminolevulinat, Mitobronitol, Mitoguazon,

Mitotan, Mitomycin, Mitoxantron, Nedaplatin, Nimustin, Oblimersen, Omacetaxin, Ortataxel, Oxaliplatin, Paclitaxel, Pegaspargaza, Pemetrexed, Pentostatin, Pirarubixin, Pixantron, Plicamycin, Porfimer natri, Prednimustin, Procarbazine, Raltitrexed, Ranimustin, Rubitecan, Sapacitabin, Semustin, Sitimagin ceradenovec, Strataplatin, Streptozoxin, Talaporfin, Tegafur-uraxil, Temoporfin, Temozolomit, Teniposid, Tesetaxel, Testolacton, Tetranitrat, Thiotepa, Tiazofurin, Tioguanin, Tipifarnib, Topotecan, Trabectedin, Triaziquone, Trietylenemelamin, Triplatin, Tretinoin, Treosulfan, Trofosfamid, Uramustin, Valrubixin, Verteporfin, Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Vinflunin, Vinorelbin, Vorinostat, Zorubixin, và các tác nhân kìm hãm tế bào hoặc độc tế bào khác được mô tả trong bản mô tả.

Do một số thuốc dùng kết hợp tốt hơn so với dùng riêng, thường sử dụng hai hoặc nhiều thuốc ở cùng một thời điểm. Hai hoặc nhiều tác nhân hóa liệu pháp được sử dụng làm hóa liệu pháp kết hợp. Theo một số phương án, các tác nhân hóa liệu pháp (bao gồm hóa liệu pháp kết hợp) có thể được dùng kết hợp với hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả.

Liệu pháp hướng đích

Liệu pháp hướng đích là việc sử dụng tác nhân đặc hiệu với các protein bất thường của tế bào ung thư. Các thuốc điều trị được định hướng đến phân tử nhỏ thường là chất ức chế vùng enzym trên protein bị đột biến, biểu hiện quá mức, hoặc protein then chốt trong tế bào ung thư. Các ví dụ nổi bật là các chất ức chế tyrosin kinaza như Axitinib, Bosutinib, Cediranib, dasatinib, erlotinib, imatinib, gefitinib, lapatinib, Lestaurtinib, Nilotinib, Semaxanib, Sorafenib, Sunitinib, và Vandetanib, và chất ức chế kinaza phụ thuộc cyclin như Alvocidib và Seliciclib. Liệu pháp kháng thể đơn dòng là một chiến lược khác trong đó tác nhân điều trị là kháng thể liên kết đặc hiệu với protein trên bề mặt tế bào ung thư. Ví dụ bao gồm kháng thể kháng HER2/neu trastuzumab (Herceptin®) thường dùng trong ung thư vú, và kháng thể kháng CD20 rituximab và Tositumomab thường dùng trong nhiều u ác tính tế bào B. Ví dụ khác về kháng thể bao gồm Cetuximab, Panitumumab, Trastuzumab, Alemtuzumab, Bevacizumab, Edrecolomab, và Gemtuzumab. Ví dụ về các protein dung hợp bao gồm Aflibercept và Denileukin diftitox. Theo một số phương án, liệu

pháp hướng đích có thể được sử dụng kết hợp với hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả, ví dụ, Gleevec (Vignari và Wang 2001).

Liệu pháp hướng đích cũng có thể bao gồm các peptit nhỏ làm “yếu tố định hướng” mà có thể liên kết với các thụ thể bề mặt tế bào hoặc nền ngoại bào bị ảnh hưởng quanh khối u. Các nuclit phóng xạ gắn với các peptit này (ví dụ, RGDs) cuối cùng sẽ tiêu diệt tế bào ung thư nếu nuclit phân rã trong vùng lân cận của tế bào. Ví dụ về liệu pháp này bao gồm BEXXAR®.

Sự tạo mạch

Các hợp chất và phương pháp được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến sự tạo mạch. Bệnh có liên quan đến sự tạo mạch bao gồm bệnh ung thư, bệnh tim mạch và thoái hóa điểm vàng.

Sự tạo mạch là quá trình sinh lý bao gồm sự sinh trưởng của các mạch máu mới từ các mạch đã có. Sự tạo mạch là quá trình sống bình thường trong sự sinh trưởng và phát triển, cũng như trong hàn gắn vết thương và trong mô hạt. Tuy nhiên, nó cũng là bước cơ bản trong sự chuyển hóa khối u từ trạng thái ngủ thành u ác tính. Sự tạo mạch cũng có thể là đích để chống lại bệnh đặc trưng bởi sự phân bố mạch kém hoặc hệ mạch bất thường.

Việc sử dụng các hợp chất đặc hiệu mà ức chế hoặc cảm ứng sự hình thành mạch máu mới trong cơ thể có thể giúp chống lại các bệnh này. Sự có mặt của mạch máu ở những nơi không nên có có thể ảnh hưởng đến các đặc tính cơ học của mô, làm tăng nguy cơ hư hỏng. Việc thiếu mạch máu trong mô phục hồi hoặc mô hoạt động chuyển hóa có thể kìm hãm sự phục hồi hoặc các chức năng chủ yếu khác. Một số bệnh, như chấn thương mạn tính do thiếu máu cục bộ, thường do sự hình thành mạch không đúng hoặc không đầy đủ và có thể được điều trị bằng cách mở rộng cục bộ các mạch máu, nhờ đó mang đến nguồn dinh dưỡng mới cho vị trí cần điều trị, tạo thuận lợi cho sự phục hồi. Các bệnh khác, như thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, có thể do mở rộng cục bộ mạch máu, cản trở các quá trình sinh lý bình thường.

Yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (Vascular endothelial growth factor - VEGF) đã chứng tỏ là yếu tố chính góp phần vào sự tạo mạch, làm tăng số mao mạch trong mạng lưới nhất định. Việc điều chỉnh tăng VEGF là yếu tố chủ yếu mà đáp ứng sinh lý thực

hiện và vai trò của nó trong sự tạo mạch được cho là có thể điều trị các chấn thương mạch. Các nghiên cứu in vitro rõ ràng cho thấy rằng VEGF là chất kích thích hiệu quả sự tạo mạch vì, với sự có mặt của yếu tố sinh trưởng này, các tế bào nội mô được bao bọc sẽ tăng sinh và di trú, cuối cùng là tạo ra các cấu trúc tương tự mao mạch.

Các khối u gây ra sự tăng trưởng mạch máu (sự tạo mạch) bằng cách tiết ra nhiều yếu tố sinh trưởng (ví dụ, VEGF). Các yếu tố sinh trưởng như bFGF và VEGF có thể gây ra sự tăng trưởng mao mạch vào trong khối u, mà nhiều nhà nghiên cứu cho là cung cấp nguồn dinh dưỡng cần thiết, cho phép khối u mở rộng.

Sự tạo mạch là đích điều trị tuyệt vời để điều trị bệnh tim mạch. Đây là quá trình sinh lý hiệu quả làm cơ sở của con đường tự nhiên mà cơ thể đáp ứng với sự giảm cung cấp máu đến các cơ quan sống, tức là tạo ra các mạch máu phụ mới để khắc phục chấn thương do thiếu máu cục bộ.

Sự biểu hiện VEGF quá mức làm tăng độ thấm thấu của mạch máu ngoài ra kích thích sự tạo mạch. Ở bệnh thoái hóa điểm vàng ướt, VEGF gây ra sự tăng sinh mao mạch vào trong võng mạc. Do việc tăng cường sự tạo mạch cũng gây ra phù, máu và dịch võng mạc khác dò rỉ vào trong võng mạc, gây mất thị lực.

Liệu pháp chống tạo mạch có thể bao gồm chất ức chế kinaza hướng đến yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF) như sunitinib, sorafenib, hoặc các kháng thể đơn dòng hoặc thụ thể “hấp dẫn” VEGF hoặc thụ thể VEGF bao gồm bevacizumab hoặc VEGF-Trap, hoặc thalidomit hoặc chất tương tự của nó (lenalidomit, pomalidomit), hoặc các tác nhân hướng đến đích tạo mạch không phải VEGF như yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (fibroblast growth factor - FGF), angiopoietin, hoặc angiostatin hoặc endostatin.

Ngoại di truyền

Các hợp chất và phương pháp được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến ngoại di truyền. Ngoại di truyền là nghiên cứu về các biến đổi di truyền về kiểu hình hoặc biểu hiện gen do các cơ chế không phải biến đổi khác gây ra trên trình tự ADN cơ sở. Một ví dụ về biến đổi ngoại di truyền trong sinh học sinh vật nhân điển hình là quá trình biệt hóa tế bào. Trong giai đoạn phát sinh hình thái, các tế bào mầm trở thành các dòng tế bào khác của phôi mà lần lượt trở thành các tế bào được biệt hóa hoàn toàn. Nói cách khác, một

tế bào trứng được thụ tinh duy nhất biến đổi thành nhiều loại tế bào bao gồm tế bào thần kinh, tế bào cơ, biểu mô, mạch máu v.v. khi nó liên tục phân chia. Tế bào trứng hoạt động như vậy bằng cách hoạt hóa một số gen trong khi lại ức chế một số khác.

Các biến đổi ngoại di truyền được bảo tồn khi tế bào phân chia. Hầu hết các biến đổi ngoại di truyền chỉ xảy ra trong thời gian tồn tại của một cá thể sinh vật, nhưng, nếu một đột biến ADN được gây ra trong tinh trùng hoặc tế bào trứng mà sau đó thụ tinh, thì một số biến đổi ngoại di truyền được di truyền từ thế hệ này sang thế hệ kế tiếp. Các quy trình ngoại di truyền đặc hiệu bao gồm cận đột biến, bộ nhớ di truyền, in dấu di truyền khác của teratogen, điều hòa sự cải biến histon và điều hòa dị nhiễm sắc, và các hạn chế về kỹ thuật ảnh hưởng đến sinh sản đơn tính và tách dòng.

Ví dụ về các bệnh có liên quan đến ngoại di truyền bao gồm hội chứng ATR, hội chứng nhiễm sắc thể X dễ gãy, hội chứng ICF, hội chứng Angelman, hội chứng Prader-Wills, BWS, hội chứng Rett, bệnh thiếu máu tán huyết α , bệnh ung thư, bệnh bạch cầu, hội chứng Rubinstein-Taybi và hội chứng Coffin-Lowry.

Bệnh đầu tiên ở người có liên quan đến ngoại di truyền là ung thư. Các nhà nghiên cứu đã phát hiện rằng mô bị bệnh từ bệnh nhân ung thư kết-trục tràng ít methyl hóa ADN hơn so với mô bình thường từ cùng bệnh nhân. Do các gen được methyl hóa thường chuyển sang trạng thái không hoạt động, sự thiếu hụt methyl hóa ADN có thể gây ra sự hoạt hóa gen cao bất thường bằng cách thay đổi sự sắp xếp chất nhiễm sắc. Mặt khác, methyl hóa quá nhiều có thể làm mất hoạt tính bảo vệ của các gen kìm hãm khối u.

Sự methyl ADN xảy ra ở các vị trí CpG, và phần lớn xytosin CpG được methyl hóa ở động vật có vú. Tuy nhiên, có sự duỗi thẳng ADN gần vùng khởi đầu mà có mật độ vị trí CpG cao hơn (gọi là đảo CpG) không methyl hóa trong tế bào bình thường. Các đảo CpG trở nên bị methyl hóa quá mức trong các tế bào ung thư, nhờ đó tạo ra các gen mà không cam và không hoạt động. Sự bất thường này là sự thay đổi loại ngoại di truyền xảy ra trong các khối u và xảy ra sớm trong quá trình phát triển bệnh ung thư. Sự methyl hóa các đảo CpG ở mức cao có thể gây ra các khối u bằng cách bất hoạt các gen kìm hãm khối u. Thực tế, các loại thay đổi này có thể phổ biến hơn ở các bệnh ung thư ở người so với các đột biến trình tự ADN.

Hơn nữa, mặc dù các thay đổi ngoại di truyền không làm thay đổi trình tự ADN, chúng có thể gây ra đột biến. Một nửa trong số các gen gây ra các dạng ung thư gia

đỉnh hoặc di truyền bị bất hoạt bởi methyl hóa. Hầu hết các gen này thường kìm hãm sự hình thành khối u và giúp phục hồi ADN, bao gồm O6-methylguanin-ADN methyltransferaza (MGMT), chất ức chế kinaza phụ thuộc MLH1 cyclin 2B (CDKN2B), và RASSF1A. Ví dụ, sự methyl hóa đoạn khởi đầu MGMT ở mức cao làm tăng số đột biến G thành A.

Sự methyl hóa ở mức cao cũng có thể dẫn đến sự bất ổn của các tiểu vệ tinh (microsatellite), là các trình tự ADN lặp lại. Các tiểu vệ tinh phổ biến ở các cá nhân bình thường, và chúng thường gồm các đoạn dinucleotit CA lặp lại. Methyl hóa quá nhiều tại đoạn khởi đầu gen phục hồi ADN MLH1 có thể làm cho tiểu vệ tinh không ổn định và kéo dài hoặc rút ngắn nó. Sự bất ổn Microsatellite có liên quan đến nhiều bệnh ung thư, bao gồm ung thư kết-trực tràng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư buồng trứng, và ung thư dạ dày.

Hội chứng nhiễm sắc thể X dễ gãy là bất thường về trí tuệ di truyền phổ biến nhất, đặc biệt là ở đàn ông. Cả hai giới có thể bị mắc tình trạng bệnh lý này, nhưng do đàn ông chỉ có một nhiễm sắc thể X, một nhiễm sắc thể X dễ gãy sẽ ảnh hưởng đến họ nghiêm trọng hơn. Thực tế, hội chứng nhiễm sắc thể X dễ gãy xảy ra đối với khoảng 1 trong số 4.000 đàn ông và 1 trong số 8.000 phụ nữ. Người mắc hội chứng này gặp phải những bất thường về trí tuệ nghiêm trọng, chậm phát triển ngôn ngữ, và biểu hiện “giống tự kỷ”.

Hội chứng nhiễm sắc thể X dễ gãy được gọi như vậy do hình thái của phần nhiễm sắc thể X chứa gen bất thường dưới kính hiển vi; phần này thường như đang treo trên dây và dễ gãy. Hội chứng này do bất thường ở gen FMR1 (fragile X mental retardation 1) gây ra. Người không mắc hội chứng nhiễm sắc thể X dễ gãy có 6 đến 50 đoạn trinucleotit CGG lặp lại trong gen FMR1 của họ. Tuy nhiên, các cá nhân có trên 200 đoạn lặp bị đột biến hoàn toàn, và họ thường biểu hiện các triệu chứng của hội chứng này. Quá nhiều CGG làm cho các đảo CpG ở vùng khởi đầu của gen FMR1 bị methyl hóa; trong điều kiện bình thường, chúng không bị như vậy. Sự methyl hóa này bất hoạt gen, ngăn gen FMR1 tạo ra một protein quan trọng gọi là protein chậm phát triển tâm thần do nhiễm sắc thể X dễ gãy. Việc mất protein đặc hiệu này gây ra hội chứng nhiễm sắc thể X dễ gãy. Mặc dù đột biến mở rộng CGG đã được quan tâm nhiều dưới dạng nguyên nhân của hội chứng nhiễm sắc thể X dễ gãy, thay đổi ngoại di truyền có liên quan đến sự methyl hóa FMR1 mới là nguyên nhân thực sự của hội chứng này.

Hội chứng nhiễm sắc thể X dễ gây không phải là rối loạn duy nhất có liên quan đến chậm phát triển trí tuệ mà bao gồm các thay đổi ngoại di truyền. Các tình trạng bệnh lý khác như vậy bao gồm các hội chứng Rubenstein-Taybi, Coffin-Lowry, Prader-Willi, Angelman, Beckwith-Wiedemann, ATR-X, và Rett.

Các liệu pháp ngoại di truyền bao gồm chất ức chế enzyme kiểm soát các cải biến ngoại di truyền, đặc biệt là ADN methyltransferaza và histon deacetylaza, đã thể hiện các tác dụng chống sinh khối u tiềm năng đối với một số u ác tính, cũng như các oligonucleotit đối nghĩa và siARN.

Liệu pháp miễn dịch

Theo một số phương án, hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả được sử dụng kèm liệu pháp miễn dịch. Liệu pháp miễn dịch ung thư chỉ tập hợp các chiến lược điều trị khác nhau được thiết kế để kích thích hệ miễn dịch của chính bệnh nhân chống lại khối u. Các phương pháp hiện có để tạo ra đáp ứng miễn dịch chống khối u bao gồm liệu pháp miễn dịch bơm BCG trong bàng quang đối với bệnh ung thư bàng quang nông, vaccin Provenge cho bệnh ung thư tuyến tiền liệt, và sử dụng interferon và các xytokin khác để kích thích đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân caxinom tế bào thận và u hắc tố.

Cấy ghép tế bào gốc tạo máu dị ghép có thể được xem là một loại liệu pháp miễn dịch, vì tế bào miễn dịch của người cho thường tấn công khối u nhờ tác dụng ghép-chống-khối u. Theo một số phương án, tác nhân dùng trong liệu pháp miễn dịch có thể được dùng kết hợp với hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả.

Liệu pháp hormon

Theo một số phương án, hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả được dùng kèm với liệu pháp hormon. Sự phát triển một số bệnh ung thư có thể bị ức chế bằng cách cung cấp hoặc ngăn chặn các hormon nhất định. Ví dụ phổ biến về các khối u nhạy với hormon bao gồm các loại ung thư vú và ung thư tuyến tiền liệt nhất định, cũng như các loại bệnh bạch cầu nhất định mà đáp ứng với các retinoit/axit retinoic nhất định. Việc loại trừ hoặc ngăn chặn estrogen hoặc testosterone thường là phương pháp điều trị bổ sung quan trọng. Đối với các bệnh ung thư nhất định, việc sử dụng chất chủ vận hormon, như progestogen có thể có lợi trong điều trị. Theo một số phương án, các tác nhân dung trong liệu pháp hormon có thể được sử dụng kết hợp với hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả.

Các tác nhân dùng trong liệu pháp hormon bao gồm chất chủ vận hormon hoặc chất đối kháng hormon và bao gồm các retinoit/ axit retinoic, các hợp chất mà ức chế estrogen hoặc testosterone, cũng như sử dụng progestogen.

Viêm và bệnh tự miễn

Các hợp chất và phương pháp được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến viêm, đặc biệt ở người và động vật có vú khác. Hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả có thể được sử dụng trước khi khởi phát, tại thời điểm khởi phát, hoặc sau khi bắt đầu viêm. Khi sử dụng để phòng bệnh, tốt hơn nếu các hợp chất được dùng trước đáp ứng hoặc triệu chứng viêm bất kỳ. Việc sử dụng các hợp chất này có thể ngăn ngừa hoặc làm giảm đáp ứng hoặc triệu chứng viêm. Ví dụ về các tình trạng viêm bao gồm, ví dụ, đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, bệnh thoái hóa khớp, bệnh khớp cột sống, các bệnh viêm khớp huyết thanh âm tính khác, đau đa cơ do thấp khớp, nhiều loại viêm mạch khác nhau (ví dụ, viêm động mạch tế bào khổng lồ, viêm mạch ANCA+), viêm khớp do bệnh gút, luput ban đỏ hệ thống, viêm khớp ở thiếu niên, viêm khớp dạng thấp ở thiếu niên, viêm xương khớp, bệnh loãng xương, đái tháo đường (ví dụ, bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin hoặc bệnh đái tháo đường khởi phát ở tuổi thiếu niên), đau bụng kinh, xơ nang, bệnh viêm ruột, hội chứng kích ứng ruột, bệnh Crohn, viêm đại tràng niêm dịch, viêm loét đại tràng, viêm dạ dày, viêm thực quản, viêm tụy, viêm phúc mạc, bệnh Alzheimer, sốt, viêm cột sống dính khớp, viêm dạ dày, viêm kết mạc, viêm tụy (cấp hoặc mạn tính), hội chứng thương tổn đa cơ quan (ví dụ, sau nhiễm trùng huyết hoặc chấn thương), nhồi máu cơ tim, xơ vữa động mạch, đột quỵ, thương tổn tái tưới máu (ví dụ, do sử dụng tim phổi nhân tạo hoặc lọc thận), viêm cầu thận cấp, thương tổn do nhiệt (tức là, cháy nắng), viêm ruột hoại tử, hội chứng liên quan đến truyền bạch cầu hạt, và/hoặc hội chứng Sjogren. Ví dụ về các tình trạng viêm da bao gồm, ví dụ, chàm, viêm da dị ứng, viêm da tiếp xúc, mày đay, xơ cứng bì, bệnh vẩy nến, và viêm da với các thành phần viêm cấp tính.

Theo một phương án khác, hợp chất hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa dị ứng và các tình trạng hô hấp, bao gồm hen, viêm phế quản, xơ hóa phổi, viêm mũi dị ứng, nhiễm độc oxy, bệnh khí thũng, viêm phế quản mạn tính, hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển, và bệnh phổi tắc

ngheñ mạn tính bất kỳ (COPD). Các hợp chất này có thể được sử dụng để điều trị nhiễm viêm gan mạn tính, bao gồm viêm gan B và viêm gan C.

Ngoài ra, hợp chất hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị bệnh tự miễn và/hoặc viêm có liên quan đến bệnh tự miễn, như bệnh tự miễn mô cơ quan (ví dụ, hội chứng Raynaud), xơ cứng bì, bệnh nhược cơ, thải loại mảnh ghép, sốc nội độc tố, nhiễm trùng máu, bệnh vẩy nến, chàm, viêm da, đa xơ cứng, viêm tuyến giáp tự miễn, viêm màng bồ đào, luput ban đỏ hệ thống, bệnh Addison, bệnh đa tuyến tự miễn (còn gọi là hội chứng đa tuyến tự miễn), và bệnh Grave.

Theo một phương án cụ thể, các hợp chất được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị đa xơ cứng. Theo một khía cạnh cụ thể, hợp chất để điều trị đa xơ cứng là hợp chất 1: (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1-(3,3-difluoroazetidin-1-yl)prop-2-en-1-on).

Liệu pháp hỗn hợp

Theo các phương án nhất định, hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả có thể được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp với các hợp chất khác hữu dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa viêm. Ví dụ về các tác nhân chống viêm bao gồm, ví dụ, steroid (ví dụ, Cortisol, cortison, fludrocortison, prednison, 6[alpha]-methylprednison, triamcinolon, betamethason hoặc dexamethason), các thuốc chống viêm không steroid (NSAIDS (ví dụ, aspirin, acetaminophen, tolmetin, ibuprofen, axit mefenamic, piroxicam, nabumeton, rofecoxib, celecoxib, etodolac hoặc nimesulit). Theo một phương án khác, tác nhân điều trị khác là chất kháng sinh (ví dụ, vancomycin, penicillin, amoxicillin, ampicillin, cefotaxim, ceftriaxon, cefixim, rifampin, metronidazol, doxycyclin hoặc streptomycin). Theo một phương án khác, tác nhân điều trị khác là chất ức chế PDE4 (ví dụ, roflumilast hoặc rolipram). Theo một phương án khác, tác nhân điều trị khác là chất chống histamin (ví dụ, xylizine, hydroxyzine, promethazine hoặc diphenhydramine). Theo một phương án khác, tác nhân điều trị khác là thuốc chống sốt rét (ví dụ, artemisinin, artemete, artesunate, cloroquin phosphate, mefloquine hydrochloride, doxycycline hyclate, proguanil hydrochloride, atovaquone hoặc halofantrine). Theo một phương án, hợp chất khác là drotrecogin alpha.

Ví dụ khác về các tác nhân chống viêm bao gồm, ví dụ, axeclofenac, axemetaxin, axit e-axetamidocaproic, axetaminophen, axetaminosalol, axetanilit, axit axetylsalixylic, S-adenosylmethionin, alclofenac, alclometason, alfentanil, algeston, alylprodin, alminoprofen, aloxiprin, alphaprodin, nhôm bis(axetylsalixylat), amxinonit, amfenac, aminochlorthenoxazin, axit 3-amino-4-hydroxybutyric, 2-amino-4-picolin, aminopropylon, aminopyrin, amixetrin, nhôm salixylat, ampiroxicam, amtolmetin guaxil, anileridin, antipyrin, antrafenin, apazon, beclomethason, bendazac, benorylat, benoxaprofen, benzpiperylon, benzydamin, benzylmorphin, bermoprofen, betamethason, betamethason-17-valerat, bezitramit, [alpha]-bisabolol, bromfenac, p-bromoaxetanilit, axetat của axit 5-bromosalixylic, bromosaligenin, buxetin, axit bucloxic, bucolom, budesonit, bufexamac, bumadizon, buprenorphin, butaxetin, butibufen, butorphanol, carbamazepin, carbiphen, caiprofen, carsalam, chlorobutanol, chloroprednison, chlorthenoxazin, cholin salixylat, xinchophen, xinmetaxin, xiramadol, clidanac, clobetasol, clocortolon, clometaxin, clonitazen, clonixin, clopirac, cloprednol, clove, codein, codein metyl bromua, codein phosphat, codein sulfat, cortison, cortivazol, cropropamit, crotethamit, xyclazoxin, deflazacort, dehydrotestosteron, desomorphin, desonit, desoximetason, dexamethason, dexamethason-21-isonicotinat, dexoxadrol, dextromoramit, dextropropoxyphen, deoxycorticosteron, dezoxin, diampromit, diamorphon, diclofenac, difenamizol, difenpiramit, diflorason, diflucortolon, diflunisal, difluprednat, dihydrocodein, dihydrocodeinon enol axetat, dihydromorphin, dihydroxy nhôm axetylsalixylat, dimenoxadol, dimepheptanol, dimetylthiambuten, dioxaphetyl butyrat, dipipanon, diproxetyl, dipyrone, ditazol, droxicam, emorfazon, axit enfenamic, enoxolon, epirizol, eptazoxin, etersalat, ethenzamit, ethoheptazin, ethoxazen, etylmetylthiambuten, etylmorphin, etodolac, etofenamat, etonitazen, eugenol, felbinac, fenbufen, axit fenclozic, fendosal, fenoprofen, fentanyl, fentiazac, fepradinol, feprazon, floctafenin, fluazacort, flucloronit, axit flufenamic, flumethason, flunisolit, flunixin, flunoxaprofen, fluoxinolon axetonit, fluoxinonit, fluoxinolon axetonit, fluocortin butyl, fluocoitolon, fluoreson, fluorometholon, fluperolon, flupirtin, flupredniden, fluprednisolon, fluproquazon, flurandrenolit, flurbiprofen, fluticason, formocortal, fosfosal, axit gentisic, glafenin, glucametaxin, glycol salixylat, guaiazulen, halcinonit, halobetasol, halometason, haloprednon, heroin, hydrocodon, hydro cortamat,

hydrocortison, hydrocortison axetat, hydrocortison succinat, hydrocortison hemisuccinat, hydrocortison 21-lysinat, hydrocortison xypionat, hydromorphon, hydroxypethidin, ibufenac, ibuprofen, ibuproxam, imidazol salixylat, indomethaxin, indoprofen, isofezolac, isoflupredon, isoflupredon axetat, isoladol, isomethadon, isonixin, isoxepac, isoxicam, ketobemidon, ketoprofen, ketorolac, p-lactophenetit, lefetamin, levalorphan, levorphanol, levophenaxyl-morphan, lofentanil, lonazolac, lornoxicam, loxoprofen, lysin axetylsalixylat, mazipredon, axit meclofenamic, medryson, axit mefenamic, meloxicam, meperidin, meprednison, meptazinol, mesalamin, metazoxin, methadon, methotrimепразин, metylprednisolon, metylprednisolon axetat, metylprednisolon natri succinat, metylprednisolon suleptnat, axit metiazinic, metofolin, metopon, mofebutazon, mofezolac, mometason, morazon, morphin, morphin hydroclorua, morphin sulfat, morpholin salixylat, myrophin, nabumeton, nalbuphin, nalorphan, 1-naphtyl salixylat, naproxen, narxein, nefopam, nicomorphin, nifenazon, axit niflumic, nimesulit, 5'-nitro-2'-propoxyaxetanilit, norlevorphanol, normethadon, normorphan, norpipanon, olsalazin, opium, oxaceprol, oxametaxin, oxaprozin, oxycodon, oxymorphon, oxyphenbutazon, papaveretum, paramethason, paranylin, parsalmit, pentazoxin, perisoxal, phenaxetin, phenadoxon, phenazoxin, phenazopyridin hydroclorua, phenocol, phenoperidin, phenopyrazon, phenomorphan, phenyl axetylsalixylat, phenylbutazon, phenyl salixylat, phenyramidol, piketoprofen, piminodin, pipebuzon, piperylon, pirazolac, piritramit, piroxicam, pirprofen, pranoprofen, prednicarbat, prednisolon, prednison, prednival, prednyliden, proglumetaxin, proheptazin, promedol, propaxetamol, properidin, propiram, propoxyphen, propyphenazon, proquazon, axit protizinic, proxazol, ramifenazon, remifentanil, rimazolium metilsulfat, salaxetamit, salixin, salixylamit, salixylamit axit o-axetic, axit salixylic, axit salixylsulfuric, salsalat, salverin, simetrit, sufentanil, sulfasalazin, sulindac, superoxit dismutaza, suprofen, suxibuzon, talniflumat, tenidap, tenoxicam, terofenamat, tetrandrin, thiazolinobutazon, axit tiaprofenic, tiaramit, tilidin, tinoridin, tixocortol, axit tolfenamic, tolmetin, tramadol, triamxinolon, triamxinolon axetonit, tropesin, viminol, xenbuxin, ximoprofen, zaltoprofen và zomepirac.

Theo một phương án, hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả có thể được sử dụng kèm chất ức chế COX-2 chọn lọc để điều trị hoặc ngăn ngừa viêm. Ví dụ về chất ức

chế COX-2 chọn lọc bao gồm, ví dụ, deracoxib, parecoxib, celecoxib, valdecoxib, rofecoxib, etoricoxib, và lumiracoxib.

Theo một số phương án, hợp chất được đề cập đến được sử dụng kết hợp với anthracyclin hoặc chất ức chế Topo II. Theo các phương án nhất định, hợp chất được đề cập đến được sử dụng kết hợp với Doxorubixin (Dox). Theo các phương án nhất định, hợp chất được đề cập đến được sử dụng kết hợp với bortezomib (và rộng hơn bao gồm carfilzomib). Đã bắt nhờ phát hiện rằng hợp chất được đề cập đến kết hợp với Dox hoặc bortezomib tạo ra tác dụng hiệp đồng (tức là, hơn cả bổ sung).

Nhiễm virus

Các hợp chất và phương pháp được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến nhiễm virus, đặc biệt là ở người và động vật có vú khác. Hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả có thể được sử dụng trước khi khởi phát, tại thời điểm khởi phát, hoặc sau khi bắt đầu nhiễm virus. Khi được dùng để phòng bệnh, tốt hơn nếu các hợp chất này được cung cấp trước khi nhiễm virus bất kỳ hoặc triệu chứng của nó.

Ví dụ về các bệnh do virus bao gồm viêm họng cấp sốt, sốt kết mạc họng, viêm kết giác mạc dịch, viêm dạ dày ruột ở trẻ em, nhiễm Coxsackie, tăng bạch cầu đơn nhân nhiễm khuẩn, u lympho Burkitt, viêm gan cấp, viêm gan mạn tính, xơ gan, caxinom tế bào gan, nhiễm HSV-1 nguyên phát (ví dụ, viêm nước-miệng ở trẻ em, viêm amidan và viêm họng ở người lớn, viêm kết giác mạc), nhiễm HSV-1 tiềm ẩn (ví dụ, lở môi và lở miệng), nhiễm HSV-2 nguyên phát, nhiễm HSV-2 tiềm ẩn, viêm màng não vô khuẩn, tăng bạch cầu đơn nhân nhiễm khuẩn, bệnh thể vùi bệnh thể vùi do virus đại cự bào, sarcoma Kaposi, bệnh tăng sản bạch huyết Castleman, u lympho tràn dịch nguyên phát, bệnh AIDS, cúm, hội chứng Reye, bệnh sởi, viêm não tùy hậu nhiễm, quai bị, thương tổn biểu mô tăng sản (ví dụ, mụn cóc thông thường, mụn cóc dẹt, mụn cóc bàn chân và mụn cóc ở bộ phận sinh dục, u nhú thanh quản, loạn sản thượng bì dạng mụn cóc), caxinom cổ tử cung, caxinom tế bào vảy, viêm tắc thanh quản, viêm phổi, viêm phế quản, cảm, viêm tùy xám, bệnh dại, hội chứng giống cúm, viêm phế quản nghiêm trọng kèm viêm phổi, bệnh sởi Đức, bệnh rubella bẩm sinh, thủy đậu, và bệnh zona thần kinh.

Ví dụ về các mầm bệnh virus bao gồm Adenovirus, Coxsackievirus, Dengue virus, Encephalitis Virus, Epstein-Barr virus, virus viêm gan A, virus viêm gan B, virus viêm gan C, virus Herpes simplex typ 1, virus Herpes simplex typ 2, cytomegalovirus, virus herpes ở người typ 8, virus suy giảm miễn dịch ở người, virus cúm, virus sởi, virus quai bị, virus papilloma ở người, virus Parainfluenza, Poliovirus, virus dại, virus hợp bào hô hấp, virus rubella, virus thủy đậu-zona thần kinh, virus West Nile, Dungee, và virus sốt vàng. Các mầm bệnh virus cũng có thể bao gồm các virus mà gây ra nhiễm virus kháng thuốc.

Các thuốc kháng virus thuộc họ được phẩm sử dụng đặc hiệu để điều trị nhiễm virus. Hoạt tính kháng virus thường theo ba cơ chế sau: cản trở khả năng thâm nhiễm của virus vào tế bào đích (ví dụ, amantadin, rimantadin và pleconaril), ức chế sự tổng hợp virus (ví dụ, các chất tương tự nucleosit, ví dụ, axyclovir và zidovudin (AZT), và ức chế sự giải phóng virus (ví dụ, zanamivir và oseltamivir).

Nhãn khoa

Các hợp chất và phương pháp được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn nhãn khoa. Ví dụ về các rối loạn nhãn khoa bao gồm phù hoàng điểm (phù hoàng điểm liên quan đến đái tháo đường và không liên quan đến đái tháo đường), thoái hóa điểm vàng do tuổi tác dạng ướt và dạng khô, thoái hóa điểm vàng dạng đĩa do tuổi tác, phù hoàng điểm dạng nang, phù mi mắt, phù võng mạc, bệnh võng mạc do đái tháo đường, bệnh hắc võng mạc, bệnh lý hoàng điểm tân mạch, tăng nhãn áp tân mạch, viêm màng bồ đào, viêm móng mắt, viêm mạch võng mạc, viêm nội nhãn, viêm toàn nhãn, viêm mắt lan tỏa, viêm màng mạch, viêm biểu mô sắc tố võng mạc, viêm kết mạc, viêm thể mi, viêm củng mạc, viêm thượng củng mạc, viêm dây thần kinh thị giác, viêm dây thần kinh thị giác hậu nhãn, viêm giác mạc, viêm bờ mi, bong võng mạc xuất tiết, loét giác mạc, loét kết mạc, viêm giác mạc hình đồng tiền mạn tính, bệnh nhãn khoa liên quan đến giảm oxy huyết hoặc thiếu máu cục bộ, bệnh võng mạc trẻ sinh non, bệnh võng mạc đái tháo đường tăng sinh, bệnh màng mạch polyp, tăng sinh mạch máu võng mạc, thuyên tắc động mạch võng mạc, thuyên tắc tĩnh mạch võng mạc, bệnh Coats, bệnh võng mạc-dịch kính xuất tiết di truyền, bệnh vô mạch (bệnh Takayasu), bệnh Eales, hội chứng kháng thể kháng phospholipid, bệnh võng mạc bạch cầu, hội chứng tăng độ nhớt máu, bệnh

macroglobulin huyết, bệnh võng mạc liên quan đến interferon, bệnh võng mạc do tăng huyết áp, bệnh võng mạc do chiếu xạ, thiếu hụt tế bào mầm biểu mô võng mạc hoặc đục thủy tinh thể.

Các rối loạn nhãn khoa khác điều trị được bằng các hợp chất và phương pháp được mô tả trong bản mô tả bao gồm bệnh tăng sinh dịch kính võng mạc và bong võng mạc mạn tính.

Các bệnh viêm mắt cũng điều trị được bằng các hợp chất và phương pháp được mô tả trong bản mô tả.

Bệnh thoái hóa thần kinh

Thoái hóa thần kinh là thuật ngữ chung để chỉ sự mất tiến triển cấu trúc hoặc chức năng của tế bào thần kinh, bao gồm chết tế bào thần kinh. Nhiều bệnh thoái hóa thần kinh bao gồm bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, và bệnh Huntington xảy ra do các quá trình thoái hóa thần kinh. Trong quá trình nghiên cứu, nhiều biểu hiện tương tự cho thấy mối liên quan giữa các bệnh này với nhau ở mức độ dưới tế bào. Việc phát hiện những biểu hiện tương tự này tạo ra hy vọng về các đặc điểm có lợi trong trị liệu mà có thể làm thuyên giảm nhiều bệnh cùng lúc. Có nhiều điểm tương đồng giữa các rối loạn thoái hóa thần kinh khác nhau bao gồm các tập hợp protein không bình thường cũng như sự chết tế bào được cảm ứng.

Bệnh Alzheimer đặc trưng bởi sự mất tế bào thần kinh và khớp thần kinh trong vỏ não và các vùng dưới vỏ não nhất định. Sự mất mát này làm teo toàn bộ các vùng bị ảnh hưởng, bao gồm thùy thái dương và thùy đỉnh, và các phần của vỏ não vùng trán và hồi đai.

Bệnh Huntington gây ra tế bào hình sao và mất tế bào thần kinh sống giữa. Các vùng não bị ảnh hưởng theo cấu trúc của chúng và loại tế bào thần kinh chứa trong đó, giảm kích thước khi chúng mất tế bào theo cách tích lũy. Các vùng bị ảnh hưởng chủ yếu là ở thể vân, nhưng cũng có thể ở vỏ não vùng trán và vùng thái dương. Cấu trúc nhân dưới đồi của thể vân gửi các tín hiệu kiểm soát đến cầu nhát, mà khởi động và điều hòa vận động. Các tín hiệu yếu hơn từ cấu trúc nhân dưới đồi do đó gây ra giảm khởi động và điều hòa vận động, dẫn đến các vận động đặc trưng của rối loạn. Ví dụ về thuốc điều trị bệnh Huntington bao gồm tetrabenazin, neuroleptic, benzodiazepin, amantadin, remaxemit, axit valproic, chất ức chế tái hấp thu serotonin chọn lọc

(selective serotonin reuptake inhibitors - SSRIs), mirtazapin và các thuốc chống loạn thần.

Cơ chế mất tế bào não ở bệnh Parkinson có thể bao gồm sự tích tụ bất thường của protein alpha-synuclein liên kết với ubiquitin trong tế bào bị thương tổn. Phức alpha-synuclein-ubiquitin không thể hướng đến proteosom. Sự tích tụ protein này tạo ra các thể vùi protein trong tế bào chất gọi là thể Lewy. Nghiên cứu mới nhất về sinh bệnh học của bệnh này cho thấy rằng sự chết của các tế bào thần kinh dopamin bởi alpha-synuclein là do thiếu cơ chế vận chuyển protein giữa hai bào quan chính —lưới nội chất (endoplasmic reticulum - ER) và bộ máy Golgi. Các proteins nhất định như Rab1 có thể khắc phục sự thiếu hụt này do alpha-synuclein gây ra này ở mô hình động vật. Ví dụ về các thuốc điều trị bệnh Parkinson bao gồm levodopa, chất chủ vận dopamin bao gồm bromocriptin, pergolit, pramipexol, ropinirol, piribedil, cabergolin, apomorphin và lisurit, chất ức chế dopa decarboxylat, chất ức chế MAO-B như selegilen và rasagilen, thuốc kháng phó giao cảm và amantadin.

Bệnh xơ cứng teo cơ một bên (bệnh ALS/Lou Gehrig) là bệnh mà trong đó tế bào thần kinh vận động là đích chọn lọc của thoái hóa. Ví dụ về các thuốc điều trị ALS bao gồm riluzol, baclofen, diazepam, trihexyphenidyl và amitriptylin.

Ví dụ về các liệu pháp thoái hóa thần kinh khác bao gồm oligonucleotit đối nghĩa và tế bào mầm.

Hàn gắn vết thương

Vết thương là một loại tình trạng bệnh lý đặc trưng bởi sự thương tổn tế bào hoặc mô. Hàn gắn vết thương là quá trình chức năng mà dẫn đến một cách tốt nhất sự phục hồi mô nguyên vẹn và chức năng mô. Quá trình hàn gắn vết thương bao gồm ba giai đoạn gối nhau. Giai đoạn đầu tiên là giai đoạn viêm, đặc trưng bởi sự cân bằng nội mô, kết tụ tiểu cầu và thoát bọt. Tiểu cầu là đáp ứng đầu tiên, giải phóng nhiều yếu tố sinh trưởng để thu hút tế bào miễn dịch, tế bào biểu mô, và tế bào nội mô. Giai đoạn viêm thường xảy ra từ ngày 0 đến ngày 5. Giai đoạn thứ hai của hàn gắn vết thương là giai đoạn tăng sinh trong đó đại thực bào và tế bào hạt lan tỏa trong vết thương. Nguyên bào sợi thâm nhập bắt đầu sản xuất collagen. Đặc trưng chính của giai đoạn này là biểu mô hóa, tạo mạch, hình thành mô hạt và sản xuất collagen. Giai đoạn tăng sinh thường xảy ra từ ngày 3 đến ngày 14. Giai đoạn thứ ba là giai đoạn tái tổ chức

trong đó xảy ra quá trình hình thành nên. Nguyên bào sợi, tế bào biểu mô, và tế bào nội mạc tiếp tục sản xuất collagen và collagenaza cũng như metalloprotease (matrix metalloproteases - MMPs) để tái tổ chức. Sự liên kết ngang collagen diễn ra và vết thương co lại. Giai đoạn tái tổ chức thường xảy ra từ ngày thứ 7 đến một năm.

Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để thúc đẩy hàn gắn vết thương (ví dụ, thúc đẩy hoặc tăng tốc độ đóng miệng vết thương và/hoặc hàn gắn vết thương, giảm xơ hóa sẹo của mô vết thương hoặc mô quanh vết thương, ức chế sự chết tế bào theo chương trình của các tế bào bao quanh hoặc gần vết thương). Do đó, bản mô tả mô tả phương pháp để thúc đẩy hàn gắn vết thương ở đối tượng, bao gồm việc cho đối tượng sử dụng hợp chất (ví dụ, chất ức chế CRM1), hoặc muối được dụng hoặc dược phẩm chứa nó. Phương pháp này không cần đạt đến hàn gắn hoặc đóng miệng vết thương hoàn toàn; phương pháp này chỉ cần thúc đẩy mức độ đóng miệng vết thương bất kỳ là đủ. Theo khía cạnh này, phương pháp này có thể được áp dụng một mình hoặc kết hợp với các phương pháp khác để hàn gắn mô bị thương.

Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị vết thương trong giai đoạn viêm (hoặc giai đoạn sớm), trong giai đoạn hàn gắn vết thương nhanh chóng (hoặc giai đoạn giữa), và/hoặc trong giai đoạn hàn gắn vết thương tái tổ chức (hoặc giai đoạn sau).

Theo một số phương án, đối tượng cần hàn gắn vết thương là người hoặc động vật, ví dụ, ngựa, lợn, hoặc động vật gặm nhấm, như chuột.

Theo một số phương án, các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả hữu dụng để hàn gắn vết thương được sử dụng khu trú, ví dụ, gần vị trí vết thương, hoặc toàn thân.

Cụ thể hơn, hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng (tùy ý kết hợp với các tác nhân khác) ở vị trí vết thương bằng cách phủ lên vết thương hoặc dùng băng, vật liệu bao gói, chỉ khâu, v.v., được phủ hoặc xử lý bằng hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả. Do đó, các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được bào chế để dùng khu trú để điều trị các vết thương bề mặt. Các dạng bào chế dùng khu trú bao gồm các dạng bào chế để phân phối qua đường miệng (trong má) và trên da như lớp da (tức là, biểu bì, hạ bì, và/hoặc lớp dưới da) được cho tiếp xúc với hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô

tả. Các hệ phân phối khu trú có thể được sử dụng để dùng khu trú các dạng bào chế chứa các hợp chất và được phẩm được mô tả trong bản mô tả.

Theo cách khác, các hợp chất và được phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng tại hoặc gần vị trí vết thương bằng cách, ví dụ, tiêm dung dịch, tiêm dạng bào chế giải phóng kéo dài, hoặc cấy viên cấy phân hủy sinh học chứa hợp chất và được phẩm được mô tả trong bản mô tả.

Các hợp chất và được phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để điều trị các vết thương cấp tính hoặc vết thương mạn tính. Vết thương mạn tính gặp phải khi quá trình phục hồi bình thường bị gián đoạn. Các vết thương mạn tính có thể phát triển từ các chấn thương cấp tính do nhiễm trùng dai dẳng không rõ nguyên nhân hoặc điều trị ban đầu không đủ. Tuy nhiên, trong hầu hết các trường hợp, các thương tổn mạn tính là giai đoạn cuối của sự hư hại mô tiến triển do bệnh tĩnh mạch, bệnh động mạch, hoặc bệnh mạch chuyển hóa, loét do áp lực, thương tổn do phóng xạ, hoặc khối u.

Đối với các vết thương mạn tính, sự hàn gắn không xảy ra do nhiều lý do khác nhau, bao gồm tuần hoàn bất thường ở loét do đái tháo đường, hoại tử nghiêm trọng, như bong, và nhiễm trùng. Đối với các vết thương mạn tính này, khả năng sống hoặc giai đoạn phục hồi thường là bước có tốc độ hạn chế. Tế bào không sống được và do đó giai đoạn phục hồi ban đầu bị kéo dài do môi trường không có lợi cho vết thương.

Các vết thương mạn tính bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các vết thương sau: thương tổn da do thiếu máu cục bộ mạn tính; loét do xơ cứng bì; loét động mạch; loét bàn chân do đái tháo đường; loét do áp lực; loét tĩnh mạch; vết thương chi dưới không hàn gắn; loét do tình trạng viêm; và/hoặc vết thương lâu lành.

Theo một phương án cụ thể, các hợp chất và được phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để hàn gắn vết thương do đái tháo đường hoặc tăng tốc độ hàn gắn vết loét cẳng chân và bàn chân do đái tháo đường hoặc thiếu máu cục bộ ở đối tượng.

Theo một phương án, vết thương là vết thương bề mặt. Theo một phương án khác, vết thương vết thương do phẫu thuật (ví dụ, vết thương do phẫu thuật ổ bụng hoặc dạ dày ruột). Theo một phương án khác, vết thương là vết bong. Theo một phương án khác nữa, vết thương là do phơi nhiễm phóng xạ.

Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả cũng có thể được sử dụng để hàn gắn vết thương do đái tháo đường, hàn gắn vết thương dạ dày ruột, hoặc để làm lành vết dính, ví dụ, do phẫu thuật.

Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả cũng có thể được sử dụng hàn gắn vết thương do bệnh khác. Ví dụ, đối với bệnh viêm da, như bệnh vẩy nến và viêm da, có nhiều trường hợp thương tổn da do bệnh, và do da nứt sâu, hoặc da xước gây ra. Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để hàn gắn vết thương do những bệnh này gây ra, ví dụ, bệnh viêm da, như bệnh vẩy nến và viêm da.

Theo một phương án khác, vết thương là vết thương bên trong. Theo một khía cạnh cụ thể, vết thương bên trong là vết thương mạn tính. Theo một khía cạnh cụ thể khác, vết thương vết thương ở mạch. Theo một khía cạnh cụ thể khác nữa, vết thương bên trong vết loét.

Ví dụ về vết thương bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trầy da, lột da, vết thương do nổ (tức là, tràn khí màng phổi hở), vết thương do bỏng, bầm tím, vết thương do súng bắn, vết thương do cắt, vết thương hở, vết thương sâu, vết thương viền răng cưa, vết thương thủng, vết thương đâm xuyên, vết thương do dao đâm, vết thương do phẫu thuật, vết thương dưới da, thương tổn do đái tháo đường, hoặc vết thương lộn xộn. Ví dụ khác về vết thương mà có thể được điều trị bằng các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả bao gồm các tình trạng bệnh lý hoặc vết thương cấp tính, như bỏng nhiệt, bỏng hóa chất, bỏng phóng xạ, bỏng do tiếp xúc với bức xạ cực tím quá nhiều (ví dụ, cháy nắng); thương tổn mô cơ thể, như thương tổn vùng đáy chậu do lao động và sinh con; thương tổn gặp phải trong quy trình y tế, như rách đáy chậu; thương tổn do chấn thương bao gồm cắt, rách, tuột da; chấn thương do tai nạn; chấn thương sau phẫu thuật, cũng như các tình trạng bệnh lý mạn tính, như loét do áp lực, loét do nằm lâu, các tình trạng bệnh lý liên quan đến đái tháo đường và tuần hoàn kém, và tất cả các loại mụn trứng cá. Ngoài ra, vết thương có thể bao gồm viêm da, như chốc da, viêm kẽ, viêm chân lông và chàm, các vết thương sau phẫu thuật nha khoa; bệnh nha chu; các vết thương sau chấn thương; và vết thương liên quan đến khối u. Ví dụ khác về vết thương bao gồm vết động vật cắn, bệnh động mạch, côn trùng đốt và cắn, nhiễm trùng xương, mảnh ghép da/xương bị thương tổn, hoại tử, rách hoặc trót

da, lão hóa da, vết mổ, bao gồm vết thương do phẫu thuật chậm hoặc không liền, xuất huyết nội sọ, phình mạch, suy nhược da, và nhiễm trùng hậu phẫu.

Theo các phương án được ưu tiên, vết thương được chọn từ nhóm gồm vết thương do bỏng, vết thương do cắt, vết thương hở, vết thương do phẫu thuật hoặc sau phẫu thuật, thương tổn do đài tháo đường, bỏng nhiệt, bỏng hóa chất, bỏng phóng xạ, loét do áp lực, loét do nằm, và tình trạng bệnh lý liên quan đến đài tháo đường hoặc tuần hoàn kém.

Bản mô tả cũng đề cập đến phương pháp và dược phẩm là giảm hình thành sẹo trong quá trình hàn gắn vết thương ở đối tượng. Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng trực tiếp cho vết thương hoặc tế bào gắn vết thương với lượng hữu hiệu để giảm hình thành sẹo trên và/hoặc quanh vết thương.

Vết thương có thể bao gồm chấn thương bất kỳ ở bộ phận bất kỳ của cơ thể đối tượng. Bản mô tả cũng bộc lộ, phương pháp làm thuyên giảm hoặc giảm khả năng hình thành sẹo ở đối tượng bị chấn thương do bỏng. Bản mô tả cũng bộc lộ, phương pháp điều trị, làm giảm khả năng xảy ra, hoặc giảm xác suất phát triển sẹo phì đại ở đối tượng bị vết thương hoặc chấn thương cấp hoặc mạn tính.

Các rối loạn khác

Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả cũng có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn sinh trưởng mô bất thường và xơ hóa bao gồm bệnh cơ tim giãn, bệnh cơ tim phì đại, bệnh cơ tim hạn chế, xơ hóa phổi, xơ gan, viêm cầu thận, và các rối loạn thận khác.

Xạ trị kết hợp

Các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả hữu dụng làm chất nhạy phóng xạ. Do đó, các hợp chất và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng kết hợp với xạ trị. Xạ trị là việc sử dụng bức xạ năng lượng cao trong y học (ví dụ, tia X, tia gamma, hạt tích điện) để thu nhỏ khối u và tiêu diệt tế bào u ác tính, và nói chung được sử dụng như một phần của phương pháp điều trị bệnh ung thư. Xạ trị tiêu diệt tế bào u ác tính bằng cách phá hủy ADN của chúng.

Xạ trị có thể dùng cho bệnh nhân theo nhiều cách. Ví dụ, bức xạ có thể được phân phối từ nguồn bên ngoài, như máy bên ngoài cơ thể bệnh nhân, như trong xạ trị

bằng tia bên ngoài. Phương pháp xạ trị bằng tia bên ngoài để điều trị bệnh ung thư sử dụng nguồn bức xạ nằm bên ngoài cơ thể bệnh nhân, thường là đồng vị phóng xạ, như ^{60}Co , ^{137}Cs , hoặc nguồn tia X năng lượng cao, như máy gia tốc tuyến tính. Nguồn bên ngoài tạo ra tia chuẩn trực hướng vào vị trí khối u trong cơ thể bệnh nhân. Xạ trị nguồn bên ngoài tránh được một số vấn đề của xạ trị nguồn bên trong, nhưng nó thường chiếu xạ cả thể tích đáng kể mô khỏe mạnh hoặc không phải khối u cùng với mô khối u trên đường đi của tia xạ một cách không mong muốn và không cần thiết.

Tác dụng bất lợi của việc chiếu xạ đến mô khỏe mạnh có thể giảm, trong khi vẫn duy trì liều bức xạ đã cho trong mô khối u, bằng cách chiếu tia bức xạ bên ngoài vào bệnh nhân ở những góc “giá đỡ” khác nhau với tia xạ hội tụ vào vị trí khối u. Các yếu tố thể tích đặc biệt của mô khỏe mạnh, dọc theo đường đi của tia xạ, thay đổi làm giảm liều tổng đến từng yếu tố của mô khỏe mạnh trong toàn bộ quá trình điều trị.

Việc chiếu xạ mô khỏe mạnh cũng có thể giảm bằng cách chuẩn trực chặt chẽ tia xạ đến tiết diện ngang chung của khối u vuông góc với trục của tia xạ. Có một số hệ thống để tạo ra sự chuẩn trực chu vi, một số trong đó sử dụng nhiều cửa sập trượt mà, từng phần, có thể tạo ra tám chắn bức xạ với hình dạng bất kỳ.

Để sử dụng tia xạ ngoài, lượng các phân đoạn có thể ít nhất khoảng 1 Gray (Gy) dùng ít nhất một lần mỗi ngày cho thể tích điều trị. Theo một phương án cụ thể, bức xạ được sử dụng với lượng các phân đoạn ít nhất khoảng 2 Gray (Gy) dùng ít nhất mỗi ngày một lần cho thể tích điều trị. Theo một phương án cụ thể khác, bức xạ được sử dụng với lượng các phân đoạn ít nhất khoảng 2 Gray (Gy) dùng ít nhất mỗi ngày một lần cho thể tích điều trị trong 5 ngày liên tiếp mỗi tuần. Theo một phương án cụ thể khác, bức xạ được sử dụng với các phân đoạn 10 Gy hai ngày một lần, ba lần một tuần cho thể tích điều trị. Theo một phương án cụ thể khác, tổng ít nhất 20 Gy được sử dụng cho bệnh nhân khi cần. Theo một phương án cụ thể khác, ít nhất khoảng 30 Gy được sử dụng cho bệnh nhân khi cần. Theo một phương án cụ thể khác, ít nhất khoảng 40 Gy được sử dụng cho bệnh nhân khi cần.

Thông thường, bệnh nhân xạ trị tia ngoài bốn hoặc năm lần mỗi tuần. toàn bộ khóa điều trị thường kéo dài từ một đến bảy tuần tùy thuộc vào loại bệnh ung thư và mục đích điều trị. Ví dụ, bệnh nhân có thể dùng liều 2 Gy/ngày trong 30 ngày.

Xạ trị bên trong là xạ trị khu trú, nghĩa là nguồn bức xạ được đặt ở vị trí khối u hoặc vùng bị ảnh hưởng. Xạ trị bên trong có thể được phân phối bằng cách đặt nguồn

bức xạ trong hoặc cạnh vùng cần điều trị. Xạ trị bên trong còn gọi là liệu pháp phóng xạ gần. Liệu pháp phóng xạ gần bao gồm việc điều trị trong hốc và trong kẽ. Ở điều trị trong hốc, vật chứa mà đựng nguồn bức xạ được đặt trong hoặc cần khối u. Nguồn này được đặt vào các khoang cơ thể. Ở điều trị trong kẽ, nguồn phóng xạ đơn độc được đặt trong khối u. Các nguồn phóng xạ này có thể lưu trong cơ thể bệnh nhân lâu dài. Thông thường, nguồn phóng xạ được loại bỏ khỏi cơ thể bệnh nhân sau vài ngày. Nguồn phóng xạ nằm trong vật chứa.

Có một số phương pháp sử dụng tác nhân điều trị phóng xạ. Ví dụ, tác nhân điều trị phóng xạ có thể được sử dụng bằng cách phân phối hướng đích hoặc phân phối toàn thân các thể tiếp hợp phóng xạ hướng đích, như kháng thể đánh dấu phóng xạ, peptit đánh dấu phóng xạ và hệ phân phối liposom. Theo một phương án cụ thể về phân phối hướng đích, tác nhân điều trị đánh dấu phóng xạ có thể là kháng thể đánh dấu phóng xạ. Xem tài liệu, ví dụ, Ballangrud A. M., et al. *Cancer Res.*, 2001; 61:2008-2014 và Goldenber, D.M. *J. Nucl. Med.*, 2002; 43(5):693-713, nội dung của các tài liệu này được kết hợp bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án cụ thể khác về phân phối hướng đích, tác nhân điều trị phóng xạ có thể được sử dụng ở dạng hệ phân phối liposom, như các nang một lớp nhỏ, nang một lớp lớn và nang nhiều lớp. Liposom có thể được tạo ra từ nhiều phospholipid khác nhau, như cholesterol, stearylamin hoặc phosphatidylcholin. Xem tài liệu, ví dụ, Emfietzoglou D, Kostarelos K, Sgouros G. An analytical dosimetry study for the use of radionuclide-liposome conjugates in internal radiotherapy. *J Nucl Med* 2001; 42:499-504, nội dung của tài liệu này được kết hợp bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án cụ thể khác nữa về phân phối hướng đích, tác nhân điều trị đánh dấu phóng xạ có thể là peptit đánh dấu phóng xạ. Xem tài liệu, ví dụ, Weiner RE, Thakur ML. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. *Appl Radiat Isot* 2002 Nov;57(5):749-63, nội dung của tài liệu này được kết hợp bằng cách viện dẫn.

Ngoài phân phối hướng đích, liệu pháp phóng xạ gần còn có thể được sử dụng để phân phối tác nhân điều trị phóng xạ đến vị trí đích. Liệu pháp phóng xạ gần là kỹ thuật đặt nguồn bức xạ càng gần vị trí khối u càng tốt. Thường thì nguồn được đặt trực tiếp vào trong khối u. Nguồn phóng xạ có thể ở dạng dây, hạt hoặc thanh. Nói chung, xesi, iridi hoặc iot được sử dụng.

Xạ trị toàn thân là loại xạ trị khác và bao gồm việc sử dụng các chất phóng xạ trong máu. Xạ trị toàn thân là dạng liệu pháp hướng đích. Trong xạ trị toàn thân, bệnh nhân thường được cho ăn hoặc tiêm chất phóng xạ, như iot phóng xạ hoặc chất phóng xạ liên kết với kháng thể đơn dòng.

Thuật ngữ “tác nhân điều trị phóng xạ,” như được xác định trong bản mô tả, chỉ tác nhân điều trị chứa ít nhất một đồng vị phóng xạ phát ra bức xạ. Tác nhân điều trị phóng xạ thường được sử dụng trong y học hạt nhân để chẩn đoán và/hoặc điều trị nhiều bệnh khác nhau. Tác nhân điều trị đánh dấu phóng xạ, ví dụ, kháng thể đánh dấu phóng xạ, chứa đồng vị phóng xạ (radioisotope - RI) đóng vai trò nguồn bức xạ. Theo tinh thần của bản mô tả, thuật ngữ “đồng vị” bao gồm các đồng vị kim loại và phi kim. Đồng vị được chọn dựa trên ứng dụng trong y tế của tác nhân điều trị đánh dấu phóng xạ. Nếu đồng vị là đồng vị kim loại, chất tạo chelat thường được sử dụng để liên kết đồng vị kim loại với phần còn lại của phân tử. Nếu đồng vị là đồng vị phi kim, đồng vị phi kim thường được liên kết trực tiếp, hoặc qua cầu nối liên kết, với phần còn lại của phân tử.

Như được sử dụng trong bản mô tả, “đồng vị kim loại” là đồng vị kim loại bất kỳ thích hợp mà hữu dụng trong quy trình điều trị hoặc chẩn đoán in vivo hoặc in vitro. Các đồng vị thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: Actini-225, Antimon-124, Antimon-125, Arsen-74, Bari-103, Bari-140, Berily-7, Bismut-206, Bismut-207, Bismut-212, Bismut-213, Cadimi-109, Cadimi-115m, Canxi-45, Xeri-139, Xeri-141, Xeri-144, Xesi-137, Crom-51, Coban-55, Coban-56, Coban-57, Coban-58, Coban-60, Coban-64, đồng-60, đồng-62, đồng-64, đồng-67, Erbi-169, Europi-152, Gali-64, Gali-67, Gali-68, Gadolini-153, Gadolini-157, Vàng-195, Vàng-199, Hafini-175, Hafini-175-181, Holmi-166, Indi-110, Indi-111, Iridi-192, sắt-55, sắt-59, Krypton-85, chì-203, chì-210, Luteti-177, Mangan-54, Thủy ngân-197, Thủy ngân-203, Molybden-99, Neodym-147, Neptuni-237, Niken-63, Niobi-95, Osmi-185+191, Paladi-103, Paladi-109, Platin-195m, Praseodym-143, Prometi-147, Prometi-149, Protactini-233, Radi-226, Reni-186, Reni-188, Rubidi-86, Ruteni-97, Ruteni-103, Ruteni-105, Ruteni-106, Samari-153, Scandi-44, Scandi-46, Scandi-47, Selen-75, bạc-110m, bạc-111, Natri-22, Stronti-85, Stronti-89, Stronti-90, Lur huỳnh-35, Tantan-182, Tecneti-99m, Telu-125, Telu-132, Tali-204, Thori-228, Thori-232, Tali-170, thiếc-113, thiếc-114, thiếc-117m,

titan-44, vonfram-185, Vanadi-48, Vanadi-49, Yterbi-169, Ytri-86, Ytri-88, Ytri-90, Ytri-91, kẽm-65, Ziricon-89, và Ziricon-95.

Như được sử dụng trong bản mô tả, “đồng vị phi kim” là đồng vị phi kim bất kỳ thích hợp mà hữu dụng trong quy trình điều trị hoặc chẩn đoán in vivo hoặc in vitro. Các đồng vị phi kim thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: Iot-131, Iot-125, Iot-123, Phospho-32, Astatin-211, Flo-18, Cacbon-11, Oxy-15, Brom-76, và Nitơ-13.

Việc nhận biết loại đồng vị thích hợp nhất để xạ trị đòi hỏi nhiều yếu tố khác nhau. Các yếu tố này bao gồm khả năng hấp thu và lưu trong khối u, độ thanh thải của máu, tốc độ phân phối bức xạ, thời gian bán hủy và hoạt tính đặc hiệu của đồng vị, và khả năng sản xuất ở quy mô lớn của đồng vị xét về mặt kinh tế. Điểm quan trọng đối với một tác nhân điều trị phóng xạ là phân phối lượng cần thiết của liều bức xạ đến tế bào khối u và đạt được tác dụng độc tế bào hoặc chống khối u trong khi không gây ra các tác dụng phụ không kiểm soát được.

Tốt hơn nếu thời gian bán hủy vật lý của đồng vị điều trị tương tự thời gian bán hủy sinh học của tác nhân điều trị phóng xạ ở vị trí khối u. Ví dụ, nếu thời gian bán hủy của đồng vị quá ngắn, sự phân rã sẽ diễn ra nhiều trước khi tác nhân điều trị phóng xạ đạt tỷ lệ đích/nền tối đa. Mặt khác, thời gian bán hủy quá dài có thể gây ra liều bức xạ không cần thiết đối với mô bình thường. Tốt nhất, nếu đồng vị có thời gian bán hủy đủ dài để đạt tỷ lệ liều tối thiểu và để chiếu xạ tất cả các tế bào trong pha nhạy bức xạ nhất của chu kỳ tế bào. Ngoài ra, thời gian bán hủy của đồng vị cũng phải đủ dài để có đủ thời gian sản xuất, giải phóng, và vận chuyển.

Các cân nhắc thực tế khác khi chọn đồng vị để ứng dụng trong điều trị khối u là tính sẵn có và chất lượng. Độ tinh khiết phải đủ và đồng đều, vì lượng vết tạo chất có thể ảnh hưởng đến việc đánh dấu phóng xạ và độ tinh khiết hóa phóng xạ của tác nhân điều trị phóng xạ.

Số các vị trí thụ thể đích ở khối u thường hạn chế. Do đó, tốt hơn nếu đồng vị có hoạt tính đặc hiệu cao. Hoạt tính đặc hiệu tùy thuộc trước tiên vào phương pháp sản xuất. Tạp chất kim loại với lượng vết phải được tối thiểu hóa vì chúng thường cạnh tranh với đồng vị để gắn với chất tạo chelat và phức kim loại của chúng cạnh tranh để liên kết thụ thể với tác nhân chelat hóa đánh dấu phóng xạ.

Loại bức xạ thích hợp để sử dụng trong các phương pháp bộc lộ trong bản mô tả có thể thay đổi. Ví dụ, bức xạ có thể có bản chất điện từ hoặc bản chất hạt. Bức xạ điện

từ hữu dụng để thực hành sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tia X và tia gamma. Bức xạ hạt hữu dụng để thực hành sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tia electron (hạt beta), tia proton, tia neutron, hạt alpha, và hạt meson pi mang điện âm. Bức xạ có thể được phân phối bằng cách sử dụng các thiết bị và phương pháp điều trị phóng xạ thông thường, và bằng các phương pháp trong phẫu thuật và phương pháp sinh thiết. Thảo luận khác về phương pháp điều trị bằng bức xạ thích hợp để thực hành sáng chế có thể xem trong tài liệu của Steven A. Leibel et al., *Textbook of Radiation Oncology* (1998) (publ. W. B. Saunders Company), và đặc biệt ở các chương 13 và 14. Bức xạ cũng có thể được phân phối bằng các phương pháp khác như phân phối hướng đích, ví dụ bằng "hạt" có hoạt tính phóng xạ hoặc phân phối toàn thân qua thể tiếp hợp hướng đích có hoạt tính phóng xạ. J. Padawer et al., *Combined Treatment with Radioestradiol lucanthone in Mouse C3HBA Mammary Adenocarcinoma and with Estradiol lucanthone in an Estrogen Bioassay*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 7:347-357 (1981). Các phương pháp phân phối bức xạ khác có thể được sử dụng để thực hành sáng chế.

Đối với việc điều trị khối u, cả chất phát xạ α và hạt β đều đã được nghiên cứu. Hạt alpha particles đặc biệt tốt làm tác nhân độc tế bào do chúng tiêu hao lượng lớn năng lượng trong phạm vi một hoặc hai lần đường kính tế bào. Chất phát xạ hạt β có khoảng đâm xuyên tương đối sâu (2-12mm trong mô) tùy thuộc vào mức năng lượng. Khả năng đâm xuyên sâu là đặc biệt quan trọng đối với các khối u rắn mà có dòng máu không đồng nhất và/hoặc biểu hiện thụ thể. Chất phát xạ hạt β tạo ra khả năng phân phối liều đồng nhất hơn ngay cả khi chúng được phân bố không đồng nhất trong mô đích.

Theo một phương án cụ thể, lượng hữu hiệu để điều trị của các hợp chất và được phẩm được mô tả trong bản mô tả được sử dụng kết hợp với lượng hữu hiệu điều trị của xạ trị để điều trị bệnh ung thư (ví dụ, ung thư phổi, như ung thư phổi tế bào không nhỏ). Lượng bức xạ cần thiết có thể xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa trên liều đã biết đối với loại bệnh ung thư cụ thể. Xem tài liệu, ví dụ, *Cancer Medicine* 5th ed., Edited by R.C. Bast et al., July 2000, BC Decker.

Phần bộc lộ trên đây mô tả tổng quát về sáng chế. Có thể hiểu đầy đủ hơn bằng cách tham khảo các ví dụ cụ thể sau. Các ví dụ này được mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa và không giới hạn phạm vi của sáng chế. Những thay đổi về hình thức và thay thế

trương đương được dự tính làm các tình huống gợi ý hoặc làm cho thích hợp. Mặc dù các thuật ngữ cụ thể đã được sử dụng trong bản mô tả, các thuật ngữ này dùng để mô tả và không giới hạn phạm vi.

Ví dụ thực hiện sáng chế

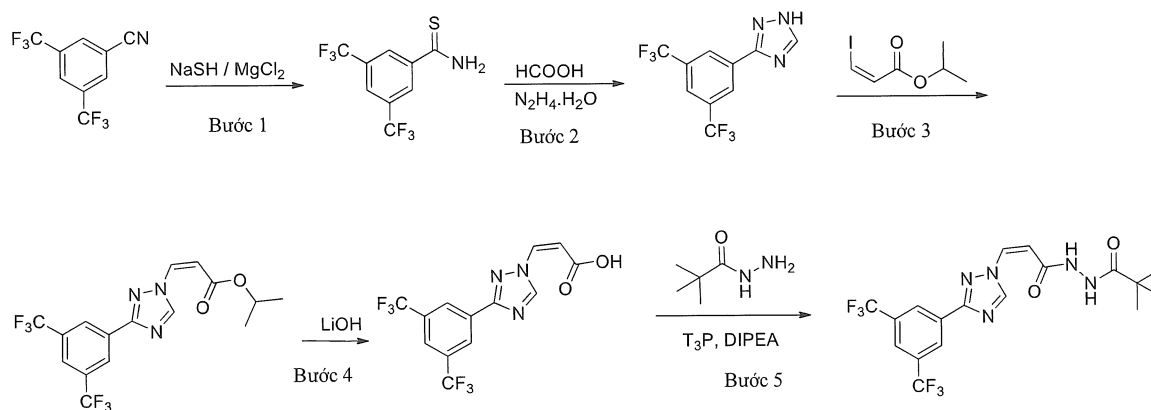
Chữ viết tắt

aq.	Chứa nước
Boc	tert-butoxycarbonyl
CH ₂ Cl ₂	Diclorometan
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan
DIPEA	N,N-Diisopropyletylamin
DMF	N,N-Dimetylformamit
DMSO	Dimetylsulfoxit
eq.	Đương lượng
EtOAc	Etyl axetat
EtOH	Etanol
h	giờ
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
LCMS	Phổ khối sắc ký lỏng
LiOH	Lithi hydroxit
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân
RT	Nhiệt độ trong phòng hoặc thời gian lưu
T3P	Anhydrit propylphosphonic
TFA	Axit trifloaxetic
THF	Tetrahydrofuran

Trong phần mô tả các quy trình sau đây, cần hiểu rằng, nếu thích hợp, các nhóm bảo vệ thích hợp sẽ được thêm vào, và tiếp đó loại bỏ khỏi, các chất phản ứng và chất trung gian khác nhau theo cách mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tổng hợp hữu cơ dễ dàng hiểu được. Các quy trình thông thường để sử dụng các nhóm bảo vệ này cũng như ví dụ về các nhóm bảo vệ thích hợp được mô tả, ví dụ, trong tài liệu "Protective Groups in Organic Synthesis", T.W. Green, P.G.M. Wuts, Wiley-Interscience, New York, (1999). Cũng cần hiểu rằng biến đổi của nhóm hoặc phần tử

thể thành nhóm hoặc phân tử thể khác bằng thao tác hóa học có thể được tiến hành trên sản phẩm trung gian hoặc sản phẩm cuối trong quá trình tổng hợp sản phẩm cuối, trong đó các loại biến đổi có thể có chỉ giới hạn bởi tính không tương thích vốn có về chức năng khác của phân tử ở giai đoạn đó với điều kiện hoặc chất phản ứng dùng trong phép biến đổi. Những đặc tính không tương thích vốn có, và cách khách phục chúng bằng cách thực hiện những biến đổi và bước tổng hợp thích hợp và theo trật tự thích hợp, sẽ dễ dàng được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tổng hợp hữu cơ hiểu được. Ví dụ về các phép biến đổi được đưa ra dưới đây, và cần hiểu rằng các phép biến đổi được mô tả không chỉ giới hạn ở các nhóm hoặc các phân tử thể chung làm ví dụ trong các phép biến đổi này. Giới thiệu và mô tả về các phép biến đổi thích hợp được thể hiện trong tài liệu “Comprehensive Organic Transformations – A Guide to Functional Group Preparations” R. C. Larock, VHC Publishers, Inc. (1989). Giới thiệu và mô tả về các phản ứng thích hợp khác được mô tả trong các sổ tay hóa hữu cơ, ví dụ, “Advanced Organic Chemistry”, March, 4th ed. McGraw Hill (1992) hoặc, “Organic Synthesis”, Smith, McGraw Hill, (1994). Các kỹ thuật tinh chế các hợp chất trung gian và sản phẩm cuối bao gồm ví dụ, sắc ký trực tiếp và sắc ký đảo pha trên cột hoặc đĩa quay, kết tinh lại, chưng cất và chiết lỏng-lỏng hoặc chiết rắn-rắn, mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dễ dàng hiểu được. Định nghĩa về các phân tử thể và nhóm là như trong công thức (I) trừ khi được xác định khác đi. Thuật ngữ “nhiệt độ trong phòng” và “nhiệt độ môi trường”, trừ khi được chỉ định khác, là nhiệt độ nằm trong khoảng 16 đến 25°C. Thuật ngữ “hồi lưu”, trừ khi được chỉ định khác, theo dung môi được sử dụng, là nhiệt độ tại điểm sôi hoặc trên điểm sôi của dung môi đã nêu.

Ví dụ 1. Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-pivaloylacryloylhydrazit (Hợp chất 1). Hợp chất 1 được tổng hợp theo sơ đồ sau:



3,5-bis(trifluorometyl)benzothioamit (Bước 1). Bình đáy tròn 3 cổ dung tích 2L được nạp dung dịch chứa 3,5-bis(trifluorometyl)benzonitril (200g) trong DMF (1L). Sau đó, dung dịch này được xử lý bằng NaSH (123,7g, 2,0 đương lượng) và MgCl_2 (186,7g, 1,0 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trọng phòng trong 3 giờ. Hỗn hợp này được rót vào hồ nước đá-nước (10L) và hợp chất được chiết bằng EtOAc (3 x 1L). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước (3 x 100ml), làm khô qua Na_2SO_4 khan, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 205g hợp chất 3,5-bis(trifluorometyl)benzothioamit thô mong muốn (hiệu suất: 90%), hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo.

3-(3,5-bis(trifluorometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol (Bước 2). Bình đáy tròn 3 cổ dung tích 5L được nạp dung dịch chứa 3,5-bis(trifluorometyl)benzothioamit (205,65g) trong DMF (1,03L). Hydrazin hydrat (73,2ml, 2,0 đương lượng) được bổ sung từng giọt và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trọng phòng trong 1 giờ. HCOOH (1,03L) được bổ sung từng giọt và hỗn hợp phản ứng được đun hồi lưu ở 90°C trong 3 giờ. Sau khi được để cho mát đến nhiệt độ trọng phòng, hỗn hợp phản ứng được rót vào dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (7L) và chiết bằng EtOAc (3 x 1L). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước (3 x 500ml), làm khô qua Na_2SO_4 khan, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm (35°C , 20mm thủy ngân) để tạo ra 180 g sản phẩm thô. Vật liệu thô được khuấy với ete dầu mỏ (3 x 500ml), lọc, và làm khô để thu được 160g hợp chất 3-(3,5-bis(trifluorometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol mong muốn dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (hiệu suất: 75%).

(Z)-isopropyl 3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylat (Bước 3). Bình đáy tròn 3 cổ dung tích 2L được nạp dung dịch chứa 3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol (160g) trong DMF (960ml). Dung dịch này được xử lý bằng DABCO (127,74g, 2 đương lượng) và khuấy trong 30 phút trước khi bổ sung từng giọt (Z)-isopropyl 3-iodoacrylat (150,32g, 1,1 đương lượng). Sau 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được rót vào hồ nước đá-nước (5L) và chiết bằng EtOAc (3 x 1L). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước (3 x 100ml), làm khô qua Na₂SO₄ khan, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm (35 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra 250g sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien etyl axetat/n-hexan (cột được bao bằng hexan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 2% EtOAc/n-hexan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra (Z)-isopropyl 3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylat (138g, hiệu suất: 61%).

Axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (Bước 4). Hòa tan (Z)-isopropyl 3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylat (130g, 1,0 đương lượng) trong THF (1,3L) trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 5L. Dung dịch chứa LiOH (69,3g, 5,0 đương lượng) trong nước (1,3L) được bổ sung từng giọt vào dung dịch và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ trước khi được làm lạnh bằng 400mL hồ nước đá-nước và axit hóa (độ pH=2-3) bằng dung dịch HCl trong nước loãng. Hỗn hợp này được chiết bằng EtOAc (3 x 1L) và các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước, làm khô qua Na₂SO₄ khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 110 g axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (hiệu suất: 94%), (hàm lượng đồng phân cis = 90,0%, hàm lượng đồng phân trans = 8,2 % theo LCMS).

(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-pivaloylacryloylhydrazit (Hợp chất 1). Hòa tan axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (0,2g, 1,0 đương lượng) trong EtOAc (20ml) trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 50ml và làm mát đến -60 °C, tại nhiệt độ này bổ sung từng giọt pivalohydrazit (0,08g, 1,2 đương lượng). T3P (50% trong EtOAc) (0,4mL, 4 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (0,4ml, 4 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở t -60 °C. Hỗn

hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) bằng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-pivaloylacrylohydrazit (0,11g, hiệu suất: 43%);

Ví dụ 2. Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-morpholinoaxetyl)acrylohydrazit (Hợp chất 2).

2-morpholinoaxetohydrazit. Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 25ml, metyl 2-morpholinoaxetat (0,25g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong etanol (5ml) ở nhiệt độ trọng phòng. Hydrazin hydrat (0,087g, 1,1 đương lượng) được bổ sung từng giọt ở nhiệt độ trọng phòng và hỗn hợp phản ứng được đun hồi lưu ở 95 °C trong 20 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (40°C, 20mm thủy ngân) để tạo ra hợp chất 2-morpholinoaxetohydrazit thô (0,23g) hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo.

(Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-morpholinoaxetyl)acrylohydrazit (Hợp chất 2). Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 50ml, axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (Ví dụ 1, Bước 4; 0,5g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong CH₂Cl₂: EtOAc (20mL, 2:1) và làm mát đến -60 °C, tại nhiệt độ này 2-morpholinoaxetohydrazit (0,23g, 1,0 đương lượng) được bổ sung từng giọt. T3P (50% trong EtOAc) (1,27ml, 1,5 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (0,96mL, 2 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở -60 °C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) bằng cách sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-morpholinoaxetyl)acrylohydrazit (0,1g, hiệu suất: 14%).

Ví dụ 3. Tổng hợp (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-5-metyl-1H-pyrazol-4-carbohydrazit (Hợp chất 3).

5-metyl-1H-pyrazol-4-carbohydrazit. Etyl 5-metyl-1H-pyrazol-4-carboxylat (0,25g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong etanol (5ml) trong ống dung tích 25mL hàn kín ở nhiệt độ trọng phòng. Hydrazin hydrat (1ml, 5 đương lượng) được bổ sung từng giọt ở nhiệt độ trọng phòng và hỗn hợp phản ứng được đun nóng ở 120 °C trong 20 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (40 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra hợp chất 5-metyl-1H-pyrazol-4-carbohydrazit thô (0,24g) hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo.

(Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-5-metyl-1H-pyrazol-4-carbohydrazit (Hợp chất 3). Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 50ml, axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (Ví dụ 1, Bước 4; 0,5g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong EtOAc:EtOH (15mL, 2:1) và làm mát đến -60 °C, tại nhiệt độ này 5-metyl-1H-pyrazol-4-carbohydrazit (0,24g, 1,0 đương lượng) được bổ sung từng giọt. T3P (50% trong EtOAc) (1,69ml, 1,5 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (2mL, 8 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở -60 °C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-5-metyl-1H-pyrazol-4-carbohydrazit (0,2g, hiệu suất: 42%).

Ví dụ 4. Tổng hợp (Z)-2-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-N-xyclopropylhydrazincarbothioamit (Hợp chất 4)

Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 50ml, axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (Ví dụ 1, Bước 4; 0,5g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong EtOAc:EtOH (15mL, 2:1) và làm mát đến -60 °C tại nhiệt độ này N-xyclopropylhydrazincarbothioamit (0,22g, 1,2 đương lượng) được bổ sung từng giọt. T3P (50% trong EtOAc) (1,69ml, 2 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (1ml, 4 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1

giờ ở -60 °C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25°C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra (Z)-2-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-N'-xyclopropylhydrazincarbothioamit (0,06g, hiệu suất: 9%).

Ví dụ 5. Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-metyl-N'-(2-morpholinoaxetyl)acrylohydrazit (Hợp chất 5).

N-metyl-2-morpholinoaxetohydrazit. Trong ống hàn kín dung tích 25ml, metyl 2-morpholinoaxetat (0,5g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong etanol (5ml) ở nhiệt độ trọng phòng. Metylhydrazin (0,16g, 1,1 đương lượng) được bổ sung từng giọt ở nhiệt độ trọng phòng và hỗn hợp phản ứng được đun hồi lưu ở 95°C trong 48 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (40°C, 20mm thủy ngân) để tạo ra N-metyl-2-morpholinoaxetohydrazit thô (0,27g) hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo.

(Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-metyl-N'-(2-morpholinoaxetyl)acrylohydrazit (Hợp chất 5). Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 50ml, axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (Ví dụ 1, Bước 4; 0,3g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong THF: EtOAc (15ml, 2:1) và làm mát đến -60 °C tại nhiệt độ này N-metyl-2-morpholinoaxetohydrazit (0,23g, 1,5 đương lượng) được bổ sung từng giọt. T3P (50% trong EtOAc) (1,27ml, 2,5 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (0,45ml, 3 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở -60 °C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-metyl-N'-(2-morpholinoaxetyl)acrylohydrazit (0,052g, hiệu suất: 12%).

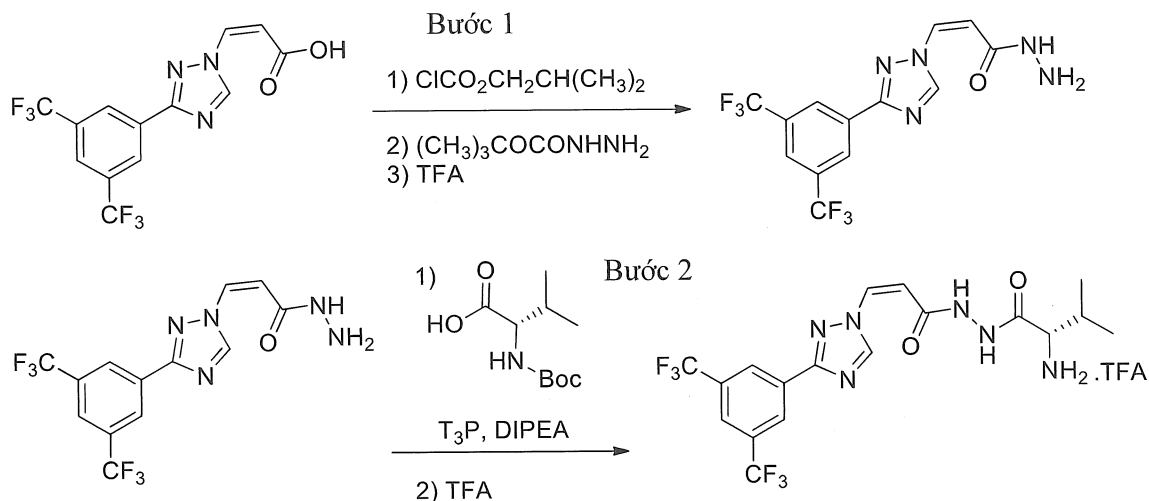
Ví dụ 6. Tổng hợp (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)piperidin-3-carbohydrazit (Hợp chất 6).

Piperidin-3-carbohydrazit. Trong ống hàn kín dung tích 30mL, etyl methyl piperidin-3-carboxylat (1g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong etanol (5ml) ở nhiệt độ trọng phòng. Hydrazin hydrat (1,05g, 3 đương lượng) được bổ sung từng giọt ở nhiệt độ trọng phòng và hỗn hợp phản ứng được đun nóng ở 120°C trong 20 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (40°C, 20mm thủy ngân) để tạo ra hợp chất piperidin-3-carbohydrazit thô (0,8g) hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo.

(Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)piperidin-3-carbohydrazit (Hợp chất 6). Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 50ml, axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (Ví dụ 1, Bước 4; 0,25g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong THF: EtOAc (15ml, 2:1) và làm mát đến -60 °C tại nhiệt độ này piperidin-3-carbohydrazit (0,113g, 1,1 đương lượng) được bổ sung từng giọt. T3P (50% trong EtOAc) (1,69ml, 4 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (0,25ml, 2 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở -60 °C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra hợp chất (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)piperidin-3-carbohydrazit (0,01g, hiệu suất: 2.4%).

Ví dụ 7. Tổng hợp (S,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-3-metylbutanehydrazit 2,2,2-trifloaxetat (Hợp chất 7).

Hợp chất 7 được tổng hợp theo sơ đồ sau:



(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylohydrazit (Bước 1). Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 50ml, axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (Ví dụ 1, Bước 4; 0,5g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong THF (10ml) và làm mát đến -10°C tại nhiệt độ này NMP (0,3g, 2,1 đương lượng) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 5 phút. Sau đó, bổ sung isobutyl chloroformat (0,465g, 2,4 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ. Chất rắn thu được được loại bỏ bằng cách lọc. Dịch lọc được làm mát đến 0°C và bổ sung tert-butoxycarbonyl hydrazit (0,21g, 1,1 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng được để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng, tại nhiệt độ này hỗn hợp được khuấy trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được rót vào hồ nước đá-nước và chiết bằng EtOAc (3 X 50ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước (25ml), làm khô qua Na_2SO_4 khan, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm (25°C , 20mm thủy ngân) để tạo ra 0,5g sản phẩm thô. Sau đó, sản phẩm thô được hòa tan trong THF (10ml) và bổ sung từng giọt TFA (2ml) ở nhiệt độ trong phòng và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25°C , 20mm thủy ngân) và chất rắn thu được được nghiền bằng pentan để tạo ra (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylohydrazit (0,25g, hiệu suất: 48,5%).

Axit (S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-metylbutanoic. Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 25ml, axit (S)-2-amino-3-metylbutanoic (0,8g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong nước (4ml). Natri bicacbonat (0,63g, 1,1 đương lượng), tiếp theo là di-tert-butyl dicacbonat (2,97g, 2,0 đương lượng) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được chiết bằng

EtOAc (3 X 10ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước (25ml), làm khô qua Na_2SO_4 khan, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm (25 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra 1,2g sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra axit (S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-metylbutanoic (0,7g, hiệu suất: 47,3%).

(S,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-3-metylbutanehydrazit 2,2,2-trifluoaxetat (Hợp chất 7). Trong bình đáy tròn dung tích 10mL, (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylohydrazit (0,25g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong THF (5ml) và làm mát đến -60 °C tại nhiệt độ này axit (S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-metylbutanoic (0,19g, 1,3 đương lượng) được bổ sung từng giọt. T3P (50% trong EtOAc) (0,81ml, 2 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (0,48ml, 4 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở -60 °C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra (S,Z)-tert-butyl (1-(2-(3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)hydrazinyl)-3-metyl-1-oxobutan-2-yl)carbammat (0,07g, hiệu suất: 18%). Sau đó, trong bình đáy tròn dung tích 10ml, (S,Z)-tert-butyl (1-(2-(3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)hydrazinyl)-3-metyl-1-oxobutan-2-yl)carbammat được hòa tan trong diclometan (2ml). TFA (0,05ml) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25°C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô (0,01g), sản phẩm này được nghiền bằng ete dầu mỏ và làm khô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất (S,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-3-metylbutanehydrazit 2,2,2-trifluoaxetat (0,006g, hiệu suất: 2%).

Ví dụ 8. Tổng hợp (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)pyrazin-2-carbohydrazit (Hợp chất 8).

Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 25ml, axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (Ví dụ 1, Bước 4; 0,5g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong diclometan (5ml) và làm mát đến -60 °C tại nhiệt độ này pyrazin-2-carbohydrazit (0,216g, 1,1 đương lượng) được bổ sung vào. T3P (50% trong EtOAc) (3,39ml, 4 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (0,5ml, 2 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở -60°C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25°C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)pyrazin-2-carbohydrazit (0,13g, hiệu suất: 19,4%).

Ví dụ 9. Tổng hợp (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-1-metylpiperidin-4-carbohydrazit (Hợp chất 9).

1-metylpiperidin-4-carbohydrazit. Trong ống hàn kín dung tích 25ml, metyl 1-metylpiperidin-4-carboxylat (0,2g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong etanol (5ml) ở nhiệt độ trọng phòng. Hydrazin hydrat (0,127g, 2 đương lượng) được bổ sung từng giọt ở nhiệt độ trọng phòng và hỗn hợp phản ứng được đun nóng ở 120°C trong 20 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (40°C, 20mm thủy ngân) để tạo ra hợp chất 1-metylpiperidin-4-carbohydrazit thô (0,145g) hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo.

(Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-1-metylpiperidin-4-carbohydrazit (Hợp chất 9). Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 50ml, axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (0,25g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong EtOAc:THF (15 mL; 2:1) và làm mát đến -60 °C tại nhiệt độ này 1-metylpiperidin-4-carbohydrazit (0,123g, 1,1 đương lượng) được bổ sung vào. T3P (50% trong EtOAc) (0,85ml, 2 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (0,31ml, 2,5 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở -60 °C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (35°C,

20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-1-metylpiiperidin-4-carbohydrazit (0,016g, hiệu suất: 4.5%).

Ví dụ 10. Tổng hợp (R,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-3-metylbutanehydrazit 2,2,2-trifloaxetat (Hợp chất 10).

Axit (R)-2-((tert-butoxycacbonyl)amino)-3-metylbutanoic. Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 25ml, axit (R)-2-amino-3-metylbutanoic (0,8g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong nước (4ml). Natri bicacbonat (0,394g, 1,1 đương lượng), tiếp theo là di-tert-butyl dicacbonat (1,86g, 2,0 đương lượng) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trọng phòng. Hỗn hợp phản ứng được chiết bằng EtOAc (3 X 10ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa trong nước (25ml), làm khô qua Na₂SO₄ khan, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm (25°C, 20mm thủy ngân) để tạo ra 0,75g sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra axit (R)-2-((tert-butoxycacbonyl)amino)-3-metylbutanoic (0,44g, hiệu suất: 47,3%).

(R,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-3-metylbutanehydrazit 2,2,2-trifloaxetat (Hợp chất 10). Trong bình đáy tròn dung tích 10ml, (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylohydrazit (0,05g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong THF (5ml) và làm mát đến -60 °C tại nhiệt độ này axit (R)-2-((tert-butoxycacbonyl)amino)-3-metylbutanoic (0,038g, 1.3 đương lượng) được bổ sung từng giọt. T3P (50% trong EtOAc) (0,16ml, 2 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (0,095ml, 4 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở -60 °C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel) sử dụng gradien

metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra (R,Z)-tert-butyl (1-(2-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)hydrazinyl)-3-metyl-1-oxobutan-2-yl)carbammat (0,017g, hiệu suất: 26%). Sau đó, trong bình đáy tròn dung tích 10ml, (R,Z)-tert-butyl (1-(2-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)hydrazinyl)-3-metyl-1-oxobutan-2-yl)carbammat được hòa tan trong diclometan (2ml). TFA (0,2ml) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trọng phòng trong 5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô (0,02g), mà được nghiền bằng ete dầu mỏ và làm khô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra (R,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acryloyl)-3-metylbutanehydrazit 2,2,2-trifloaxetat (0,007g, hiệu suất: 35%).

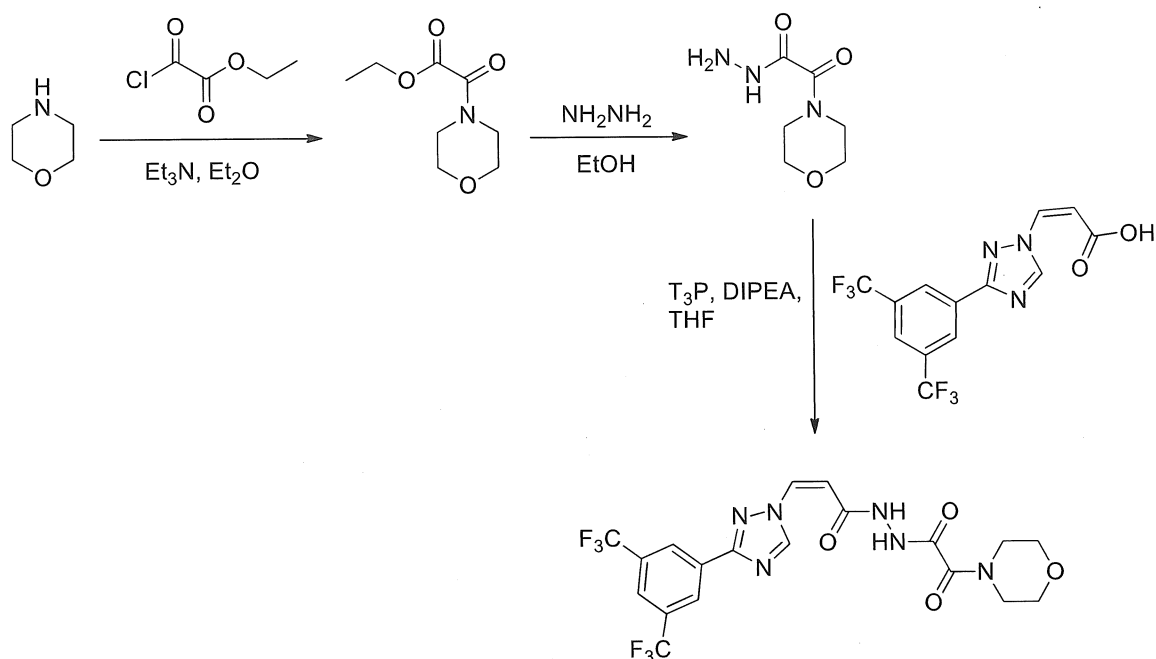
Ví dụ 11. Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(pyrazin-2-yl)axetyl)acrylohydrazit (Hợp chất 11).

2-(pyrazin-2-yl)axetohydrazit. Trong ống hàn kín dung tích 25ml, metyl 2-(pyrazin-2-yl)axetat (0,25g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong etanol (5ml) ở nhiệt độ trọng phòng. Hydrazin hydrat (0,33g, 4 đương lượng) được bổ sung từng giọt ở nhiệt độ trọng phòng và hỗn hợp phản ứng được đun nóng ở 120 °C trong 20 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (40°C, 20mm thủy ngân) để tạo ra hợp chất 2-(pyrazin-2-yl)axetohydrazit thô (0,2g) hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo.

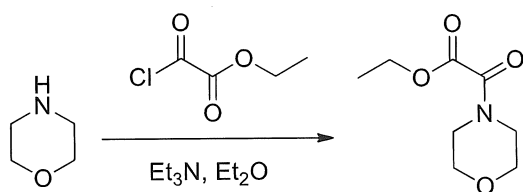
(Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(pyrazin-2-yl)axetyl)acrylohydrazit (Hợp chất 11). Trong bình đáy tròn 3 cổ dung tích 50ml, axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (0,3g, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong EtOAc:THF (15 mL; 2:1) và làm mát đến -60 °C tại nhiệt độ này 2-(pyrazin-2-yl)axetohydrazit (0,129g, 1,1 đương lượng) được bổ sung vào. T3P (50% trong EtOAc) (1,01ml, 2 đương lượng) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (0,35ml, 2,5 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở -60 °C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm (25 °C, 20mm thủy ngân) để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký cột (60/120 silica gel)

sử dụng gradien metanol/diclometan (cột được bao bằng diclometan và hợp chất mong muốn bắt đầu giải hấp từ 3% metanol/diclometan). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp để tạo ra hợp chất (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-yl)axetyl)acrylohydrazit (0,025g, hiệu suất: 5%).

Ví dụ 12. Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-morpholino-2-oxoaxetyl)acrylohydrazit (Hợp chất 12).



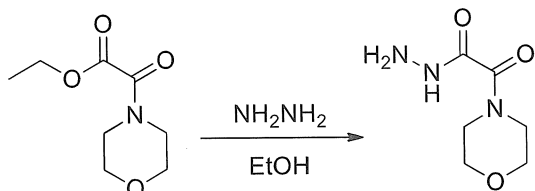
Tổng hợp etyl 2-morpholino-2-oxoaxetat:



Dung dịch chứa etyl 2-clo-2-oxoaxetat (1,25g, 9,18mmol) trong dietyl ete (5ml) được bổ sung từng giọt vào dung dịch chứa morpholin (1,0g, 11,48mmol) trong dietyl ete (20ml) và trietylamin (1,16g, 11,48mmol) ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng được để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc và dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Dầu màu vàng được chuyển vào 25mL nước đá và chiết bằng etyl axetat (3 x 20ml). Các lớp hữu cơ hỗn hợp được rửa bằng nước muối, làm khô qua natri sulphat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 1g sản phẩm thô, sản phẩm này được sử dụng tiếp mà không cần

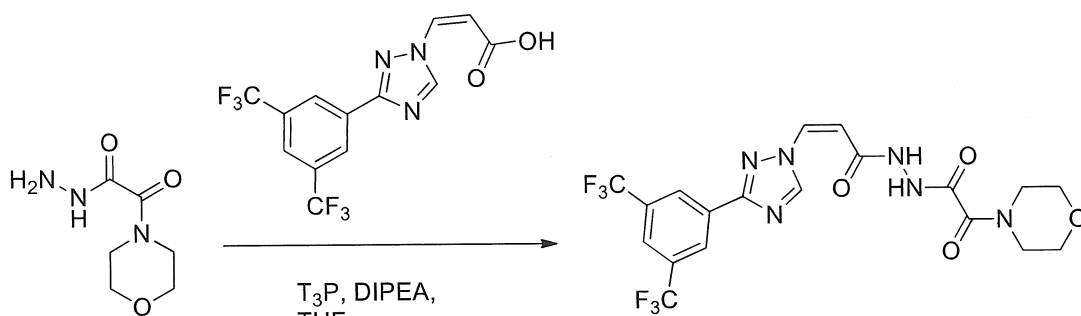
tinh chế. Hiệu suất thô 47%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4,33-4,38 (q, 2H), 3,72-3,76 (m, 4H), 3,65-3,68 (m, 2H), 3,47-3,50 (m, 2H), 1,37-1,40 (t, 3H), LCMS m/z 187,93 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 0,525$ phút.

Tổng hợp 2-morpholino-2-oxoaxetohydrazit:



Etyl 2-morpholino-2-oxoaxetat (1,0g, 5,34mmol) được hòa tan trong etanol (7ml) và hydrazin hydrat (0,267g, 5,34mmol) được bổ sung từng giọt ở 0°C . Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 0,9 g sản phẩm thô, hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo. Hiệu suất thô 90%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9,79 (s, 1H), 4,43-4,48 (m, 2H), 3,56-3,61 (m, 4H), 3,40-3,48 (m, 4H), LCMS m/z 174,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 2,031$ phút.

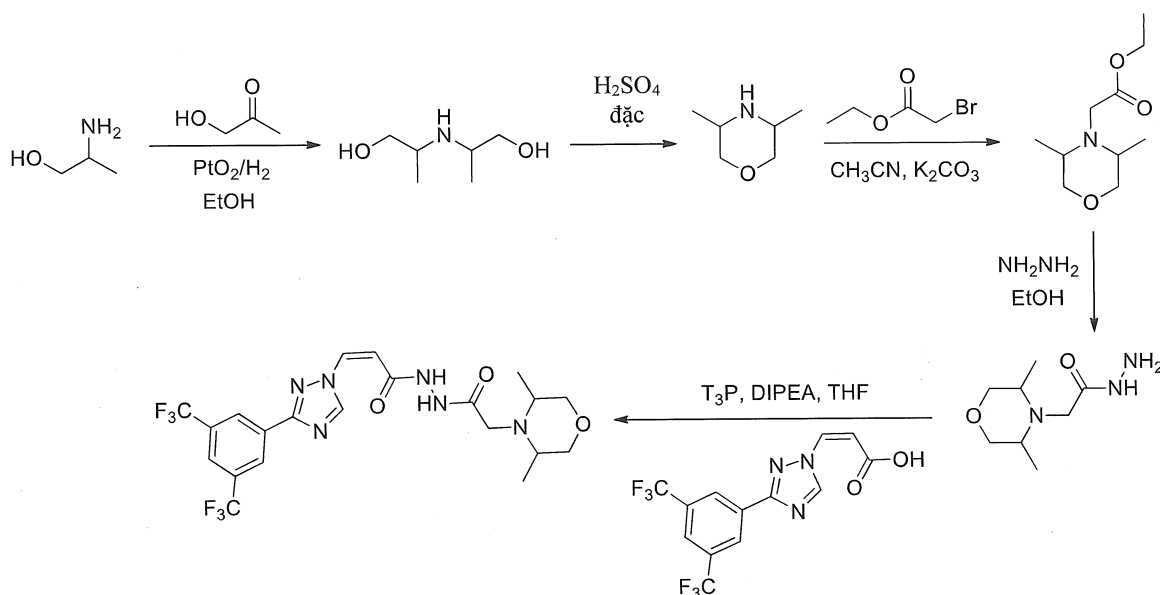
Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-morpholino-2-oxoaxetyl)acrylohydrazit:



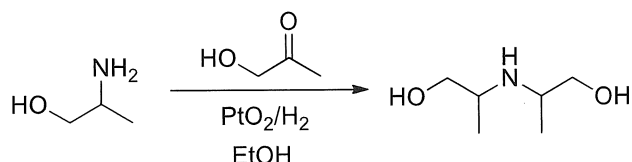
Dung dịch chứa axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (0,2g, 0,569mmol) và 2-morpholino-2-oxoaxetohydrazit (0,02g, 0,175mmol) trong THF (3ml) được làm mát đến -60°C . T_3P (0,098g, 0,569mmol) (0,50ml) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (0,11g, 0,854mmol) và khuấy ở -60°C trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được chuyển vào 25mL nước đá và chiết bằng etyl axetat (2 x 25ml). Các lớp hữu cơ hỗn hợp được rửa bằng nước muối, làm khô qua natri sulphat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 0,3g sản phẩm thô, mà được tinh chế bằng sắc ký (0-4% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) để tạo ra 0,15g hợp chất (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-morpholino-2-oxoaxetyl)

acrylohydrazit (hiệu suất 50%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,70-10,88 (m, 2H), 9,56 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,52-7,55 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 6,0-6,03 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 3,51-3,64 (m, 8H). LCMS m/z 507,25 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 2,012$ phút.

Ví dụ 13. Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(3,5-dimethylmorpholino)acetyl)acrylohydrazit (Hợp chất 13).

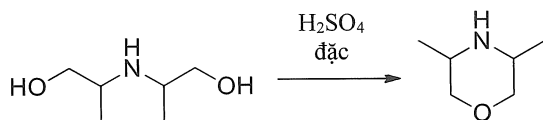


Tổng hợp 2,2'-azanediylldipropen-1-ol:



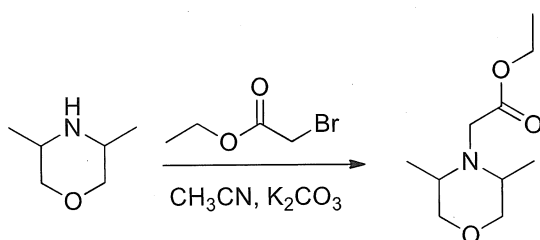
2-Aminopropan-1-ol (5g, 66,57mmol) và 1-hydroxypropan-2-on (5,77g, 77,89mmol) được hòa tan trong etanol (115ml) và 50 mg PtO_2 được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở áp suất H_2 0,344 MPa (50 psi) ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc và dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo. Hiệu suất thô: 79 %. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4,45 (bs, 2H), 3,42-3,43 (m, 1H), 3,16-3,22 (m, 4H), 2,65-2,69 (m, 2H) 0,87-0,91(m, 6H): LCMS m/z 133,99 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 4,077$ phút.

Tổng hợp 3,5-dimetylmorpholin:



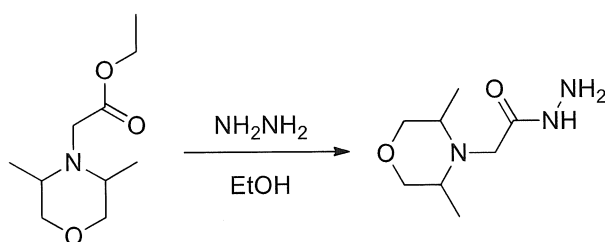
2,2'-Azanediyl dipropan-1-ol (7g, 52mmol) được tạo huyền phù trong dung dịch H_2SO_4 đặc (5,3ml, 99,8mmol) ở nhiệt độ trong phòng và đun nóng ở 180°C trong 8 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm mát ở 0°C và dung dịch KOH (11,79g, 21,02mmol) trong 60mL nước được bổ sung từng giọt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc và dịch lọc được chiết bằng CHCl_3 :MeOH (85:15; 5X50ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô qua natri sulphat khan và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 3,5g sản phẩm thô, hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo (hiệu suất thô: 58%).

Tổng hợp etyl 2-(3,5-dimetylmorpholino)axetat:



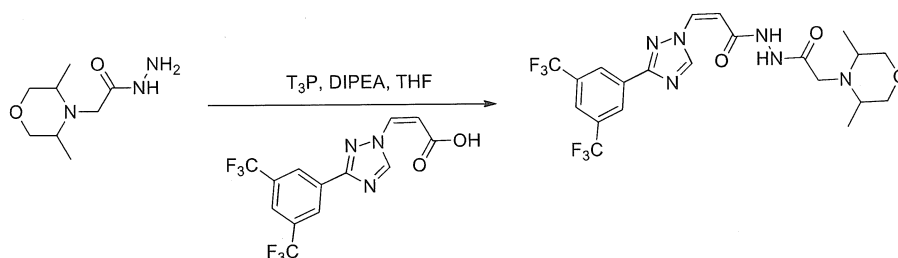
Kali cacbonat (0,311g, 2,25mmol) và etyl bromoaxetat (0,319g, 1,91mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa 3,5-dimetylmorpholin (0,2g, 1,73mmol) trong axetonitril (4ml) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 60°C trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được chuyển vào nước đá và chiết bằng etyl axetat (20 mL x 3). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, được sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế tiếp (hiệu suất thô: 54%).

Tổng hợp etyl 2-(3,5-dimetylmorpholino)axetohydrazit:



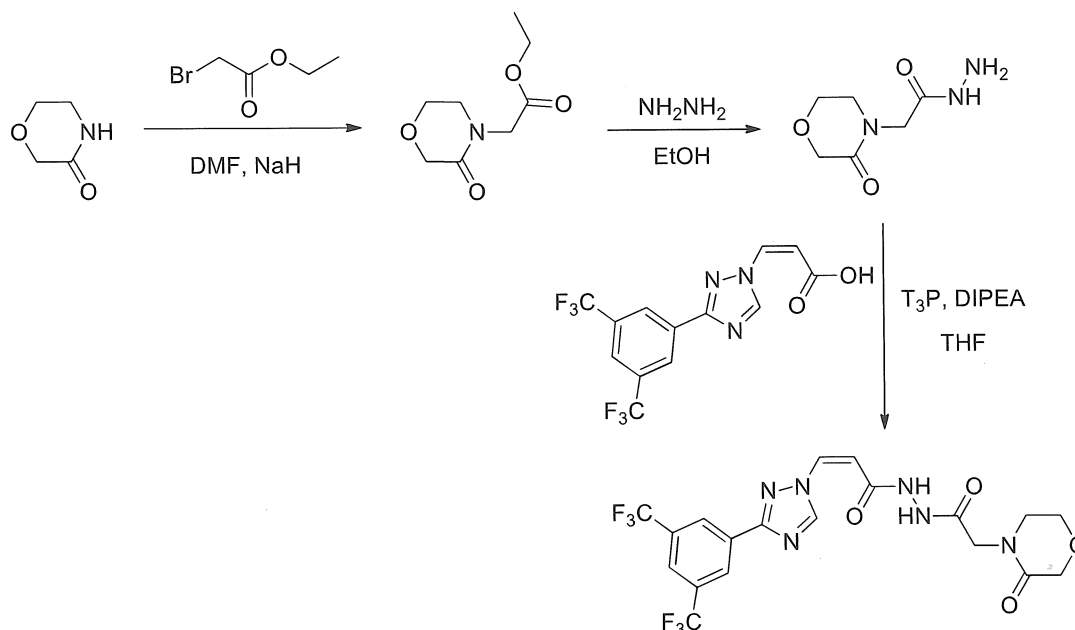
Etyl-2-(3,5-dimethylmorpholino)axetat (0,19g, 0,944mmol) được hòa tan trong etanol (4ml) và hydrazin hydrat (0,047g, 0,944mmol) được bổ sung từng giọt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 80°C trong 20 giờ và hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo. (hiệu suất thô: 97%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,95 (s, 2H), 8,84 (s, 1H), 3,60-3,63 (m, 2H), 3,25-3,29 (m, 2H), 3,14 (s, 2H), 3,05 (s, 2H), 0,86-0,88 (m, 6H): LCMS m/z 188,12 [M+H]⁺, t_R 4,716 phút.

Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(3,5-dimethylmorpholino)axetyl)acrylohydrazit:

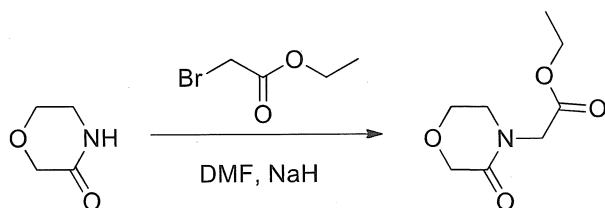


Bổ sung T3P (0,543g, 0,854mmol) tiếp theo là DIPEA (0,110g, 0,854mmol) vào dung dịch chứa axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (0,2g, 0,569mmol) và 2-(3,5-dimethylmorpholino)axetohydrazit (0,106g, 0,569mmol) trong THF (10ml) ở -60 °C và khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được chuyển vào 25mL nước đá và chiết bằng etyl axetat (2 x 25ml) và các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô qua natri sulphat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, sản phẩm này được tinh chế bằng sắc ký (0-3% MeOH/CH₂Cl₂) để tạo ra 0,02g (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(3,5-dimethylmorpholino)axetyl)acrylohydrazit (Hiệu suất: 7%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,58 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,54-8,56 (m, 2H), 8,25-8,30(m, 1H), 7,49-7,51 (d, J=10,4 Hz, 1H), 6,01-6,04 (d, J=10,4 Hz, 1H), 3,44-3,57 (m, 2H), 3,28-3,34 (m, 2H), 3,21 (s, 1H), 3,15 (s, 1H), 2,84-2,88 (m, 2H), 0,93-1,04(m, 6H): LCMS m/z 521,18 [M+H]⁺, t_R 1,898 phút.

Ví dụ 14. Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(3-oxomorpholino)axetyl)acrylohydrazit (Hợp chất 14).

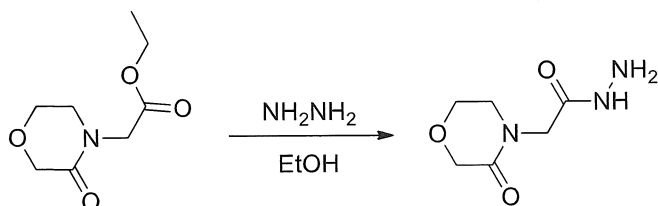


Tổng hợp Etyl 2-(3-oxomorpholino) axetat:



Morpholin-3-on (3g, 29,67mmol) được hòa tan trong DMF (15ml, 29,67mmol) và NaH (1,78g, 44,51mmol) được bổ sung ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút và etylbromo axetat (3,76ml, 32,64mmol) được bổ sung từng giọt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy tiếp ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ và chuyển vào 50mL nước và chiết bằng EtOAc (3 x 50ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước muối (2 x 50ml), làm khô qua natri sulphat khan và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, sản phẩm này được tinh chế bằng sắc ký (0-100% etyl axetat/hexan) để tạo ra 600mg etyl-2-(3-oxomorpholino)axetat (hiệu suất: 10%). LCMS m/z 187 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R 2,505 phút.

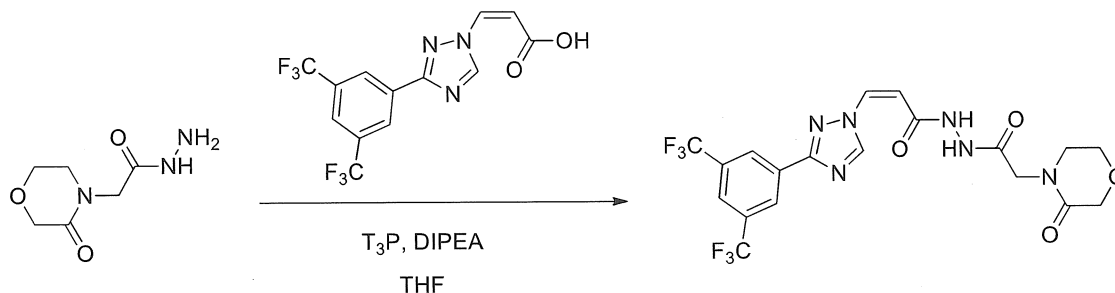
Tổng hợp 2-(3-oxomorpholino)axetohydrazit:



Etyl-2-(3-oxomorpholino)axetat (600mg, 3,21mmol) được hòa tan trong etanol (3ml) và hydrazin hydrat (160,46mg, 3,21mmol) được bổ sung ở nhiệt độ trong phòng.

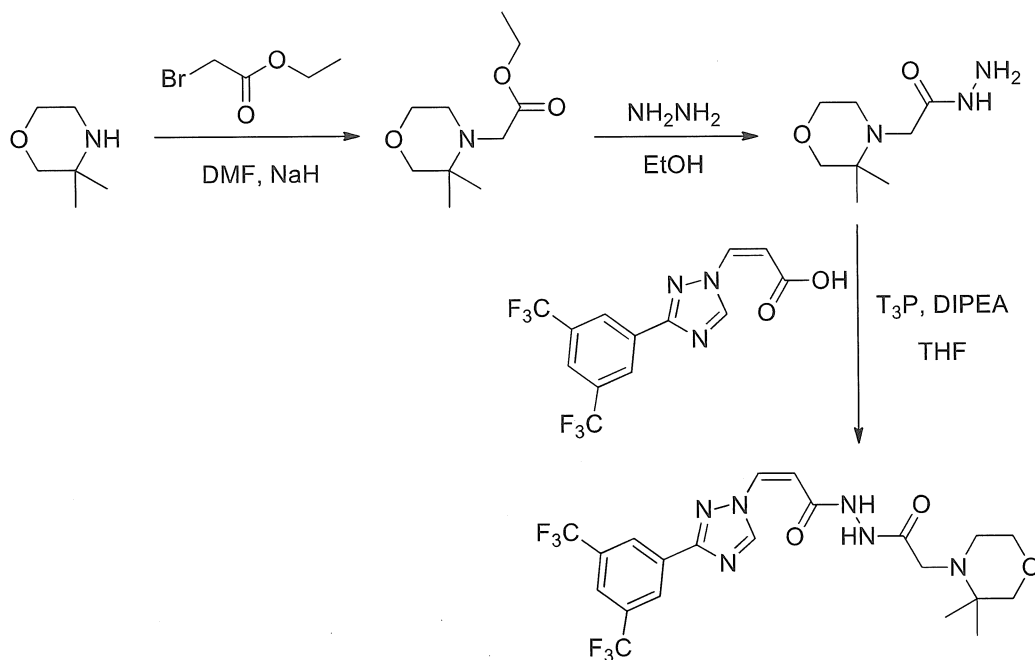
Hỗn hợp phản ứng được đun nóng ở 80°C trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được chuyển vào 50ml nước và chiết bằng EtOAc (3 x 50ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô qua natri sulphat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo (hiệu suất thô: 54%). LCMS m/z 174,05 $[M+H]^+$ t_R 2,489 phút.

Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflormetyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(3-oxomorpholino)axetyl)acrylohydrazit:

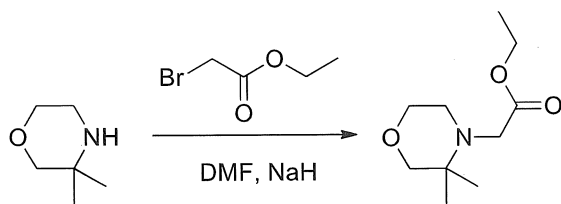


Axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflormetyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (0,400g, 1,14mmol) được hòa tan trong THF (4ml) và 2-(3-oxomorpholino)axetohydrazit (0,295g, 1,71mmol) được bổ sung vào. T₃P (1,09g, 1,71mmol) được bổ sung từng giọt tiếp theo là DIPEA (220,80mg, 1,71mmol) ở - 60 °C và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được chuyển vào 25 mL nước đá và chiết bằng EtOAc (2x25ml). Các lớp hữu cơ hỗn hợp được rửa bằng nước muối, làm khô qua natri sulphat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô which được tinh chế bằng sắc ký (0-4% MeOH/CH₂Cl₂) để tạo ra 0,05g (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflormetyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(3-oxomorpholino)axetyl)acrylohydrazit (hiệu suất: 8%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,33 (bs, 2H), 9,63 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,50-7,52 (d, J = 8 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J = 8 Hz, 1H), 4,08-4,12 (m, 4H), 3,85-3,87 (m, 2H), 3,41-3,44 (m, 2H). LCMS m/z 507,13 $[M+H]^+$, t_R 1,950 phút.

Ví dụ 15. Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflormetyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(3,3-dimetylmorpholino)axetyl)acrylohydrazit (Hợp chất 15).

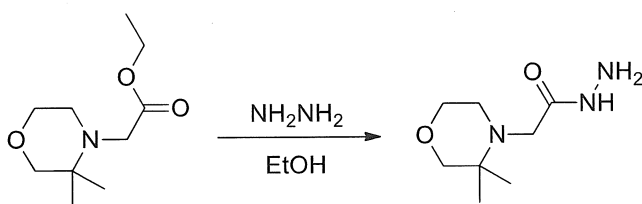


Tổng hợp Ethyl 2-(3,3-dimethylmorpholino)axetat:



3,3-Dimethylmorpholin (1g, 8,68mmol) được hòa tan trong axetonitril (5ml) và kali cacbonat (1,8g, 13mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút và etylbromo axetat (1,1ml, 9,55mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được đun nóng ở 60°C trong 1 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được chuyển vào 50ml nước và chiết bằng etyl axetat (3x50ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô qua natri sulphat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo (Hiệu suất thô: 91%). LCMS m/z 202,9 $[M+H]^+$, t_R 2,33 phút.

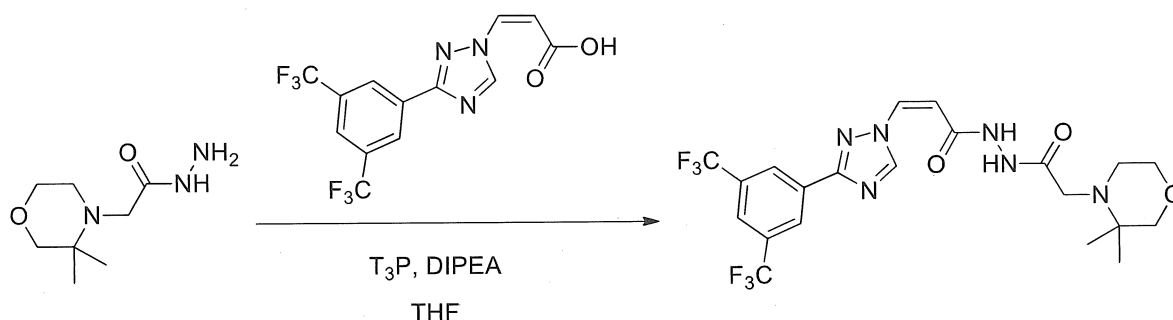
Tổng hợp 2-(3,3-dimethylmorpholino)axetohydrazit:



Bổ sung hydrazin hydrat (0,20ml, 2,98mmol) vào dung dịch chứa ethyl 2-(3-oxomorpholino)axetat (600mg, 2,98mmol) trong etanol (3ml) ở nhiệt độ trong phòng.

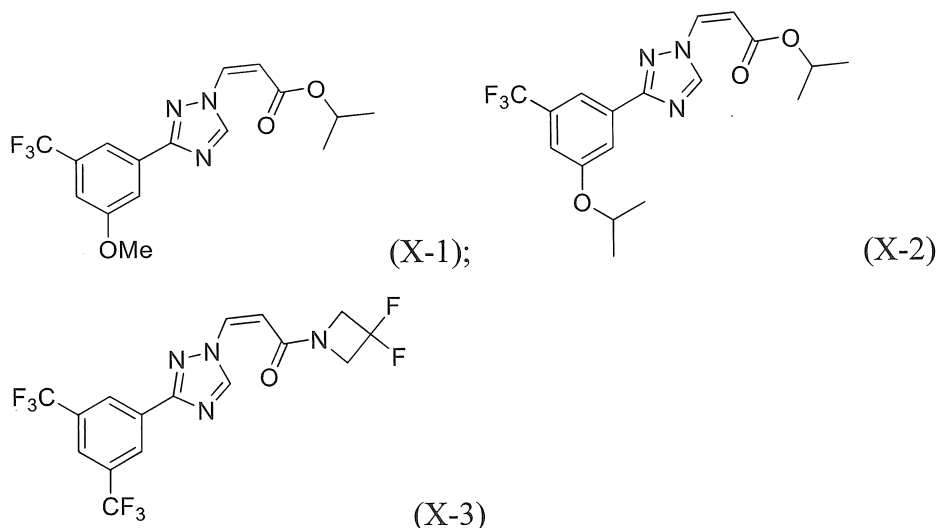
Hỗn hợp phản ứng được đun nóng ở 80°C trong 1 giờ, để cho mát đến nhiệt độ trong phòng, chuyển vào 50ml nước, và chiết bằng etyl axetat (3x25ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô qua natri sulphat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp ở bước tiếp theo (Hiệu suất thô: 28%). LCMS m/z 188 $[M+H]^+$ t_R : 188 phút.

Tổng hợp (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(3,3-dimetylmorpholino)axetyl)acrylohydrazit:



Bổ sung từng giọt T_3P (0,63ml, 1,06mmol) tiếp theo là DIPEA (0,18ml, 1,06mmol) vào dung dịch chứa axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic (0,250g, 0,7mmol) và 2-(3,3-dimetylmorpholino)axetohydrazit (0,160g, 0,85mmol) trong THF (2,5ml) ở -60 °C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ, chuyển vào 25 mL nước đá, và chiết bằng etyl axetat (2x25mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô qua natri sulphat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, sản phẩm này được tinh chế bằng sắc ký (0-4% MeOH:CH₂Cl₂) để tạo ra 0,05g (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-(2-(3,3-dimetylmorpholino)axetyl)acrylohydrazit (Hiệu suất: 13%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,55 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 3,65-3,67 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 2H), 3,08 (bs, 2H), 2,55-2,58 (m, 2H), 0,96 (s, 6H). LCMS m/z 521,18 $[M+H]^+$, t_R 1,937 phút.

Ví dụ 16. Thử nghiệm. Các hợp chất nhất định theo sáng chế, cùng với các hợp chất X-1, X-2 và X-3 (thể hiện dưới đây) được thử nghiệm trong các thử nghiệm khác nhau.



Ức chế sự xuất ra khỏi nhân

Khả năng ức chế sự xuất ra khỏi nhân qua trung gian CRM1 của các hợp chất theo sáng chế đã được xác định. Kết quả được thể hiện trên bảng 2. Hoạt tính ức chế của các hợp chất đối với CRM1 được xác định trong thử nghiệm RevGFP. Hợp chất theo sáng chế có hoạt tính trong thử nghiệm Rev-GFP với $IC_{50} < 10\mu M$ với các hợp chất được ưu tiên nhất có hoạt tính với trị số IC_{50} 1 μM .

Quy trình thử nghiệm: Rev là protein từ virus suy giảm miễn dịch ở người typ 1 (human immunodeficiency virus type 1 - HIV-1) và chứa tín hiệu xuất ra khỏi nhân (nuclear export signal - NES) ở vùng tận cùng C của nó và tín hiệu khu trú trong nhân (nuclear localization signal - NLS) ở vùng tận cùng N của nó. Sự xuất khỏi nhân của protein Rev phụ thuộc vào con đường NES/ CRM1 cổ điển (Neville et al, 1997, Kau et al, 2003). Sự tích tụ trong nhân của Rev quan sát được trong các tế bào được xử lý bằng các chất ức chế đặc hiệu của CRM1, như LMB (Kau et al, 2003). Trong thử nghiệm này, tế bào U2OS-RevGFP được cấy vào các đĩa 384-giếng, màu đen, đáy trong vào ngày trước khi thử nghiệm. Các hợp chất được pha loãng hàng loạt 1:2 bắt đầu từ 40 μM trong đĩa 384-giếng khác trong DMEM, và sau đó chuyển vào tế bào. Các tế bào được ủ với hợp chất trong khoảng 1 giờ trước khi cố định bằng dung dịch formaldehyt 3,7% và nhuộm nhân bằng Hoechst 33258. Lượng GFP trong nhân tế bào được xác định và IC_{50} của các hợp chất được xác định (Kau et al, 2003).

Thử nghiệm tăng sinh tế bào MTT

Thử nghiệm tăng sinh tế bào CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega) được sử dụng trên tế bào MM1.S, Jurkat và tế bào HCT-116 để nghiên cứu đặc tính độc tế bào và kìm tế bào của các hợp chất. Thử nghiệm này dựa trên sự phân cắt của muối tetrazoli, MTS, với sự có mặt của chất phản ứng kết hợp electron PES (phenazin ethosulfat). Hợp chất MTS tetrazoli được khử sinh học bằng các tế bào thành sản phẩm formazan có màu tan trong môi trường nuôi cấy mô. Sự chuyển hóa này được cho là thực hiện bởi NADPH hoặc NADH do các enzyme dehydroaza tạo ra trong các tế bào hoạt động chuyển hóa. Các thử nghiệm được tiến hành bằng cách bổ sung lượng nhỏ chất phản ứng CellTiter 96® AQueous One Solution trực tiếp vào các giếng nuôi cấy, ủ trong 1–4 giờ và then ghi lại độ tiêu thụ ở bước sóng 490nm bằng máy đọc đĩa 96-giếng. Độ tiêu thụ trực tiếp cho thấy mối tương quan giữa số tế bào và hoạt tính chuyển hóa của chúng. Các tế bào được cấy ở mật độ 5×10^3 đến $1,5 \times 10^4$ tế bào (tùy thuộc loại tế bào) trong mỗi giếng của đĩa 96-giếng trong 100µL môi trường nuôi cấy tươi và các tế bào bám dính được để cho bám qua đêm. Dung dịch gốc chứa các hợp chất được pha loãng trong môi trường nuôi cấy tế bào để thu được 8 nồng độ của mỗi thuốc, nằm trong khoảng từ 1nM đến 30 µM và DMSO nồng độ nhỏ hơn 1% thể tích/thể tích được dùng làm đối chứng âm. Sau 72 giờ xử lý, 20µl chất phản ứng CellTiter96® AQueous được bổ sung vào từng giếng của đĩa thử nghiệm 96 giếng và đĩa này được ủ ở 37°C trong 1–4 giờ khí quyển 5% CO₂ ẩm. Sau đó độ tiêu thụ của từng giếng được ghi lại ở bước sóng 490nm bằng cách sử dụng máy đọc đĩa 96 giếng. Trong hầu hết các trường hợp thử nghiệm được tiến hành theo bộ ba và kết quả được biểu thị dưới dạng nồng độ ức chế 50% mức tối đa (IC₅₀) được mô tả dưới đây. Mật độ quang so với nồng độ hợp chất được vẽ đồ thị và phân tích bằng phương trình hồi quy không tuyến tính (Excel Fit) và IC₅₀ của từng hợp chất được tính toán. Kết quả được thể hiện trên bảng 2.

Xác định dược động học (Pharmacokinetics - PK) và tỷ lệ Não:Huyết tương Thu mẫu máu từ chuột (N=3) để góp vào tổng số 10 thời điểm (trước khi sử dụng liều, 5 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ và 24 giờ sau khi sử dụng liều). Chuột được lấy máu trên cơ sở xoay vòng, mỗi chuột góp vào 3 thời điểm thu máu. Ở các thời điểm đã định, các động vật này được gây mê bằng isofluran, và mỗi thời điểm thu khoảng 110µL máu bằng cách tiêm sau nhãn cầu vào các ống chứa

K₂EDTA (chất chống đông) đã làm mát trước. Các mẫu máu được đặt trên nước đá uớt và ly tâm (2000g, 5 phút ở 4°C) để thu huyết tương trong vòng 30 phút thu mẫu. Tất cả các mẫu được bảo quản lạnh đông ở khoảng -80°C cho đến khi phân tích. Trước khi phân tích, các mẫu được trộn với chất nội chuẩn (dexamethason) trong axetonitril, xoáy, ly tâm, và dịch nổi được tiêm để phân tích. Nồng độ hợp chất trong huyết tương được xác định bằng thiết bị LC-MS-MS (API 4000, Triple Quadrupole với ion hóa bằng phun điện; Acuity Ultra Performance Liquid Chromatography cột C18, với dung môi hữu cơ MeOH và axit formic). Các thông số PK bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở T_{max}, C_{max}, t_{1/2}, AUC_{last}, AUC_{inf} được tính toán bằng các sử dụng gói phần mềm WinNonlin Professional 6.2, mô hình được động học được động học không buồng NCA200.

Tỷ lệ Não so với Huyết tương (B:P). Nhóm chuột khác (N=3) được cho sử dụng liều (10mg/kg qua đường miệng trừ khi được chỉ định khác) và sau đó giết ở thời điểm nồng độ huyết tương đạt tối đa (T_{max} ước lượng sau khi sử dụng liều 2 giờ) tại thời điểm đó huyết tương và não được thu nhận. Mô não sau khi thu nhận được rửa bằng nước muối lạnh, làm khô bằng giấy lọc, cân và làm lạnh đông nhanh bằng cách đặt trên đá khô. Tất cả các mẫu được bảo quản lạnh đông ở khoảng -80°C cho đến khi phân tích. Ở thời điểm phân tích, mô não được đồng hóa (dung dịch đồng hóa PBS, độ pH=7,4), trộn với chất nội chuẩn (dexamethason) trong axetonitril, xoáy, ly tâm, và dịch nổi được tiêm để phân tích nồng độ hợp chất bằng phương pháp LC-MS-MS (API 4000, Triple Quadrupole với ion hóa bằng phun điện; Acuity Ultra Performance Liquid Chromatography cột C18, với dung môi hữu cơ MeOH và axit formic). Các mẫu huyết tương được xử lý bằng phương pháp tương tự (trừ bước đồng hóa) và nồng độ hợp chất trong cả hai mẫu được tính toán dựa trên các đường cong chuẩn được tạo ra. Kết quả được thể hiện trên bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm hợp chất có công thức (I) và các hợp chất so sánh với nó.

Hợp chất	Mức độ xuất Rev [IC ₅₀]	Độ độc tế bào [IC ₅₀]	AUC _{Inf} (giờ•ng/mL)*	B:P*
X-1**	< 1μM	< 1μM	209‡	NT
X-2***	< 1μM	< 1μM	68,3†	1,27†
X-3	< 1μM	< 1μM	12300	5,0
1	NT	< 1μM	33100	2,25
2	< 1μM	< 1μM	28900	0,16
3	< 1μM	< 1μM	15200	0,03
4	NT	< 1μM	20929	0,028
5	NT	< 1μM	NT	NT
6	NT	< 1μM	NT	NT
7	NT	< 1μM	NT	NT
8	NT	< 1μM	9150	0,41
19	NT	< 1μM	671****	N/A
10	NT	< 1μM	NT	NT
11	NT	< 1μM	8340	0,095
12	< 1μM	< 1μM	19600	0,06
13	NT	< 1μM	1103	1,5
14	NT	< 1μM	1419	0
15	NT	< 1μM	588	0

* Sử dụng liều 10mg/kg qua đường miệng ở chuột.

** Hợp chất 26 từ tài liệu US 2009/0275607.

*** Hợp chất 44 từ tài liệu US 2009/0275607.

**** Sử dụng liều 5mg/kg qua đường miệng ở chuột

‡ Trị số AUC_{Inf} của hợp chất X-1 dùng cho chuột với liều 10mg/kg qua đường miệng là dưới giới hạn định lượng. Dữ liệu được báo cáo cho liều 5mg/kg trong tĩnh mạch.

† Sử dụng liều 10mg/kg qua đường miệng ở chuột cống.

NT = không thử nghiệm

N/A= dưới giới hạn định lượng

AUC_{Inf} của hợp chất X-là dưới giới hạn phát hiện khi dùng liều 10mg/kg qua đường miệng cho chuột. Khi dùng liều 5mg/kg trong tĩnh mạch, hợp chất X-1 thể hiện mức phơi nhiễm tối thiểu, như được chỉ thị bởi AUC_{Inf} thấp 209 giờ•ng/mL. Tỷ lệ não so với huyết tương của hợp chất X-1 không được xác định do mức của nó không đáng kể (dưới giới hạn định lượng) trong não khi dùng liều qua đường miệng.

AUC_{Inf} của hợp chất X-2 được tính toán là 68,3 giờ•ng/mL khi dùng liều 10mg/kg qua đường miệng cho chuột cống. Mức phơi nhiễm này quá thấp so với hợp chất X-3 và hợp chất có công thức (I) theo sáng chế. Tuy nhiên, hợp chất X-2 thể hiện tỷ lệ não so với huyết tương vừa phải. AUC_{Inf} kết hợp với tỷ lệ não so với huyết tương đáng kể cho thấy hợp chất X-2 cũng có thể đi qua BBB bất chấp mức phơi nhiễm thấp. Chúng ta tin rằng hợp chất X-2 sẽ có tỷ lệ não so với huyết tương cao hơn đáng kể nếu AUC_{Inf} của nó tăng.

AUC_{Inf} của hợp chất X-3 được tính toán là 12300 giờ•ng/mL khi dùng liều 10mg/kg qua đường miệng cho chuột cống, cho thấy mức phơi nhiễm tốt. Tuy nhiên, X-3 thể hiện tỷ lệ B:P cao 5,0.

Các hợp chất có công thức (I), đều thể hiện AUC_{Inf} cao (>3500 giờ•ng/mL) và tỷ lệ B:P tương đối thấp (<2,5). Nói chung, mức phơi nhiễm cao hơn của tác nhân điều trị thường làm tăng khả năng thâm nhập não. Do đó ngạc nhiên và bất ngờ rằng các hợp chất có công thức (I) thể hiện mức AUC_{Inf} cao trong khi tỷ lệ não so với huyết tương tương đối thấp.

Ví dụ 17. Mô hình

Đánh giá ảnh hưởng của hợp chất 2 đến sự sinh trưởng khối u trong dòng tế bào u lympho Z-138 sinh trưởng dưới dạng mảnh ghép ở chuột SCID

Tế bào u lympho Z-138 (ATCC # CRL-3001) vô nhiễm được từ ATCC. Các tế bào này được nuôi trong môi trường IMEM có bổ sung 10% huyết thanh ngựa, 1% penixilin và streptomycin, và 2mM L-glutamin. Các tế bào được nuôi cấy cứ cấp bằng cách pha loãng với tỷ lệ 1:5 đến 1:10. Sử dụng hai mươi bốn (24) chuột CB-17 SCID cái (Charles River Labs mã chủng 236), độ tuổi từ 5 đến 6 tuần tuổi. Các chuột SCID được tiêm vào sườn trái bằng tế bào Z-138 với thể tích 0,2ml, tương đương với 4×10^7 tế bào cho mỗi chuột.

Việc điều trị được bắt đầu khi khối u đạt thể tích trung bình 84,3mm³. Chuột được chia thành bốn (4) nhóm gồm tám (8) chuột trước khi bắt đầu điều trị dựa trên thể tích khối u sao cho thể tích khối u trung bình trong mỗi nhóm nằm trong khoảng từ 77 đến 92mm³. Các chuột được điều trị bằng chất dẫn, thuốc điều trị chuẩn/thuốc đối chứng dương (cyclophosphamid) hoặc hợp chất 2, như được thể hiện trên bảng 3.

Bảng 3. Các nhóm nghiên cứu ban đầu

Nhóm	Số động vật	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng
1	8	Chất dẫn	10 ml/kg	Đường miệng	Thứ 2, thứ 4, thứ 6
2	8	Xyclophosphamit	80mg/kg	Trong màng bụng	Các ngày 1, 3, 5
3	8	Hợp chất 2	15mg/kg	Đường miệng	Thứ 2, thứ 4, thứ 6
4	8	Hợp chất 2	7.5mg/kg	Đường miệng	Thứ 2, thứ 4, thứ 6

Các động vật này được cho ăn thức ăn nhai Labdiet® 5001 dạng do loài gặm nhấm và nước vô trùng tùy ý. Các khối u được đo hai ngày một lần bằng thước kẹp micro, và thể tích khối u được tính toán dưới dạng (chiều dài x chiều rộng x chiều rộng)/2. Tất cả các động vật được cân hàng ngày để đánh giá sự khác biệt có thể có về khối lượng của động vật giữa các nhóm điều trị như là chỉ thị của độc tính có thể có do điều trị. Các động vật mất giảm khối lượng trên 20% so với ban đầu bị giết. Chuột giảm khối lượng trên 15% so với ban đầu không được điều trị tiếp cho đến khi độ giảm khối lượng phục hồi còn nhỏ hơn 5% so với khối lượng ban đầu của chúng. Động vật bất kỳ với thể tích khối u trên 1500 mm³ bị giết.

Dung dịch liều dùng được bào chế mới vào mỗi ngày sử dụng liều. Hợp chất 2 được phân phối dưới dạng bột đông khô chứa 69,61% hợp chất 2 với lượng Pluronic F-68 và PVP K29/32 đến cân bằng. Dung dịch này được bào chế bằng cách hòa tan bột đông khô trong nước vô trùng. Xyclophosphamit được hòa tan ở nồng độ 8 mg/mL trong nước vô trùng để tiêm. Tất cả các chất thử nghiệm được sử dụng với thể tích 10 mL/kg thể trọng.

Sự khác biệt thống giữa các nhóm điều trị được xác định bằng thử nghiệm Mann-Whitney Rank Sum hoặc thử nghiệm ANOVA với trị số tới hạn 0,05.

FIG.1 thể hiện rằng tất cả các nhóm điều trị thể hiện độ giảm sự sinh trưởng khối u có ý nghĩa thống kê so với chất dẫn khi được đánh giá bằng cách so sánh diện tích dưới đường cong sinh trưởng bằng thử nghiệm ANOVA về cả thể tích khối u và tỷ lệ phần trăm thể tích khối u. Các nhóm điều trị này thể hiện độ giảm sinh trưởng khối u đáng kể với $p < 0,0001$. Đã quan sát thấy một số mức độ giảm thể trọng ở nhóm điều trị

bằng hợp chất 2 ở liều 15mg/kg và, dù có ý nghĩa thống kê, so với đối chứng chất dẫn, độ giảm thể trọng nhiễm trùng chỉ giới hạn ở một số động vật.

Hợp chất 2, dùng qua đường miệng, có tác dụng chống khối u ở cả liều 7,5mg/kg và 15mg/kg theo cách phụ thuộc liều.

Hoạt tính kháng khối u của hợp chất 2 trong mô hình caxinom phổi tế bào nhỏ A549

Dòng tế bào A549 thu được từ môi trường nuôi cấy mô caxinom phổi từ bệnh nhân nam 58 tuổi người Cáp-ca. Các tế bào này được nuôi trong môi trường nuôi cấy mô F12-K Ham với 10% huyết thanh thai bò và 1% penixilin/streptomycin. Các tế bào được trypsin hóa định kỳ và cấy chuyển 1:10. Ba mươi hai (32) chuột CB-17 SCID cái (Charles River Labs mã chủng 236), độ tuổi từ 5 đến 6 tuần tuổi được sử dụng với thể trọng trung bình trước điều trị là 16,3g. Các chuột được chia thành bốn (4) nhóm mỗi nhóm tám (8) chuột khi bắt đầu điều trị dựa trên thể tích khối u. Vào ngày cấy ghép, các tế bào được rửa trong PBS, trypsin hóa và tại huyền phù lại trong môi trường không đầy đủ đến mật độ 2×10^7 tế bào/mL trước khi cố định bằng cùng thể tích dung dịch Matrigel. Sau đó hỗn hợp này được tiêm dưới da vào chuột với thể tích 0,1 L bằng kim 23G.

Các chuột được điều trị bằng chất dẫn, thuốc điều trị chuẩn/thuốc đối chứng dương (xisplatin) hoặc hợp chất 2, như được thể hiện trên bảng 4. Khối lượng và tình trạng của động vật điều được ghi lại hàng ngày, và các khối u được đo vào Thứ 2, Thứ 4 và Thứ 4 bằng thước kẹp micro, và thể tích khối u được tính toán bằng (chiều dài x chiều rộng x chiều rộng)/2.

Bảng 4. Nhóm thử nghiệm ban đầu

Nhóm	Số động vật	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng liều
1	8	Chất dẫn	10 ml/kg	Qua đường miệng	Thứ 2, thứ 4, thứ 6
2	8	Xisplatin	5 mg/kg	trong màng bụng	Các ngày 1, 15
3	8	Hợp chất 2	10 mg/kg	Qua đường miệng	Thứ 2, thứ 4, thứ 6
4	8	Hợp chất 2	5 mg/kg	Qua đường miệng	Thứ 2, thứ 4, thứ 6

Các động vật với độ giảm khối lượng trên 20% so với khối lượng ban đầu bị giết. Chuột với độ giảm khối lượng trên 15% so với khối lượng ban đầu không được điều trị

tiếp cho đến khi độ giảm khối lượng phục hồi còn dưới 5% so với khối lượng ban đầu. Động vật bất kỳ với thể tích khối u trên 1500mm^3 bị giết.

Các dung dịch liều dùng được bào chế mới vào mỗi ngày sử dụng liều. Hợp chất 2 được phân phối dưới dạng bột đông khô chứa 69,61% hợp chất 2 với lượng Pluronic F-68 và PVP K29/32 đến cân bằng. Dung dịch này được bào chế bằng cách hòa tan bột đông khô trong nước vô trùng. Xisplatin được hòa tan ở 5 mg/mL trong DMSO và pha loãng 1:10 trong nước vô trùng để tiêm. Tất cả các chất thử nghiệm được sử dụng với thể tích 0,1mL/10g thể trọng.

Những khác biệt thống kê giữa các nhóm điều trị được xác định bằng thử nghiệm Mann-Whitney Rank Sum hoặc thử nghiệm ANOVA với trị số tới hạn là 0,05.

Dữ liệu về sự thay đổi thể tích khối u trong suốt thử nghiệm được thể hiện trong FIG. 2. Thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng chất dẫn tăng từ 95mm^3 vào Ngày 1 đến 1669mm^3 vào Ngày 29. Nhóm được điều trị bằng xisplatin có thể tích khối u trung bình là 104mm^3 vào Ngày 1, tăng đến 1136mm^3 vào Ngày 29. Chuột được điều trị bằng hợp chất 2 với liều 10mg/kg qua đường miệng (Nhóm 3) có thể tích khối u trung bình 101mm^3 vào Ngày 1, tăng đến 686mm^3 vào Ngày 29. Chuột được điều trị bằng hợp chất 2 với liều 5mg/kg qua đường miệng (Nhóm 6) có thể tích khối u trung bình là 101mm^3 vào Ngày 1, tăng đến 1231mm^3 vào Ngày 29.

Các phép phân tích dữ liệu về thể tích khối u khá được tiến hành bằng cách tính toán diện tích trung bình dưới đường cong (AUC) đối với mỗi khối u và so sánh các nhóm bằng thử nghiệm ANOVA một chiều. Phép phân tích này cho thấy rằng những khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm đối chứng chất dẫn và nhóm được điều trị bằng hợp chất 2 với liều 10mg/kg ($p=0,0005$). Cần lưu ý rằng không có sự giảm sinh trưởng khối u có ý nghĩa thống kê trong nhóm đối chứng dương (xisplatin).

Hợp chất 2, dùng qua đường miệng, có tác dụng chống khối u ở cả liều 5mg/kg và 10mg/kg theo cách phụ thuộc liều. Tuy nhiên, chỉ có nhóm dùng liều 10mg/kg thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm điều trị bằng chất dẫn.

Đánh giá hợp chất 2 trong mô hình chuột viêm khớp dạng thấp do kháng thể kháng collagen gây ra (anti-collagen antibody induced mouse model of rheumatoid arthritis - CAIA)

Hai mươi bốn (24) chuột BALB/c đực, độ tuổi từ 6 đến 8 tuần tuổi được sử dụng. Sự thay đổi thể trọng của các động vật này ở thời điểm bắt đầu điều trị không quá $\pm 20\%$ khối lượng trung bình. Các động vật này được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm sử dụng chất dẫn, dexamethason hoặc hợp chất 2. Vào ngày nghiên cứu 0 (bắt đầu nghiên cứu), tất cả các chuột được tiêm tĩnh mạch 2mg hỗn hợp kháng thể ArthritoMAbTM (MD Biosciences #S1203001) tiếp theo là tiêm trong màng bụng LPS (100 μ g/chuột) vào ngày nghiên cứu thứ 3. Các động vật thử nghiệm được điều trị bằng 7,5mg/kg hợp chất 2 hoặc 4mg/kg hợp chất 2 qua đường miệng; 1mg/kg dexamethason trong màng bụng; hoặc chất dẫn qua đường miệng. Việc điều trị được thực hiện mỗi ngày một lần vào các ngày 4, 6, 8 và 10 cho tất cả các nhóm, trừ khi các khoảng cách sử dụng liều được áp dụng. Nếu thể trọng của động vật giảm xuống dưới 87% thể trọng ban đầu vào ngày thử nghiệm 0, động vật sẽ không được cho sử dụng liều cho đến khi nó đạt khối lượng tương đương 90% thể trọng vào ngày 0 hoặc cao hơn.

Sự phát triển bệnh viêm khớp, các dấu hiệu lâm sàng và thể trọng được theo dõi ở tất cả các chuột vào ngày nghiên cứu thứ 0, 3-8, 10 và 12. Quan sát bao gồm các thay đổi trên da, lông, mắt, màng nhày, sự bài tiết và xuất tiết (ví dụ, tiêu chảy) và hoạt động tự động (ví dụ, chảy nước mắt, tiết nước bọt, nổi da gà, thay đổi kích thước đồng tử, phở hô hấp bất thường). Tất cả các chi (chi trước trái và phải, và chi sau trái và phải) của từng động vật được kiểm tra dấu hiệu đáp ứng sinh viêm khớp trước khi cảm ứng bệnh viêm khớp và sử dụng thuốc thử nghiệm hoặc đối chứng vào ngày nghiên cứu thứ 0 và tiếp theo vào các ngày nghiên cứu thứ 3-8, 10 và 12 (kết thúc thử nghiệm). Các phản ứng viêm khớp được tính điểm và ghi nhận theo thang đo 0-4 theo trật tự tăng dần về mức độ nghiêm trọng, như thể hiện trong bảng 5 dưới đây. Độ dày chi cũng được đo bằng thước kẹp đôi (Kroeplin, Munich, Germany).

Bảng 5. Điểm viêm khớp lâm sàng

Điểm viêm khớp	Điểm
Không phản ứng, bình thường	0
Nhẹ, nhưng đỏ và sưng rõ ràng ở mắt cá/cổ tay hoặc đỏ và sưng rõ ràng giới hạn ở các ngón riêng rẽ, không tính đến số ngón bị ảnh hưởng	1
Đỏ và sưng vừa đến nghiêm trọng ở mắt cá/cổ tay	2
Đỏ và sưng toàn chi bao gồm các ngón	3
Chi viêm tối đa liên quan đến nhiều khớp	4

Liều được sử dụng được tính toán dựa trên giả định rằng các động vật có khối lượng trung bình 20g. Dung dịch gốc chứa dexamethason được bào chế trong etanol 100% và pha loãng đến nồng độ thích hợp trong PBS trước khi sử dụng. Chất dẫn cho nhóm đối chứng chất dẫn được bào chế bằng cách hòa tan 0,6g Pluronic và 0.6g PVP trong 100mL nước cất khử ion. Dung dịch MAb gốc (10mg/mL) do MD Biosciences, Division of Morwell Diagnostics GmbH cung cấp. LPS được pha loãng trong PBS để thu được nồng độ thích hợp. Chỉ cần xoay kỹ trước khi tiêm. Hợp chất 2 được phân phối dưới dạng bột thuốc đông khô chứa 70,71% hợp chất 2 với lượng Pluronic F-68 và PVP K29/32 đến cân bằng. Sử dụng thể tích cố định 200 μ L cho mỗi chuột.

Đánh giá ban đầu dựa trên giá trị trung bình của phép đo điểm viêm khớp và độ dày chân. Nếu thích hợp, sử dụng phép phân tích dữ liệu bằng phần mềm ANOVA với phân tích post-hoc kiểm định Tukey để xác định ý nghĩa của hiệu quả điều trị.

FIG.3A và FIG.3B thể hiện kết quả của thử nghiệm trên mô hình chuột CAIA. Các dấu hiệu lâm sàng có liên quan đến sử dụng LPS xuất hiện ở tất cả các nhóm sau khi sử dụng LPS vào Ngày 3. So với chuột được điều trị bằng chất dẫn, chuột được điều trị bằng 7,5mg/kg hoặc 4mg/kg hợp chất 2 có tổng điểm viêm khớp giảm đáng kể lần lượt vào các Ngày 5-12 và 6-12. Việc điều trị bằng dexamethason giảm đáng kể tổng điểm viêm khớp so với nhóm sử dụng chất dẫn vào các Ngày 6-12. So với chuột được điều trị bằng chất dẫn, chuột được điều trị bằng 7,5mg/kg hoặc 4mg/kg hợp chất 2 điểm viêm khớp chân sau giảm đáng kể vào các Ngày 5-12. Việc điều trị bằng dexamethason giảm đáng kể điểm viêm khớp chân sau so với nhóm sử dụng chất dẫn vào các Ngày 5 và 12. Không có sự khác biệt đáng kể về thể trọng giữa nhóm điều trị bằng chất dẫn và nhóm điều trị bằng thuốc thử nghiệm.

Qua các phát hiện trong nghiên cứu này, hợp chất 2 với liều 7,5mg/kg hoặc 4mg/kg phân phối qua đường miệng thể hiện hoạt tính chống viêm khớp đáng kể trong mô hình viêm khớp dạng thấp do kháng thể kháng collagen gây ra, với sự giảm liên tục điểm trung bình viêm khớp và giảm độ dày chân.

Nghiên cứu hiệu lực của hợp chất 2 trong bệnh viêm khớp do collagen gây ra (collagen-induced arthritis - CIA) ở chuột cống Lewis

Bốn mươi (40) chuột cống Lewis cái (BK), độ tuổi từ 6 đến 8 tuần tuổi thể trọng trước khi điều trị nằm trong khoảng từ 180 đến 200g được chia ngẫu nhiên thành bốn (4) nhóm (Nhóm A-D) mỗi nhóm gồm mười (10) chuột cống. Chuột cống ở các nhóm B đến D được gây miễn dịch qua da bằng CII bò trong IFA ở ba vị trí cần gốc đuôi và qua lưng bằng 500 μ L nhũ dịch vào Ngày 0 (200 μ L, 200 μ L, 100 μ L cho từng vị trí). Vào Ngày 7, chuột cống ở các nhóm B-D được tiêm nhắc lại bằng cùng lượng nhũ dịch qua da gần các vị trí tiêm trước đó. Trong mô hình điều trị (Nhóm C và D), dexamethason hoặc hợp chất 2 được dùng qua đường miệng cho chuột cống mắc CIA sau khi bệnh viêm khớp khởi phát, như được thể hiện trong bảng 6. Các chuột cống được cân hằng ngày và nghỉ dùng thuốc khi động vật giảm khối lượng trên 13%.

Bảng 6. Các nhóm nghiên cứu ban đầu

Nhóm	Gây miễn dịch	Điều trị		Sử dụng	n
A	Naive	PBS	chất dẫn	qua đường miệng mỗi ngày một lần, từ khi khởi phát đến ngày 28	10
B	Model	Col II trong IFA	chất dẫn	qua đường miệng mỗi ngày một lần, từ khi khởi phát đến ngày 28	10
C	DEX (1MPK)	Col II trong IFA	DEX (1MPK)	qua đường miệng mỗi ngày một lần, từ khi khởi phát đến ngày 28	10
D	Hợp chất 2 (4MPK)	Col II trong IFA	Hợp chất 2 (4MPK)	qua đường miệng hai ngày một lần, từ khi khởi phát đến ngày 28	10

Sự phát triển CIA được đánh giá thông tính qua điểm đại thể và đo độ sưng chân. Sự phát triển này được đánh giá hằng ngày trong 5 ngày đầu sau khi gây miễn cảm (ngày 7) và sau đó là hai lần một tuần (Thứ 2 và Thứ 5) trong thời gian còn lại với hệ thống tính điểm lâm sàng đối với từng chân được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7. Điểm viêm khớp lâm sàng

Điểm viêm khớp	Điểm
Không có bằng chứng về ban đỏ và sưng	0
Ban đỏ và sưng giới hạn ở giữa bàn chân (cổ chân) hoặc khớp mắt cá	1
Ban đỏ và sưng nhẹ kéo dài từ mắt cá đến giữa bàn chân	2

Ban đỏ và sưng vừa kéo dài từ mắt cá đến xương bàn chân	3
Ban đỏ và sưng nghiêm trọng quanh mắt cá, bàn chân, và ngón chân	4

Thể tích bàn chân được đo bằng thiết bị đo độ phồng mạch vào cùng ngày đo viêm khớp trong suốt giai đoạn thử nghiệm. Thể tích của từng chân sau và tỷ lệ sưng được xác định và sử dụng phương trình sau:

$$\text{Tỷ lệ sưng} = (C_N - C_0) / C_0 \times 100\%.$$

FIG. 4A là đồ thị sưng khớp theo thời gian, và thể hiện độ sưng khớp đo được theo thang đo 0-4 ở chuột cống tự nhiên và chuột cống được điều trị theo mô hình, bằng đối chứng dương, hoặc bằng hợp chất 2.

CII bò (trong axit axetic 10mM) ở nồng độ 4mg/mL được nhũ hóa với cùng thể tích IFA.

Điểm lâm sàng được xác định cho từng động vật, và trung bình tổng của tất cả các động vật trong từng nhóm được biểu thị dưới dạng điểm viêm khớp trung bình. FIG. 4B là đồ thị điểm lâm sàng dưới dạng hàm của thời gian, và thể hiện điểm viêm khớp lâm sàng của chuột cống tự nhiên và chuột cống được điều trị theo mô hình, bằng đối chứng dương, hoặc bằng hợp chất 2.

Vào Ngày 28 của thử nghiệm, ba đại diện của mỗi nhóm điều trị bị giết và chân sau được thu nhận và bảo quản trong dung dịch formalin đậm trung tính 4%. Các đoạn cắt ra từ chân sau đã chuẩn bị được nhuộm hematoxylin và eosin (H&E).

Phân tích mô bệnh học của các động vật đối chứng thể hiện sự bào mòn sụn và hình thành mô xơ phù hợp với chiều hướng bệnh. Tuy nhiên, ở các chuột cống được điều trị bằng hợp chất 2, đã phát hiện sụn tương đối nguyên vẹn trên bề mặt khớp và hình thành mô xơ là tối thiểu. Kết quả phân tích mô học được thể hiện trong FIG. 5.

Điểm lâm sàng, dữ liệu về sưng khớp và dữ liệu kiểm tra mô học thể hiện sự tương quan. Các kết quả cũng thể hiện rằng hiệu quả điều trị của hợp chất 2 với liều 4mg/kg (MPK), những được thể hiện qua ảnh hưởng của nó đến điểm lâm sàng, sưng khớp và kiểm tra mô học. Kết quả đối với mô hình CIA ở chuột cống Lewiss được minh họa trên FIG. 4A, FIG. 4B, và FIG. 5.

Hoạt tính chống bệnh vẩy nến của hợp chất 2 đối với bệnh vẩy nến do phorbol-12-myristat-13-axetat (PMA) gây ra ở chuột BALB/c cái

Hai mươi bốn (24) chuột BALB/c cái, độ tuổi từ 6 đến 8 tuần tuổi với thể trọng nằm trong khoảng từ 22 đến 30g được sử dụng. Các chuột được chia ngẫu nhiên thành bốn (4) nhóm gồm tám (8) chuột trong mỗi nhóm. Việc chia nhóm động vật như sau: Nhóm I (tự nhiên; etanol), Nhóm II (PMA; etanol), Nhóm III (PMA; Hợp chất 2 10 μ M) và Nhóm IV (PMA; betamethason). Hai mươi (20) μ L PMA (4 μ g/20 μ L axeton) được dùng khu trú ở phần bề mặt trên của loa tai của tất cả các động vật ở Nhóm II đến Nhóm IV. PMA được dùng hằng ngày trên tai trái và vào các ngày xen kẽ (thứ 2-thứ 4-thứ 6) trên tai phải từ Ngày 1 đến Ngày 9. Ba mươi (30) phút sau khi dùng PMA, chất dẫn hoặc hợp chất chuẩn (betamethason) hoặc hợp chất 2 được dùng khu trú trên các tai động vật từ các nhóm khác nhau. Lưu ý, chất dẫn, hợp chất chuẩn, và hợp chất 2 được dùng hằng ngày trên cả hai tai của các động vật khác nhau từ Ngày 1 đến Ngày 12.

Các động vật được quan sát hằng ngày trong khoảng thời gian 12 ngày để phát hiện triệu chứng bất kỳ liên quan đến điều trị. Độ dày tai cơ bản được ghi lại ở tất cả các động vật (trước khi dùng PMA) bằng thước calip kiểu ren kỹ thuật số tại thời điểm T0 (Ngày 1). Trong toàn bộ thời gian thử nghiệm, 4 giờ sau khi sử dụng chất dẫn, hợp chất chuẩn, hoặc hợp chất 2, đo độ dày tai hằng ngày bằng thước calip kiểu ren kỹ thuật số và điểm ban đỏ, tróc vảy và gấp nếp được ghi nhận. Mức độ nghiêm trọng của thương tổn loa tai được đánh giá bằng hệ thống tính điểm được thể hiện trên Bảng 8.

Bảng 8. Điểm bệnh vảy nến

Chỉ số/Điểm	0	1	2	3
Ban đỏ	Bình thường	Nhẹ	Vừa	Nặng
Tróc vảy				
Gấp nếp				

Các động vật được cho ăn thức ăn dạng viên hấp chín cân bằng dinh dưỡng (Nutrivet Life Sciences, Pune (India)) tùy thích và được cho uống nước bình thường trong toàn bộ các giai đoạn thử nghiệm.

DMSO 100% (LR Grade) và etanol (LR Grade) có bán trên thị trường được sử dụng để chuẩn bị các dạng bào chế. PMA được chuẩn bị bằng cách hòa tan 10mg PMA trong 50,0mL axeton. Hợp chất 2 chuẩn bị bằng cách hòa tan 1,47mg hợp chất 2 trong 300 μ L DMSO 100%.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên các FIG. 6A-6D dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM). Không có sự khác biệt đáng kể về thể trọng, mức tiêu thụ thức ăn và nước uống giữa tất cả các nhóm điều trị. Việc sử dụng PMA cho thấy, (i) độ dày tai trái cũng như tai phải tăng (Nhóm II so với nhóm Tự nhiên) và (ii) chỉ số diễn biến của bệnh (DAI) của tai trái cũng như tai phải tăng (Nhóm II so với nhóm Tự nhiên). Điều quan trọng là, việc dùng hợp chất 2 khu trú làm giảm rõ rệt sự gia tăng do PMA gây ra đối với (i) độ dày tai trái và phải, và (ii) DAI tai trái và phải. Ảnh hưởng này rõ rệt vào các Ngày 6-8 của thử nghiệm khi nhiều động vật được điều trị bằng hợp chất 2 giảm độ dày tai trái/phải (so với các động vật thuộc Nhóm II), và DAI (so với các động vật thuộc Nhóm II) hơn. Lưu ý, sự giảm độ gia tăng độ dày tai trái/phải và DAI bởi PMA do hợp chất 2 gây ra giảm theo tiến triển của thử nghiệm (Ngày 10 và sau đó).

Trong mô hình bệnh vảy nến do PMA gây ra ở chuột, hợp chất 2 thể hiện hoạt tính chống bệnh vảy nến có ý nghĩa thống kê.

Hoạt tính chống bệnh vảy nến của hợp chất 2 trong mô hình viêm da/bệnh vảy nến do Imiquimod (IMQ) gây ra (thử nghiệm 1)

Bốn mươi (40) chuột BALB/c được độ tuổi từ 6 đến 8 tuần tuổi được sử dụng với thể trọng trước điều trị nằm trong khoảng từ 22 đến 30g. Chuột BALB/c được chia ngẫu nhiên thành (4) nhóm gồm 10 chuột mỗi nhóm. Một vùng da nhỏ (khoảng $2 \times 2 \text{ cm}^2$) trên lưng của tất cả các động vật này được cạo gọn gàng. Các động vật Nhóm-I là động vật tự nhiên. Bệnh vảy nến được gây ra ở các Nhóm II đến IV [Nhóm II (IMQ; chất dẫn), Nhóm III (IMQ; Hợp chất 2 ($1 \mu\text{M}$)) và Nhóm IV (IMQ; xyclophosphamit (10 mg/kg))] bằng cách dùng 31,25mg kem IMQ khú trú hằng ngày trên lưng của các động vật này từ Ngày 1 đến Ngày 13. Bốn giờ sau khi sử dụng IMQ, chất dẫn hoặc hợp chất chuẩn (xyclophosphamit) hoặc hợp chất 2 được sử dụng hằng ngày (khu trú - $30 \mu\text{L}$; qua đường miệng - theo thể trọng) cho nhóm thích hợp từ Ngày 1 đến Ngày 13. Hai giờ sau khi sử dụng chất dẫn hoặc hợp chất chuẩn hoặc hợp chất 2, ban đỏ, tróc vảy, gập nếp và độ dày da được ghi nhận để xác định chỉ số diễn biến của bệnh (DAI).

Các động vật được quan sát hằng ngày trong 13 ngày để phát hiện triệu chứng bất kỳ liên quan đến việc điều trị. Các quan sát hằng ngày bao gồm thể trọng, hộ hấp thu thức ăn, độ dày da, tróc vảy, gập nếp, ban đỏ, chảy nước mũi, cử động, hô hấp,

lông, bụng căng, tình trạng da, lông mao, niêm mạc, sự có mặt hoặc không có mặt chất bài tiết, tình trạng mắt, độ nâng đuôi, hoạt động, tư thế và dáng đi. Mức độ nghiêm trọng của tương tổn phần da lưng được đánh giá bằng các cho điểm ban đỏ, tróc vảy, gập nếp và dày da dựa trên các quan sát bên ngoài của da, theo cách tính trong Bảng 9.

Bảng 9. Điểm bệnh vảy nến

Thông số/Điểm	0	1	2	3
Ban đỏ	Bình thường	Nhẹ	Vừa	Nặng
Tróc vảy				
Gập nếp				
Dày da				

DMSO 100% (LR Grade), etanol (LR Grade), xyclophosphamit (CMC), PVP và Pluronic có bán trên thị trường được sử dụng để chuẩn bị các chế phẩm. Hợp chất 2 được chuẩn bị bằng cách hòa tan 1,47mg hợp chất 2 trong 300 μ L DMSO 100%. Xyclophosphamit được chuẩn bị bằng cách hòa tan 500mg CMC trong 100mL nước cất.

Kết quả thử nghiệm thể hiện FIG. 7A và FIG. 7B được biểu thị dưới dạng trung bình $\pm$ SEM.

Không có sự khác biệt đáng kể về thể trọng, mức độ tiêu thụ thức ăn và nước uống trong nhóm điều trị so với nhóm đối chứng suốt khoảng thời gian thử nghiệm. Hợp chất 2 làm giảm biểu hiện bệnh do IMQ gây ra.

Hợp chất 2 thể hiện hoạt tính chống bệnh vảy nến, như chứng tỏ bằng sự giảm chỉ số diễn biến của bệnh so với nhóm điều trị bằng chất dẫn. Hơn nữa, hợp chất 2 có được tác dụng này mà không ảnh hưởng bất lợi đến thể trọng, độ tiêu thụ thức ăn và nước uống.

Hoạt tính chống bệnh vảy nến của hợp chất 2 trong mô hình viêm da/bệnh vảy nến do Imiquimod (IMQ) gây ra (Thử nghiệm 2)

Bốn mươi (40) chuột BALB/c đực (Biological E Limited, Hyderabad (số đăng ký CPCSEA: 36/99/CPCSEA)) được chia thành bốn (4) nhóm gồm mười (10) chuột mỗi nhóm. Các động vật được chia ngẫu nhiên dựa trên thể trọng của chúng. Các nhóm được gọi là Nhóm-I (Tự nhiên), Nhóm-II (IMQ; chất dẫn (PEG 400 và HPBCD)), Nhóm-III (IMQ; hợp chất 2 (2,5mg/kg)) và Nhóm-IX (IMQ; xyclophosphamit (10mg/kg)).

Một vùng nhỏ trên lưng của từng chuột được cạo, đảm bảo rằng các vùng này có cùng kích thước/diện tích. Bệnh vẩy nến được gây ra ở các Nhóm II đến IV bằng cách dùng khú trú 50mg kem IMQ hằng ngày từ Ngày 1 đến Ngày 6 trên lưng của các động vật này. Vào Ngày 1 và Ngày 2 của thử nghiệm, bốn giờ sau khi dùng khú trú IMQ, hợp chất 2 hoặc đối chứng dương (xyclophosphamit) hoặc chất dẫn được sử dụng cho các động vật thuộc các nhóm thích hợp. Lưu ý, các động vật trong Nhóm II và Nhóm III được tiêm dưới da, trong khi các động vật thuộc Nhóm IV được dùng qua đường miệng. Việc điều trị bằng hợp chất 2, chất dẫn và xyclophosphamit được kết thúc vào Ngày 2. Các nhóm động vật này được điều trị duy trì hằng ngày bằng IMQ cho đến Ngày 6. Vào Ngày 7, các động vật bị gây bệnh vẩy nến được chia ngẫu nhiên lại thành 3 nhóm gồm 10 động vật mỗi nhóm dựa trên chỉ số diễn biến tích lũy của bệnh (CDAI). Từ Ngày 7 đến Ngày 9, các động vật được cho dùng chất dẫn hoặc đối chứng dương hoặc hợp chất 2. Lưu ý, vào những ngày này các động vật không được điều trị bằng IMQ. Từ Ngày 10 đến Ngày 14, các động vật được điều trị theo cách khác bằng IMQ (các ngày 10, 12 và 14), hoặc chất dẫn, đối chứng dương hoặc hợp chất 2 (các ngày 11, 13).

Tất cả các động vật được quan sát hằng ngày trong khoảng thời gian 16 ngày để quan sát chung về thể trọng và độ tiêu thụ thức ăn và nước uống. Vào các Ngày 1 và 2, điểm ban đỏ, tróc vảy, gập nếp và dày da được ghi nhận 2 giờ sau khi sử dụng chất dẫn/đối chứng dương/các hợp chất thử nghiệm, và vào các Ngày 3 đến 14 điểm được ghi nhận 4 giờ sau khi dùng IMQ, hoặc dùng đối chứng dương, chất dẫn hoặc hợp chất 2. Mức độ nghiêm trọng của cảm ứng trên lưng động vật được đánh giá và tính điểm như được thể hiện trong bảng 10.

Chất dẫn được chuẩn bị bằng cách hòa tan 40mg HPBCD trong 70,0mL nước cất. Hợp chất 2 được chuẩn bị bằng cách hòa tan 3,59mg trong PVP 0,5% và Pluronic 0,5%. Xyclophosphamit được chuẩn bị bằng cách hòa tan 500mg CMC trong 100 mL nước cất.

Kết quả thử nghiệm thể hiện trong bảng 10 được biểu thị dưới dạng trung bình $\pm$ SEM. Dữ liệu được đánh giá bằng thử nghiệm ANOVA một chiều, và phân tích post hoc được thực hiện bằng thử nghiệm Dunnett.

Bảng 10. Tỷ lệ giảm chỉ số diễn biến của bệnh (DAI)

<u>Tỷ lệ giảm DAI</u>		Số liệu trước khi sử dụng IMQ/thuốc							
		% thay đổi từ khi sử dụng liều đầu tiên (tức là, từ các số liệu trước khi sử dụng IMQ/thuốc vào ngày 7)							
		Ngày 7	Ngày 8	Ngày 9	Ngày 10	Ngày 11	Ngày 12	Ngày 13	Ngày 14
Tự nhiên, chất dẫn		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IMQ, chất dẫn		0,0	4,2	-33,3	-66,7	-60,4	-54,2	-45,8	-43,8
IMQ, hợp chất 2		0,0	-33,8	-58,8	-88,2	-73,5	-80,9	-61,8	-64,7
IMQ, xyclophosphamit		0,0	16,3	-39,5	-79,1	-25,6	-39,5	-25,6	-34,9

		Số liệu sau khi sử dụng IMQ/thuốc 4 giờ							
		% thay đổi từ khi sử dụng liều đầu tiên (tức là, từ các số liệu trước khi sử dụng IMQ/thuốc vào Ngày 7)							
		Ngày 7	Ngày 8	Ngày 9	Ngày 10	Ngày 11	Ngày 12	Ngày 13	Ngày 14
Tự nhiên, chất dẫn		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IMQ, chất dẫn		4,2	8,3	-35,4	-70,8	-58,3	-52,1	-39,6	-41,7
IMQ, hợp chất 2		-30,9	-35,3	-63,2	-88,2	-70,6	-73,5	-60,3	-63,2
IMQ, xyclophosphamit		23,3	20,9	-41,9	-86,0	-25,6	-34,9	-32,6	-32,6

Đã quan sát thấy rằng tỷ lệ giảm chỉ số diễn biến của bệnh ở các động vật được điều trị bằng hợp chất 2 lớn hơn đáng kể so với tỷ lệ quan sát được ở các động vật được điều trị bằng chất dẫn. Không có sự khác biệt đáng kể về thể trọng, mức độ tiêu thụ thức ăn và nước uống trong nhóm điều trị so với nhóm đối chứng trong quá trình của thử nghiệm.

Kết quả thu được cho thấy rằng việc điều trị bằng hợp chất 2 làm giảm biểu hiện bệnh do IMQ gây ra mà không ảnh hưởng lớn đến mức độ tiêu thụ thức ăn hoặc nước uống, và do đó không thể hiện ảnh hưởng đến thể trọng của động vật thuộc các nhóm được điều trị.

Tác dụng của hợp chất 2 ở chuột cống Zucker

Hai mươi một (21) chuột cống Zucker đực ở độ tuổi 7 tháng tuổi được chia thành 3 nhóm với N=7 dựa trên thể trọng và mức độ tiêu thụ thức ăn tương đồng. Một nhóm khác với N=7 ở độ tuổi phù hợp để đối chứng chuột Zucker gây được dùng làm đối chứng. Thể trọng và mức độ tiêu thụ thức ăn và nước uống được xác định ở gần như cùng thời điểm mỗi ngày (từ 14 giờ 30 đến 15 giờ 30). Vào các ngày điều trị, việc sử dụng liều được thực hiện vào lúc 14 giờ 30 đến 15 giờ 30 (khoảng 2 giờ trước khi tắt đèn).

Đối chứng chuột Zucker béo phì và gây còm được điều trị bằng chất dẫn qua đường miệng (thể tích liều 10mL/kg; 0,5% Pluronic F68 và 0,5% PVP K29/32 trong nước) vào mỗi ngày trong tuần. Cả hai nhóm sử dụng hợp chất 2 (1,5mg/kg và 3mg/kg) được điều trị qua đường miệng vào mỗi ngày trong tuần (thể tích liều 10mL/kg; 0,5% Pluronic F68 và 0,5% PVP K29/32 trong nước). Trước giai đoạn điều

trị, dữ liệu đường cơ sở 4 ngày được thu thập. Giai đoạn điều trị dài 16 ngày và giai đoạn thanh thải dài 6 ngày cũng được tính đến.

FIG. 8A, FIG. 8B và FIG. 9 thể hiện tác dụng của hợp chất 2 trên chuột cống Zucker. Tại đường cơ sở, không có sự khác biệt đáng kể về thể trọng và mức độ tiêu thụ thức ăn hằng ngày giữa 3 nhóm chuột Zucker béo phì. Tuy nhiên, tất cả các nhóm đều khác đáng kể so với nhóm chuột Zucker gầy còm.

Hợp chất 2 (1,5-3mg/kg dùng qua đường miệng) làm giảm mức độ tiêu thụ thức ăn và thể trọng hằng ngày liên quan đến liều trong khoảng thời gian điều trị 16 ngày so với nhóm đối chứng Zucker. Việc điều trị bằng hợp chất 2 cũng làm giảm đáng kể mức độ tiêu thụ nước trong cùng khoảng thời gian. Có sự khác biệt đáng kể về độ tăng thể trọng giữa nhóm dùng liều 3mg/kg hợp chất 2 và nhóm Zucker dùng chất dẫn. Không có sự khác biệt đáng kể về độ tăng thể trọng giữa nhóm điều trị bằng liều 1,5mg/kg hợp chất 2 và nhóm Zucker dùng chất dẫn.

Hợp chất 2 thể hiện sự giảm ảnh hưởng đến thức ăn hằng ngày theo cách phụ thuộc liều với liều cao hơn (3mg/kg) hiệu quả hơn so với liều 1,5mg/kg. Hơn nữa, nhóm dùng hợp chất 2 với liều 3mg/kg thể hiện độ tăng trọng thấp hơn so với nhóm đối chứng Zucker.

Tác dụng của hợp chất 2 trong mô hình bệnh béo phì do chế độ ăn gây ra

Chuột cống Sprague-Dawley được 2 tháng tuổi được cho ăn chế độ ăn giàu béo (Research Diets Inc., mã sản phẩm D12492, 60% kcal % chất béo) trong 3 tháng. Nhóm chuột phù hợp về độ tuổi được cho ăn thức ăn nhai bình thường dùng trong thử nghiệm (LabDiet 5001, ~13% kcal % chất béo), các động vật này dùng làm đối chứng cho nhóm DIO.

Ở độ tuổi 4 tháng, và 2 tháng theo chế độ ăn giàu béo, tất cả các chuột được chia thành 3 nhóm với N=7 dựa trên thể trọng và mức độ tiêu thụ thức ăn tương đồng. Thể trọng và độ tiêu thụ thức ăn và nước uống được xác định ở gần như cùng thời điểm mỗi ngày. Vào các ngày điều trị, sử dụng liều khoảng 2 giờ trước khi tắt đèn.

Nhóm đối chứng DIO được điều trị bằng chất dẫn (qua đường miệng, thể tích liều 10mL/kg; 0,5% Pluronic F68 và 0,5% PVP K29/32 trong nước) vào mỗi ngày trong tuần. Nhóm dùng liều 1,5mg/kg hợp chất 2 được điều trị qua đường miệng vào mỗi ngày trong tuần trong suốt giai đoạn điều trị (thể tích liều 10mL/kg; 0,5% Pluronic

F68 và 0,5% PVP K29/32 trong nước). Nhóm dùng liều 3mg/kg hợp chất 2 (thể tích liều 10mL/kg; 0,5% Pluronic F68 và 0,5% PVP K29/32 trong nước) được điều trị qua đường miệng ban đầu mỗi ngày một lần vào mỗi ngày trong tuần trong tuần 1, sau đó là hai lần một tuần (Thứ 2, Thứ 4) trong tuần 2. Trong các tuần điều trị 3 và 4, việc điều trị bằng liều 3mg/kg hợp chất 2 tiếp tục hai lần một tuần, trừ việc liều được dùng vào Thứ 2 và Thứ 5.

Trước giai đoạn điều trị, dữ liệu đường cơ sở 3 ngày được thu thập. Giai đoạn điều trị dài 4 tuần. Giai đoạn thanh thải dài 10 ngày cũng được tính đến.

Hợp chất 2 được dùng ở dạng bột. Hợp chất thử nghiệm này có tỷ lệ phần trăm hoạt tính là 65,89%. Tỷ lệ phần trăm hoạt tính được điều chỉnh bằng cách sử dụng BEW 1,437 và pha bằng cách hòa tan vào 0,5% khối lượng/thể tích Pluronic F-68 và 0,5% khối lượng/thể tích dung dịch chất dẫn PVP K-29-32. Dung dịch chất dẫn được pha hằng tuần trong khi hợp chất 2 được chuẩn bị mới 2 ngày một lần và bảo quản ở +4°C. Các động vật được cho sử dụng thể tích liều 10 mL/kg. Các liều riêng rẽ được tính toán dựa trên thể trọng gần nhất để tạo ra liều mg/kg/ngày chính xác.

FIG. 10A, FIG. 10B và FIG. 11 thể hiện tác dụng của hợp chất 2 trong mô hình bệnh béo phì do chế độ ăn gây ra. Tại đường cơ sở, không có sự khác biệt đáng kể về thể trọng và độ tiêu thụ thức ăn và nước uống hằng ngày giữa 3 nhóm DIO. Tuy nhiên, tất cả các nhóm DIO đều khác đáng kể so với nhóm có chế độ ăn bình thường. Đặc biệt, các động vật được cho ăn chế độ ăn bình thường có thể trọng thấp hơn đáng kể so với các chuột được cho ăn chế độ ăn giàu béo. Trái lại, chuột được cho ăn chế độ ăn giàu béo tiêu thụ ít thức ăn và nước uống hằng ngày hơn đáng kể so với chuột được cho ăn chế độ ăn bình thường.

Hợp chất 2 (1,5-3mg/kg qua đường miệng) làm giảm mức độ tiêu thụ thức ăn hằng ngày và thể trọng phụ thuộc liều trong khoảng thời gian điều trị 28 ngày so với nhóm đối chứng DIO. Việc điều trị bằng hợp chất 2 cũng làm giảm đáng kể độ tiêu thụ nước đo được trong cùng khoảng thời gian ($F_{3,27} = 11,2$, $P < 0,01$).

Xét về ảnh hưởng của điều trị đến độ tăng trọng, ảnh hưởng này được xác định theo tỷ lệ phần trăm thay đổi thể trọng từ ngày thử nghiệm 3. Có sự giảm đáng kể độ tăng trọng ở cả hai nhóm dùng hợp chất 2 so với các đối chứng DIO vào ngày điều trị 7 (ngày thử nghiệm 10) và 14 (ngày thử nghiệm 17).

Thể trọng, độ tiêu thụ thức ăn/nước uống được xác định hằng ngày trong giai đoạn thanh thải. Mức độ tiêu thụ thức ăn ở các nhóm dùng hợp chất 2 tương tự như ở đối chứng DIO. Thể trọng trong các nhóm dùng hợp chất 2 duy trì thấp hơn so với đối chứng DIO.

Hợp chất 2 làm giảm mức độ tiêu thụ thức ăn hằng ngày theo cách phụ thuộc liều. Hợp chất 2 cũng ảnh hưởng đến độ tăng trọng ở cả hai liều 1,5 và 3mg/kg.

Hợp chất 1 cảm ứng con đường kháng viêm Nrf2

Các tế bào THP-1 (human acute monocytic leukemia cells - tế bào bệnh bạch cầu đơn nhân ác tính ở người) được sử dụng để đánh giá tác dụng của hợp chất 1 đến con đường Nrf2 trong môi trường viêm. Yếu tố giống yếu tố nhân 2 (nguồn gốc hồng cầu 2) (Nuclear factor like-2 - Nrf2) là yếu tố phiên mã chống viêm. Trong điều kiện bình thường, Nrf2 được giữ trong tế bào chất bởi protein 1 liên quan đến ECH giống Kelch (Kelch like-ECH associated protein 1 - KEAP1), mà phân hủy Nrf2 bằng cách ubiquitin hóa. Nrf2 cũng có thể di chuyển vào nhân và trở lại tế bào chất dưới dạng hàng hóa của CRM1. Trong nghiên cứu này, Nrf2 được bảo vệ khỏi bị phân hủy bằng cách bất hoạt KEAP1 bằng siRNA. Sau đó, các tế bào mất KEAP1 được xử lý bằng TNF α để gây viêm, và khả năng kháng viêm của hợp chất 1 bằng cách điều khiển tăng con đường Nrf2 được thử nghiệm. Để chứng tỏ sự hoạt hóa con đường Nrf2, mức độ biểu hiện hai gen phía sau của nó là NAD(P)H dehydroaza [quinon]1 (NQO1) và epoxid hydrolaza 1 (EPHX1) được định lượng bằng phương pháp PCR định lượng.

Các tế bào THP-1 (bệnh bạch cầu đơn nhân ác tính) được đưa vào hai đĩa nuôi cấy 10cm (6*10⁶ tế bào/đĩa) với môi trường RPMI-1640 (Lonza) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò bất hoạt bằng nhiệt (Invitrogen) và 2-mercaptoetanol đến nồng độ cuối 0,05 mM. Tế bào trong một đĩa được chuyển nhiễm bằng 50nM KEAP1 siARN (Life Technologies, Silencer Select, siARN ID# s18982) bằng Lipofectamin RNAiMax (Invitrogen), trong khi đó tế bào trong đĩa còn lại được chuyển nhiễm bằng 50nM siRNA đối chứng, Block-iT (Invitrogen). Các tế bào được chuyển nhiễm được để yên trong 72 giờ và hiệu quả bất hoạt KEAP1 được tính toán bằng PCR định lượng bằng cách sử dụng mẫu dò bắt cặp KEAP1.

Tiếp theo, các tế bào từ mỗi đĩa được chia đều vào 4 giếng trong các đĩa 6 giếng khác. Một trong số các giếng của mỗi đĩa được xử lý trước bằng 1 μ M hợp chất 1 trong

1 giờ, tiếp theo là 20ng/mL TNF α trong 24 giờ. Các giếng khác được xử lý bằng 1 μ M hợp chất 1 hoặc 20 ng/mL TNF α hoặc không xử lý trong 24 giờ. Sau khi xử lý, ARN được chiết từ các tế bào bằng bộ kit chiết ARN (Qiagen). Các mẫu ARN từ mỗi nhóm điều trị được phiên mã ngược và phương pháp PCR thời gian thực được thực hiện trên trình tự cADN tương ứng bằng cách sử dụng mẫu dò bắt cặp Nrf2 và hai gen phía sau của nó, NQO1 và EPHX1. Các tế bào THP-1 được chuyển nhiễm bằng KEAP1 siRNA. Đạt được hiệu quả bất hoạt 40%. Các tế bào đã bất hoạt KEAP1 được xử lý bằng 1 μ M hợp chất 1 hoặc 20ng/mL TNF α hoặc cả hai trong 24 giờ.

FIG. 12A thể hiện độ tăng 2,5 lần về mức độ biểu hiện Nrf2 trong tế bào được điều trị bằng hỗn hợp TNF α và hợp chất 1 so với tế bào không được điều trị. Tuy nhiên, độ tăng tương tự (không quá 3 lần) về mức Nrf2 mRNA cũng được phát hiện trong các tế bào được điều trị bằng hợp chất 1 và TNF α mà không bất hoạt KEAP1. Hợp chất 1 hoặc TNF α đơn độc không có ảnh hưởng đáng kể đến sự biểu hiện Nrf2 có hoặc không bất hoạt KEAP1.

FIG. 12B thể hiện mức độ biểu hiện NAD(P)H dehydroaza [quinon]1 hoặc NQO1 trong tế bào có hoặc không bất hoạt KEAP1. FIG. 12B thể hiện rằng sự bất hoạt KEAP1 có ảnh hưởng đến sự biểu hiện NQO1. Ngay cả mẫu không được điều trị cũng thể hiện độ tăng 2 lần mức mRNA của nó khi bất hoạt KEAP1. Hỗn hợp chứa hợp chất 1 và TNF α làm tăng 4 lần mức biểu hiện NQO1 đối với mẫu bất hoạt KEAP1 so với độ tăng 2 lần với cùng hỗn hợp ở các tế bào không bất hoạt KEAP1.

FIG. 12C thể hiện mức mRNA của epoxit hydrolaza 1 hoặc EPHX1 trong các tế bào có hoặc không bất hoạt KEAP1 sau khi điều trị bằng hợp chất 1 và/hoặc TNF α . FIG. 12C thể hiện rằng hợp chất 1 điều chỉnh tăng mức biểu hiện EPHX1 khi có mặt hoặc không có TNF α . Sự bất hoạt KEAP1 góp phần vào tác dụng của hợp chất 1, vì đã quan sát thấy sự cảm ứng lên đến 2,5 lần trong các mẫu với hợp chất 1 và bất hoạt KEAP1.

Việc điều trị bằng 1 μ M hợp chất 1 trong 24 giờ với sự có mặt của 20 ng/mL TNF α điều chỉnh tăng tín hiệu Nrf2. Sự bất hoạt KEAP1 tăng cường tác dụng như quan sát được sự tăng độ cảm ứng NQO1 nhiều lần hơn (4 lần so với 2 lần) và EPHX1 (2.5 lần so với 1,5 lần) so với mức biểu hiện của chúng khi không bất hoạt KEAP1. Kết quả cho thấy sự ức chế CRM1 có thể hoạt hóa con đường Nrf2 trong quá trình

viêm, và cho thấy rằng việc điều trị bằng hợp chất 1 kết hợp với chất ức chế KEAP1 có thể hiệu quả hơn so với điều trị bằng hợp chất 1 đơn độc.

Tác dụng của hợp chất 1, 2, và 12 đến hoạt tính phiên mã của NF- κ B

TNF α có thể bao gồm hoạt tính phiên mã của NF- κ B. Hoạt tính phiên mã này bắt đầu khi I κ B, mà liên kết với NF κ B và ức chế hoạt tính của nó, bị phân hủy. Sau đó, một thành viên thuộc họ protein NF- κ B lớp II, RelA hoặc p65, tạo ra heterodime với thành viên thuộc họ protein này lớp I, p50, di chuyển đến nhân. Cấu trúc dưới đơn vị p65 có vùng chuyển hoạt hóa ở đầu tận cùng bằng C của nó, mà hoạt hóa sự phiên mã của các gen liên quan đến viêm. Giống như NF- κ B, I κ B cũng có thể di chuyển vào nhân tế bào. Sự tích tụ trong nhân của I κ B bảo vệ protein này khỏi bị phân hủy, vì sự phân hủy chủ yếu xảy ra ở tế bào chất. CRM1 chịu trách nhiệm xuất I κ B khỏi nhân. Do đó, việc ngăn chặn sự xuất I κ B khỏi nhân bằng cách ức chế CRM1 sẽ giảm thiểu hoạt tính của NF- κ B, do I κ B nhân liên kết với NF- κ B và ngăn NF- κ B liên kết với các trình tự ADN.

Các hợp chất được thử nghiệm trên tế bào HeLa (caxinom tuyến) để định lượng khả năng ức chế hoạt tính phiên mã của NF- κ B của chúng. Hoạt tính của NF- κ B được cảm ứng trong các tế bào HeLa bởi TNF α , và sau đó các hợp chất này được bổ sung để ức chế hoạt tính của NF- κ B được cảm ứng. Nồng độ ức chế 50% mức tối đa (IC₅₀) của một số hợp chất, tức là hợp chất 1, hợp chất 2 và hợp chất 12, được xác định bằng các nghiên cứu đáp ứng liều.

Các tế bào HeLa được đưa vào đĩa 12 giếng (200.000 tế bào/giếng) và nuôi cấy trong môi trường Eagle Minimal Essential (EMEM) của hãng Lonza có bổ sung 10% huyết thanh thai bò bất hoạt bằng nhiệt (Invitrogen) và 50 μ g/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen), và được để yên qua đêm để gắn kết. Các tế bào này được xử lý trước bằng hợp chất đã pha loãng hàng loạt (bắt đầu với nồng độ 30 μ M; pha loãng 1:3) trong 1 giờ và sau đó cho tiếp xúc với 20ng/mL TNF α (Peprotech) trong 4 giờ trong môi trường không chứa huyết thanh. Sau khi xử lý, các tế bào được rửa bằng PBS (Invitrogen), và dung giải bằng dung dịch đệm RIPA (Thermo Scientific). Hoạt tính phiên mã NF- κ B trong các tế bào được xác định bằng bộ kit thử nghiệm Chemiluminescent Transcription Factor Assay (Thermo Scientific Catalog# 89859), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, 1,5mg/mL dịch chiết tế

bảo toàn phần dung giải bằng RIPA từ từng mẫu xử lý được ủ trong đĩa 96 giếng phủ trình tự liên ứng được biotin hóa NF- κ B. Yếu tố phiên mã NF- κ B hoạt động liên kết với trình tự liên ứng được ủ với kháng thể đầu tiên kháng NF- κ B p65 và sau đó với kháng thể thứ hai tiếp tiếp hợp HRP. Cơ chất hóa phát quang được bổ sung vào các giếng và tín hiệu thu được được phát hiện bằng quang kế. Ba thử nghiệm riêng rẽ được phân tích đối với từng nồng độ của đường cong IC₅₀. Mô hình XLFit 205 được dùng để tính toán đường cong IC₅₀.

Mức độ ức chế hoạt tính phiên mã NF- κ B được xác định bằng dung dịch pha loãng hàng loạt hợp chất 1, hợp chất 2 và hợp chất 12 sau 1 giờ xử lý trước bằng hợp chất tiếp theo là 4 giờ phơi nhiễm với 20ng/mL TNF α . Ba thử nghiệm độc lập được tính điểm cho từng nồng độ, với điểm trung bình được trình bày trong bản mô tả. Hợp chất 1 có trị số IC₅₀ 1,59 μ M, hợp chất 2 có trị số IC₅₀ 1,22 μ M, và hợp chất 12 có trị số IC₅₀ 1,46 μ M.

Đánh giá ảnh hưởng của hợp chất 1 đến mức biểu hiện protein gây viêm, COX-2, trong tế bào HeLa sinh trưởng in vitro

Các tế bào HeLa được đưa vào đĩa nuôi cấy 6 giếng (2,5x10⁵ tế bào/giếng) trong môi trường EMEM (Lonza) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò bất hoạt bằng nhiệt (Invitrogen). Hai trong số các giếng của đĩa được xử lý trước bằng 10 μ M hợp chất 1 trong 30 phút, tại thời điểm đó một trong số các giếng được phơi nhiễm với 20ng/ml TNF α (Preprotech) trong 1 giờ. Các giếng khác được xử lý bằng 20 ng/ml TNF α hoặc không xử lý trong 1 giờ. Sau khi xử lý, RNA được chiết từ các tế bào bằng cách sử dụng bộ kit chiết ARN (Qiagen). Các mẫu ARN từ mỗi nhóm điều trị được phiên mã ngược và phương pháp PCR định lượng thời gian thực (quantitative real time - qRT) được thực hiện trên các trình tự cADN tương ứng bằng cách sử dụng mẫu dò bắt cặp COX-2 (Life Technologies).

Các tế bào HeLa được đưa vào đĩa nuôi cấy 6 giếng (5x10⁵ tế bào/giếng) trong môi trường EMEM (Lonza) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò bất hoạt bằng nhiệt (Invitrogen). Hai trong số các giếng của đĩa này được xử lý trước bằng 1 μ M hợp chất 1 trong 30 phút, tại thời điểm đó một trong số các giếng được phơi nhiễm với 20 ng/ml TNF α (Preprotech) trong 24 giờ. Các giếng khác được xử lý bằng 20 ng/ml TNF α hoặc không xử lý trong 24 giờ. Sau khi xử lý, dịch dung giải tế bào toàn phần từ các tế

bào bằng cách dung giải với dung dịch đệm RIPA có bổ sung chất ức chế proteaza và phosphatasa (Roche). Việc phát hiện protein COX-2 bằng thẩm tách miễn dịch được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng COX-2 (Cayman). Cường độ tín hiệu của protein COX-2 chuẩn hóa đến cường độ tín hiệu của beta-actin (Santa Cruz) cho từng mẫu và vẽ đồ thị dưới dạng đơn vị cường độ tùy ý.

Dữ liệu từ phân tích mARN bằng qRT-PCR được thể hiện trên FIG. 13A. Sau 1 giờ xử lý, TNF α cảm ứng mức biểu hiện mARN của COX-2 tăng khoảng 8 lần so với đối chứng, trong khi đó hợp chất 1 đơn độc không có tác dụng lên mức biểu hiện COX-2. Hợp chất 1 không phải là nguyên nhân làm tăng mức biểu hiện mARN của COX-2.

Dữ liệu phân tích protein bằng thẩm tách miễn dịch được thể hiện trên FIG. 13B. Tế bào HeLa được để yên không xử lý, được xử lý bằng 20 ng/ml TNF α hoặc 1 μ M hợp chất 1, hoặc bằng 20 ng/ml TNF α và 1 μ M hợp chất 1 trong 24 giờ, sau đó đánh giá lượng protein COX-2 có mặt bằng cách phát hiện bằng thẩm tách miễn dịch. Protein COX-2 tăng sau 24 giờ trong tế bào được kích thích bằng TNF α so với đối chứng không xử lý và so với tế bào được xử lý bằng hợp chất 1, trong khi đó hợp chất 1 làm giảm lượng protein COX-2 với sự có mặt của TNF α . Cường độ tín hiệu thẩm tách miễn dịch của protein COX-2 được chuẩn hóa đến cường độ tín hiệu của β -actin cho từng mẫu và biểu diễn bằng đồ thị.

Hợp chất 1 không ảnh hưởng mức biểu hiện COX-2 do TNF α gây ra, nhưng làm giảm mức biểu hiện protein COX-2 cảm ứng bởi TNF α .

Hợp chất 1 hướng các chất do CRM1 liên quan đến viêm vận chuyển đến nhân

Các tế bào HeLa và THP-1 (bệnh bạch cầu đơn nhân cấp tính ở người) được xử lý bằng yếu tố cảm ứng viêm, TNF α , đơn độc hoặc kết hợp với 1-10 μ M hợp chất 1 trong khoảng 4 đến 24 giờ, và sau đó được phân tích bằng miễn dịch huỳnh quang (immunofluorescence - IF) để phát hiện sự khu trú trong nhân của các protein do CRM1 liên quan đến viêm vận chuyển: I κ B, Nrf2, HMGB1, FoxP3, FOXO1a, RxR α , PPAR γ và NF κ B (cấu trúc dưới đơn vị p65).

Để phát hiện sự khu trú của I κ B, Nrf2, RxR α và PPAR γ , các tế bào được ủ trước với 10 μ M hợp chất 1 trong 30 phút, tiếp theo là ủ với 20 ng/mL TNF α trong 4 giờ trong môi trường không chứa huyết thanh. Để phát hiện HMGB1, FoxP3 và Foxo1A,

các tế bào được ủ trước với 1 μM hợp chất 1 trong 2 giờ, tiếp theo là ủ với 20 ng/mL $\text{TNF}\alpha$ trong 24 giờ. Để phát hiện $\text{NF}\kappa\text{B}$, các tế bào được ủ trước với 1 μM hợp chất 1 trong 2 giờ, tiếp theo là ủ với 20 ng/mL $\text{TNF}\alpha$ trong 24 giờ. Tế bào được cố định bằng metanol (MeOH) 100% lạnh băng và thấm/chẹn bằng 0,1% Tween 20, glyxin 0,3M, và BSA 1% trong PBS, hoặc cố định bằng PFA (3% paraformaldehyt và 2% sacaroza trong PBS) và thấm/chẹn bằng Triton-X100 0,1% và BSA 1% trong PBS. I κ B được phát hiện bằng kháng thể thứ nhất là kháng thể đơn dòng của thỏ (E130) của hãng Abcam (ab32518); Nrf2 được phát hiện bằng kháng thể thứ nhất là kháng thể đa dòng của thỏ của hãng Santa Cruz (sc722); RxR alpha được phát hiện bằng kháng thể thứ nhất là kháng thể đa dòng của thỏ của hãng Santa Cruz (sc553); PPAR gamma được phát hiện bằng kháng thể thứ nhất là kháng thể đơn dòng của thỏ [E130] của hãng Cell Signaling (#2443); Foxo1A được phát hiện bằng kháng thể thứ nhất là kháng thể đơn dòng của thỏ [C29H4] của hãng Cell Signaling (#2880); HMGB1 được phát hiện bằng kháng thể thứ nhất là kháng thể đa dòng của thỏ của hãng Abcam (ab18256); FoxP3 được phát hiện bằng kháng thể thứ nhất là kháng thể đa dòng của thỏ của hãng Abcam (ab10563); $\text{NF}\kappa\text{B}$ -p65 được phát hiện bằng kháng thể thứ nhất là kháng thể đơn dòng của thỏ [C22B4] của hãng Cell Signaling (#4764). Kháng thể thứ hai của thỏ, Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11008) được dùng để nhuộm tất cả các mẫu. Chụp ảnh ở độ phóng đại 20X.

Việc khóa các chất do CRM1 liên quan đến viêm vận chuyển trong nhân có các tác dụng bất lợi đến viêm và, do đó, thử nghiệm IF có thể làm dấu chuẩn sinh học xác định tác dụng chống viêm của các chất ức chế CRM1.

I κ B là chất ức chế $\text{NF}\kappa\text{B}$ mà cảm ứng con đường biểu hiện gây viêm. do hầu hết sự phân hủy I κ B diễn ra trong tế bào chất, sự khu trú trong nhân của nó bảo vệ I κ B khỏi phân hủy và làm cho nó liên kết với $\text{NF}\kappa\text{B}$ nhân, ngăn chặn hoạt tính gây viêm của $\text{NF}\kappa\text{B}$. Nrf2 là yếu tố phiên mã kiểu khóa kéo leuxin mà cảm ứng mức biểu hiện hoạt tính chống viêm trong nhân. HMGB1 là yếu tố box 1 nhóm di động cao, và thường liên kết chặt với chromatin. Khi được tiết một cách chủ động hoặc giải phóng thụ động khỏi các tế bào bị thương tổn, chức năng của HMGB1 là một xytokin và cảm ứng đáp ứng gây viêm. Việc khóa HMGB1 trong nhân ngăn chặn tác dụng gây viêm của nó. FoxP3, forkhead box P3, có chức năng là yếu tố phiên mã chủ đạo trong sự phát triển và chức năng của tế bào T điều hòa mà có hoạt tính ức chế miễn dịch.

FOXO1a là yếu tố phiên mã có khả năng cảm ứng các gen chống viêm, như angiopoietin-2. Do đó, sự khu trú trong nhân ngăn FOXO1a phosphoryl hóa, xuất khỏi nhân và phân hủy sau đó. R α R α là thụ thể nhân mà điều hòa mức biểu hiện các chemokin như Ccl6 và Ccl9 trong đại thực bào. R α R α là yếu tố chính thu hút bạch cầu đến các vị trí viêm. Việc khóa R α R α trong nhân dẫn đến sự thu hút và phá vỡ các yếu tố đồng hoạt hóa phiên mã mà bình thường có vai trò liên kết các yếu tố phiên mã gây viêm như NF κ B. PPAR γ là yếu tố phiên mã được hoạt hóa bởi phối tử thuộc siêu họ thụ thể nhân, và điều hòa mức biểu hiện các gen chống viêm.

Kết quả, thể hiện trong FIG. 14A và FIG. 14B, chứng tỏ sự khu trú trong nhân của các chất được vận chuyển nêu trên, ngay cả với sự có mặt của TNF α , đã biết là gây viêm. Các kết quả cho thấy khả năng của hợp chất 1 trong cảm ứng con đường chống viêm để vượt qua tình trạng viêm.

Đánh giá tác dụng của hợp chất 1 đối với sự thiếu hụt nhận thức sau chấn thương BCCI ở chuột cống

Chấn thương tác động đến vỏ não điều khiển hai bên (Bilateral controlled cortical impact - BCCI) ở vỏ não giữa vùng trán (medial frontal cortex - MFC) của chuột cống Sprague Dawley được gây ra bằng dụng cụ giập vỏ não. Sau khi kiểm soátCCI xuất huyết bề mặt vỏ não bất kỳ, và băng và da đầu được khâu lại. Các chuột cống được phẫu thuật và được gây mê, cố định trên thiết bị lập thể, và thực hiện phẫu thuật sọ.

Progesteron 16 mg/mL được hòa tan trong 22,5% 2-hydroxypropyl- β -xyclodextrin và tiêm lần đầu (16mg/kg) trong màng bụng 1 giờ sau khi chấn thương. Các lần tiêm còn lại (đều với liều 16mg/kg) được thực hiện dưới da 6 giờ sau khi chấn thương và tiếp tục trong 5 ngày sau khi chấn thương. Thực hiện việc tiêm progesteron với nồng độ 1 mL/kg. Progesteron được dùng làm đối chứng.

Hợp chất 1 0,2, 0,4, và 0,6mg/mL được tạo huyền phù trong chất dẫn (0,6% khối lượng/thể tích Pluronic® F-68 và 0,6% khối lượng/thể tích PVP K-29/32 trong nước) và dùng qua đường miệng với nồng độ 10mL/kg, 16 giờ trước khi chấn thương và 2 giờ sau khi chấn thương, và việc sử dụng tiếp tục trong 4 ngày. Các chuột đối chứng được tiêm tương tự với chất dẫn thay cho hợp chất 1, ở cùng thời điểm. Các nhóm điều trị được tóm tắt trong bảng 11.

Bảng 11. Các nhóm điều trị

Nhóm	Số động vật	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng
1	8	Chất dẫn+Phẫu thuật vờ	N/A	Qua đường miệng	16 giờ trước khi chấn thương, 2 giờ sau khi chấn thương và tiếp tục trong 4 ngày.
2	8	Chất dẫn+BCCI	N/A	Qua đường miệng	16 giờ trước khi chấn thương, 2 giờ sau khi chấn thương và tiếp tục trong 4 ngày.
3	8	Progesteron	16mg/kg	Trong màng bụng + dưới da	1 h sau khi chấn thương, [trong màng bụng] 6 giờ sau chấn thương và tiếp tục trong 5 ngày sau khi chấn thương [dưới da]
4	8	Hợp chất 1	2mg/kg	Qua đường miệng	16 giờ trước khi chấn thương, 2 giờ sau khi chấn thương và tiếp tục trong 4 ngày.
5	8	Hợp chất 1	4mg/kg	Qua đường miệng	16 giờ trước khi chấn thương, 2 giờ sau khi chấn thương và tiếp tục trong 4 ngày.
6	8	Hợp chất 1	6mg/kg	PO	16 giờ trước khi chấn thương, 2 giờ sau khi chấn thương và tiếp tục trong 4 ngày.

Thử nghiệm Morris Water Maze (MWM) là một bài tập về định hướng không gian dùng để đo khả năng nhận biết và ghi nhớ ở động vật gặm nhấm sử dụng các gợi ý nhìn thấy. Đối tượng học được trong khóa học nhiều ngày cách tìm ra bục giấu kín. Thử nghiệm MWM được tiến hành hai tuần sau khi chấn thương. Chuột cống Sprague Dawley đực được để cho bơi trong bể đến khi chúng chạm bục được bố trí ở góc tây nam của bể, hoặc đến khi quá 90 giây. Biểu hiện được theo dõi bằng máy quay video treo phía trên bể và ghi lại và phân tích bằng phần mềm theo dõi bằng video (ANY-maze).

Tác dụng của hợp chất 1 và progesteron đến kết quả của thử nghiệm MWM được thể hiện trong FIG. 15A. Phép đo ANOVA lặp lại hai chiều cho thấy hiệu quả điều trị đáng kể. So với chuột chấn thương phẫu thuật vờ, chuột chấn thương BCCI thể hiện sự thiếu hụt nhận biết không gian đáng kể, như biểu thị bằng sự gia tăng đáng kể thời gian cần để tìm thấy bục giấu kín trong giai đoạn tiếp thu 5 ngày (FIG. 15A). So với chuột chấn thương BCCI điều trị bằng chất dẫn, hợp chất 1 (2, 4 và 6mg/kg) thể hiện sự giảm phụ thuộc liều về thời gian cần để tìm thấy bục giấu kín, với ảnh hưởng đáng

kể vào các ngày 17 và 18 sau khi chấn thương với liều 6mg/kg và vào Ngày 18 với liều 4mg/kg. Dữ liệu này cho thấy rằng hợp chất 1 có tác dụng bảo vệ thần kinh.

FIG. 15C là ảnh chụp toàn bộ não của các động vật thương tổn phẫu thuật vờ (Phẫu thuật vờ), CCI + chất dẫn (Đối chứng), hoặc CCI + hợp chất 1 (6mg/kg), và thể hiện kết quả kiểm tra định tính bằng mắt thường toàn bộ não trước khi cắt lát bằng thiết bị cắt rung. Kết quả kiểm tra cho thấy không có (0 trên 4) động vật phẫu thuật vờ nào thể hiện thương tổn mô vỏ não phần đệm lưng não. Hoàn toàn trái lại, cả bốn đối chứng CCI thể hiện thương tổn hai bên nặng giới hạn ở vùng này của vỏ não. Các động vật CCI được cho dùng hợp chất 1 thể hiện mức thương tổn từ vừa đến thấp. Đáng lưu ý, não cho thấy chấn thương nặng nhất trong nhóm hợp chất 1 ít nghiêm trọng hơn so với tất cả các não trong nhóm đối chứng CCI.

Mức biểu hiện một số xytokin trong huyết tương thu được từ chuột ở từng nhóm điều trị được xác định. Các mẫu được làm lạnh đông và bảo quản ở -80°C. Vào ngày thử nghiệm, các mẫu được làm tan băng, pha loãng 4 lần, và phân tích về mức biểu hiện xytokin trên nền Luminex. Các mẫu được phân tích về xytokin GRO/KC, IFN γ , IL-1B, IL-6, IL-10, IL-12p70 và TNF α , bằng cách sử dụng bộ kit multiplex của hãng Millipore. Như thể hiện trong FIG. 15B, đã qua sát thấy phổ giống nhau về mức biểu hiện giữa các mẫu. Thay đổi lớn nhất là ở IL-10. Hợp chất 1 với liều 6mg/kg làm giảm IL-10 so với nhóm đối chứng điều trị bằng chất dẫn.

Trong nhiều trường hợp, chấn thương gọi đến đáp ứng chấn thương thứ cấp. Trong hầu hết các trường hợp, kết quả sẽ là viêm. Đáp ứng viêm được điều khiển bởi xytokin và chemokin và được truyền đi từng phần bởi sản phẩm thu được từ mô bị thương tổn (Damage associated Molecular Patterns).

Hội chứng rối loạn chức năng đa cơ quan (Multiple Organ Dysfunction Syndrome - MODS), một hội chứng ít biết về sự mất chức năng cơ quan lần lượt và dần dần, là nguyên nhân phổ biến nhất của tử vong sau chấn thương, gây ra bệnh tật nghiêm trọng và tử vong. MODS một phần được xem là do sự hoạt hóa quá mức hoặc thích nghi không tốt của con đường viêm.

Các số đo định lượng mật độ tế bào được thu thập từ các tiểu phần kháng NeuN đánh dấu miễn dịch từ khoảng 2-3mm phía trước thóp. Các vùng cần quan tâm (Regions of interest - ROIs) được rút ra (mù với các điều kiện thử nghiệm) quanh các Lớp IV-VI trong vùng vỏ não gần với vị trí chấn thương ở động vật được điều trị bằng

CCI hoặc vùng tương tự (vỏ não sau) ở động vật phẫu thuật vờ. ROI có diện tích tương tự cũng được đánh giá ở vùng vỏ não trước với cùng đoạn. Thực hiện việc nhận dạng tế bào bằng modul đếm tế bào của phần mềm Keyence BZ-II Analyzer. Hệ số Tế bào so với diện tích chất xám (CG) được xác định cho mỗi ROI. Các động vật phẫu thuật vờ thể hiện mật độ đánh dấu đều đặn trong cả vùng sau và trước. Như đã dự đoán, động vật đối chứng CCI thể hiện hệ số CG giảm ở cả vùng vỏ não sau (-45% so với nhóm phẫu thuật vờ) và trước (-30% so với nhóm phẫu thuật vờ) so với nhóm động vật phẫu thuật vờ (FIG. 15D). Độ giảm hệ số CG do CCI gây ra giảm bằng cách điều trị bằng hợp chất 1 ở vỏ não trước (-3% so với nhóm phẫu thuật vờ; $p = 0,09$). Mặc dù tác dụng của hợp chất 1 so với điều trị chất dẫn ở vỏ não trước là có ý nghĩa thống kê, có thể thấy rằng tác dụng này đạt ý nghĩa thống kê trong nghiên cứu lớn hơn. Không phát hiện được tác dụng của hợp chất 1 ở vùng vỏ não sau (-32% so với nhóm phẫu thuật vờ) ngay gần vị trí thương tổn. Sự khác biệt về tác dụng của hợp chất 1 trên vùng trước so với vùng sau có thể là tác dụng ngưỡng liên quan đến mức độ thương tổn, mà ngược lại cũng liên quan đến khoảng cách từ vị trí thương tổn. Do đó, thương tổn vùng vỏ não sau cũng có thể quá nặng để điều trị bằng hợp chất 1 trong các điều kiện này.

Phương pháp miễn dịch huỳnh quang được thực hiện để đánh giá ảnh hưởng của TBI đến một số đường đáp ứng miễn dịch, và để xác định liệu hợp chất 1 có thể có được tác dụng bảo vệ thần của nó thông qua một hoặc nhiều đường này không. Các số đo bán định lượng của đáp ứng thương tổn thứ cấp được kiểm tra bằng cách đánh dấu miễn dịch huỳnh quang IgG kháng chuột (một chỉ thị độ thấm thấu qua hàng rào máu não (blood-brain barrier (BBB)), và $\text{TNF}\alpha$ (một chỉ thị của viêm thần kinh). Tất cả các dấu chuẩn được chụp ảnh với độ phóng đại 20X ở vùng vỏ não quanh vị trí thương tổn ở các tiểu khu trong phạm vi 300 μm so với các vùng được dùng để đánh giá đánh dấu NeuN. Với mỗi nhãn đánh dấu, ROI đích được vạch ra trong các Lớp IV-VI liền kề với vị trí thương tổn (hoặc vùng tương đương của vỏ não sau của động vật phẫu thuật vờ), và ROI đối chứng được thu từ cùng lớp của vỏ não trước. Cường độ huỳnh quang chuẩn hóa được đánh giá cho từng ROI trong số hai ROI. Đối với tất cả các nhãn đánh dấu, vị trí đối chứng ở vỏ não trước được xác định là không khác biệt giữa các nhóm ($p > 0,5$); do đó, tỷ lệ phần trăm giá trị đích so với đối chứng (IF) được xác định.

IgG kháng chuột được biểu hiện trong các tế bào thần kinh (được chỉ ra bằng mũi tên trong FIG. 15E) ở mô bị thương tổn. FIG. 15E thể hiện rằng IgG kháng chuột được

phân bố trong vùng thương tổn ái nhân của mô vỏ não. IgG kháng chuột không có trong mô phẫu thuật vờ. Các tế bào dương tính miễn dịch TNF α (được chỉ ra bằng mũi tên trong FIG. 15E) thấy được rõ ràng trong mô bị thương tổn quanh vị trí thương tổn ở động vật đối chứng. Các yếu tố này đều không có ở các động vật điều trị bằng hợp chất 1 và động vật phẫu thuật vờ. FIG. 15E thể hiện rằng hợp chất 1 làm giảm đáp ứng thương tổn thứ cấp ở chuột công bị tổn thương não.

Viêm khớp do collagen gây ra (CIA)-Nghiên cứu 2

Để nghiên cứu tiếp về tác dụng của các hợp chất được mô tả trong bản mô tả đến các dấu chuẩn sinh học của tình trạng viêm, mô hình CIA thứ hai được tiến hành. Trong mô hình này, các nhóm được gọi là nhóm A (tự nhiên), nhóm B (mô hình; điều trị bằng chất dẫn), nhóm C (hợp chất 2 với liều 5mg/kg hai ngày một lần). Các chuột công thuộc nhóm B và C được gây miễn dịch qua da bằng collagen bò Typ II trong IFA vào Ngày 0, và tiêm nhắc lại vào Ngày 7. Hợp chất 2 được dùng qua đường miệng cho chuột mắc CIA sau khi viêm khớp khởi phát (ngày 11). Sự phát triển CIA được đánh giá qua điểm đại thể và xác định độ sưng chân. Sự phát triển này được đánh giá hằng ngày trong 5 ngày đầu sau khi gây miễn cảm (ngày 7), và sau đó hai lần một tuần (Thứ 2 và Thứ 5) đến Ngày 28 bằng hệ thống tính điểm lâm sàng được mô tả trong Bảng 7 trên đây. Ngoài ra, phương pháp ELISA đối với CD45, CRP, CCL2/MCP-1, TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-17, và xác định cathepsin K và elastaza được thực hiện sau khi điều trị bằng hợp chất 4 ngày (ngày 15 của thử nghiệm) và 10 ngày (ngày 21 của thử nghiệm – đỉnh điểm của bệnh) và tại cuối thử nghiệm (ngày 28) trên tất cả các nhóm động vật. Ngoài ra, vào ngày cuối của thử nghiệm (ngày 28), một số động vật đại diện từ mỗi nhóm được chụp cắt lớp vi tỷ trọng ba chiều xương gót, và độ bào mòn xương bàn chân được xác định.

16A và FIG. 16B thể hiện rằng chuột công được điều trị bằng hợp chất 2 với liều 5mg/kg giảm đáng kể sưng khớp (FIG. 16B) và điểm lâm sàng (FIG. 16A) so với chuột được điều trị bằng chất dẫn.

FIG. 17A và FIG. 17B thể hiện rằng chuột công được điều trị bằng hợp chất 2 với liều 5mg/kg giảm đáng kể bào mòn xương ở bàn chân sau so với chuột được điều trị bằng chất dẫn. Tình trạng khớp của động vật điều trị bằng hợp chất 2 tương tự như

động vật tự nhiên. Trái lại, các động vật điều trị bằng chất dẫn thể hiện mức bào mòn xương tăng có ý nghĩa thống kê ở bàn chân sau của chúng.

Thử nghiệm LUMINEX® và ELISA được sử dụng để xác định tác dụng của hợp chất 2 đến mức xytokin gây viêm và dấu chuẩn viêm. Hoạt dịch được thu thập vào Ngày 21, sau khi gây miễn dịch lần đầu, từ 2 chuột cống trong nhóm mô hình và 2 chuột cống trong nhóm điều trị bằng hợp chất 2, và vào cuối thử nghiệm từ 2 chuột nhóm tự nhiên, 3 chuột nhóm mô hình và 3 chuột nhóm điều trị bằng hợp chất 2.

Các FIG. 17C-17F thể hiện rằng, so với nhóm mô hình, hợp chất 2 thể hiện tác dụng ức chế sự sản sinh xytokin gây viêm và dấu chuẩn viêm trong mẫu hoạt dịch. Các xytokin giảm bao gồm IL-1 β , IL-6 và MCP-1, và dấu chuẩn viêm là protein hoạt động C (CRP).

Thử nghiệm LUMINEX® cũng được dùng để xác định mức xytokin gây viêm trong huyết thanh. Các mẫu huyết thanh (1mL máu cho mỗi chuột cống) được thu thập sau khi điều trị bằng hợp chất 4 ngày (ngày 15), 10 ngày sau khi điều trị bằng hợp chất (thường ở đỉnh điểm của bệnh – Ngày 21) và cuối thử nghiệm (ngày 27).

FIG. 17G thể hiện rằng, so với nhóm mô hình, Hợp chất 2 thể hiện tác dụng ức chế đến sự sản sinh IL-1 β mẫu trong huyết thanh.

Mô hình viêm não tủy tự miễn thử nghiệm (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis - EAE)

Mô hình EAE là mô hình được chấp nhận để thử nghiệm các bệnh CNS hủy myelin như đa xơ cứng. Tác dụng của hợp chất 1 được nghiên cứu trong mô hình chuột mắc EAE do MOG gây ra ở chuột C57B1/6J cái. Các động vật được chia thành 3 nhóm gọi là Nhóm I (đối chứng chất dẫn), Nhóm II (đối chứng dương dexamethason) và Nhóm III (Hợp chất 1 với liều 7,5mg/kg). Nước muối, dexamethason và hợp chất 1 được sử dụng theo lịch thể hiện trong FIG. 18A. Nước muối và dexamethason được sử dụng trong màng bụng hằng ngày bắt đầu từ Ngày 0. Hợp chất 1 với liều 7,5mg/kg dùng qua đường miệng bắt đầu từ Ngày 11 (khởi phát bệnh) vào Thứ 2, Thứ 4 và Thứ 6 trong 3 tuần liên tiếp. Bệnh được cảm ứng bằng cách tiêm mũi duy nhất MOG được nhũ hóa trong tá dược Freund đầy đủ (Complete Freund's Adjuvant - CFA) qua da vào ngày nghiên cứu 0, tiếp theo là kích thích miễn

dịch bổ sung trong màng bụng bằng độc tố gây ho (pertussis toxin - PT) vào ngày nghiên cứu 0, và lặp lại 48 giờ sau đó vào ngày nghiên cứu thứ 2.

Như thể hiện trong FIG. 18B, dấu hiệu đầu tiên của bệnh được thông báo sau khi gây miễn dịch MOG 7-9 ngày và đỉnh điểm của bệnh phát triển vào ngày nghiên cứu thứ 17. Việc điều trị bằng dexamethason bắt đầu từ ngày 0 với liều 1mg/kg trong màng bụng giảm đáng kể điểm lâm sàng vào ngày nghiên cứu thứ 8-37 (Nhóm II) so với đối chứng chất dẫn (Nhóm I). Việc điều trị bằng hợp chất 1 bắt đầu từ Ngày 11 với liều 7,5mg/kg (Nhóm III) giảm đáng kể điểm và độ nghiêm trọng của bệnh. Các kết quả này được thể hiện trong FIG. 18B.

Theo các phát hiện có được trong các điều kiện thử nghiệm này, việc điều trị bằng hợp chất 1 với liều 7,5mg/kg qua đường miệng bắt đầu vào ngày nghiên cứu thứ 11 làm giảm điểm và mức độ nghiêm trọng của bệnh.

Ví dụ 18. Mô hình hàn gắn vết thương

Vật liệu

Chuột – chuột C57BL/6J, đực, 6-8 tuần tuổi, SPF, của hãng Harlan Laboratories LTD. Các chuột được giữ trong các lồng vô trùng có thông khí riêng rẽ (individual ventilated cages - IVC) được cung cấp thức ăn và nước uống tùy thích, chu kỳ sáng và tối 12 giờ/12 giờ, nhiệt độ được kiểm soát trong khoảng 19-21°C, độ ẩm được kiểm soát trong khoảng 40 – 60%, áp suất không khí dương trong buồng nhốt động vật, và kiểm soát báo cáo tình trạng sức khỏe 3 tháng một lần, được thực hiện trên các trạm gác đặc biệt.

Lợn - *sus scrofa domestica*, lợn nội địa (chủ yếu là lợn trắng lớn Landrace X), cái, khoảng 60 Kg, 4-5 tháng tuổi, của hãng Lahav Institute of Animal Research, Kibbutz Lahav, Israel. Các lợn được giữ trong môi trường sạch không có SPF, nước uống từ vòi tùy thích trực tiếp từ nguồn công cộng, thức ăn theo khuyến cáo của bảng tăng trưởng chuẩn dưới sự giám sát của bác sĩ thú y.

ISOFLURAN 99,9% để hít, lô 6027962, Abbot Laboratories Ltd, Anh

Nước - nước để tiêm, mẻ 11481012, B. Braun Melsungen AG, Đức

Nước muối – natri clorua 0,9% để tiêm, mẻ 12224012, B. Braun Melsungen AG, Đức

DMSO – dimetyl sulfoxit, D2650, Sigma-Aldrich Inc., U.S.

PLURONIC® F-68

PVP K-29/32

Đánh giá tác dụng của việc sử dụng toàn thân và dùng khú trú hợp chất 1 trên vết thương trên da ở chuột C57BL

Tác dụng của hợp chất 1 đến sự hàn gắn vết thương trên da được nghiên cứu trên mô hình vết thương do cắt da đủ dày theo chiều dọc ở chuột. Khi được đưa đến, các động vật được nhận dạng bằng thẻ đeo tai, cân và để thích nghi với khí hậu trong vài ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm. Vào ngày gây ra vết thương, chuột được cân và chia thành 6 nhóm thử nghiệm với mỗi nhóm 6 động vật, ngẫu nhiên theo sự khác biệt về thể trọng. Trước quá trình phẫu thuật, chuột được gây mê bằng isofluran và lưng của các động vật này được cắt lông. Thực hiện cắt các vết cắt theo chiều dọc đủ độ dày dài 20mm bằng lưỡi dao mổ chuẩn trên lưng của các động vật này (song song với xương sống). Ba giờ sau khi gây ra vết thương, do độ đàn hồi và hoạt tính của da ở các động vật này, các vết cắt có dạng hình elip. Ở giai đoạn này, diện tích rộng nhất của vết thương được xác định để thiết lập độ rộng vết thương cơ sở. Đánh giá sự hàn gắn vết thương bằng cách đo diện tích rộng nhất của vết thương. Các nhóm điều trị gồm nhóm dùng ống thông dạ dày qua đường miệng hoặc nhóm khú trú. Trong quá trình thử nghiệm, vết thương được theo dõi bằng hình ảnh và thực hiện phân tích hình thái. Cuối thử nghiệm, 8 ngày sau khi gây ra vết thương, chuột bị giết, độ rộng vết thương được xác định và sinh thiết vùng vết thương được thu thập và phân tích.

Bảng 12. Nhóm nghiên cứu ban đầu

Nhóm	Số chuột	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng
1	6	Đối chứng dung dịch Pluronic® F-68 0,6% khối lượng/thể tích trong nước và dung dịch PVP K-29/32 0,6% khối lượng/thể tích	0,2 mL	Qua đường miệng	Hai ngày một lần
2	6	Hợp chất 1 trong PVP/Pluronic® F-68	4mg/kg	Qua đường miệng	Hai ngày một lần
3	6	Hợp chất 1 trong PVP/Pluronic® F-68	7,5mg/kg	Qua đường miệng	Hai ngày một lần
4	3	Chất dẫn, nước để tiêm	0,2 mL	Khu trú	Hằng ngày
5	6	Hợp chất 1 trong nước	2,5 µM	Khu trú	Hằng ngày
6	6	Hợp chất 1 trong nước	1 µM	Khu trú	Hằng ngày

Các dung dịch liều dùng được bào chế mới vào mỗi ngày sử dụng liều. Hợp chất 1 để dùng bằng ống thông dạ dày qua đường miệng được phân phối dưới dạng bột đông khô và hoàn nguyên trong dung dịch Pluronic® F-68 0,6% khối lượng/thể tích trong nước và PVP K-29/32 to 0,6% khối lượng/thể tích để tạo ra huyền phù gốc 0,75mg/mL, mà sau đó được pha loãng bằng Pluronic® F-68 0,6% khối lượng/thể tích và PVP K-29/32 0,6% khối lượng/thể tích để pha chế cung dịch làm việc với nồng độ 7,5mg/kg và 4mg/kg. Hợp chất 1 để dùng khú trú được phân phối dưới dạng bột đông khô và tạo huyền phù trong nước đến nồng độ 10mM, mà tiếp tục được pha loãng bằng nước để thu được nồng độ làm việc để dùng khú trú.

Việc theo dõi bằng hình ảnh được thực hiện như một phần của đánh giá hình thái hằng ngày bằng cách sử dụng máy ảnh kỹ thuật số FinePix S700. FIG. 19 là hình ảnh các vết thương đại diện từ mỗi nhóm thử nghiệm vào Ngày 5 sau khi gây ra vết thương. Mỗi vạch chia màu đen là 1cm. Tổng số 33 vết thương được gây ra trên 33 chuột. Kết quả đánh giá hình thái cho thấy tác dụng tích cực của việc điều trị bằng hợp chất 1, qua đường miệng hoặc khú trú. Tất cả các phép điều trị đều hàn gắn vết thương vượt trội so với đối chứng. Các vết thương được điều trị có kích cỡ nhỏ hơn và vảy nhẹ hơn, mỏng hơn và đồng nhất không vị nứt, cho thấy giai đoạn sau của hàn gắn vết thương. Khi đánh giá vào cùng ngày với các nhóm điều trị, nhóm vết thương đối chứng có kích cỡ lớn hơn và phủ bởi vảy dày nứt mà làm hở ra vùng vết thương chưa lành (quan sát được các vùng màu đỏ và hồng) cả ở cạnh và giữa vết thương.

Phân tích hình thái là thống số chủ yếu để đánh giá sự hàn gắn vết thương trong các nghiên cứu tiền lâm sàng trên động vật và trong điều trị lâm sàng vết thương ở người. Dựa trên phân tích hình thái, hợp chất 1 thể hiện hiệu quả, và có tác dụng tích cực đến sự hàn gắn vết thương. Lưu ý, hợp chất 1 cả dùng khú trú và dùng toàn thân hàn gắn vết thương tốt hơn, qua xác định bằng sự giảm kích cỡ vết thương và đặc tính vảy tốt hơn.

Đánh giá tác dụng của việc dùng khú trú hợp chất thử nghiệm trên vết thương ở da lợn

Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đến sự hàn gắn vết thương trên da có thể được nghiên cứu trong mô hình vết thương do cắt trên da đủ độ dày theo chiều dọc ở lợn. Khi được đưa đến, các động vật được nhận dạng bằng thẻ đeo tai, cân và để cho thích nghi với khí hậu trong vài ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm. Ba ngày trước khi phẫu

thuật, lợn được chuyển đến điều kiện bệnh viện để thích nghi với khí hậu. Mười hai giờ trước quá trình, thức ăn được ngừng cung cấp. Vào ngày phẫu thuật, lợn được gây mê bằng ketamin, xylazin, diazepam và isofluran. Lông trên lưng ở phần ngực và bụng được cắt cẩn thận bằng máy xén long Oster® (cỡ dao 30) và 20 vùng riêng rẽ với diện tích 4 cm² được đánh dấu theo hai hàng (10 vùng mỗi hàng). Mười cặp vết cắt trên da theo chiều dọc đủ độ dày 2,5cm được tạo ra bằng dao mổ #11, cách hai bên sống lưng 4cm.

Sau quá trình phẫu thuật, các vết thương được chia thành các nhóm thử nghiệm và điều trị hằng ngày khú trú trên vùng vết thương và trên cạnh vết thương. Vùng điều trị gồm bề mặt da với khoảng cách tối đa 2cm tính từ tâm vết thương. Các dung dịch liều dùng được đưa từ từ lên từng vết thương bằng pipet, đến khi toàn bộ thể tích điều trị (ví dụ, 1mL nước muối hoặc hợp chất thử nghiệm) được thấm hết bởi mô.

Vài giờ sau khi gây ra vết thương, do sự đàn hồi và hoạt động da của các động vật này, các vết thương chuyển thành hình elip. Ở giai đoạn này, diện tích rộng nhất của vết thương được xác định để thiết lập độ rộng vết thương cơ sở. Đánh giá sự hàn gắn vết thương bằng cách đo diện tích rộng nhất của vết thương. Trong quá trình thử nghiệm, các vết thương được theo dõi bằng hình ảnh và thực hiện phân tích hình thái.

Cuối thử nghiệm (ví dụ, 12 ngày sau khi gây ra vết thương), lợn được giết bằng cách tiêm thuốc mê và KCl. Hình thái vết thương được đánh giá, độ rộng vết thương được xác định và sinh thiết của vùng vết thương được thu thập và cố định bằng paraformaldehyt 4% để phân tích tiếp. Sau khi cố định, sinh thiết vết thương được theo dõi bằng hình ảnh bằng máy ảnh kỹ thuật số có độ phân giải cao, ví dụ, FinePix S700, và sinh thiết của vùng vết thương được phân tích mô bệnh học. Đánh giá hàn gắn vết thương được thực hiện theo cách ghép đôi trong đó mỗi vết thương được điều trị bằng hợp chất thử nghiệm được so sánh trực tiếp với vết thương đối chứng ở cùng vị trí phẫu thuật ở hai phía của sống lưng. Việc đánh giá sự hàn gắn vết thương theo cách ghép đôi có ý nghĩa quyết định xét về đánh giá đối tượng và so sánh đối tượng có vết thương được điều trị với không được điều trị vì mức độ tạo mạch và tuần hoàn máu trên da ở các vùng khác nhau của lưng lợn là khác nhau. Các vết thương ở vùng trước gần cổ thể hiện đặc tính hàn gắn tốt hơn nhiều so với vết thương ở vùng lưng sau.

Bảng 13. Các nhóm nghiên cứu ban đầu

Nhóm	Số vết thương	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng
1	5 vết thương trước ở bên phải	Đối chứng nước muối	1 mL	Khu trú	Hằng ngày
2	5 vết thương sau ở bên phải	Đối chứng nước muối	1 mL	Khu trú	Hằng ngày
3	5 vết thương trước ở bên trái	Hợp chất thử nghiệm	3 μ M	Khu trú	Hằng ngày
4	5 vết thương sau ở bên trái	Hợp chất thử nghiệm	1 μ M	Khu trú	Hằng ngày

Các dung dịch liều dùng được pha mới vào mỗi ngày sử dụng liều. Hợp chất thử nghiệm được cung cấp dưới dạng bột đông khô và hoàn nguyên tiếp trong dung dịch natri clorua 0,9% để tiêm để tạo ra huyền phù gốc 3mg/mL. Huyền phù gốc được pha loãng tiếp bằng dung dịch natri clorua 0,9% để tiêm đến nồng độ cuối 3 μ M và 1 μ M để dùng khú trú.

Bề mặt vảy đồng nhất, mỏng và đều không rỉ nước, chảy máu hoặc chất tiết từ vết thương là dấu hiệu hàn gắn vết thương. Vảy không đồng nhất, nứt và sẫm màu cho thấy nhiều tình trạng ứ dịch, rỉ nước và chảy máu trong quá trình hàn gắn vết thương.

Đánh giá tác dụng của việc dùng khú trú hợp chất thử nghiệm lên quá trình hàn gắn vết thương sớm ở lợn

Tác dụng của hợp chất thử nghiệm lên sự hàn gắn vết thương sớm có thể được nghiên cứu trong mô hình vết thương do cắt trên da đủ độ dày theo chiều dọc ở lợn. Năm cặp vết cắt theo chiều dọc đủ độ dày 2,5 cm được tạo ra ở vùng trước của lưng lợn đã gây mê bằng dao mổ #11, cách hai bên sống lưng 4 cm. Trong vài giờ sau quá trình này, vết cắt theo chiều dọc trở thành vết thương hình elip.

Các vết thương được chia thành các nhóm thử nghiệm và điều trị hằng ngày khú trú trên vùng vết thương (bao gồm cạnh và trên vùng da gần vết thương). Giai đoạn điều trị bắt đầu sau khi gây ra vết thương 24 giờ. Các dung dịch liều dùng được đưa từ từ lên từng vết thương bằng pipet, đến khi toàn bộ thể tích điều trị được thấm hết bởi mô (ví dụ, 1mL nước muối hoặc hợp chất thử nghiệm).

Vào Ngày 5, trạng thái hàn gắn vết thương và hình thái được đánh giá theo các thông số sau: chảy máu, rỉ nước, sưng, viêm, chảy mủ và hình thành vảy. việc đánh giá được thực hiện theo cách ghép đôi trong đó mỗi vết thương được điều trị bằng hợp

chất thử nghiệm được so sánh trực tiếp với vết thương đối chứng ở cùng vị trí phẫu thuật ở hai phía của sống lưng.

Bảng 14. Các nhóm nghiên cứu ban đầu

Nhóm	Số vết thương	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng
1	5	Đối chứng nước muối	1mL	Khu trú	Hàng ngày
2	5	Hợp chất thử nghiệm	3 μ M	Khu trú	Hàng ngày

Các dung dịch liều dùng được pha mới vào mỗi ngày sử dụng liều. Hợp chất thử nghiệm được cung cấp dưới dạng bột đông khô và hoàn nguyên trong dung dịch natri clorua 0,9% để tạo ra huyền phù gốc 3mg/mL. Huyền phù gốc này được pha loãng tiếp bằng dung dịch natri clorua 0,9% để pha dung dịch dùng khu trú với nồng độ cuối 3 μ M.

Đánh giá hình thái của hàn gắn vết thương được thực hiện vào ngày điều trị thứ 5. Kiểm tra độ sưng, tính điểm theo độ nghiêm trọng của từng vết thương và ghi lại dưới dạng nhẹ, vừa hoặc nặng. Các vết thương sưng vừa và nặng biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm tổng số vết thương trong nhóm thử nghiệm. Kiểm tra chất tiết và tính điểm theo cách nhị phân: vết thương mà có chất tiết tối thiểu được coi là dương tính, vết thương không phát hiện được chất tiết được xem là âm tính với thông số này. Các vết thương có chất tiết (dương tính với thông số này) được biểu thị dưới dạng tỷ lệ phần trăm tổng số vết thương trong nhóm thử nghiệm. Vảy được xem là tạo thành hoàn toàn khi các lớp liên tục cứng, khô, đỏ, vàng đậm hoặc nâu hình thành bao phủ toàn bộ vùng vết thương và gắn chặt vào nền vết thương và, do đó, tạo ra hàng rào liên tục và chắc chắn giữa môi trường ngoài và mô bị thương. Kiểm tra sự hình thành vảy và tính điểm theo cách nhị phân: các vết thương có vảy tạo thành hoàn chỉnh khô và chắc chắn được xem là dương tính và các vết thương không có vảy hoặc có vảy ở giai đoạn sớm được xem là âm tính với thông số này. Các vết thương có vảy tạo thành hoàn chỉnh được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm theo tổng số vết thương trong mỗi nhóm.

Sưng, chất tiết và hình thành vảy cũng được đánh giá. Sưng và chất tiết là một phần của đáp ứng miễn dịch quá mức mà có thể làm chậm sự phục hồi mô và gây ra sẹo mất thẩm mỹ.

Đánh giá tác dụng của việc dùng khú trú hợp chất thử nghiệm đến sự hàn gắn vết thương sớm trên da lợn và đến kích ứng và xước có liên quan đến da bị thương tổn hoặc da bị thương

Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đến sự hàn gắn vết thương trên da có thể được nghiên cứu trong mô hình vết thương do cắt trên da theo chiều dọc đủ độ dày ở lợn. Ba ngày trước khi phẫu thuật, lợn được chuyển sang điều kiện bệnh viện để thích nghi với khí hậu. Mười hai giờ trước quá trình phẫu thuật, thức ăn được ngừng cung cấp. Vào ngày phẫu thuật, lợn được gây mê bằng ketamin, xylazin, diazepam và isofluran. Lông trên lưng phần ngực và bụng được cắt bằng máy xén lông Oster® (cỡ dao 30). Mười cặp khu vực có diện tích mỗi khu vực 4 cm² được đánh dấu, và tạo ra các vết cắt trên da theo chiều dọc đủ độ dày 2,5 cm bằng dao mổ #11, ở hai phía của sống lưng.

Sau quá trình phẫu thuật, các vết thương được chia thành các nhóm thử nghiệm và được điều trị hằng ngày khú trú trên vùng vết thương (bao gồm cạnh và trên vùng da gần vết thương với khoảng cách không quá 2cm từ vết thương theo tất cả các hướng). Các dung dịch liệu dùng được đưa từ từ lên từng vết thương bằng pipet, đến khi toàn bộ thể tích điều trị được thấm hết bởi mô (ví dụ, 1mL chất dẫn hoặc hợp chất thử nghiệm).

Trong vài giờ sau quy trình này, vết cắt theo chiều dọc trở thành vết thương hình elip do sự đàn hồi và hoạt động da của các động vật này. Trong quá trình thử nghiệm, các vết thương được theo dõi bằng hình ảnh và thực hiện phân tích hình thái. Tiến hành đánh giá sự hàn gắn vết thương theo cách ghép đôi trong đó mỗi vết thương được điều trị bằng hợp chất thử nghiệm được so sánh trực tiếp với vết thương đối chứng ở cùng vị trí phẫu thuật ở hai phía của sống lưng. Trong 5 ngày đầu sau khi gây ra vết thương, hình thái vết thương và biểu hiện của động vật được ghi lại.

Bảng 15. Các nhóm nghiên cứu ban đầu

Nhóm	Số vết thương	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng
1	5 vết thương trước ở bên phải	Dung dịch DMSO 0,02% trong nước	1 mL	Khu trú	Hằng ngày
2	5 vết thương sau ở bên phải	Dung dịch DMSO 0,067% trong nước	1 mL	Khu trú	Hằng ngày
3	5 vết thương trước ở bên trái	Hợp chất thử nghiệm trong DMSO 0,02%	3µM	Khu trú	Hằng ngày
4	5 vết thương sau ở bên trái	Hợp chất thử nghiệm trong DMSO 0,067%	1µM	Khu trú	Hằng ngày

Các dung dịch liều dùng được pha mới vào mỗi ngày sử dụng liều. Hợp chất thử nghiệm được cung cấp dưới dạng bột đông khô và hòa tan trong DMSO 100% đến nồng độ gốc 15mM. tiến hành pha loãng tiếp trong nước để thu được nồng độ cuối 3 μ M và 1 μ M để dùng khú trú.

Việc theo dõi vết thương bằng hình ảnh được tiến hành như một phần của đánh giá hình thái hàng ngày, bằng cách sử dụng, ví dụ, máy ảnh kỹ thuật số có độ phân giải cao FinePix S700. Ngoài ra trạng thái của vết thương, các vùng bị kích ứng và xước được quan sát. Thông thường, việc cào xước không gây ra thương tổn cho vết thương hoặc cản trở quá trình hàn gắn vết thương vì vết thương được gây ra trên lưng gần sống lưng, sao cho động vật khó và gần như không thể chạm đến vết thương.

Đánh giá tác dụng của hợp chất 1 trong PVP/Pluronic® F-68 và hợp chất 1 trong nước đến sự lành da có liên quan đến cào xước ở chuột

Trong các nghiên cứu về vết thương trên da ở chuột nhắt được mô tả trong bản mô tả, biểu hiện của các động vật này cũng được quan sát, và những cố gắng loại bỏ sẹo, dấu hiệu không thoải mái, và cào xước vùng vết thương được định lượng. Biểu hiện bất thường và thể hiện bất thường như cào xước và dấu hiệu đau từ tất cả các nghiên cứu thực hiện trên chuột được phân tích. Trong các nghiên cứu này, việc điều trị được thực hiện bằng hợp chất 1 trong PVP/Pluronic® F-68 và hợp chất 1 trong nước, và đối chứng chất dẫn tương ứng.

Trong các thử nghiệm hàn gắn vết thương ở chuột, việc theo dõi các thông số có liên quan đến sự hàn gắn vết thương, dấu hiệu kích ứng da và các tình trạng bệnh lý trên da khác ở vùng gần vết thương và vùng da được điều trị, được thực hiện. Ngoài ra, trong giai đoạn điều trị tất cả các mô hình hàn gắn trên da, đã có lưu ý đặc biệt đến biểu hiện của các động vật này, như dấu hiệu không thoải mái và đau; và dấu hiệu cào xước và làm xáo trộn vết thương và da. Tác dụng làm dịu và làm dễ chịu của việc điều trị bằng hợp chất là rất rõ ràng so với các động vật đối chứng, mà thường bị thôi thúc làm xáo trộn vết thương của chúng.

Ở chuột, việc điều trị bằng hợp chất 1 trong PVP/Pluronic® F-68 hoặc hợp chất 1 trong nước giảm tỷ lệ làm xáo trộn vết thương so với chuột được điều trị bằng chất dẫn (DMSO trong nước, nước muối, PVP/pluronic hoặc nước).

Ở chuột, việc xáo trộn vết thương thường gây ra bong vảy và chảy máu hoặc thương tổn đến mô mới tạo ra trên nền vết thương mà gắn chặt vào vảy. Hiện tượng này chủ yếu xảy ra ở nhóm điều trị bằng chất dẫn (khoảng 20 – 30% tổng số thử nghiệm).

Theo tóm tắt tình trạng trên da và biểu hiện của động vật, có thể kết luận rằng việc điều trị vết thương bằng hợp chất 1 trong PVP/Pluronic® F-68 hoặc hợp chất 1 trong nước ngăn ngừa sự xáo trộn vết thương ở chuột có thể do một số tác dụng làm dịu và làm dễ chịu của việc điều trị bằng hợp chất trên da bị thương và bị kích ứng.

Đáp ứng liều của hợp chất thử nghiệm đến hàn gắn vết thương trên da của chuột

Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đến sự hàn gắn vết thương trên da có thể được nghiên cứu trong mô hình vết thương do cắt trên da theo chiều dọc đủ độ dày ở chuột. Khi được đưa đến, động vật được nhận dạng bằng thẻ đeo tai, cân và để cho thích nghi với khí hậu trong vài ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm. Vào ngày gây ra vết thương, chuột được cân và chia thành 7 nhóm thử nghiệm (N=6 hoặc N=7), theo cách ngẫu nhiên thỏa mãn sự khác biệt về khối lượng. Nhóm sử dụng chất dẫn được cho dùng DMSO trong nước trong khi đó nhóm đối chứng dương được điều trị bằng dung dịch Pluronic® F-68 0,6% khối lượng/thể tích và dung dịch PVP K-29/32 0,6% khối lượng/thể tích trong nước. Trước quá trình phẫu thuật, chuột được gây mê bằng isofluran và lông trên lưng của các động vật này được cắt gọn. Các vết cắt theo chiều dọc dài 20 mm được tạo ra bằng dao mổ chuẩn trên lưng của các động vật này (song song với xương sống). Ba giờ sau khi gây ra vết thương, do sự đàn hồi và hoạt động da của các động vật này, các vết thương chuyển thành hình elip. Ở giai đoạn này, diện tích rộng nhất của vết thương được xác định để thiết lập độ rộng vết thương cơ sở. Đánh giá sự hàn gắn vết thương bằng cách đo diện tích rộng nhất của vết thương. Điều trị vết thương bằng cách dùng khú trú (hàng ngày) các dung dịch liều dùng (ví dụ, 0,2ml) trực tiếp trên vết thương.

Bảng 16. Các nhóm nghiên cứu ban đầu

Nhóm	Số chuột	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng
1	7	dung dịch DMSO 0,1% trong nước	0,2 mL	Khu trú	Hằng ngày
2	6	Hợp chất thử nghiệm trong dung dịch DMSO 0,1%	9 μ M	Khu trú	Hằng ngày
3	6	Hợp chất thử nghiệm trong dung dịch DMSO 0,1%	3 μ M	Khu trú	Hằng ngày
4	6	Hợp chất thử nghiệm trong dung dịch DMSO 0,1%	1 μ M	Khu trú	Hằng ngày
5	6	Hợp chất thử nghiệm trong dung dịch DMSO 0,1%	0,3 μ M	Khu trú	Hằng ngày
6	7	Đối chứng nước 0,6% khối lượng/thể tích Pluronic® F-68 và 0,6% khối lượng/thể tích PVP K-29/32	0,2 mL	Khu trú	Hằng ngày

Các dung dịch liều dùng được pha mới vào mỗi ngày sử dụng liều. Hợp chất thử nghiệm được cung cấp dưới dạng bột đông khô và hoàn nguyên trong dung dịch DMSO 0,1% trong nước để tạo ra huyền phù gốc 3 mg/mL. Huyền phù gốc này được pha loãng tiếp bằng dung dịch DMSO 0,1% trong nước để bào chế dung dịch cuối dùng khu trú. Vết thương ở nhóm đối chứng được điều trị khu trú bằng dung dịch DMSO 0,1% trong nước, hoặc dung dịch Pluronic® F-68 0,6% khối lượng/thể tích và PVP K-29/32 0,6% khối lượng/thể tích trong nước.

Cuối thử nghiệm, 8 ngày sau khi gây ra vết thương, chuột bị giết bằng cách xông CO₂, độ vết thương được đo và sinh thiết vùng vết thương được thu thập và phân tích mô học. Sinh thiết được cố định bằng paraformaldehyt 4%. Sau khi cố định toàn bộ vùng vết thương, tiến hành mổ cắt 5mm từ phần diện tích rộng nhất của vết thương và các mẫu này được bao trong parafin. Bao parafin được chuẩn bị bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn để loại nước từng phần và bao parafin các mô. Sau đó, các phần để nghiên cứu mô học được chuẩn bị và mô được nhuộm bằng thuốc nhuộm hematoxylin và eosin (H&E). Các lát cắt nhuộm H&E được kiểm tra và đánh giá hiệu quả hàn gắn vết thương.

Mức độ da đóng miệng vết thương tiến triển được đánh giá vào Ngày 8 bằng cách kiểm tra da khô được nhuộm eosin và các mép da mới tạo thành ở các khoảng trống quanh vết thương. Vết thương có mép da mới ở hai bên theo quan sát ở độ phóng đại 100x của kính hiển vi (BX41 Olympus hoặc Axiovert 25, Zeiss) được xem là dương tính với thông số đóng miệng vết thương trên da tiến triển. Số vết thương đóng miệng trên da tiến triển được biểu thị dưới dạng phần trăm so với tổng số vết thương trong các nhóm thử nghiệm.

Mức độ biểu bì đóng miệng vết thương tiến triển được đánh giá vào Ngày 8 bằng cách nhuộm H&E qua phân tích khu vực mô học ở diện tích rộng nhất của vết thương. Các vết thương mà thể hiện sự có mặt của lớp biểu bì liên tục bao phủ toàn bộ khoảng trống vết thương và các vết thương có mép biểu bì lan rộng nhất theo quan sát trên kính hiển vi ở độ phóng đại 400x được xem là dương tính với thông số biểu bì đóng miệng vết thương tiến triển. Kết quả được biểu thị dưới dạng phần trăm so với tổng trên mỗi nhóm thử nghiệm.

Mức độ biểu bì lan rộng được đánh giá vào Ngày 8 bằng cách nhuộm H&E qua phân tích biểu bì mới hình thành được nhuộm hematoxylin đặc ở cả hai mép của vết thương. Mép biểu bì được xem là lan rộng nếu mép biểu bì mới hình thành bao phủ khoảng 20-30% khoảng trống vết thương. Các mép biểu bì lan rộng ở các nhóm được đếm và được biểu thị dưới dạng phần trăm so với tổng số mép biểu bì (hai lần số vết thương trong nhóm). Cả hai mép biểu bì được xem là lan rộng trong vết thương thể hiện sự đóng miệng hoàn toàn hoặc biểu bì đóng miệng tiến triển. Tổng số 62 vết thương được tạo ra ở 62.

Điều trị vết thương bằng hợp chất thử nghiệm ngăn ngừa các biến chứng trong hàn gắn vết thương, như tăng sản biểu bì và dính

Tác dụng của hợp chất thử nghiệm lên sự hàn gắn vết thương trên da có thể được nghiên cứu trong mô hình vết thương do cắt trên da theo chiều dọc đủ độ dày ở chuột. Trước quá trình phẫu thuật, chuột được gây mê bằng isofluran, và lưng của các động vật này được cạo sạch. Các vết cắt theo chiều dọc đủ độ dày 20 mm được tạo ra bằng dao mổ trên lưng (song song với sống lưng) của các động vật này. Ba giờ sau khi gây ra vết thương, do sự đàn hồi và hoạt động da của các động vật này, các vết thương chuyển thành hình elip. Đánh giá sự hàn gắn vết thương bằng cách đo diện tích rộng

nhất của vết thương. Điều trị vết thương khu trú hằng ngày bằng ách sử dụng, ví dụ, 0,2mL hợp chất thử nghiệm trực tiếp trên vết thương. Quy trình chăm sóc vết thương một phần thực hiện trong môi trường ẩm – sau mỗi lần điều trị hằng ngày, các vết thương đôi lúc ở trạng thái ướt. Cuối thử nghiệm, 8 ngày sau khi gây ra vết thương, chuột bị giết, đo độ rộng vết thương và sinh thiết vùng vết thương được thu thập và phân tích mô học.

Bảng 17. Các nhóm nghiên cứu ban đầu

Nhóm	Số chuột	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng
1	7	Dung dịch DMSO 0,1% trong nước	0,2 mL	Khu trú	Hằng ngày
2	6	Hợp chất thử nghiệm trong dung dịch DMSO 0,1%	3 μ M	Khu trú	Hằng ngày
3	6	Hợp chất thử nghiệm trong dung dịch DMSO 0,1%	1 μ M	Khu trú	Hằng ngày
4	7	Đối chứng nước 0,6% khối lượng/thể tích Pluronic® F-68 và 0,6% khối lượng/thể tích PVP K-29/32	0,2 mL	Khu trú	Hằng ngày

Các dung dịch liều dùng được pha mới vào mỗi ngày sử dụng liều. Hợp chất thử nghiệm được cung cấp dưới dạng bột đông khô và hoàn nguyên trong dung dịch DMSO 0,1% trong nước để tạo ra huyền phù gốc nồng độ 3 mg/mL, huyền phù này sau đó được pha loãng tiếp bằng dung dịch DMSO 0,1% trong nước để đạt nồng độ làm việc để dùng khu trú. Vết thương trong nhóm đối chứng được điều trị khu trú bằng dung dịch DMSO 0,1% trong nước hoặc dung dịch Pluronic® F-68 0,6% khối lượng/thể tích và dung dịch PVP K-29/32 0,6% khối lượng/thể tích trong nước.

Vào cuối giai đoạn thử nghiệm, vào Ngày 8 sau khi gây ra vết thương, chuột bị giết bằng cách xông CO₂ và sinh thiết vùng vết thương được thu thập. Cố định mô vết thương bằng paraformaldehyt 4%. Sau khi cố định toàn bộ vùng vết thương, tiến hành mổ 5 mm trên diện tích rộng nhất của vết thương và bao bằng parafin. Bao parafin được chuẩn bị bằng các quy trình chuẩn để loại nước từng phần. Sau đó, chuẩn bị các khu vực mô học và mô được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H&E). Các thông số hàn gắn vết thương được đánh giá và lập đồ thị.

Chứng tăng sản biểu bì được đánh giá vào Ngày 8. Các mép biểu bì không lan rộng và tăng sản trong nhóm được đếm, và biểu thị dưới dạng phần trăm so với tổng số

các mép biểu bì (hai lần số vết thương trong nhóm). Các mép biểu bì tăng sản được đánh giá bằng cách nhuộm H&E qua phân tích các vùng bắt màu hematoxylin đậm của biểu bì. Khi mép biểu bì có vẻ dày hơn so với biểu bì bình thường ở vùng da khỏe mạnh và khi mép này không ran rộng theo xu hướng lấp kín khoảng trống vết thương, nó được xem là tăng sản và không lan rộng.

Hiện tượng dính ở khoảng trống vết thương được đánh giá vào Ngày 8. Đánh giá hiện tượng dính bằng cách phân tích cấu trúc tế bào và mô ở khoảng trống vết thương. Dính vết thương được tính điểm theo thang điểm nhẹ, vừa hoặc nặng. Điểm âm được cân nhắc nếu có cục máu đông ở khoảng trống vết thương hoặc mô hạt bình thường được thay bằng mô khác, như mô cơ xương hoặc mô lympho mở rộng. Hiện tượng dính nghiêm trọng hoặc tạo hạt bất thường chiếm trên 40% vùng khoảng trống vết thương được xem là nặng. Dính được xem là nhẹ nếu nó không đáng kể và không cản trở sự thay mới mô da bình thường. Các vết thương bị dính nặng được tính toán dưới dạng phần trăm tổng số vết thương trong mỗi nhóm thử nghiệm và lập độ thị. Tổng số 32 vết thương (64 mép biểu bì) được tạo ra trên 32 chuột.

Một trong số các biến chứng quan trọng nhất trong hàn gắn vết thương là tăng sản biểu bì. Dưới dạng đáp ứng với dấu hiệu stress có liên quan đến sự gây ra vết thương, sự tăng sinh tế bào trong lớp nền biểu bì xảy ra để bù lại phần da bị mất. Thông thường, đối với quá trình hàn gắn vết thương không có biến chứng, tế bào biểu bì bắt đầu lan rộng theo hướng lấp đầy khoảng trống vết thương ngay sau khi tăng sinh. Khi không xảy ra sự lan rộng hoặc sự lan rộng bị chậm lại, ví dụ, trong trường hợp biến chứng trên da do tăng đường huyết gây ra ở các vết thương do bệnh đái tháo đường, sự tăng sản biểu bì xảy ra, và có thể gây ra nhiều biến chứng hơn trong hàn gắn vết thương. Trong vết thương hở cấp tính, như trong mô hình được sử dụng trong thử nghiệm này, hoặc trong vết thương đã khâu cấp tính, như vết thương sau phẫu thuật, sự giảm hàn gắn biểu bì có liên quan đến tăng sản các mép biểu bì làm tăng nguy cơ nhiễm trùng và các biến chứng trong hàn gắn vết thương khác như nứt vết thương, chảy dịch từ vết thương, hoặc mô lồi lên từ vết thương.

Trong quá trình hàn gắn vết thương hiệu quả, cục máu đông ban đầu trải qua nhiều thay đổi dần dần để tạo ra mô hạt ở khoảng trống vết thương, mà sau khi tái tổ chức, dần trở thành mô da mới tạo thành với chức năng được phục hồi đầy đủ. Khi xảy ra dính mô không liên quan đến da ở khoảng trống vết thương, mô hạt không tạo thành

chính xác và, do đó, sự tái tổ chức mô cuối cùng bị hạn chế. Điều này có thể gây ra các hạn chế tiếp theo về chức năng của da được hàn gắn.

Điều trị vết thương bằng hợp chất thử nghiệm trong chế phẩm chứa nước muối cải thiện sự hàn gắn vết thương và ngăn ngừa hiện tượng dính nặng

Tác dụng của hợp chất thử nghiệm đến sự hàn gắn vết thương trên da được nghiên cứu trong mô hình vết thương do cắt trên da theo chiều dọc đủ độ dày ở chuột. Tiến hành quy trình phẫu thuật trên chuột C57BL đực 7-8 tuần tuổi được gây mê bằng isofluran. Trước quy trình phẫu thuật này, chuột được gây mê bằng isofluran và lông được cắt gọn. Các vết cắt theo chiều dọc đủ độ dày 20mm được tạo ra bằng dao mổ chuẩn. Ba giờ sau khi gây ra vết thương, do sự đàn hồi và hoạt động da của các động vật này, các vết thương chuyển thành hình elip. Ở giai đoạn này, diện tích rộng nhất của vết thương được xác định để thiết lập độ rộng vết thương cơ sở. Đánh giá sự hàn gắn vết thương bằng cách đo diện tích rộng nhất của vết thương. Tiến hành điều trị vết thương bằng cách sử dụng khu trú hằng ngày 0,2mL dung dịch trực tiếp trên vết thương. Quá trình chăm sóc vết thương ddwwo thực hiện một phần trong môi trường ẩm vì sau mỗi lần điều trị hằng ngày, các vết thương đôi lúc ở trạng thái ướt (3-5 giờ). Cuối thử nghiệm, 8 ngày sau khi gây ra vết thương, chuột bị giết, độ rộng vết thương được xác định và sinh thiết vùng vết thương được thu thập và phân tích mô học.

Bảng 18. Các nhóm nghiên cứu ban đầu

Nhóm	Số chuột	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng
1	5	Nước muối	0,2 mL	Khu trú	Hằng ngày
2	7	Hợp chất thử nghiệm trong nước muối	3 uM	Khu trú	Hằng ngày

Các dung dịch liều dùng được pha mới vào mỗi ngày sử dụng liều. Hợp chất thử nghiệm được cung cấp dưới dạng bột đông khô và hoàn nguyên trong nước muối để tạo ra huyền phù gốc 3 mg/mL, huyền phù gốc này được pha loãng tiếp bằng nước muối để đạt nồng độ làm việc 3µM để dùng khu trú. Vết thương trong nhóm đối chứng được điều trị khu trú bằng nước muối.

Ở cuối giai đoạn điều trị, 8 ngày sau khi gây ra vết thương, chuột bị giết bằng cách xông CO₂ và sinh thiết vùng vết thương được thu thập. Cố định mô vết thương bằng paraformaldehyt 4%. Sau khi cố định toàn bộ vùng vết thương, tiến hành mổ

5mm diện tích rộng nhất của vết thương và vùng đã mổ được bao parafin. Bao parafin được chuẩn bị bằng các quy trình chuẩn để loại nước từng phần. Sau đó, các khu vực mô học được chuẩn bị và mô được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H&E). Các thông số hàn gắn vết thương được đánh giá và lập đồ thị.

Mức độ đóng miệng biểu bì được đánh giá bằng cách nhuộm H&E qua phân tích các khu vực mô học ở diện tích rộng nhất của vết thương. Các vết thương với sự có mặt của lớp biểu bì liên tục bao phủ toàn bộ khoảng trống vết thương, và các vết thương với độ lan rộng tiến triển nhất của các mép biểu bì khi quan sát cả hai mép này dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400x được xem là dương tính với thông số đóng miệng biểu bì tiến triển. Kết quả được biểu thị dưới dạng phần trăm so với tổng trên mỗi nhóm thử nghiệm.

Mức độ hàn gắn da được đánh giá bằng cách kiểm tra da khỏe được nhuộm eosin và các mép da mới tạo thành ở khoảng trống vết thương. Các vết thương có cả hai mép da quan sát được trên kính hiển vi với độ phóng đại 100x (BX41 Olympus hoặc Axiovert 25, Zeiss) được xem là dương tính với thông số da đóng miệng vết thương tiến triển. Số vết thương có da đóng miệng tiến triển được biểu thị dưới dạng phần trăm so với tổng số vết thương trong các nhóm thử nghiệm.

Mô hạt được đánh giá bằng cách nhuộm H&E. Khi cục máu đông fibin ban đầu được thay thế bằng mô liên kết dạng sợi chứa tế bào mỡ, các mao mạch mới và dịch rỉ ra chứa tế bào lympho, đại thực bào, và tương bào, mô hạt được xem là sớm. Mô hạt sớm được thay thế bằng mô với chủ yếu là nguyên bào sợi và sợi collagen được xem là tiến triển. Nói chung, các vùng có mô hạt tiến triển ở khoảng trống vết thương được ghi chép lại dưới dạng phần trăm so với tổng số vùng khoảng trống vết thương. Khoảng trống vết thương thể hiện sự hình thành mô hạt tiến triển bao phủ 40% khoảng trống vết thương được xem là dương tính với thông số này. Kết quả được tính toán dưới dạng phần trăm so với tổng số vết thương trong mỗi nhóm.

Hiện tượng kết dính được đánh giá bằng cách phân tích cấu trúc tế bào và cấu trúc mô của khoảng trống vết thương. Độ dính của vết thương được tính điểm theo thang điểm nhẹ, vừa hoặc nặng. Điểm âm có thể được cân nhắc khi có cục máu đông ở khoảng trống vết thương hoặc mô hạt bình thường được thay bằng mô khác, như mô cơ xương hoặc mô lympho mở rộng. Dính nặng hoặc hình thành hạt bất thường chiếm trên 40% diện tích khoảng trống vết thương được xem là nặng. Dính được xem là nhẹ

khi nó không đáng kể và không cản trở sự tái sinh mô da bình thường. Các vết thương bị đánh nặng được tính toán dưới dạng phần trăm tổng số vết thương trong mỗi nhóm thử nghiệm. Mười chín vết thương (38 mép biểu bì) được tạo ra trên 19 chuột.

Đánh giá tác dụng của việc dùng khú trú hợp chất thử nghiệm đến quá trình hàn gắn và hình thành sẹo ở các giai đoạn sau của hàn gắn vết thương trên da lợn

Tác dụng của hợp chất thử nghiệm lên các giai đoạn sau của sự hàn gắn vết thương trên da được nghiên cứu trong mô hình vết thương do cắt theo chiều dọc đủ độ dày ở lợn. Vào ngày phẫu thuật, lợn được gây mê bằng ketamin, xylazin, diazepam và isofluran. Lông trên lưng phần ngực và bụng được cắt gọn và 10 cặp vết cắt trên da theo chiều dọc đủ độ dày 2,5 cm được tạo ra bằng dao mổ #11, cách hai bên sống lưng 4cm. Sau quá trình phẫu thuật, các vết thương được chia thành nhóm thử nghiệm và điều trị hằng ngày bằng cách dùng khú trú trên vùng vết thương và trên các mép vết thương bao gồm điều trị cho da gần vùng vết thương với khoảng cách không quá 2 cm từ vết thương theo mọi hướng. Các dung dịch liều dùng được đưa từ từ lên từng vết thương bằng pipet, đến khi toàn bộ thể tích điều trị (ví dụ, 1 mL chất dẫn hoặc hợp chất thử nghiệm) được thấm hết bởi mô. Da gần vết thương được điều trị bằng gạc nhúng trong dung dịch hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn.

Trong quá trình thử nghiệm, các vết thương được theo dõi bằng hình ảnh và phân tích hình thái. Ở cuối giai đoạn điều trị (ngày 19 sau khi gây ra vết thương), lợn bị giết bằng liều thuốc mê và KCl. Hình thái vết thương được kiểm tra, vết thương được theo dõi bằng hình ảnh và sinh thiết vùng vết thương được thu thập để cố định và tiếp tục phân tích hình thái và mô học.

Bảng 19. Các nhóm nghiên cứu ban đầu

Nhóm	Số vết thương	Chất thử nghiệm	Liều	Đường dùng	Lịch sử dụng
1	5 vết thương trước ở bên phải	Dung dịch DMSO 0,02% trong nước	1 mL	Khu trú	Hằng ngày
2	5 vết thương sau ở bên phải	Dung dịch DMSO 0,067% trong nước	1 mL	Khu trú	Hằng ngày
3	5 vết thương trước ở bên trái	Hợp chất thử nghiệm trong dung dịch DMSO 0,02%	3 μ M	Khu trú	Hằng ngày
4	5 vết thương sau ở bên trái	Hợp chất thử nghiệm trong dung dịch DMSO 0,067%	1 μ M	Khu trú	Hằng ngày

Các dung dịch liều dùng được pha mới vào mỗi ngày sử dụng liều. Hợp chất thử nghiệm được cung cấp dưới dạng bột đông khô và hòa tan trong DMSO 100% để pha chế dung dịch gốc 15 mM. Tiếp đó, tiến hành pha loãng trong nước để tiêm để đạt được nồng độ cuối 3 μ M và 1 μ M để dùng khú trú.

Ở cuối giai đoạn điều trị (ngày 19 sau khi gây ra vết thương), đánh giá sự hàn gắn vết thương. Các vết thương hàn gắn hoàn toàn được báo cáo dưới dạng phần trăm so với tổng số vết thương trong mỗi nhóm. Độ rộng trung bình của sẹo ở các vết thương đã hàn gắn hoàn toàn và thể hiện sự bong vảy hoàn toàn cũng được báo cáo. Sẹo được đo (mm) và độ rộng trung bình của sẹo và độ lệch chuẩn được tính toán. Tổng số 20 vết thương được tạo ra.

Ở cuối giai đoạn điều trị (ngày 19 sau khi gây ra vết thương), lợn bị giết bằng quá liều thuốc mê và KCl và sinh thiết vùng vết thương được thu thập. Cố ddngj sinh thiết vết thương bằng paraformaldehyt 4%. Sau khi cố định, sinh thiết vết thương được theo dõi bằng hình ảnh bằng, ví dụ, máy ảnh kỹ thuật số FinePix S700 với độ phân giải cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cronshaw JM and Matunis MJ. 2004. The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations *TRENDS Endocrin Metab.* 15:34-39

Falini B et al. 2006. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML *Blood.* 107:4514-4523.

Cai X and Liu X. 2008. Inhibition of Thr-55 phosphorylation restores p53 nuclear localization and sensitizes cancer cells to DNA damage. *PNAS.* 105:16958-16963.

Daelemans D, Afonina E, Nilsson J 2002 A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22):14440-5.98052-2517.

Davis JR et al. 2007. Controlling protein compartmentalization to overcome disease *Pharmaceut Res.* 24:17-27.

Freundt E, Yu L, Park E, et al 2009 Molecular determinants for subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame 3b protein. *J Virol* 83(13):6631-40.

- Ghildyal R, Ho A, Dias M, et al 2009 The respiratory syncytial virus matrix protein possesses a CRM1-mediated nuclear export mechanism. *J Virol* 83(11):5353-62.
- Ghosh CC et al 2008 Analysis of nucleocytoplasmic shuttling of NF kappa B proteins in human leukocytes. *Methods Mol Biol.* 457:279-92.
- Gupta N et al 2008 Retinal tau pathology in human glaucomas. *Can J Ophthalmol.* 2008 Feb;43(1):53-60.
- Hoshino L et al. 2008. Combined effects of p53 gene therapy and leptomycin B in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology.* 75:113-119.
- Lain S et al. 1999a An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs *Exp Cell Res.* 248:457-472.
- Lain S et al. 1999b. Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function *Exp Cell Res.* 253:315.
- Muller PA et al. 2009 Nuclear-cytosolic transport of COMMD1 regulates NF-kappaB and HIF-1 activity. *Traffic* 10(5):514-27.
- Mutka S 2007 Nuclear Export Inhibitors (NEIs) as novel cancer therapies AACR Annual Meeting. Poster 5609.
- Mutka S, Yang W, Dong S, et al. 2009. Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity in vivo. *Cancer Res.* 69: 510-7.
- Nakahara J et al. 2009. Abnormal expression of TIP30 and arrested nucleocytoplasmic transport within oligodendrocyte precursor cells in multiple sclerosis *J Clin Invest.* 119:169-181.
- Noske A et al. 2008. Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer. *Cancer.* 112:1733-1743.
- Pollard V & Malim M. 1998 The HIV-1 Rev protein *Annu Rev Microbiol* 52:491-532.
- Rawlinson S, Pryor M, Wright P, Jans D 2009 CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. *J Biol Chem* 284(23):15589-97.
- Sanchez V, Mahr J, Orazio N, et al 2007 Nuclear export of the human cytomegalovirus tegument protein pp65 requires cyclin-dependent kinase activity and the CRM1 exporter. *J Virol* 81(21):11730-6..
- Sorokin AV et al. 2007. Nucleocytoplasmic transport of proteins . *Biochemistry* 72:1439-1457.

Terry LJ et al. 2007. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318:1412-1416.

Van der Watt PJ et al. 2008. The Karyopherin proteins, CRM1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation. *Int J Canc.* 124:1829-1840.

Walsh MD et al. 2008 Exportin 1 inhibition attenuates nuclear factor-kappaB-dependent gene expression. *Shock* 29:160-166.

Williams P, Verhagen J, Elliott G 2008 Characterization of a CRM1-dependent nuclear export signal in the C terminus of herpes simplex virus type 1 tegument protein UL47. *J Virol* 82(21):10946-52.

Yang W 2007 Anti-tumor activity of novel nuclear export inhibitors (NEIs) in multiple murine leukemia models. *AACR Annual Meeting*. Poster 5597.

Yao Y et al. 2009. The expression of CRM1 is associated with prognosis in human osteosarcoma. *Oncol Rep.* 21:229-35.

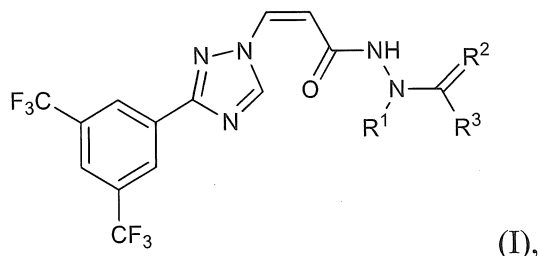
Zimmerman TL et al 2006 Nuclear export of retinoid X receptor alpha in response to interleukin-1beta-mediated cell signaling: roles for JNK and SER260. *J Biol Chem* 281:15434-15440.

Toàn bộ nội dung của toàn bộ sáng chế, đơn đã công bố và tài liệu tham khảo được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Mặc dù sáng chế được trình bày cụ thể và mô tả có tham chiếu đến các phương án làm ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng các thay đổi và chi tiết có thể được tạo ra trong các phương án đó là không chệch khỏi phạm vi của sáng chế được chứa đựng trong các yêu cầu bảo hộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm để điều trị rối loạn có liên quan đến hoạt tính CRM1, chế phẩm này chứa solvat hoặc hydrat của hợp chất có công thức I:



trong đó:

R^1 được chọn từ hydro và C_1 - C_4 alkyl;

R^2 được chọn từ O và S; và

R^3 được chọn từ $-N(R^4)-(C_3-C_6$ xycloalkyl), $-C_1-C_6$ alkyl, $-(C_0-C_4$ alkylen)-heteroxyclyl, và $-(C_0-C_4$ alkylen)-heteroaryl, trong đó phần alkyl, alkylen, heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 tùy ý và độc lập được thế; và

R^4 được chọn từ hydro và C_1 - C_4 alkyl,

và chất mang được dùng.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó

R^1 được chọn từ hydro và C_1 - C_4 alkyl;

R^2 được chọn từ O; và

R^3 được chọn từ $-C_1-C_6$ alkyl, $-(C_0-C_4$ alkylen)-heteroxyclyl, và $-(C_0-C_4$ alkylen)-heteroaryl, trong đó phần alkyl, alkylen, heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 tùy ý và độc lập được thế.

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó

R^1 được chọn từ hydro và C_1 - C_4 alkyl;

R^2 được chọn từ O; và

R^3 là $-C_1-C_6$ alkyl, trong đó R^3 tùy ý và độc lập được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm gồm $-OH$, $-SH$, nitro, halogen, amino, xyano, nhóm C_1 - C_{12} alkyl, C_2 - C_{12} alkenyl hoặc C_2 - C_{12} alkynyl, C_1 - C_{12} alkoxy, C_1 - C_{12} haloalkyl, C_1 - C_{12} haloalkoxy và C_1 - C_{12} alkyl sulfanyl.

4. Chế phẩm theo điểm 1, 2 hoặc 3 trong đó, R^1 được chọn từ hydro và metyl.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó R^1 là hydro.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó R^2 là O.
7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó R^4 là hydro.
8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó R^3 được chọn từ $-N(R^4)-(C_3-C_6 \text{ xycloalkyl})$, $-C_3-C_6 \text{ alkyl}$, $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})\text{-heteroxyclyl}$, và $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})\text{-heteroaryl}$, trong đó:
- phần alkyl hoặc alkylen bất kỳ của R^3 tùy ý và độc lập được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm gồm oxo và $-N(R^5)_2$, trong đó mỗi R^5 độc lập được chọn từ hydro và $C_1-C_4 \text{ alkyl}$;
- phần heteroxyclyl bất kỳ của R^3 chứa ít nhất một nguyên tử nitơ trong vòng, và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm gồm $C_1-C_4 \text{ alkyl}$ và oxo; và
- phần heteroaryl bất kỳ của R^3 chứa ít nhất một nguyên tử nitơ trong vòng và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều $C_1-C_4 \text{ alkyl}$.
9. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó R^3 được chọn từ $-C_3-C_6 \text{ alkyl}$, $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})\text{-heteroxyclyl}$, và $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})\text{-heteroaryl}$, trong đó:
- phần alkyl hoặc alkylen bất kỳ của R^3 tùy ý và độc lập được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm gồm oxo và $-N(R^5)_2$, trong đó mỗi R^5 độc lập được chọn từ hydro và $C_1-C_4 \text{ alkyl}$;
- phần heteroxyclyl bất kỳ của R^3 chứa ít nhất một nguyên tử nitơ trong vòng, và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm gồm $C_1-C_4 \text{ alkyl}$ và oxo; và
- phần heteroaryl bất kỳ của R^3 chứa ít nhất một nguyên tử nitơ trong vòng và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều $C_1-C_4 \text{ alkyl}$.
10. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó R^3 là $-C_3-C_6 \text{ alkyl}$.

11. Chế phẩm theo điểm 8 hoặc 9, trong đó R^3 là $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})$ -heteroxyclyl.
12. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó R^3 là $-(C_1 \text{ alkylen})$ -heteroxyclyl.
13. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó heteroxyclyl được chọn từ pyrazinyl, piperidinyl, morpholinyl, và pyrazolyl.
14. Chế phẩm theo điểm 13, trong đó heteroxyclyl là morpholinyl.
15. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phần alkyl, alkylen, heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 không được thế hoặc độc lập được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm gồm -OH, -SH, nitro, halogen, amino, xyano, nhóm C_1-C_{12} alkyl, C_2-C_{12} alkenyl hoặc C_2-C_{12} alkynyl, C_1-C_{12} alkoxy, C_1-C_{12} haloalkyl, C_1-C_{12} haloalkoxy và C_1-C_{12} alkyl sulfanyl.
16. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phần alkyl, alkylen, heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 không được thế hoặc độc lập được thế bằng nhóm amino có công thức $-N(R^5)_2$, trong đó mỗi R^5 độc lập được chọn từ hydro và C_1-C_4 alkyl.
17. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó R^3 không được thế hoặc độc lập được thế bằng nhóm amino có công thức $-N(R^5)_2$, trong đó mỗi R^5 độc lập được chọn từ hydro và C_1-C_4 alkyl.
18. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó:

phần heteroaryl bất kỳ của R^3 tùy ý và độc lập được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm gồm -OH, -SH, nitro, halogen, amino, xyano, C_1-C_{12} alkyl, C_2-C_{12} alkenyl, C_2-C_{12} alkynyl, C_1-C_{12} alkoxy, C_1-C_{12} haloalkyl, C_1-C_{12} haloalkoxy và C_1-C_{12} alkyl sulfanyl; và

phần alkyl, alkylen hoặc heteroxyclyl bất kỳ của R^3 tùy ý và độc lập được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm gồm oxo, -OH, -SH, nitro, halogen, amino, xyano, C_1-C_{12} alkyl, C_2-C_{12} alkenyl, C_2-C_{12} alkynyl, C_1-C_{12} alkoxy, C_1-C_{12} haloalkyl, C_1-C_{12} haloalkoxy và C_1-C_{12} alkyl sulfanyl.

19. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó R^3 được chọn từ $-N(R^4)-(C_3-C_6 \text{ xycloalkyl})$, $-C_3-C_6 \text{ alkyl}$, $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})\text{-heteroxyclyl}$, và $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})\text{-heteroaryl}$, trong đó:

phần alkyl hoặc alkylen bất kỳ của R^3 tùy ý được thế bằng $-N(R^5)_2$, trong đó mỗi R^5 độc lập được chọn từ hydro và $C_1-C_4 \text{ alkyl}$;

phần heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 chứa ít nhất một nguyên tử nitơ trong vòng; và

phần heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 tùy ý được thế bằng $C_1-C_4 \text{ alkyl}$.

20. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó R^3 được chọn từ $-C_3-C_6 \text{ alkyl}$, $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})\text{-heteroxyclyl}$, và $-(C_0-C_1 \text{ alkylen})\text{-heteroaryl}$, trong đó:

phần alkyl hoặc alkylen bất kỳ của R^3 tùy ý được thế bằng $-N(R^5)_2$, trong đó mỗi R^5 độc lập được chọn từ hydro và $C_1-C_4 \text{ alkyl}$;

phần heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 chứa ít nhất một nguyên tử nitơ trong vòng; và

phần heteroxyclyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 tùy ý được thế bằng $C_1-C_4 \text{ alkyl}$.

21. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó R^3 được chọn từ $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH\text{-xyclopropyl}$, $-(CH_2)_{0-1}\text{-pyrazinyl}$, piperidinyl, hydroxypiperidinyl, N-metylpiperidinyl, $-CH_2\text{-morpholin-4-yl}$, và metylpyrazolyl.

22. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó R^3 được chọn từ $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH\text{-xyclopropyl}$, $-(CH_2)_{0-1}\text{-pyrazin-2-yl}$, piperidin-3-yl, $-CH_2\text{-morpholin-4-yl}$, và 5-metyl-1-*H*-pyrazol-4-yl.

23. Chế phẩm theo điểm 22, trong đó R^3 được chọn từ $-C(CH_3)_3$, $-NH\text{-xyclopropyl}$, $-CH_2\text{-pyrazin-2-yl}$, -pyrazin-2-yl , $-CH_2\text{-morpholin-4-yl}$, và 5-metyl-1-*H*-pyrazol-4-yl.

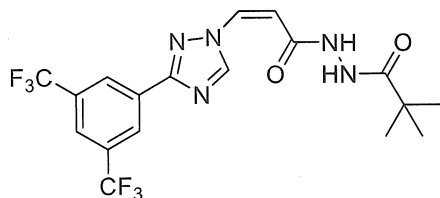
24. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó R^3 là $-C(CH_3)_3$.

25. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hợp chất có công thức bất kỳ trong số các công thức cấu trúc sau:

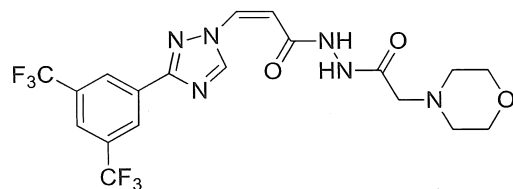
Hợp chất số	Công thức	Hợp chất số	Công thức
1		9	
2		10	
3		11	
4		12	
5		13	
6		14	
7		15	
8			

26. Chế phẩm theo điểm 25, trong đó hợp chất được chọn từ hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất 1, 2, 3, 4, 8, 11, 12 và 13.

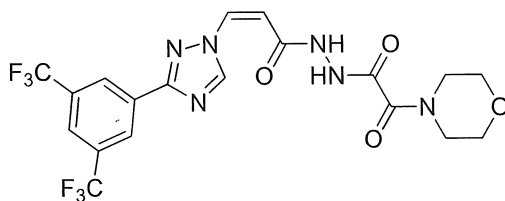
27. Chế phẩm theo điểm 25, trong đó hợp chất có công thức cấu trúc sau:



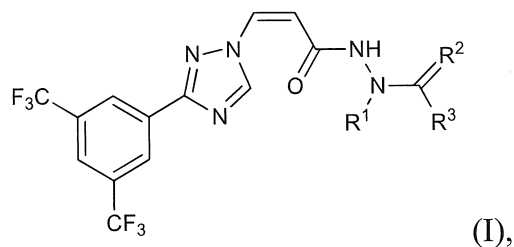
28. Chế phẩm theo điểm 25, trong đó hợp chất có công thức cấu trúc sau:



29. Chế phẩm theo điểm 25, trong đó hợp chất có công thức cấu trúc sau:



30. Dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng chứa solvat hoặc hydrat của hợp chất có công thức I:



trong đó:

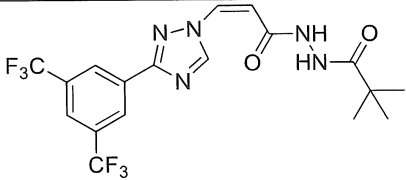
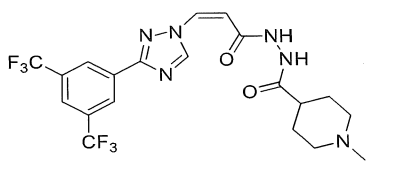
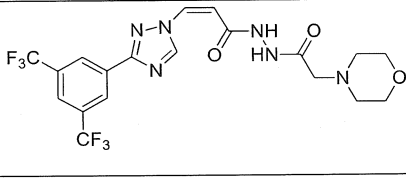
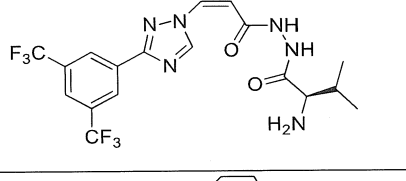
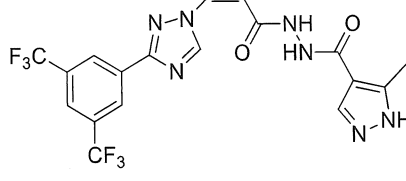
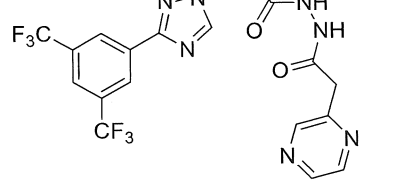
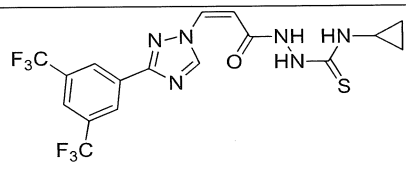
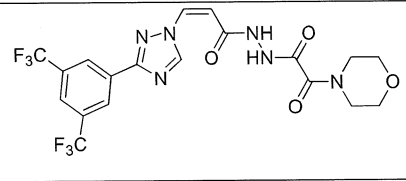
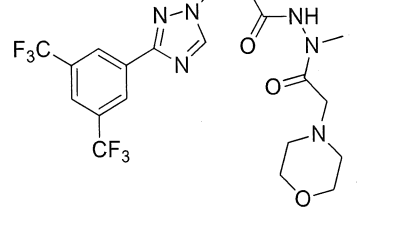
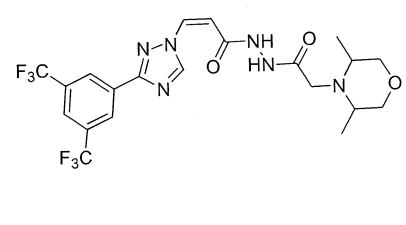
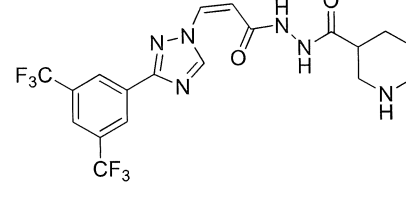
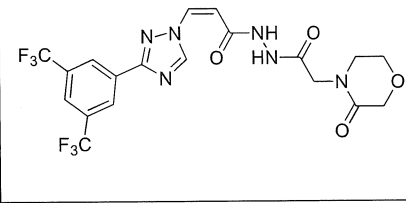
R^1 được chọn từ hydro và C_1 - C_4 alkyl;

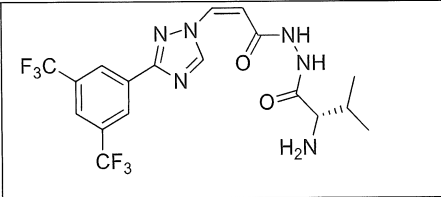
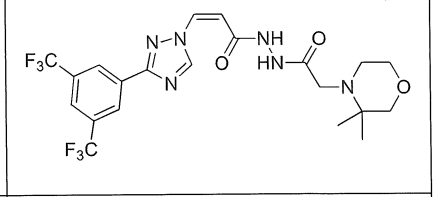
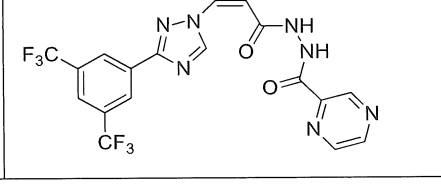
R^2 được chọn từ O và S; và

R^3 được chọn từ $-N(R^4)-(C_3-C_6 \text{ xycloalkyl})$, $-C_1-C_6 \text{ alkyl}$, $-(C_0-C_4 \text{ alkylen})$ -heteroxycyl, và $-(C_0-C_4 \text{ alkylen})$ -heteroaryl, trong đó phần alkyl, alkylen, heteroxycyl, và heteroaryl bất kỳ của R^3 tùy ý và độc lập được thế; và

R^4 được chọn từ hydro và $C_1-C_4 \text{ alkyl}$, và chất mang được dùng.

31. Dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng theo điểm 30, trong đó hợp chất có công thức bất kỳ trong số các công thức cấu trúc sau:

Hợp chất số	Công thức	Hợp chất số	Công thức
1		9	
2		10	
3		11	
4		12	
5		13	
6		14	

7		15	
8			

32. Dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng theo điểm 31, trong đó hợp chất được chọn từ hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất 1, 2, 3, 4, 8, 11, 12 và 13.

33. Dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng theo điểm 31, trong đó hợp chất là hợp chất 1.

34. Dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 31 đến 33, trong đó dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng này là viên nang, viên nén, viên ngậm dẹt, viên ngậm, hỗn dịch nước, dạng bao vi nang, hoặc dung dịch nước.

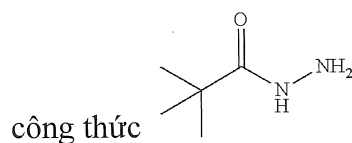
35. Dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 31 đến 34, trong đó dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng này bao gồm dược phẩm dạng liều giải phóng tức thời.

36. Dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 31 đến 34, trong đó dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng này bao gồm dược phẩm dạng liều giải phóng kéo dài.

37. Dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 31 đến 34, trong đó dược phẩm dạng liều dùng qua đường miệng này bao gồm dược phẩm dạng liều giải phóng chậm.

38. Phương pháp tổng hợp hợp chất (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-N'-pivaloylacrylohydrazit bao gồm bước cho axit (Z)-3-(3-(3,5-

bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic phản ứng với pivalohydrazit có



39. Phương pháp theo điểm 38, trong đó axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic được tạo ra bằng cách cho hợp chất (Z)-isopropyl 3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylat phản ứng với LiOH.

40. Phương pháp theo điểm 39, trong đó hợp chất (Z)-isopropyl 3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylat được tạo ra bằng cách cho hợp chất 3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol phản ứng với (Z)-isopropyl 3-iodoacrylat.

41. Phương pháp theo điểm 40, trong đó hợp chất 3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol được tạo ra bằng cách cho hợp chất 3,5-bis(triflometyl)benzothioamit phản ứng với hydrazin hydrat.

42. Phương pháp theo điểm 41, trong đó hợp chất 3,5-bis(triflometyl)benzothioamit được tạo ra bằng cách cho hợp chất 3,5-bis(triflometyl)benzonitril phản ứng với natri sulfhydrat.

43. Phương pháp tổng hợp axit (Z)-3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylic bao gồm bước cho hợp chất (Z)-isopropyl 3-(3-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acrylat phản ứng với LiOH.

1/38

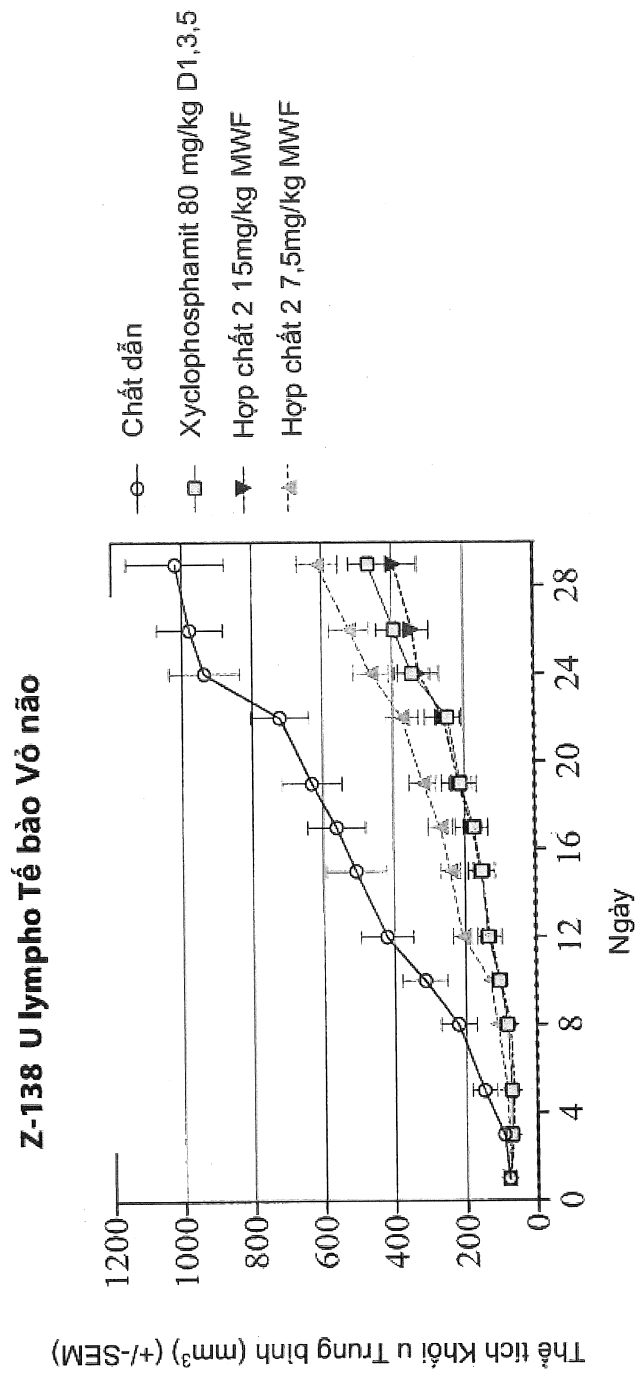


FIG. 1

2/38

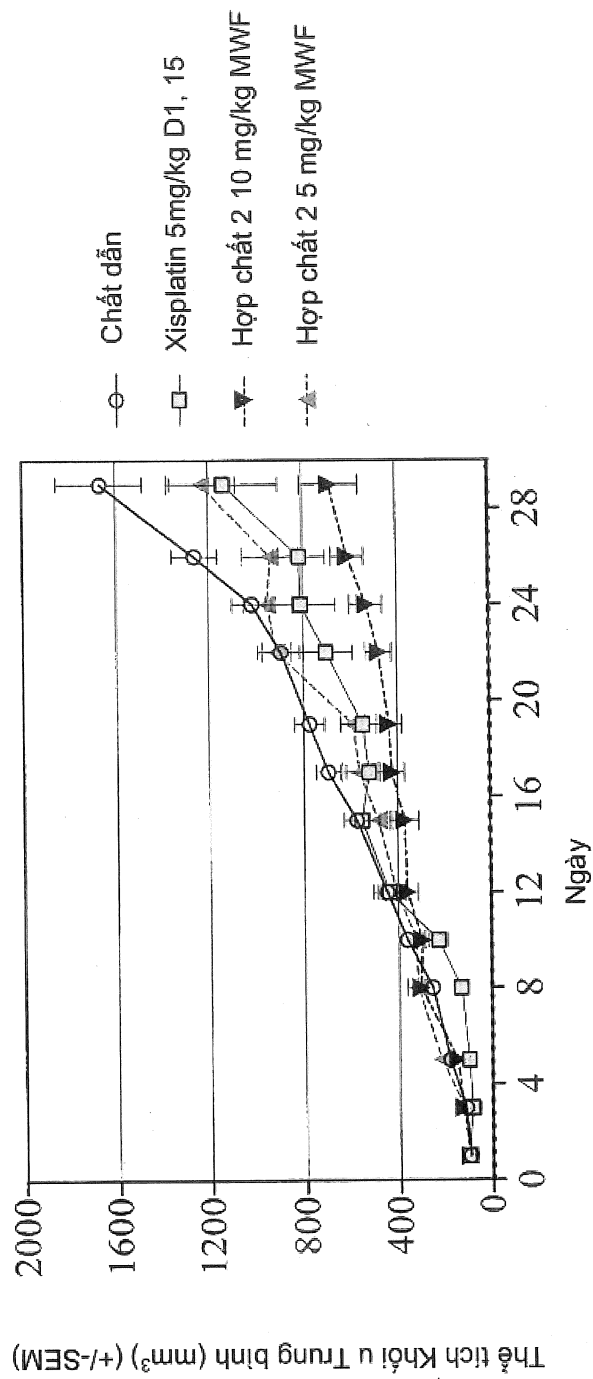


FIG. 2

3/38

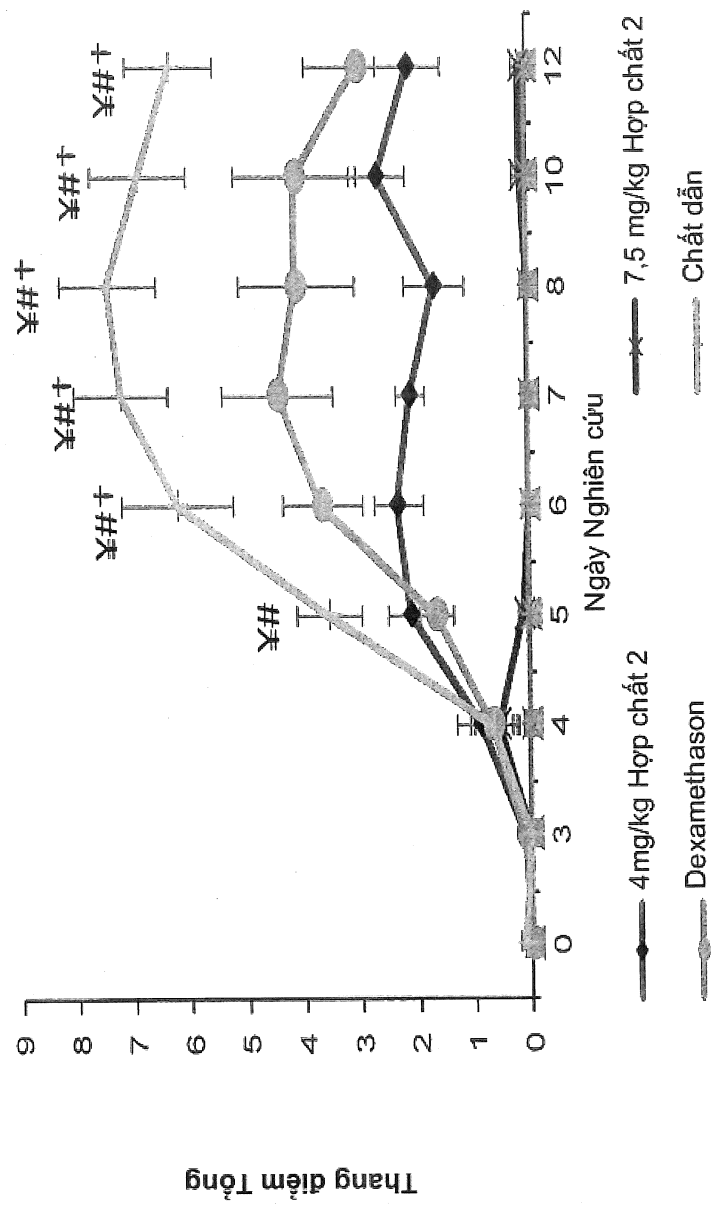


FIG. 3A

4/38

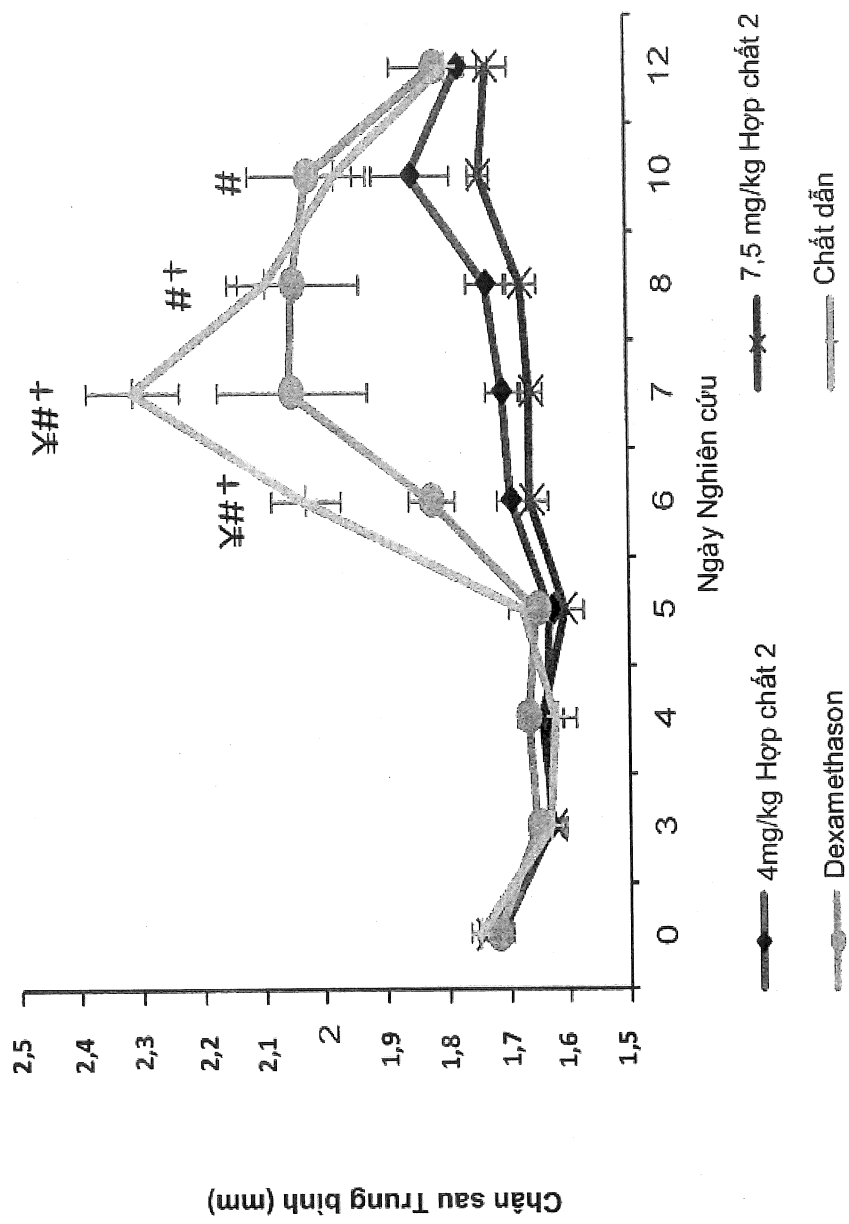


FIG. 3B

5/38

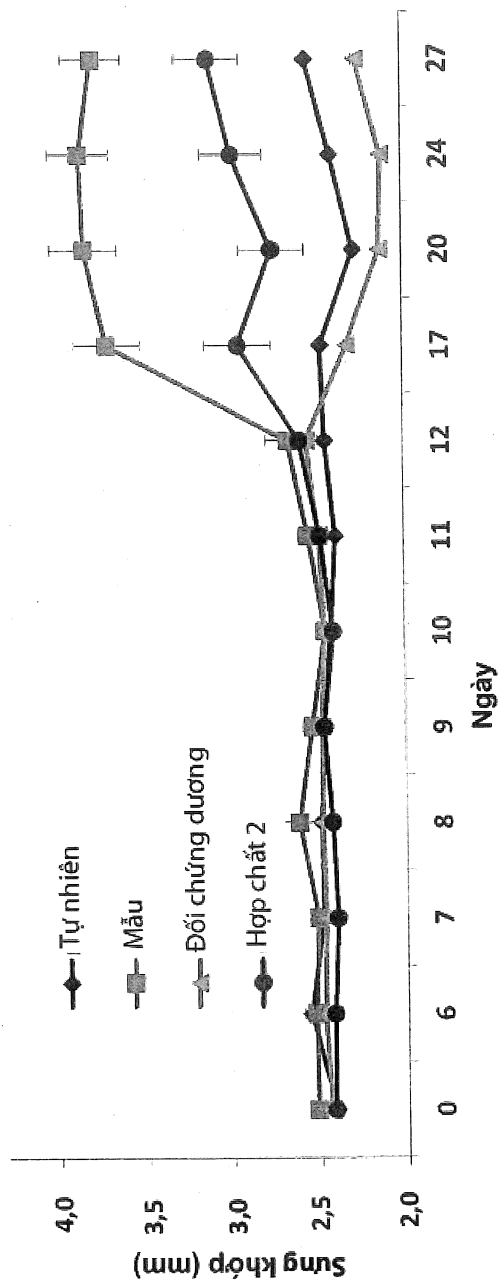


FIG. 4A

6/38

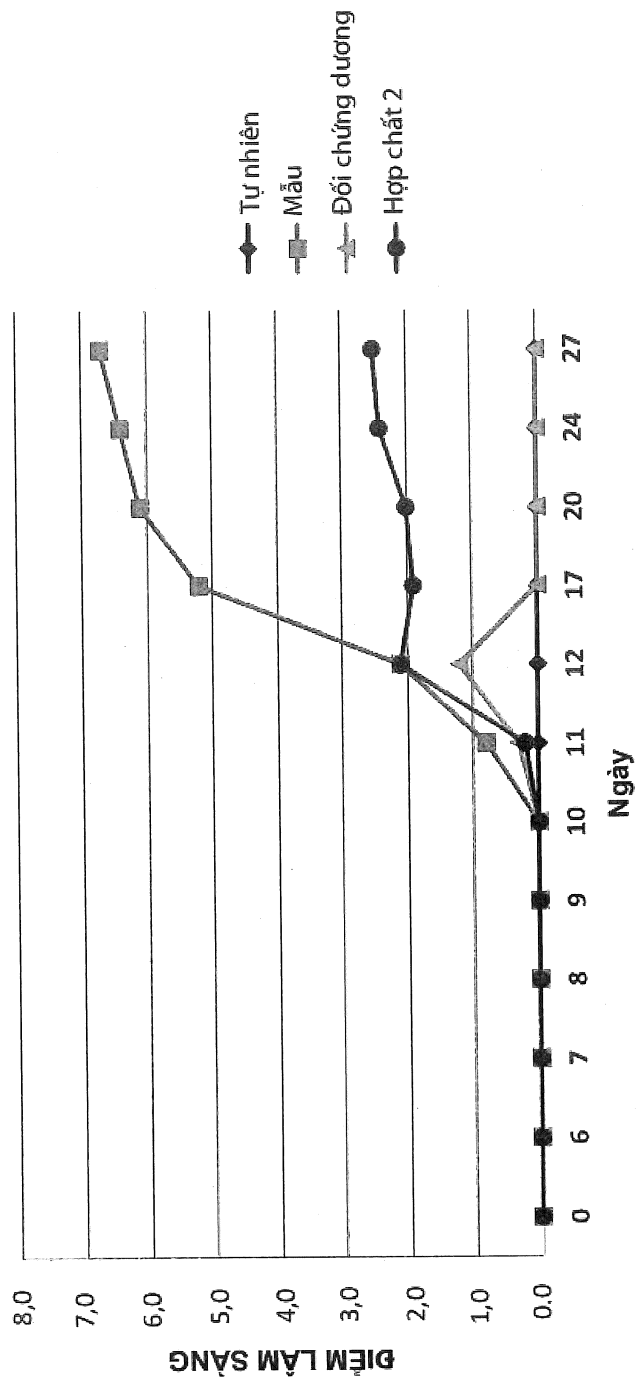
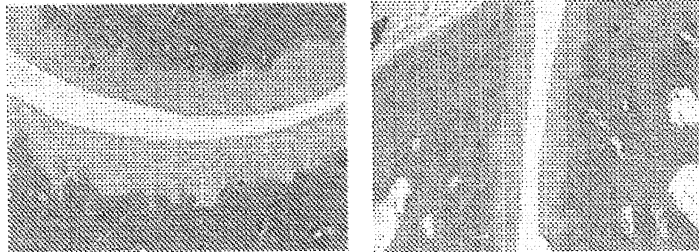


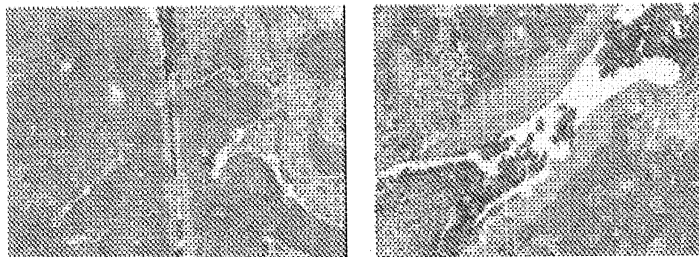
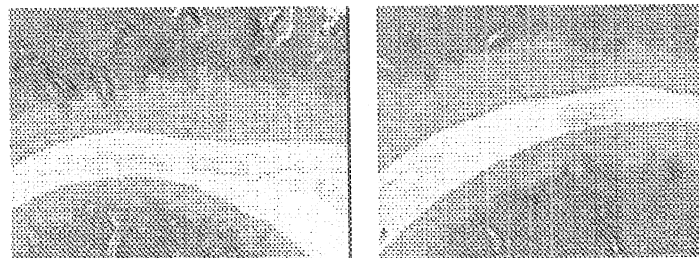
FIG. 4B

7/38

A) Tự nhiên



B) Mẫu

C) Đối chứng
dương

D) Hợp chất 2



FIG. 5

8/38

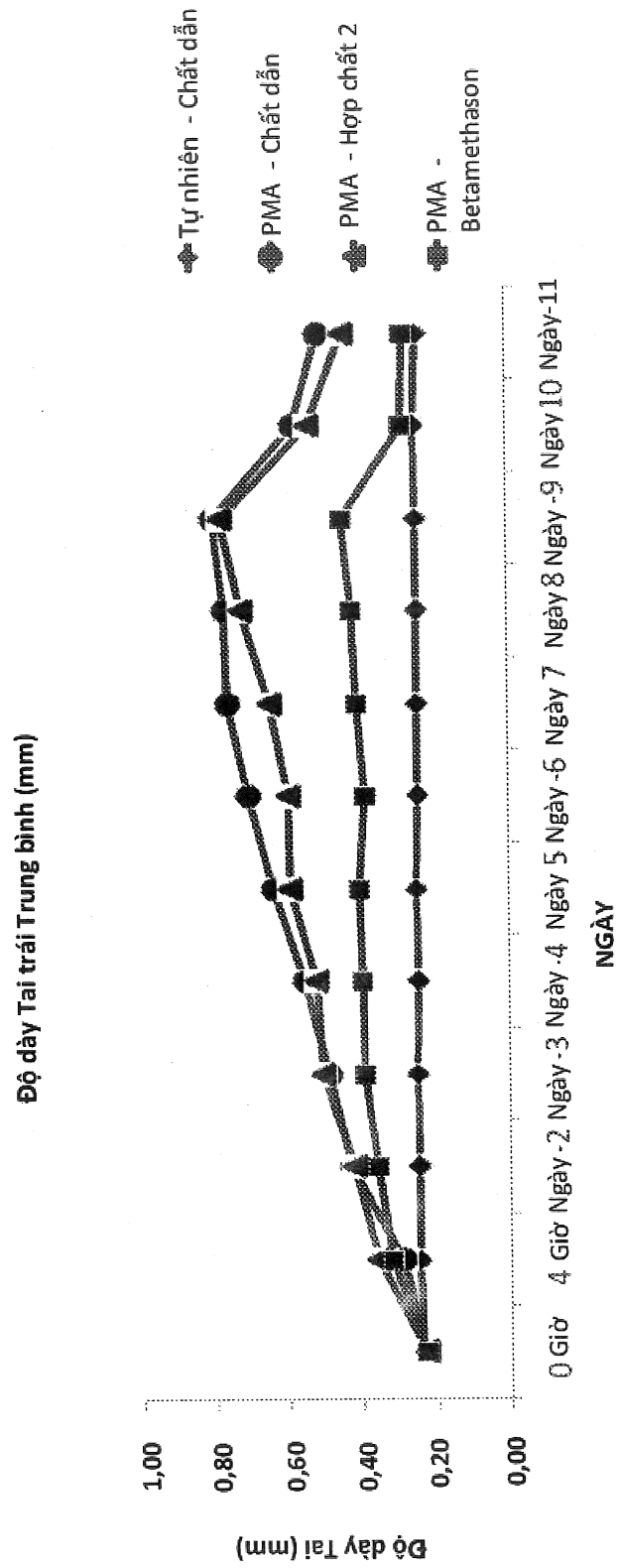


FIG. 6A

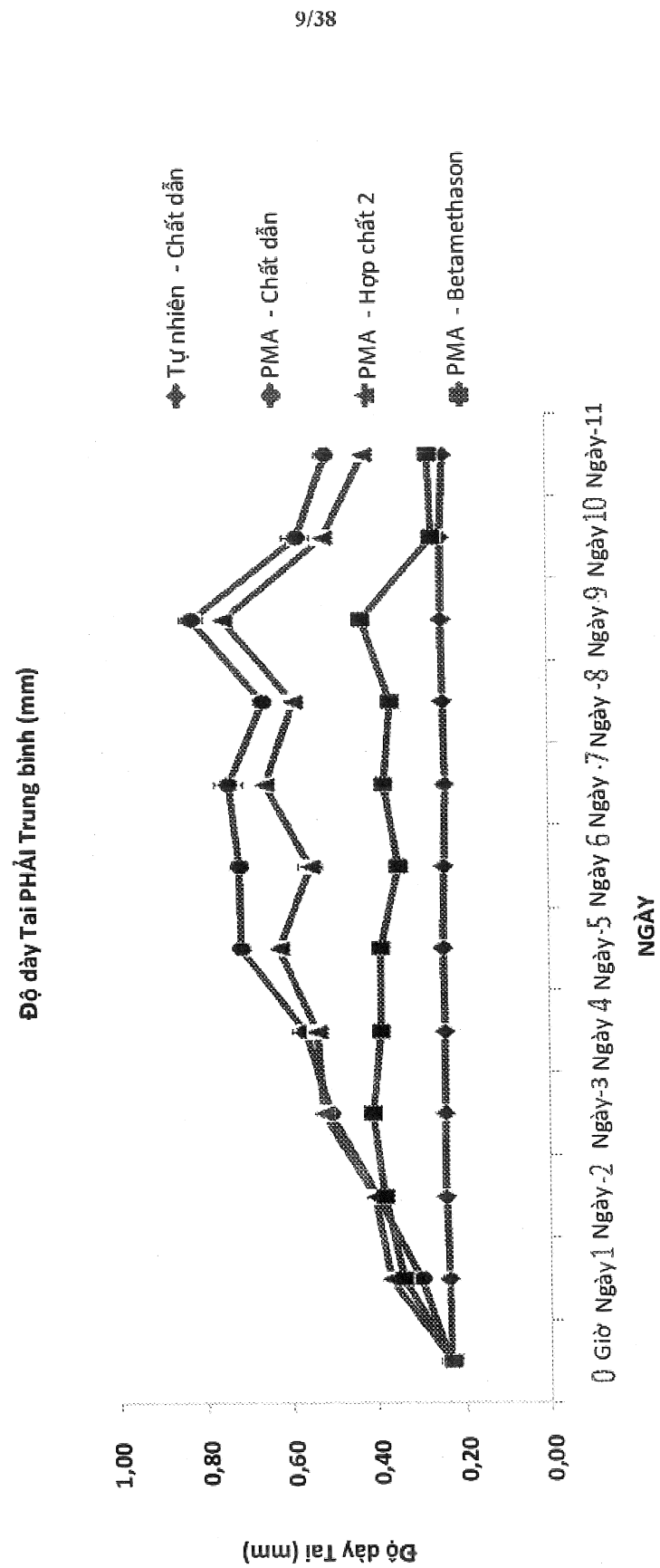


FIG. 6B

10/38

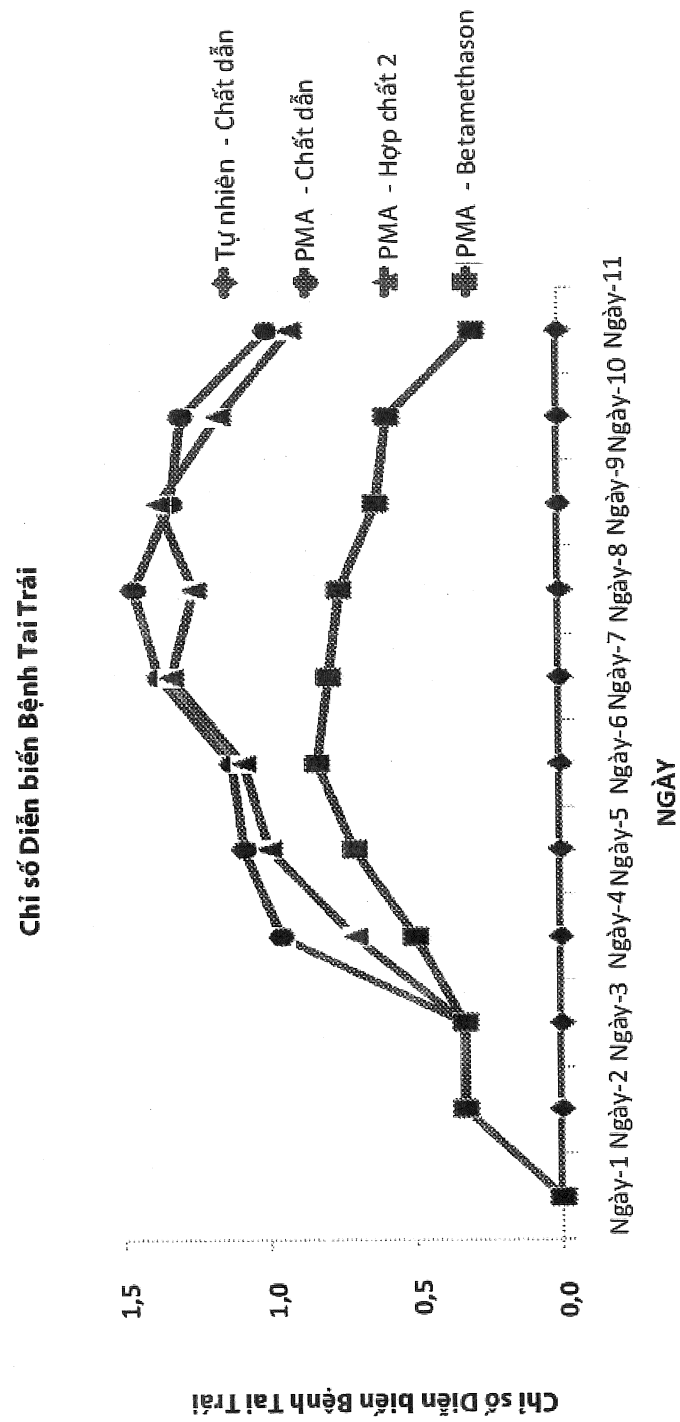


FIG. 6C

11/38

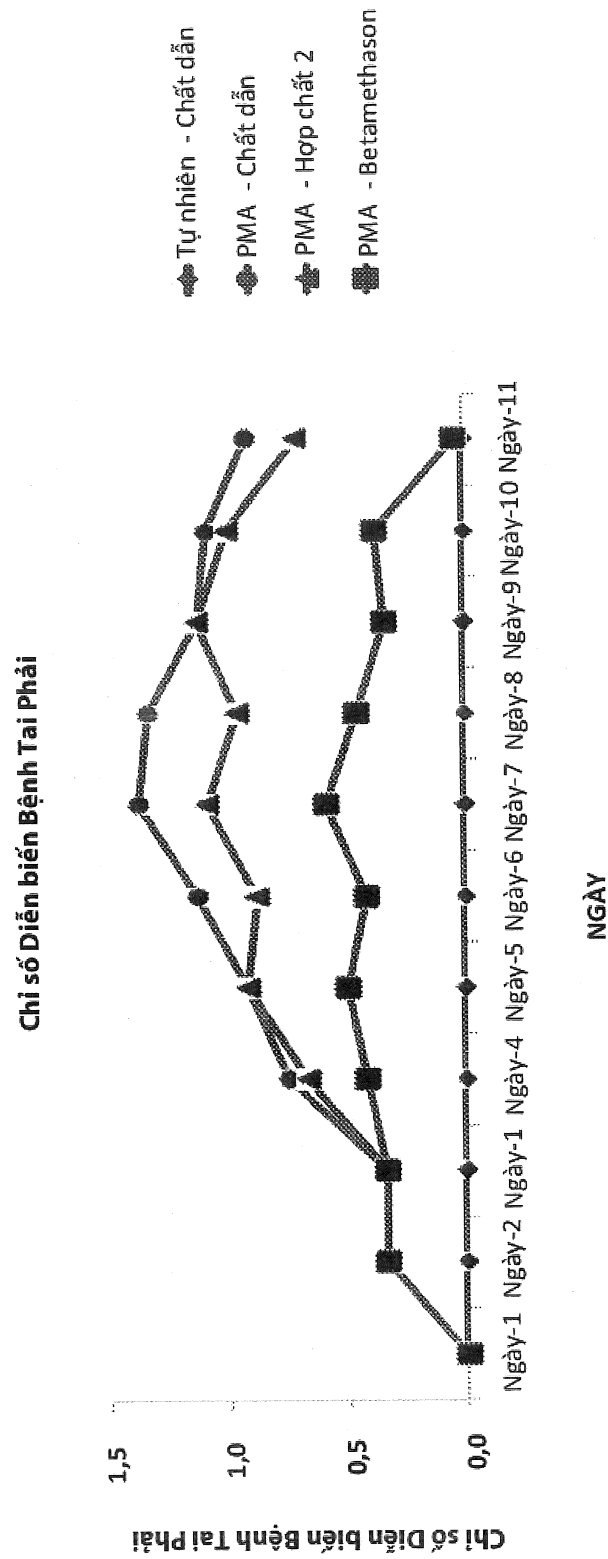


FIG. 6D

12/38

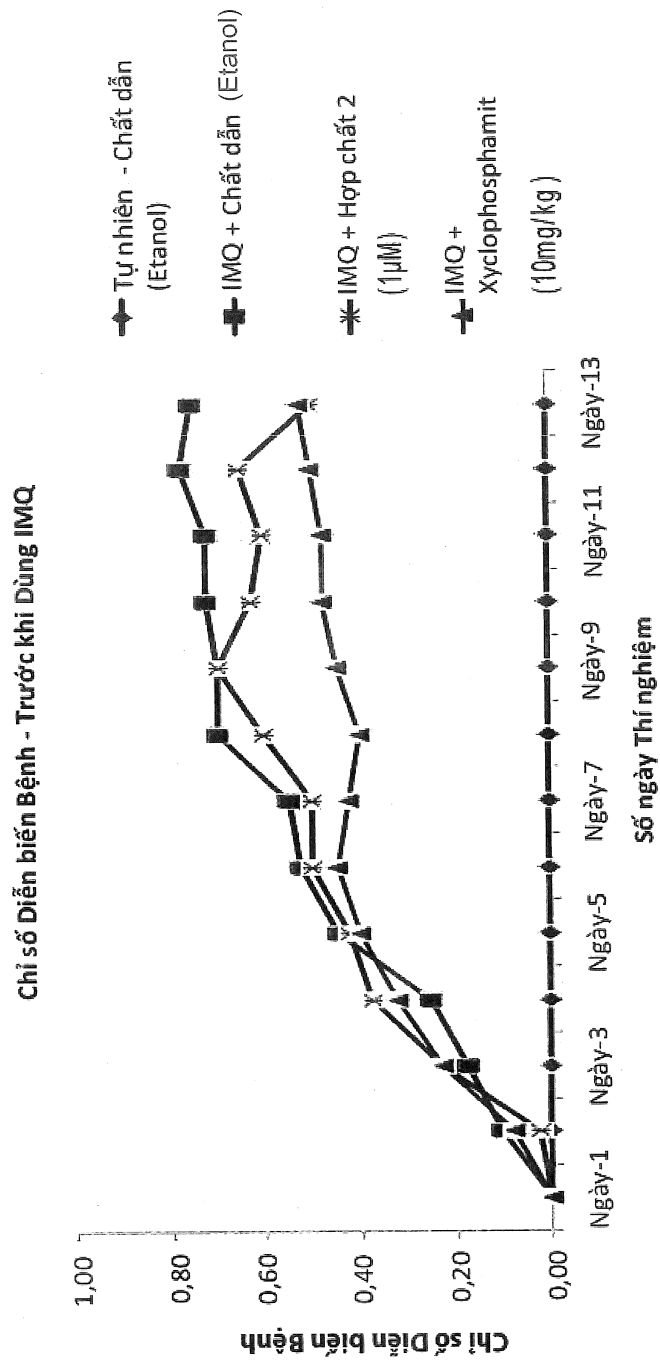


FIG. 7A

13/38

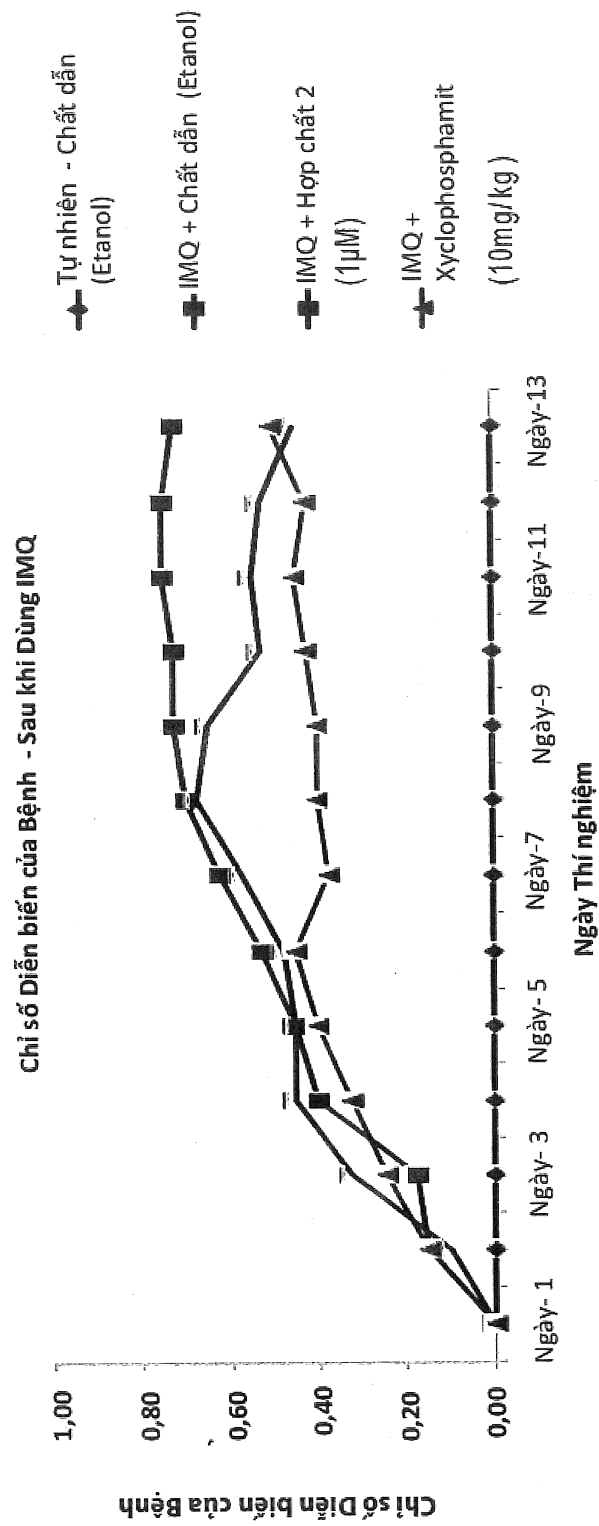


FIG. 7B

14/38

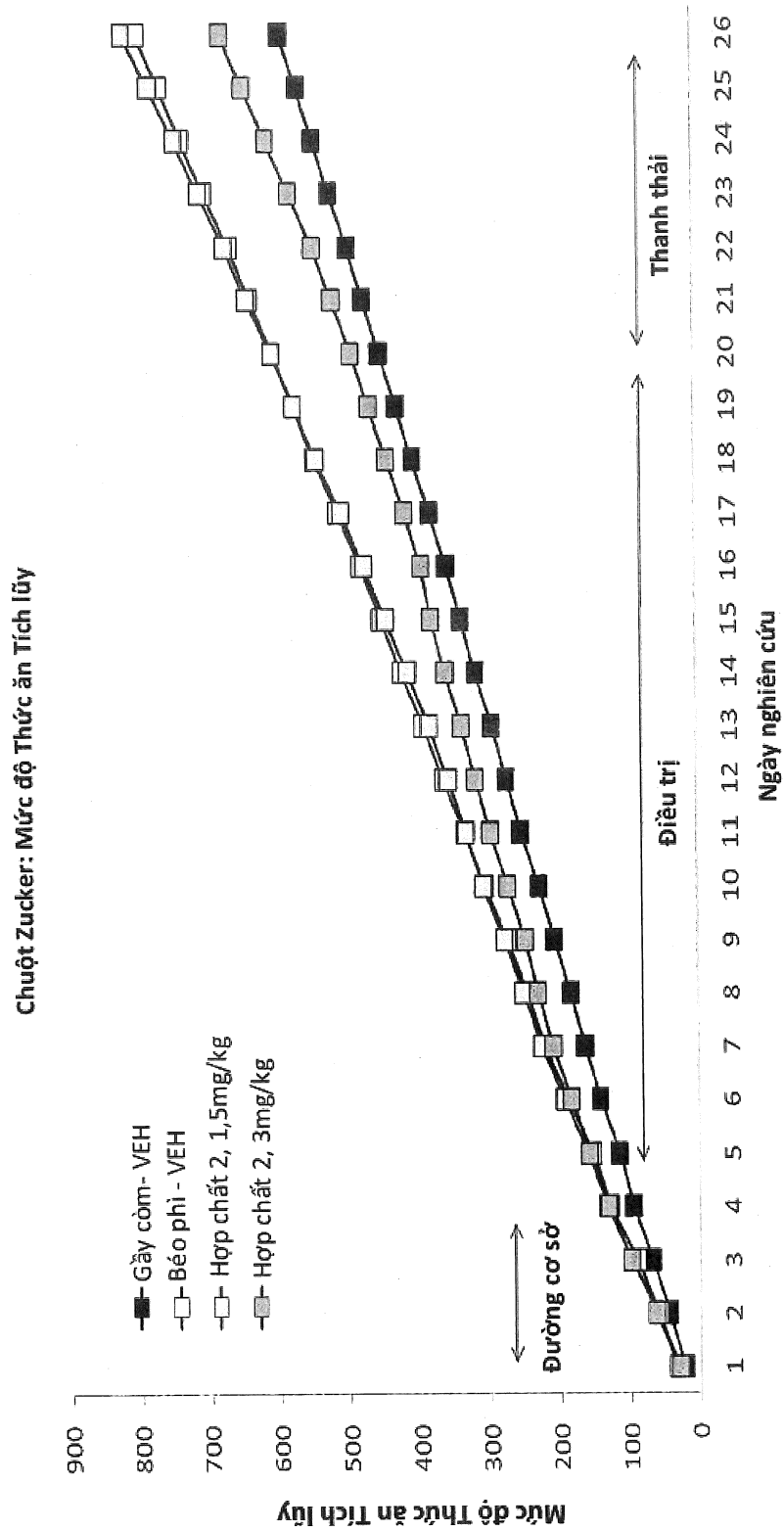


FIG. 8A

15/38

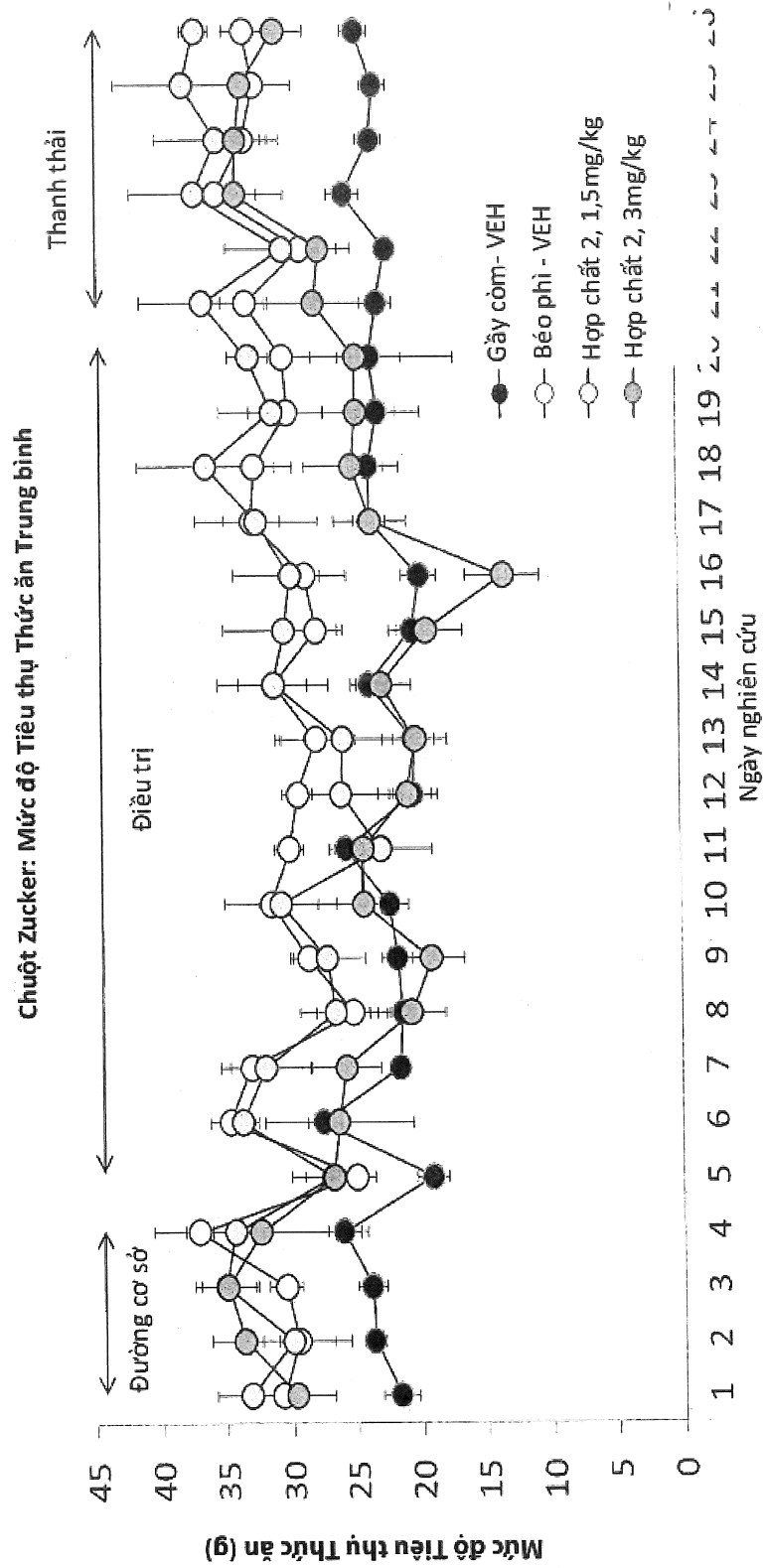


FIG. 8B

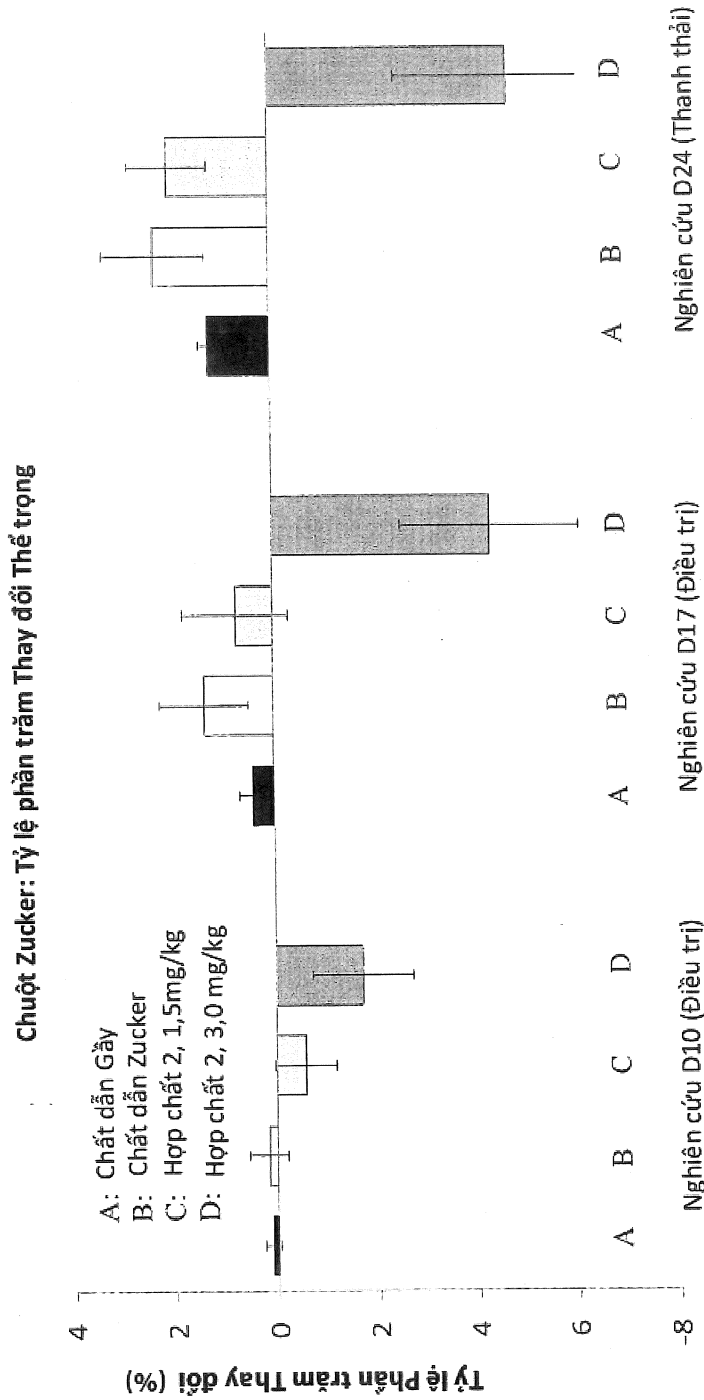


FIG. 9

17/38

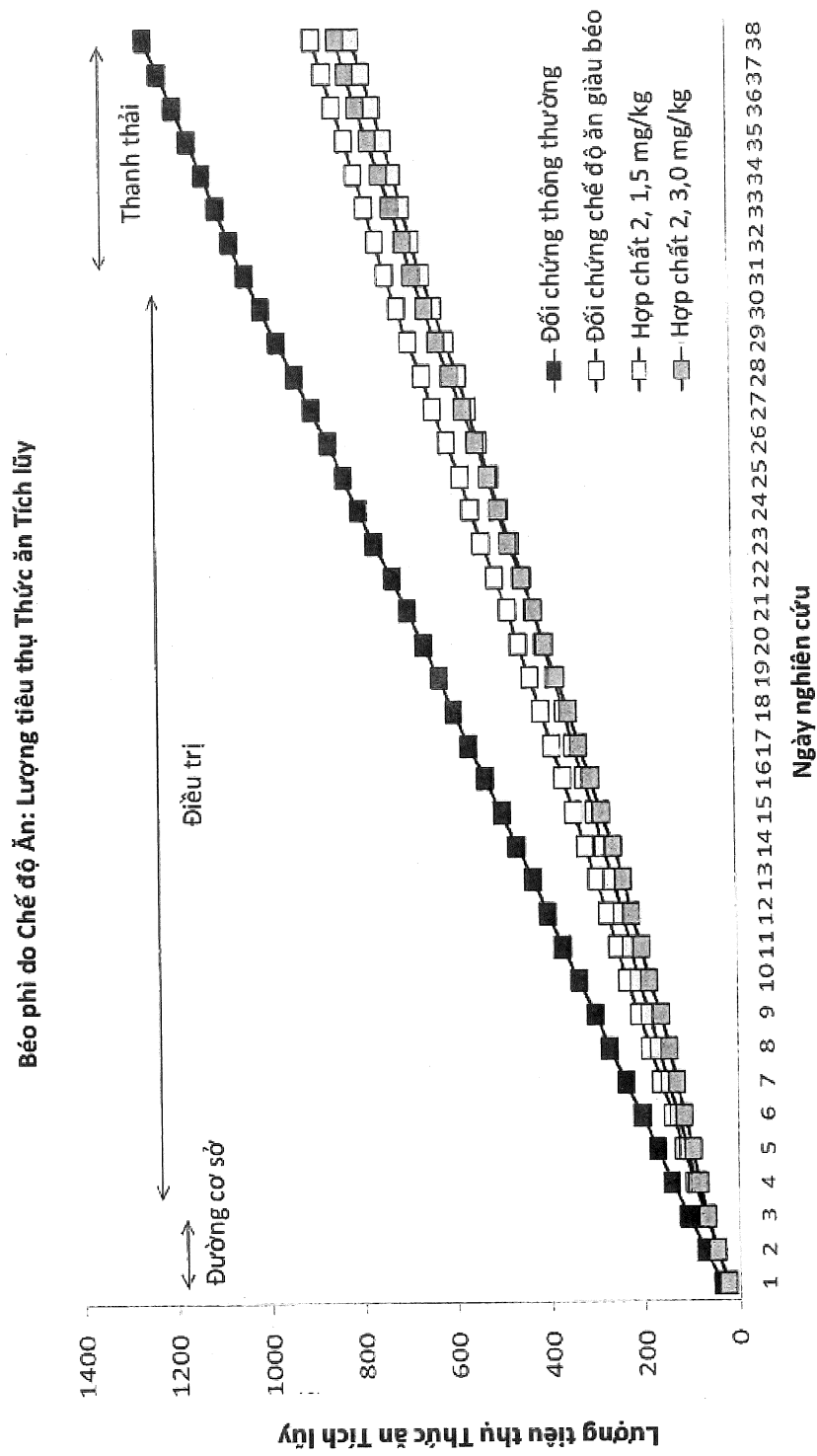


FIG. 10A

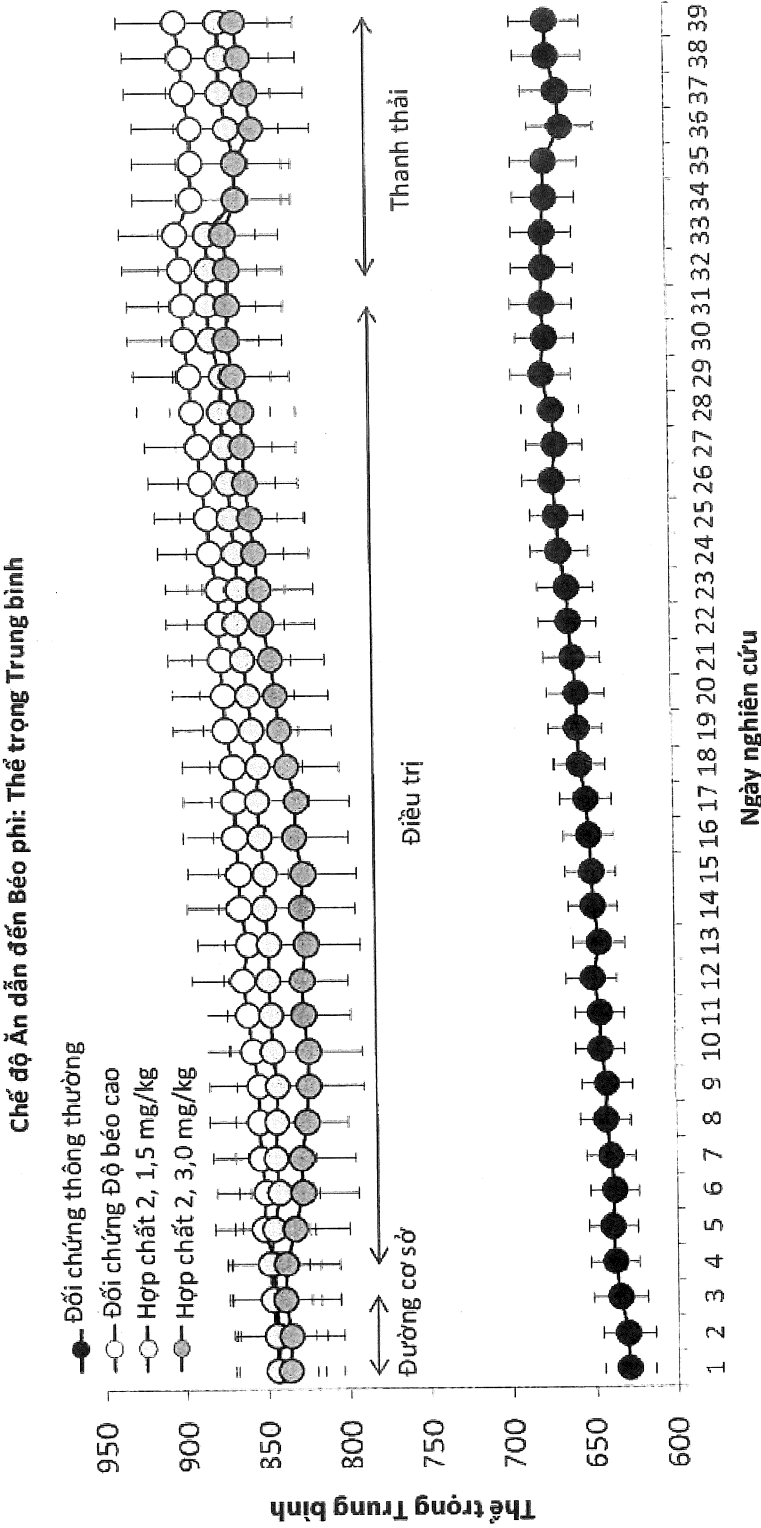


FIG. 10B

19/38

Chế độ ăn dẫn đến Béo phì: Tỷ lệ Phần trăm Thay đổi Thể trọng

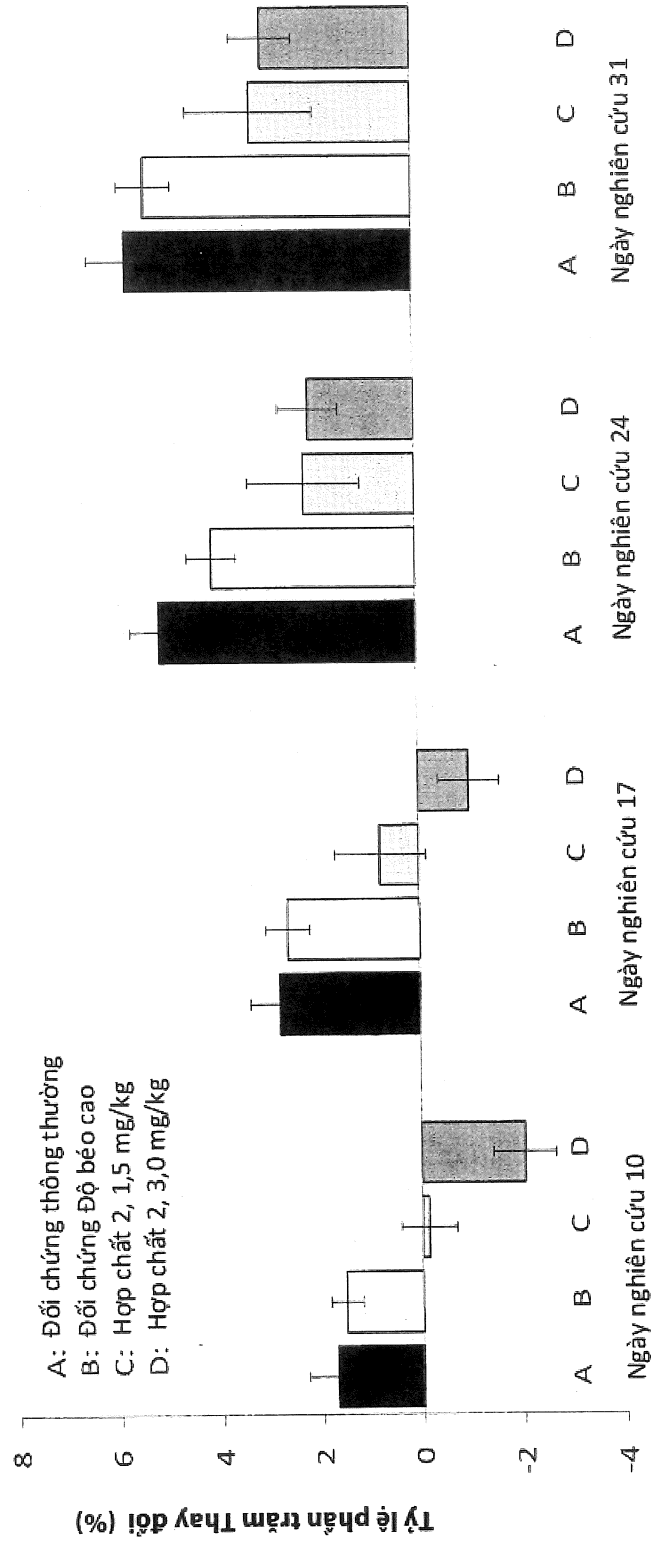


FIG. 11

20/38

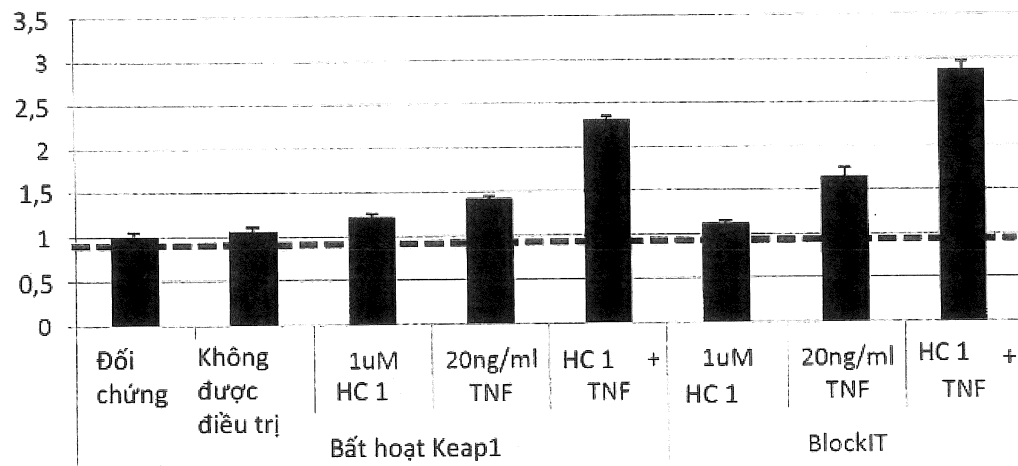


FIG. 12A

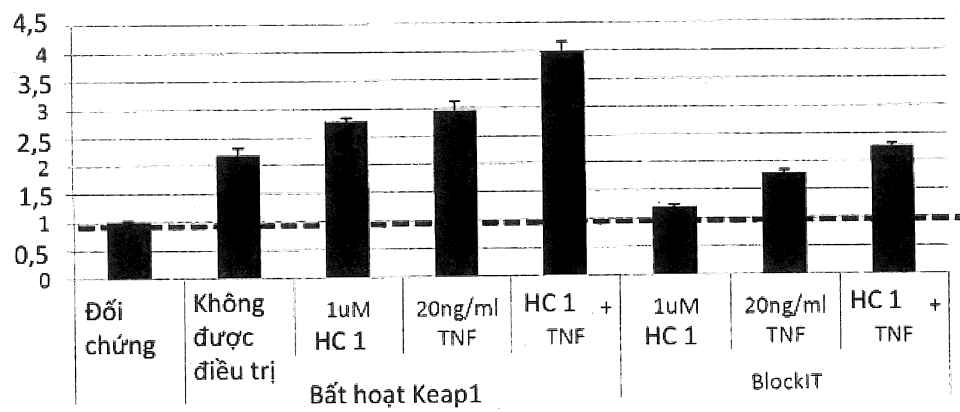


FIG. 12B

21/38

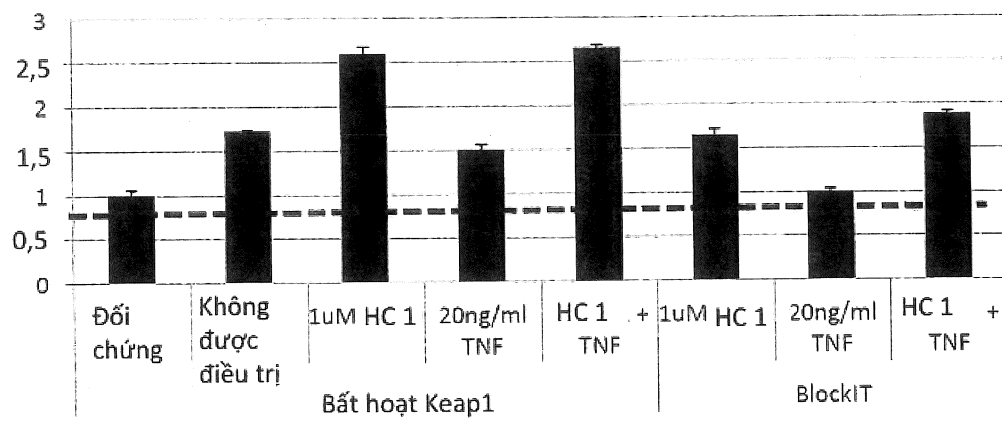


FIG. 12C

22/38

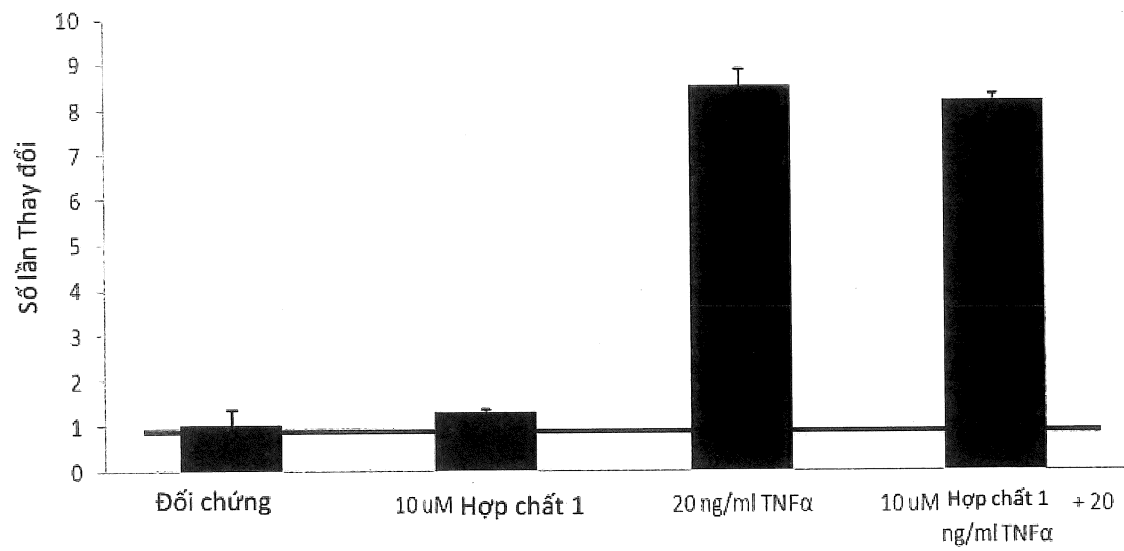


FIG. 13A

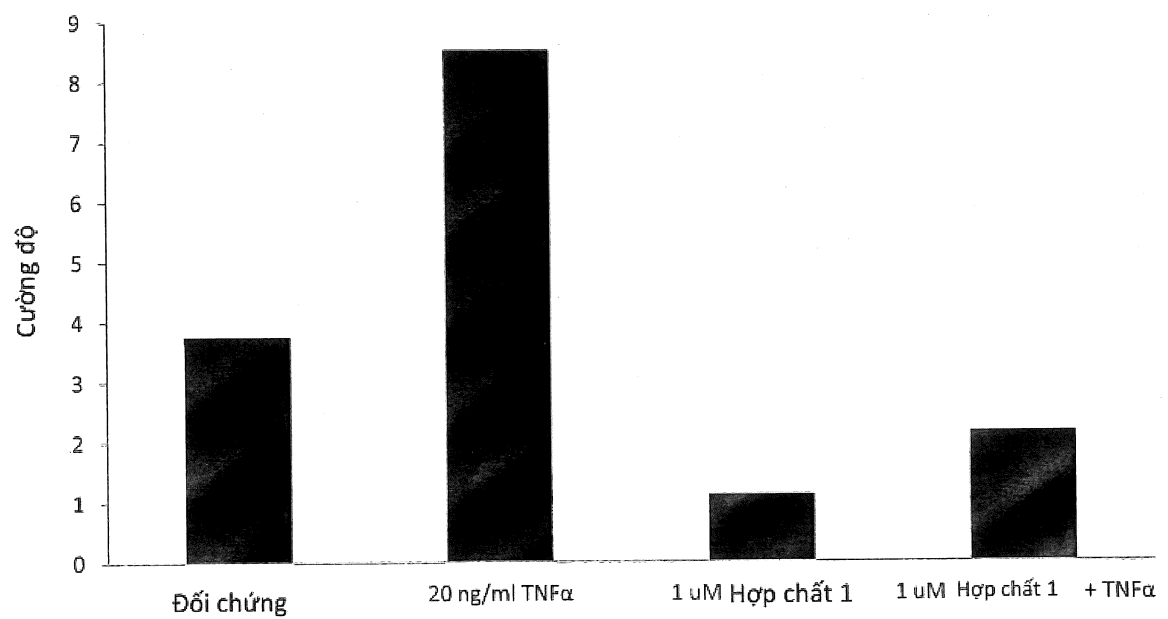


FIG. 13B

23/38

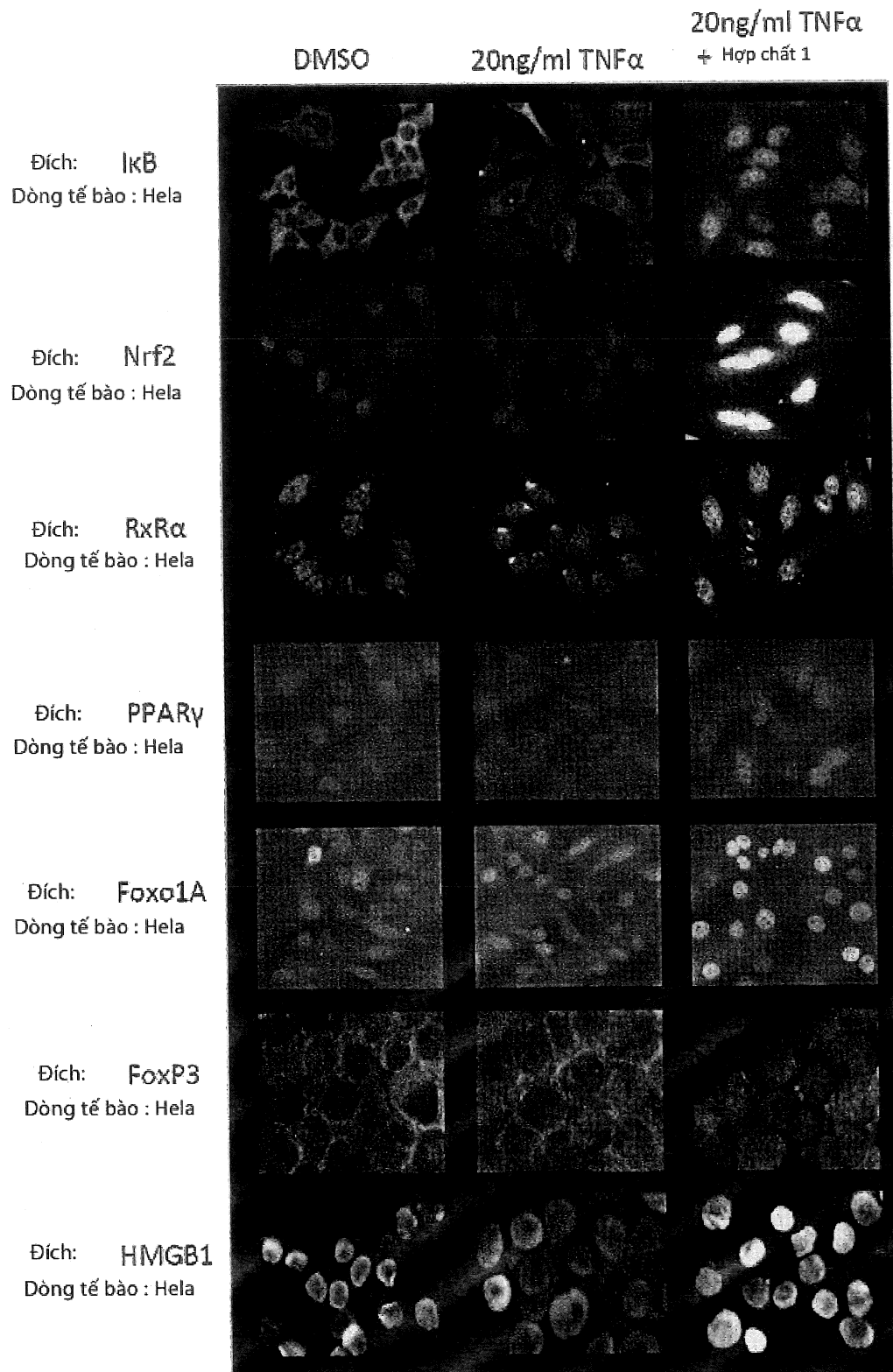


FIG. 14A

24/38

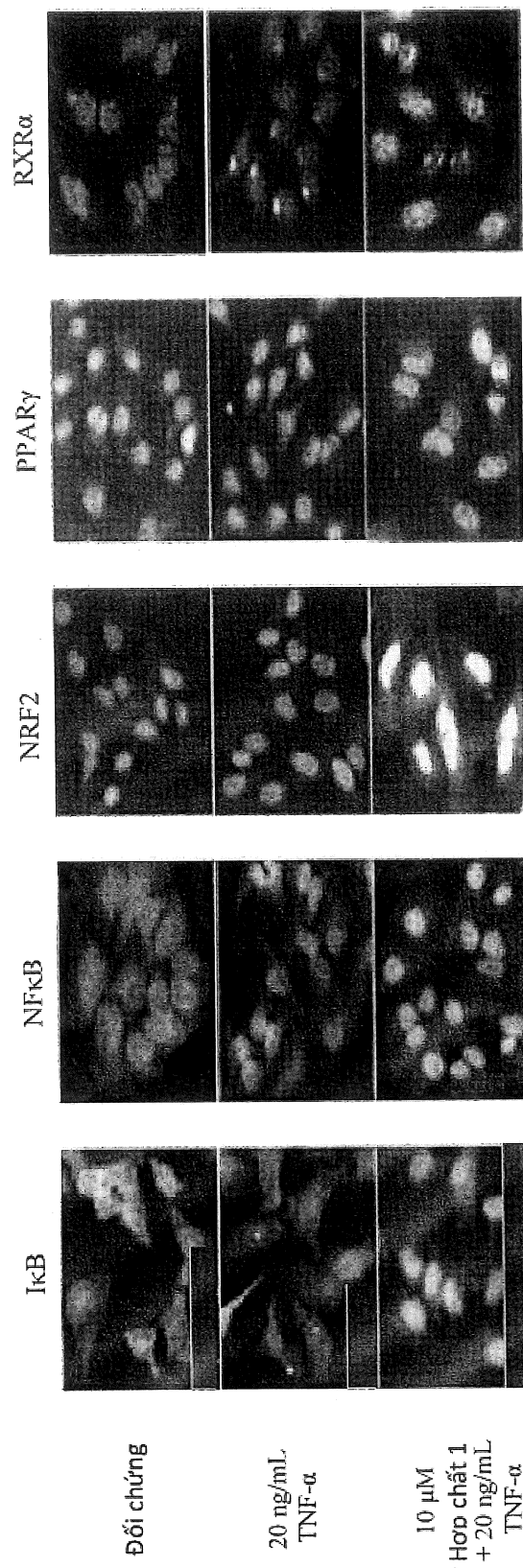


FIG. 14B

25/38

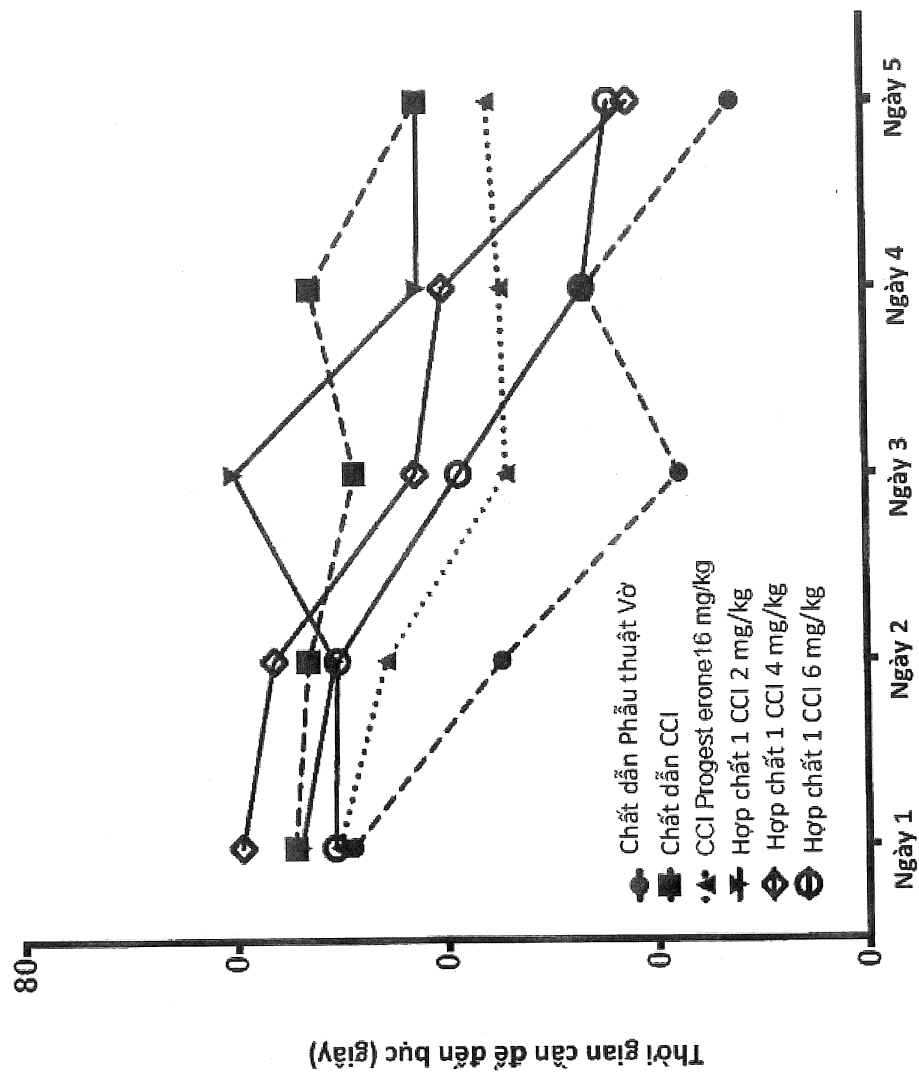


FIG. 15A

26/38

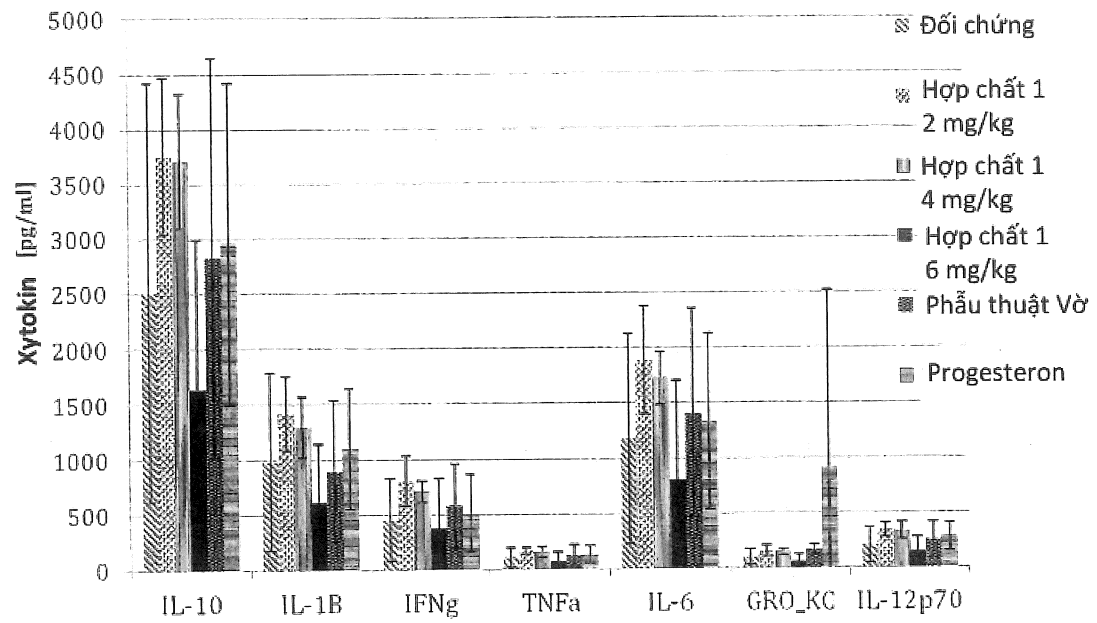


FIG. 15B

27/38

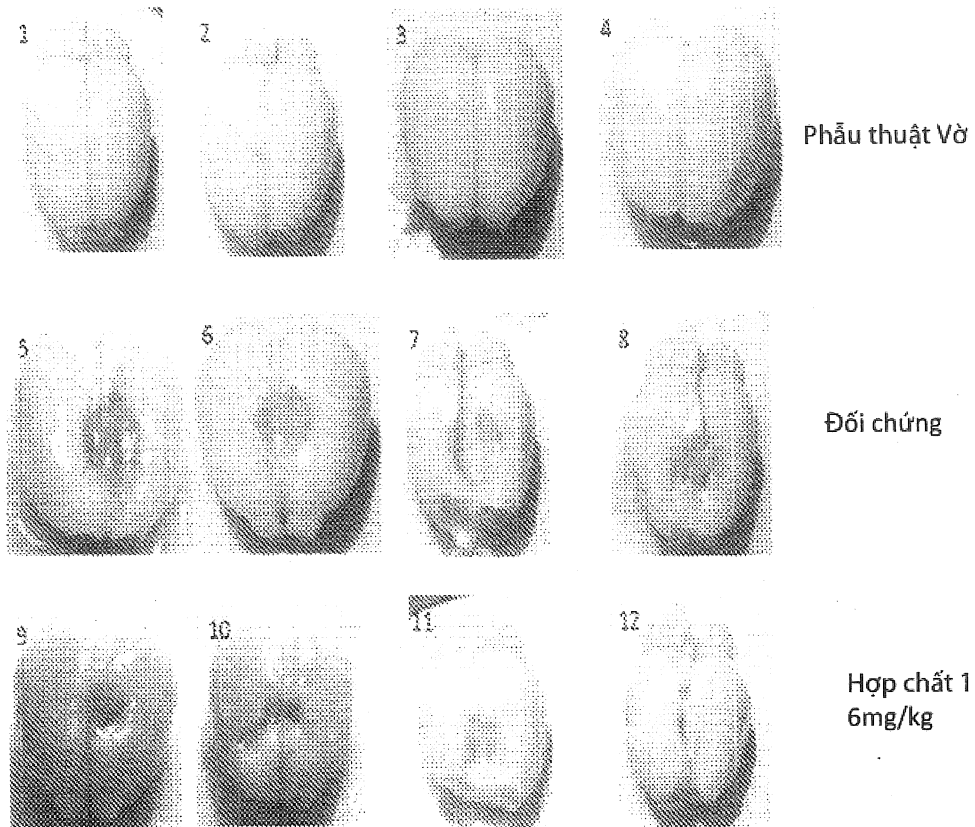


FIG. 15C

28/38

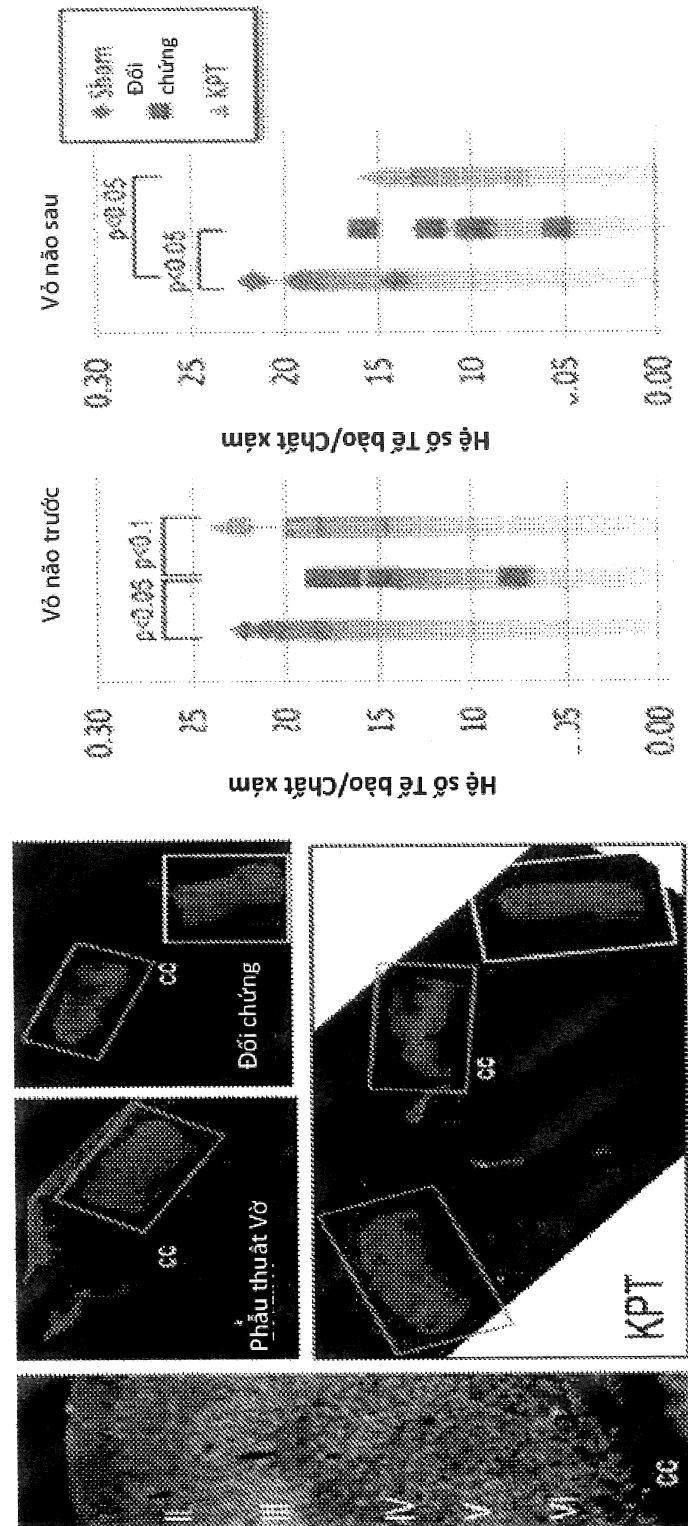


FIG. 15D

29/38

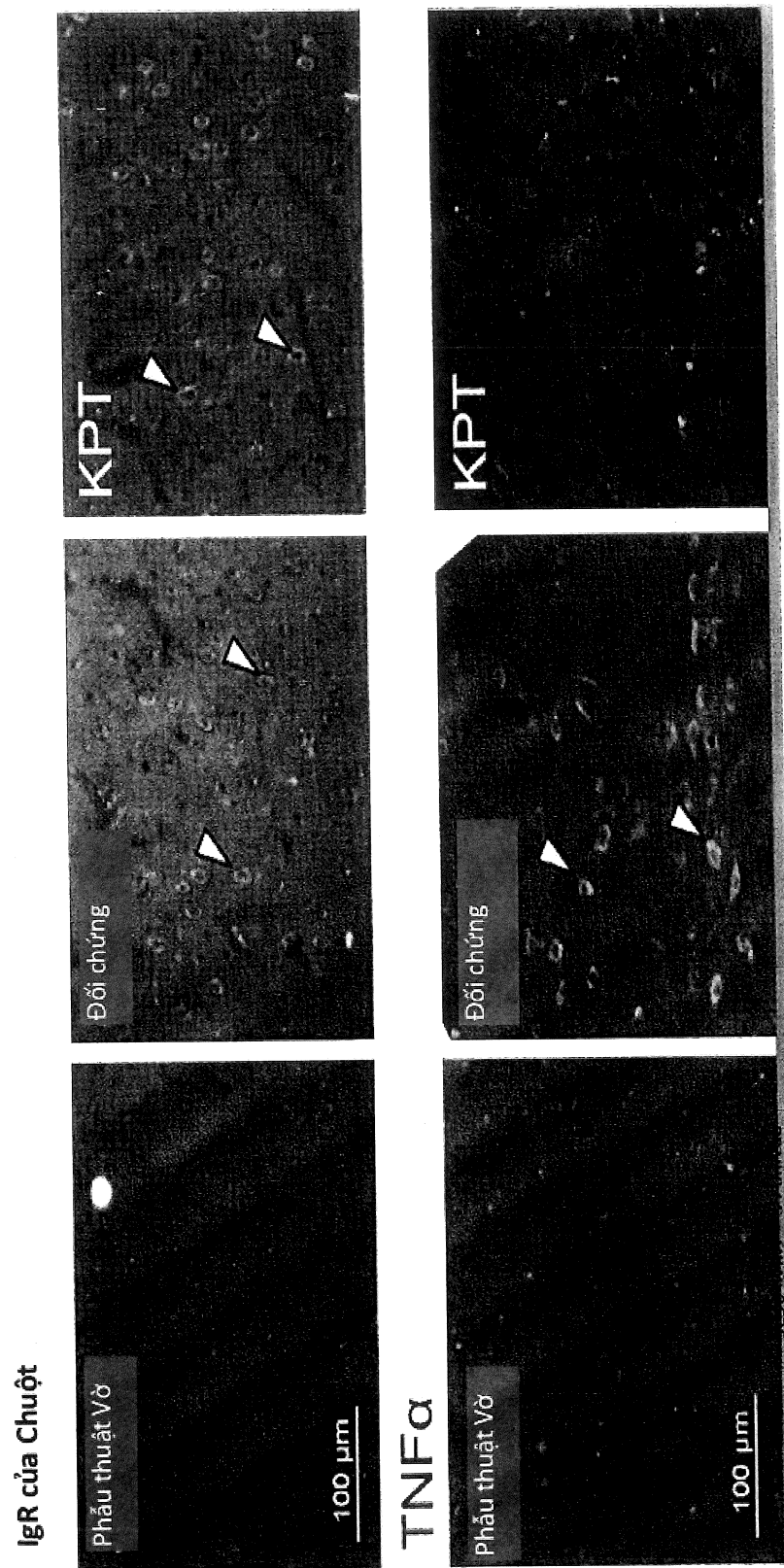


FIG. 15E

30/38

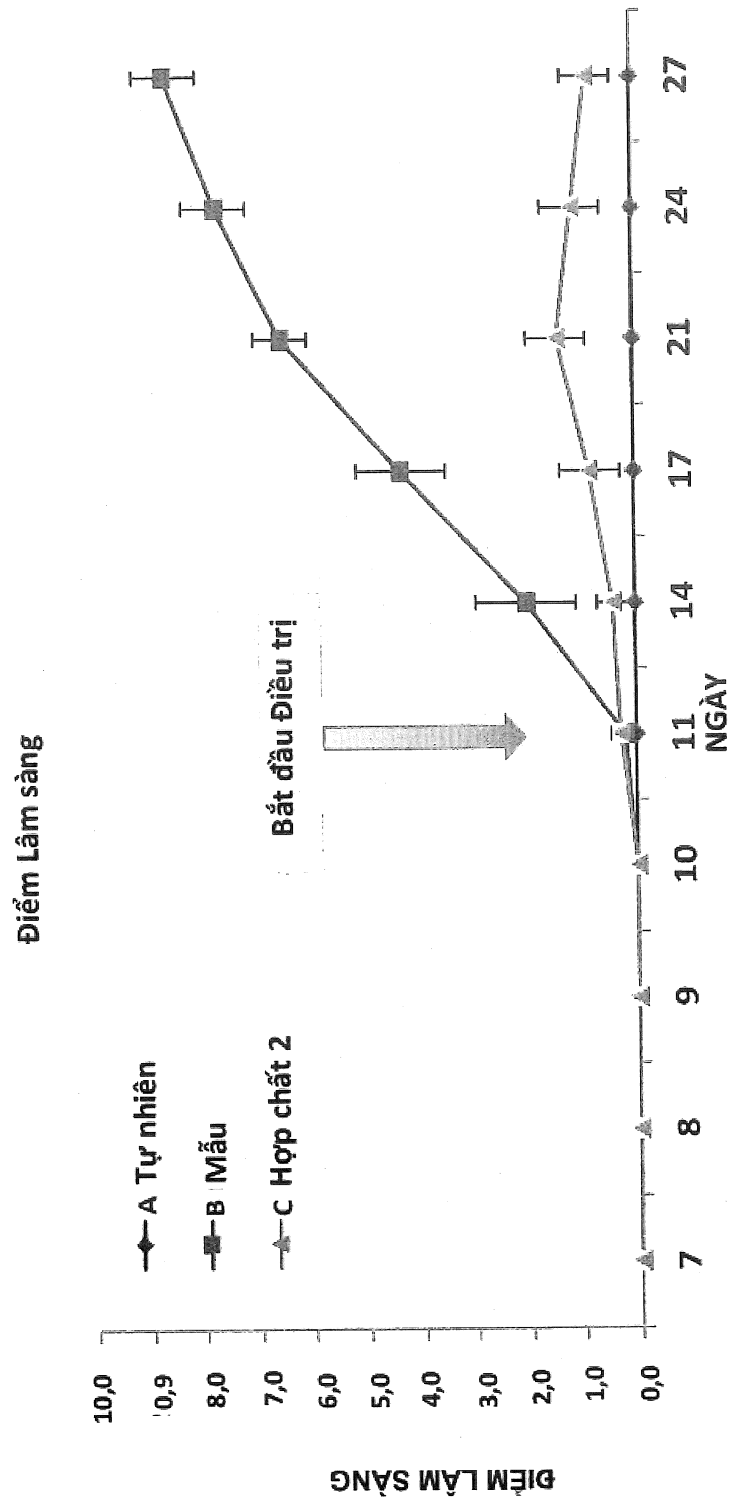


FIG. 16A

31/38

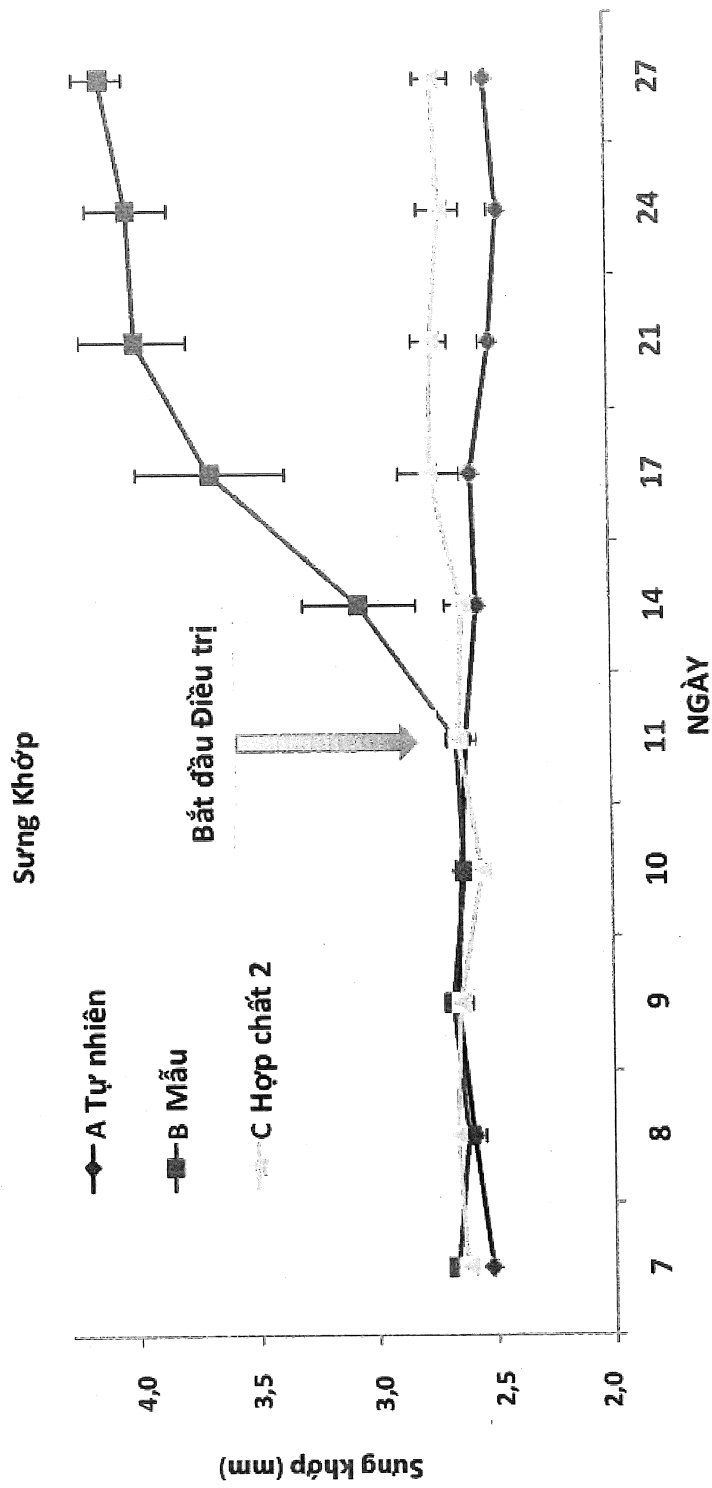


FIG. 16B

32/38

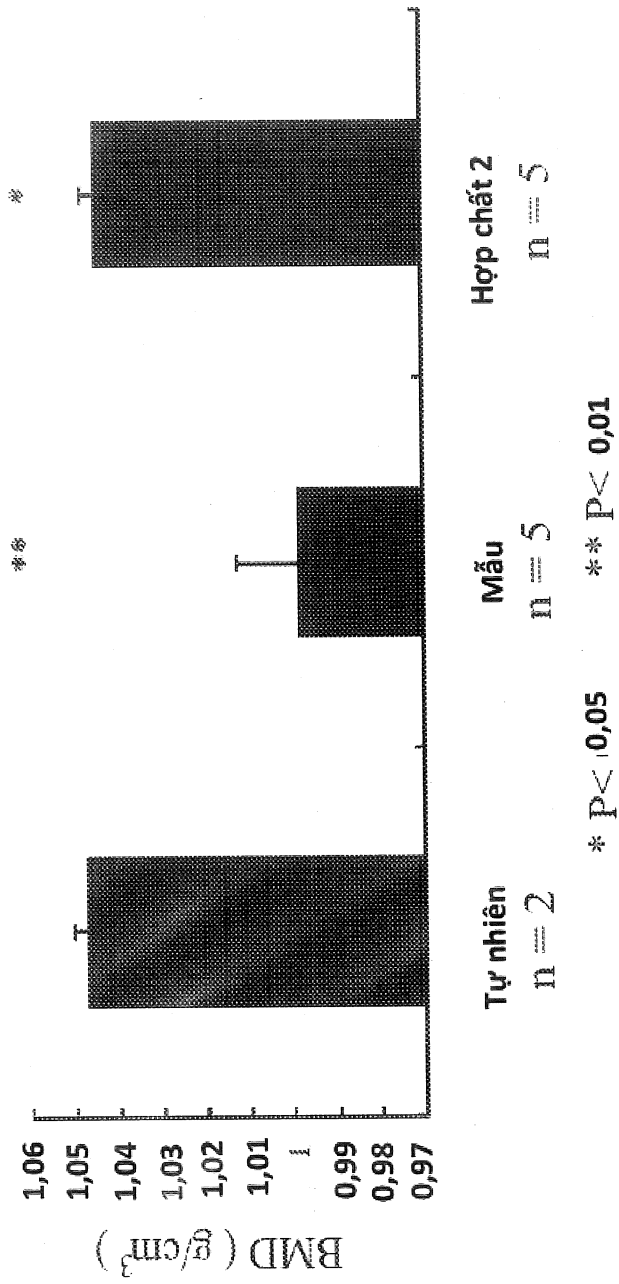
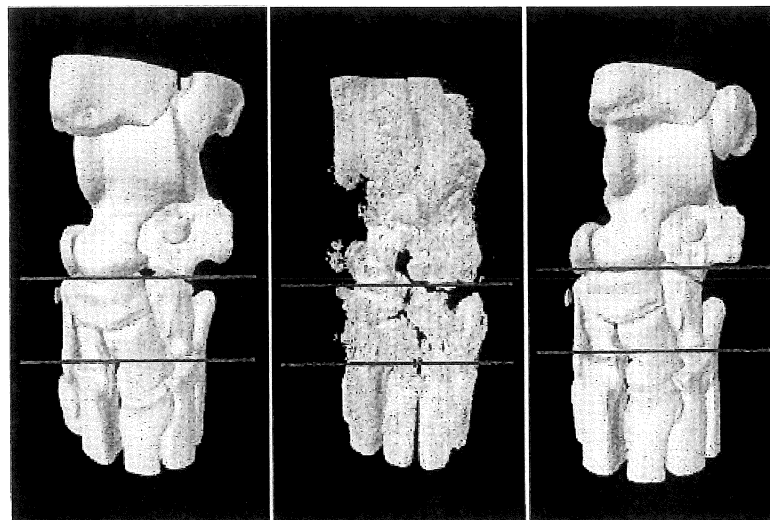


FIG. 17A

33/38



Tự nhiên
n=1

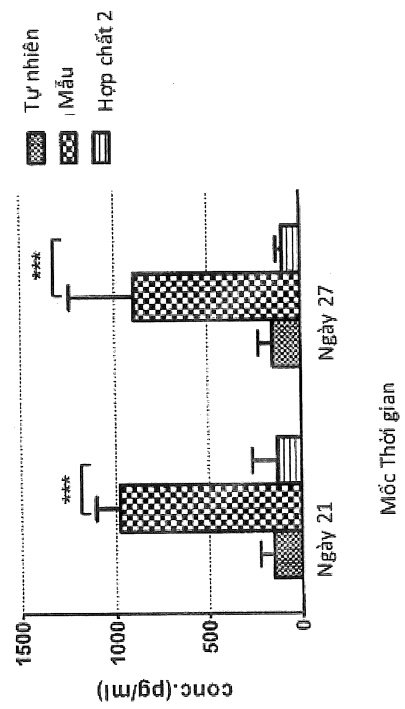
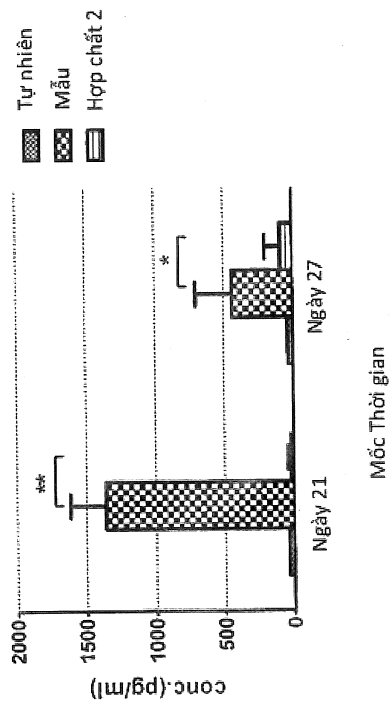
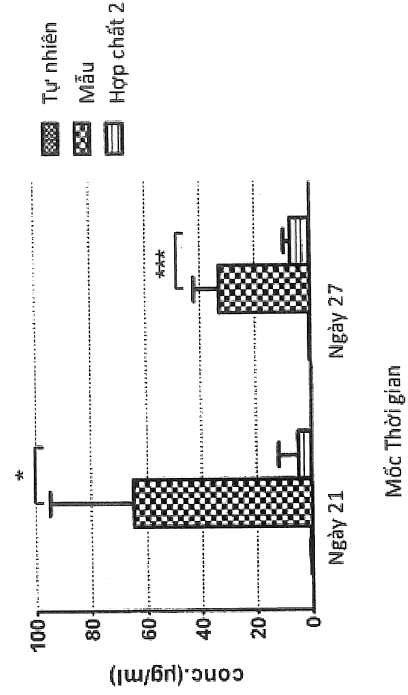
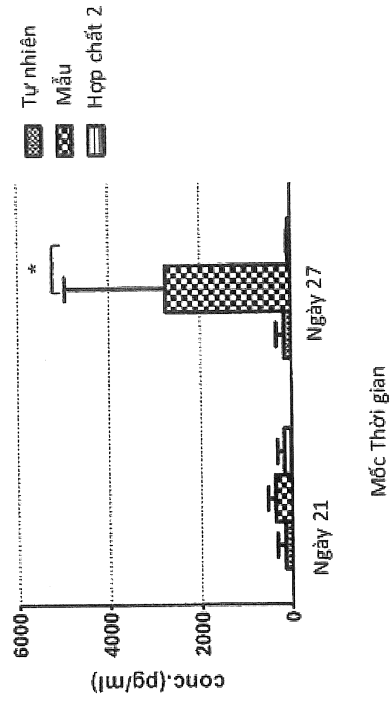
Mẫu
n=1

Hợp chất 2
n=1

Vùng xương
Cổ chân

FIG. 17B

34/38



35/38

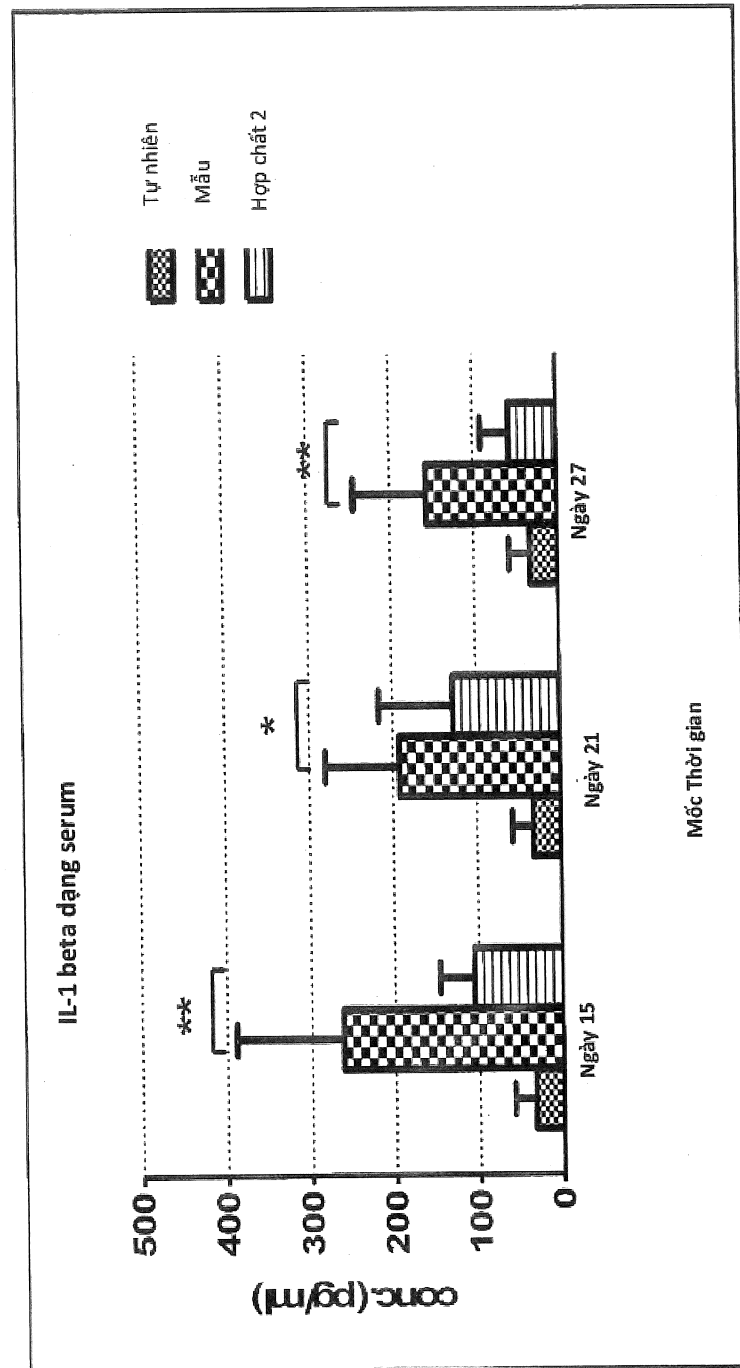


FIG. 17G

36/38

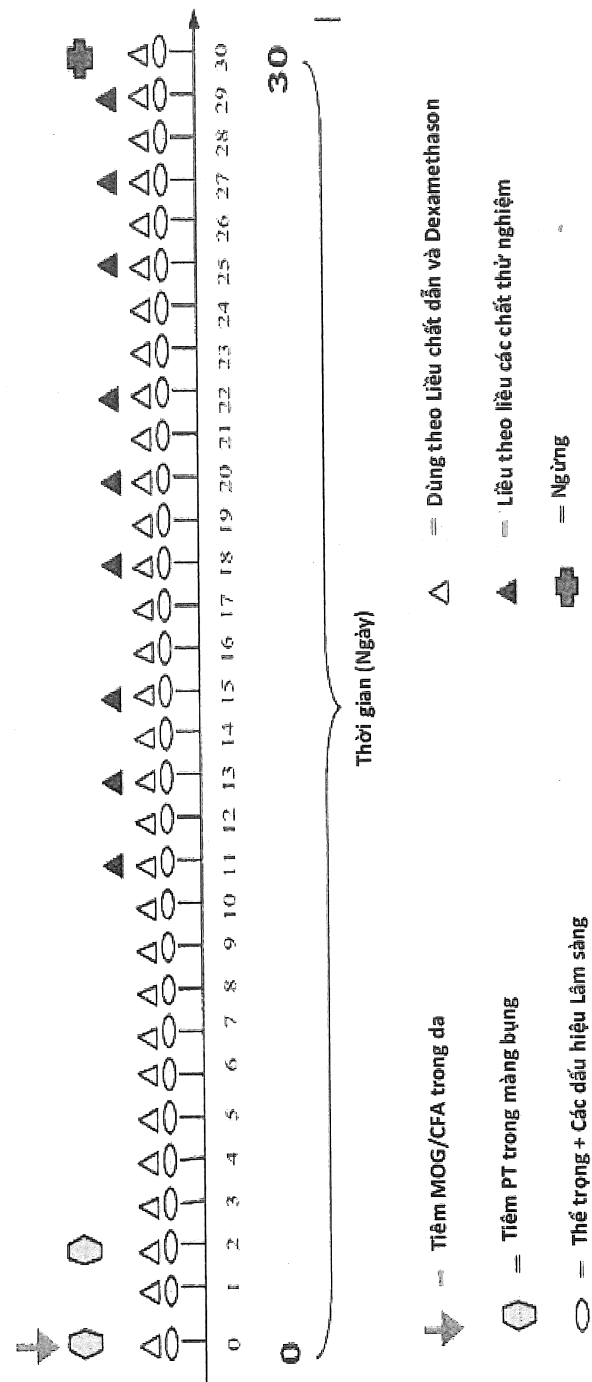


FIG. 18A

37/38

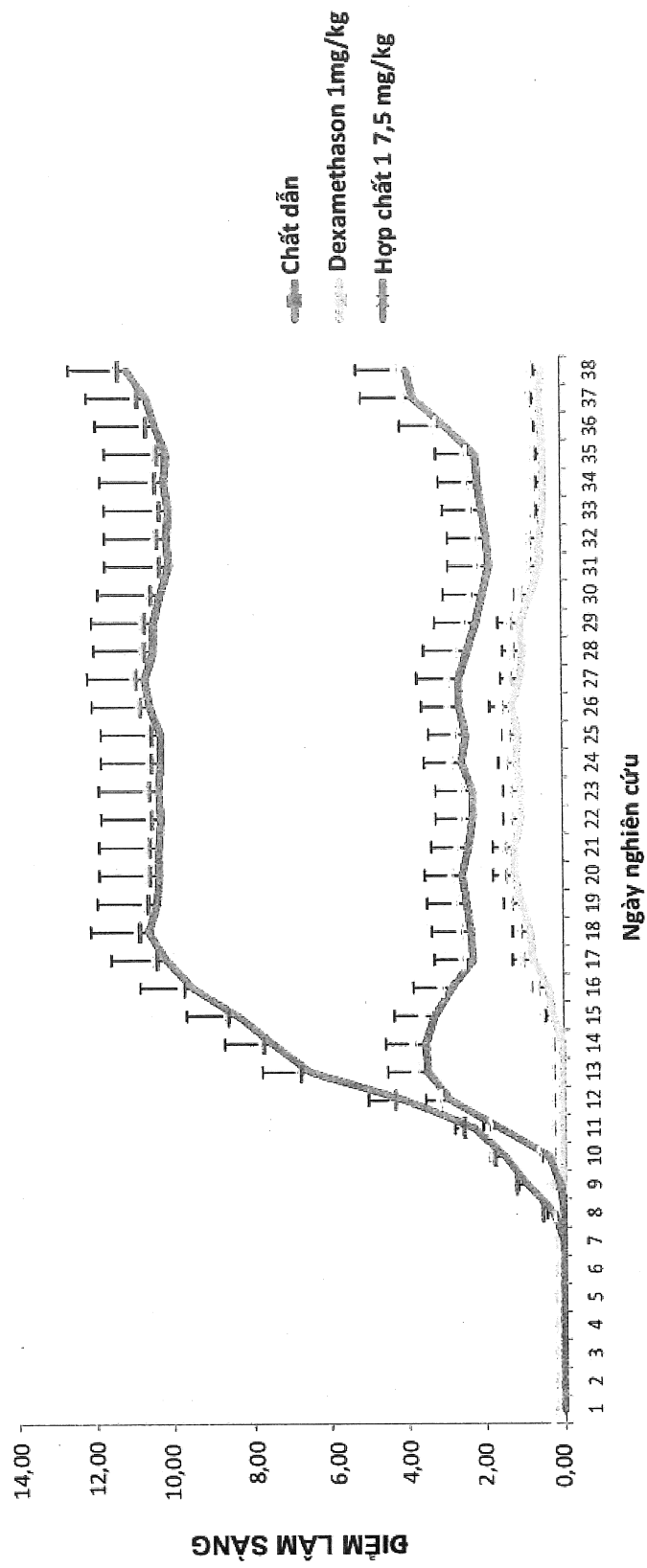
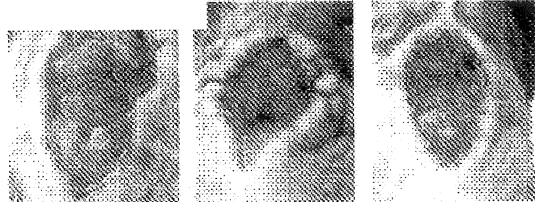


FIG. 18B

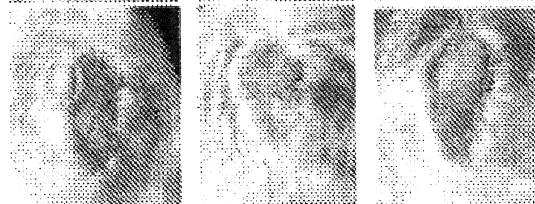
38/38

Hình thái học Vết thương sau khi gây vết thương 5 ngày**Điều trị khu trú các vết thương**

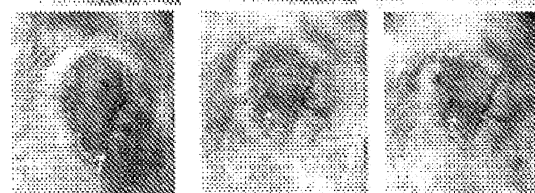
**Đối chứng,
dùng nước
khu trú**



**Hợp chất 1
2,5uM
dùng khu trú
hàng ngày**



**Hợp chất 1
1uM
dùng khu trú
hàng ngày**

**Dùng toàn thân - qua đường miệng**

**PO/Pluronic dùng
đối chứng qua
đường miệng**



**Hợp chất 1
4 mg/kg, dùng qua
đường miệng hai
ngày/lần**



**Hợp chất 1
7,5 mg/kg, dùng qua
đường miệng, hai
ngày/lần**



FIG. 19