



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ  
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)   
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ  
1-0042461  
(51)<sup>2020.01</sup> C07D 491/052; A61K 31/436; A61P (13) B  
35/00

---

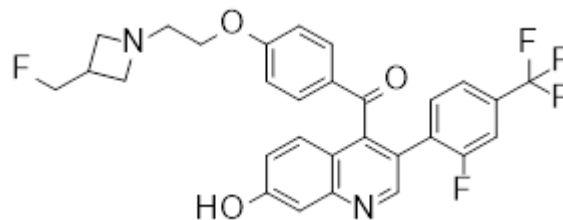
(21) 1-2021-00099 (22) 11/07/2019  
(86) PCT/US2019/041342 11/07/2019 (87) WO2020/014440 16/01/2020  
(30) 62/697,100 12/07/2018 US; 62/825,172 28/03/2019 US  
(45) 27/01/2025 442 (43) 26/04/2021 397  
(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)  
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America  
(72) COHEN, Jeffrey Daniel (US); SALL, Daniel Jon (US).  
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

---

(54) HỢP CHẤT THOÁI GIÁNG THỤ THỂ ESTROGEN CHỌN LỌC VÀ ĐƯỢC  
PHÂN CHỨA NÓ

(21) 1-2021-00099

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất thoái giáng thụ thể estrogen chọn lọc (selective estrogen receptor degrader - SERD) có công thức:



các muối dược dụng, và dược phẩm chứa chúng. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế 5-(4-{2-[3-(flometyl) azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H- [1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, và sản phẩm thu được bằng phương pháp này.

**Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

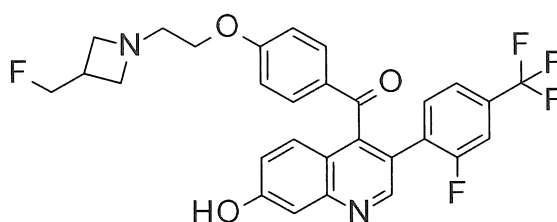
Sáng chế đề cập đến hợp chất thoái giáng thụ thể estrogen chọn lọc (selective estrogen receptor degrader - SERD), các muối được dụng, và dược phẩm chứa chúng. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, và sản phẩm thu được bằng phương pháp này.

**Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Các chất thoái giáng thụ thể estrogen chọn lọc (selective estrogen receptor degrader - SERD) gắn kết với thụ thể estrogen (estrogen receptor - ER) và điều chỉnh giảm hoạt tính phiên mã qua trung gian ER. Sự thoái giáng và sự điều chỉnh giảm được gây ra bởi các SERD có thể hữu ích trong việc điều trị các rối loạn tăng sinh tế bào, như bệnh ung thư. Một số ví dụ phân tử nhỏ của các SERD đã được bộc lộ trong các tài liệu chuyên ngành (xem, ví dụ, WO2005073204, WO2014205136, và WO2016097071). Tuy nhiên, các SERD đã biết không hữu ích như cần thiết để điều trị một cách hiệu quả bệnh ung thư. Ví dụ, việc tìm kiếm các SERD với các đặc tính dược động học (pharmacokinetic - PK) và dược lực học (pharmacodynamic - PD) tốt hơn, hiệu quả cao hơn trong lâm sàng, và độ sinh khả dụng qua đường miệng tốt sẽ rất có ích trong việc điều trị bệnh ung thư. SERD đối kháng tinh khiết với sự ức chế có hiệu lực của sự phiên mã qua trung gian ER sẽ có lợi rõ rệt trong việc điều trị bệnh ung thư. Có nhu cầu đối với các SERD mới để điều trị bệnh ung thư như bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư dạ dày, và bệnh ung thư phổi cũng như các đột biến do tính kháng đang xuất hiện. Cụ thể là, có nhu cầu đối với các SERD mới để điều trị bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, và/hoặc bệnh ung thư phổi dương tính với ER

**Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức:



và các muối được dụng của nó, và dược phẩm chứa chúng, được đề xuất trong bản mô tả này.

Các phương pháp sử dụng hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, các muối được dụng của nó, và dược phẩm chứa chúng, để điều trị bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư dạ dày, hoặc bệnh ung thư phổi cũng được đề xuất. Các phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng của nó, với lượng có hiệu quả trị liệu.

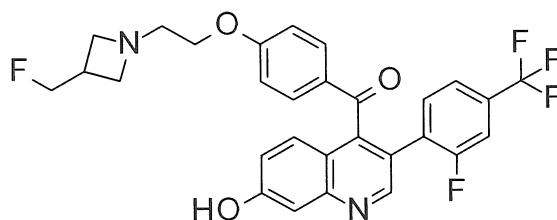
Sáng chế còn đề xuất là hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, và muối được dụng của nó, để sử dụng trong trị liệu. Hợp chất được mô tả trong bản mô tả này, và các muối được dụng của nó, có thể được sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư dạ dày, hoặc bệnh ung thư phổi.

Việc sử dụng hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, và các muối được dụng của nó, để bào chế thuốc để điều trị bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư dạ dày, hoặc bệnh ung thư phổi cũng được đề xuất.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Hợp chất bốn vòng và các muối được dụng của nó mà tác động như các SERD được bộc lộ trong bản mô tả này. Các SERD có thể được sử dụng dưới dạng các chất đơn lẻ hoặc kết hợp với các nhóm dược chất khác bao gồm các chất ức chế aromataza của chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (selective estrogen receptor modulator - SERM), các chất ức chế CDK4, các chất ức chế CDK6, các chất ức chế PI3K, và các chất ức chế mTOR để điều trị bệnh ung thư vú dương tính với thụ thể hormon.

Hợp chất được mô tả trong bản mô tả này là hợp chất có công thức:



Các muối được dụng của hợp chất này cũng được mô tả. Hợp chất này có thể được gọi bằng cách sử dụng danh pháp IUPAC là (4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl){3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]-7-hydroxyquinolin-4-yl}metanon.

Cũng được mô tả trong bản mô tả này là được phẩm chứa hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng của nó, kết hợp với tá được, chất mang, hoặc chất pha loãng được dụng. Các được phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được bào chế bằng cách sử dụng các chất phụ gia được dụng. Thuật ngữ “(các) chất phụ gia được dụng” như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, và tá được mà tương hợp với các chất phụ gia khác của các chế phẩm hoặc các chế phẩm bào chế và không có hại cho bệnh nhân. Hợp chất, hoặc các muối được dụng của nó, được mô tả trong bản mô tả này có thể được bào chế dưới dạng được phẩm được dùng qua nhiều đường, như miệng hoặc IV. Độ sinh khả dụng thường là một nhân tố trong việc điều trị ung thư và khả năng để điều chỉnh các phương pháp dùng và được phẩm để kiểm soát hoặc tối ưu hóa độ sinh khả dụng của thành phần hoạt tính là hữu ích. Chế phẩm SERD có sinh khả dụng qua đường miệng sẽ đặc biệt hữu ích. Hợp chất, hoặc các muối được dụng của nó, như được mô tả trong bản mô tả này được tin tưởng là có độ sinh khả dụng qua đường miệng. Các ví dụ về các được phẩm và các quy trình bào chế của chúng có thể được tìm thấy trong “*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*”, L. V. Allen Jr, Editor, 22<sup>nd</sup> Ed., Mack Publishing Co., 2012. Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các chất mang, các chất pha loãng, và các tá được được dụng bao gồm các chất sau: nước muối, nước, tinh bột, đường, manitol, và các dẫn xuất silic dioxit; các chất kết dính như carboxymetyl xenluloza và các dẫn xuất khác của xenluloza, alginat, gelatin, và polyvinyl-pyrrolidon; cao lanh và bentonit; polyetyl glycol.

Còn được mô tả trong bản mô tả này là các phương pháp điều trị bệnh ung thư. Các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng của nó, với lượng có hiệu quả. Ví dụ, phương pháp dùng hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng của nó, với lượng có hiệu quả có thể là việc dùng qua đường miệng. Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư đáp ứng với estrogen. Ngoài ra, bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư dạ dày, hoặc bệnh ung thư phổi. Ví dụ, bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư vú dương tính với ER, bệnh ung thư dạ dày dương tính với ER, hoặc bệnh ung thư phổi dương tính với ER.

Cũng được mô tả trong bản mô tả này là hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng của nó, để sử dụng trong trị liệu. Hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các muối được dụng của nó, như được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư dạ dày, hoặc bệnh ung thư phổi. Cụ thể là, bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư vú dương tính với ER, bệnh ung thư dạ dày dương tính với ER, hoặc bệnh ung thư phổi dương tính với ER. Ví dụ, hợp chất, hoặc muối được dụng của nó, có thể được dùng qua đường miệng.

Ngoài ra, hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các muối được dụng của nó, có thể được sử dụng để bào chế thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư. Ví dụ, thuốc này có thể được dùng qua đường miệng. Các loại bệnh ung thư mà các thuốc như được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị bao gồm bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư dạ dày, hoặc bệnh ung thư phổi. Cụ thể là, bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư vú dương tính với ER, bệnh ung thư dạ dày dương tính với ER, hoặc bệnh ung thư phổi dương tính với ER.

Hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, và các muối được dụng của nó, có thể có tính hữu ích lâm sàng dưới dạng chất đơn lẻ hoặc kết hợp với các chất chống ung thư khác, để điều trị các bệnh ung thư như bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng

trúng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư dạ dày, và bệnh ung thư phổi. Khi được sử dụng kết hợp với các chất chống ung thư khác, hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các muối được dụng của nó, có thể được sử dụng một cách đồng thời, lần lượt, hoặc riêng rẽ với các chất chống ung thư khác. Một ví dụ về chất chống ung thư khác mà có thể được kết hợp với hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này là 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng có hiệu quả” chỉ lượng hoặc liều của hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các muối được dụng của nó, mà, khi dùng đơn liều hoặc đa liều cho bệnh nhân, tạo ra tác dụng mong muốn ở bệnh nhân dưới sự chẩn đoán hoặc điều trị. Tốt hơn là, tác dụng mong muốn là ức chế sự tăng sinh tế bào khối u, sự chết tế bào khối u, hoặc cả hai. Hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các muối được dụng của nó, như được mô tả trong bản mô tả này nói chung có hiệu quả trong khoảng liều lượng rộng. Ví dụ, các liều lượng trên mỗi ngày thông thường nằm trong khoảng hằng ngày từ khoảng 100 mg đến khoảng 2000 mg.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “điều trị”, “việc điều trị” hoặc “sự điều trị” chỉ việc ngăn chặn, làm chậm, làm ngừng, hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn đang có.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh nhân” chỉ người mà bị mắc bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh cụ thể.

Hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các muối được dụng của nó, như được mô tả trong bản mô tả này có thể được điều chế bằng nhiều quy trình đã biết trong lĩnh vực này, một số trong số chúng được minh họa trong phần Điều chế và Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Các bước tổng hợp cụ thể đối với mỗi trong số các con đường được mô tả có thể được kết hợp theo các cách khác nhau, hoặc cùng với các bước từ các quy trình khác nhau, để điều chế hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các muối được dụng của nó. Các sản phẩm có thể được thu lại bằng các phương pháp thông thường đã được biết rõ trong lĩnh vực, bao gồm chiết, làm bay hơi, kết tủa, sắc ký, lọc, nghiền, và kết tinh. Các chất phản ứng và các nguyên liệu ban đầu là dễ dàng có được đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Ở bước tùy ý, muối được dụng của hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này có thể được tạo ra bằng phản ứng của bazơ tự do thích hợp theo sáng chế với axit được dụng thích hợp trong dung môi thích hợp dưới các điều kiện chuẩn. Ngoài ra, sự tạo thành của các muối như vậy có thể xảy ra một cách đồng thời khi loại bảo vệ của nhóm bảo vệ nitơ. Sự tạo thành có thể của các muối được dụng là đã được biết rõ. Xem, ví dụ, Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*, 4: 427-435 (2000); và Berge, S.M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này dễ dàng được chuyển hóa thành và có thể được tách dưới dạng muối được dụng.

Trừ khi được lưu ý cụ thể, các từ viết tắt được sử dụng trong bản mô tả này được xác định theo *Aldrichimica Acta*, Vol. 17, No. 1, 1984, hoặc có nghĩa được chấp nhận phổ biến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các từ viết tắt khác được xác định như sau: "AUC" được dùng để chỉ diện tích dưới đường cong; "BSA" được dùng để chỉ albumin huyết thanh bò; "DCM" được dùng để chỉ diclometan hoặc metylen clorua; "DMA" được dùng để chỉ dimetylamin; "DMEM" được dùng để chỉ môi trường Eagle cải biến của Dulbecco; "DMF" được dùng để chỉ N,N-dimetylformamit; "DMSO" được dùng để chỉ dimetyl sulfoxit; "DNA" được dùng để chỉ axit deoxyribonucleic; "cDNA" được dùng để chỉ DNA bổ trợ; "DNase" được dùng để chỉ deoxyribonucleaza; "DTT" được dùng để chỉ dithiotreitol; "EC<sub>50</sub>" được dùng để chỉ nồng độ của chất mà tạo ra 50% đáp ứng của hoạt tính đích so với hợp chất đối chứng dương tính đã được định trước (EC<sub>50</sub> tuyệt đối); "EDTA" được dùng để chỉ axit etylendiamintetraaxetic; "ER $\alpha$ " được dùng để chỉ thụ thể estrogen alpha; "EtOAc" được dùng để chỉ etyl axetat; "EtOH" được dùng để chỉ etanol; "FBS" được dùng để chỉ huyết thanh thai bò; "HBSS" được dùng để chỉ dung dịch muối cân bằng Hank; "HEPES" được dùng để chỉ axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-pipazinetansulfonic; "IC<sub>50</sub>" được dùng để chỉ nồng độ của chất mà tạo ra 50% đáp ứng ức chế lớn nhất có thể đối với chất đó, (IC<sub>50</sub> tương đối), hoặc nồng độ của chất mà tạo ra mức độ ức chế

50% của hoạt tính enzym đích so với đối chứng giả được ( $IC_{50}$  tuyệt đối); “iPrOH” được dùng để chỉ isopropanol hoặc rượu isopropylic; “IV” được dùng để chỉ việc dùng trong tĩnh mạch; “ $K_i$ ” được dùng để chỉ hằng số ức chế; “MeOH” được dùng để chỉ rượu metylic hoặc metanol; “MTBE” được dùng để chỉ methyl *t*-butyl ete; “PBS” được dùng để chỉ dung dịch muối đệm phosphat; “PO” được dùng để chỉ việc dùng qua đường miệng; “PR $\alpha$ ” được dùng để chỉ thụ thể progesteron alpha; “QD” được dùng để chỉ việc dùng liều mỗi ngày một lần; “RNA” được dùng để chỉ axit ribonucleic; “RNase” được dùng để chỉ ribonucleaza; “RT-PCR” được dùng để chỉ phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược; “RT-qPCR” được dùng để chỉ phản ứng chuỗi polymeraza định lượng phiên mã ngược; “THF” được dùng để chỉ tetrahydrofuran; và “XPhos Pd G2” được dùng để chỉ clo(2-dixyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl)[2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]paladi(II).

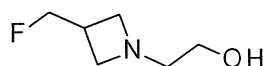
### Ví dụ thực hiện sáng chế

Phần điều chế và ví dụ thực hiện sáng chế sau minh họa thêm nữa sáng chế.

Điều chế và ví dụ

Điều chế 1

2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etan-1-ol

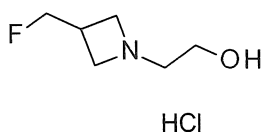


Bổ sung natri triaxetoxybohydrua (405 g, 1,91 mol) theo từng phần trong khoảng thời gian 15 phút vào dung dịch 0°C đã được khuấy chứa 3-(flometyl)azetidin hydroclorua (160 g, 1,28 mol) trong DCM (2,4 L) dưới khí N<sub>2</sub> và khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 10 phút. Bổ sung 1,4-dioxan-2,5-diol (99 g, 0,83 mol) ở 0°C theo 6 phần trong khoảng thời gian 1 giờ sau đó khuấy ở 0-5°C trong 15 phút. Để phản ứng ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 2 giờ dưới khí N<sub>2</sub>. Làm mát phản ứng đến 10-15°C trong khoảng thời gian 20 phút. Bổ sung nước (800 ml) trong khoảng thời gian 25-30 phút ở 10-15°C, để ấm đến nhiệt độ trong phòng trong 5-10 phút và sau đó tách các lớp. Rửa lớp nước bằng DCM (800 ml), tách các lớp sau đó làm mát lớp nước gộp lại đến 10-15°C và điều chỉnh độ pH đến 13-14 bằng cách sử dụng dung dịch natri

hydroxit 50% (~540 ml). Để lớp nước ấm đến nhiệt độ trong phòng, chiết bằng DCM (4 X 800 ml), làm khô bằng natri sulfat (80 g), lọc, và cô đến khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này. Sau quá trình điều chế này thu được 139 g (82%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu màu vàng đặc với ES/MS (m/z) là 134,1 (M+H).

## Điều chế 2

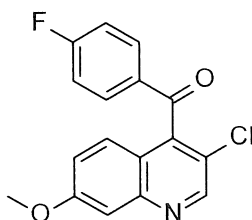
2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etan-1-ol hydroclorua



Hòa tan 2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etan-1-ol (529 g, 4 mol) trong MTBE (2,6 L) và làm lạnh xuống 0°C. Bổ sung dung dịch HCl/EtOH (492 ml, 30% khối lượng) theo từng giọt trong 30 phút sau đó khuấy ở 0°C trong 30 phút. Lọc các chất rắn và rửa bã lọc bằng MTBE (2 X 200 ml). Làm khô dưới khí N<sub>2</sub> trong 8 giờ để thu được hợp chất nêu ở đề mục này. Sau quá trình điều chế này thu được 580 g (86%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng với ES/MS (m/z) là 134,0 (M+H).

## Điều chế 3

(3-clo-7-metoxiquinolin-4-yl)-(4-flophenyl)metanon

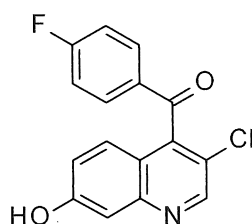


Làm lạnh hỗn hợp gồm 4-bromo-3-clo-7-metoxiquinolin (70 g, 254 mmol) và THF (1 L) xuống -40°C dưới khí N<sub>2</sub> dẫn đến sự kết tủa của nguyên liệu. Bổ sung isopropylmagie clorua (2 M trong THF, 254 ml, 509 mmol) trong 20 phút và khuấy hỗn hợp này trong 1 giờ. Bổ sung dung dịch chứa 4-flobenzoyl clorua (66 ml, 559 mmol) trong THF (140 ml) theo từng giọt sau đó để ấm đến nhiệt độ trong phòng. Làm ngừng phản ứng bằng dung dịch amoni clorua bão hòa (300 ml) và nước (200 ml) và tách các lớp. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch amoni clorua bão hòa (300 ml), làm khô bằng MgSO<sub>4</sub>, lọc, và cô để thu được cặn dầu. Lọc dầu màu nâu thô qua silicagel, rửa

giải bằng hỗn hợp gồm MTBE/hexan (1:1) để thu được sản phẩm thô dưới dạng chất rắn màu vàng (84 g). Xử lý chất rắn bằng 10% metylaxetat/heptan (800 ml) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Lọc để thu các chất rắn và dự trữ. Cô phần dịch lọc và tinh chế trên silic dioxit, rửa giải bằng 10-40% EtOAc/hexan sau đó xử lý sản phẩm bằng 10% metylaxetat/heptan (200 ml) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Lọc các chất rắn thu được, kết hợp với các chất rắn từ quá trình lọc trước đó và làm khô trong chân không qua đêm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này. Sau quá trình điều chế này thu được 31 g (38%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng với ES/MS ( $m/z$ ) là 316,0 ( $M+H$ ).

#### Điều chế 4

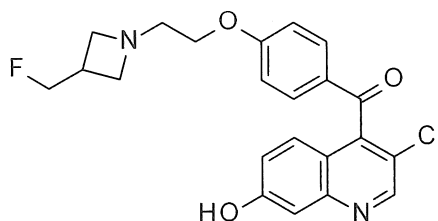
(3-clo-7-hydroxyquinolin-4-yl)-(4-flophenyl)metanon



Bổ sung bo tribromit (1 M trong DCM, 295 ml, 295 mmol) vào hỗn hợp gồm (3-clo-7-metoxiquinolin-4-yl)-(4-flophenyl)metanon (31 g, 98 mmol) trong DCM (217 ml) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Rót hỗn hợp một cách từ từ vào trong dung dịch 0°C chứa dikali phosphat (2 M trong nước, 700 ml) và nước (200 ml). Để hỗn hợp ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 1 giờ. Cô dung dịch trong chân không để loại bỏ các dung môi hữu cơ, lọc, thu phần dịch lọc và làm khô phần dịch lọc trong chân không ở 45°C qua đêm. Xử lý các chất rắn bằng DCM/heptan (1:1, 450 ml) và khuấy qua đêm. Thu các chất rắn và làm khô trong chân không qua đêm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này. Sau quá trình điều chế này thu được 32 g (hiệu suất định lượng) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu nâu nhạt với ES/MS ( $m/z$ ) là 302,0 ( $M+H$ ).

#### Điều chế 5

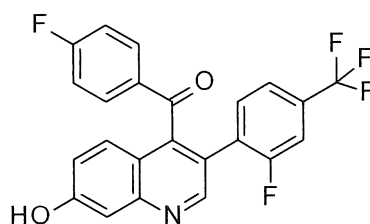
(3-clo-7-hydroxyquinolin-4-yl)-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)metanon



Bổ sung 2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etan-1-ol hydroclorua (3,90 g, 23,0 mmol) vào dung dịch đã khuấy chứa (3-clo-7-hydroxyquinolin-4-yl)-(4-flophenyl)metanon (5,00 g, 15,3 mmol) trong DMF (75 ml) tiếp theo là natri hydrua (60% trong dầu khoáng, 3,07 g, 76,6 mmol). Khuấy dưới khí N<sub>2</sub> và làm ấm đến 40°C trong 45 phút. Làm ngừng dung dịch bằng nước và cô. Phân bố cạn giữa 20% iPrOH/CHCl<sub>3</sub> và dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa và tách, chiết lớp nước bằng 2 X 20% iPrOH/CHCl<sub>3</sub>, kết hợp các phần chiết hữu cơ, làm khô các lớp hữu cơ gộp lại bằng magie sulfat, lọc và cô phần dịch lọc để thu được sản phẩm thô dưới dạng dầu màu đỏ sẫm. Tinh chế nguyên liệu thô bằng cách sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng gradien của 5-10% 7 N NH<sub>3</sub> trong MeOH/DCM để thu được hợp chất nêu ở đề mục này. Sau quá trình điều chế này thu được 5,31 g (84%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng với ES/MS (m/z) là 415,0 (M+H).

#### Điều chế 6

(4-flophenyl)-[3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]-7-hydroxy-4-quinolyl]metanon

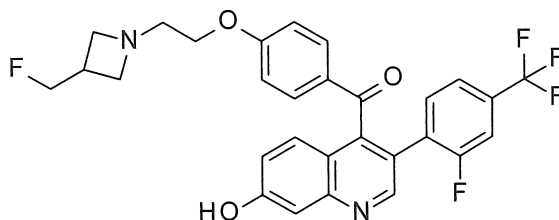


Loại khí/xả khí bằng 5 X N<sub>2</sub> hỗn hợp gồm (3-clo-7-hydroxy-4-quinolyl)-(4-flophenyl)metanon (140 g, 440,8 mmol), axit 2-flo-4-(triflometyl)phenylboronic (183,3 g, 881,7 mmol), kali cacbonat (184,6 g, 1,3 mol), 2-metyl-2-butanol (1,7 L) và nước (0,56 L). Bổ sung XPhos Pd G2 (7,1 g, 8,82 mmol) và làm nóng ở 80°C trong 2 giờ. Để nguội hỗn hợp đến nhiệt độ trong phòng và làm bay hơi dung môi hữu cơ. Bổ sung EtOAc (1 L) và nước (0,2 L). Tách lớp hữu cơ và làm khô lớp này bằng magie sulfat. Lọc nguyên liệu này qua silicagel và cô đến khô. Nghiền nguyên liệu thô bằng

hỗn hợp gồm hexan (1,25 L) và MTBE (0,25 L) để thu được chất rắn. Lọc chất rắn và làm khô trong chân không. Hòa tan chất rắn trong THF (1,5 L) và bổ sung chất loại bỏ là SiliaMetS® Thiol (150 g). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Lọc chất loại bỏ và làm bay hơi phần dịch lọc đến khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này. Sau quá trình điều chế này thu được 185,5 g (96%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng với ES/MS ( $m/z$ ) là 430,0 ( $M+H$ ).

#### Ví dụ 1

(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl){3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]-7-hydroxyquinolin-4-yl}metanon



Bổ sung THF (2,8 L), kali *tert*-butoxit (274,5 g, 2,45 mol) và 2-(3-(flometyl)azetidin-1-yl)ethan-1-ol (168 g, 1,22 mol) vào bình được trang bị cửa nạp khí  $N_2$ . Khuấy hỗn hợp trong 10 phút. Bổ sung theo từng giọt dung dịch chứa (4-flophenyl)-[3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]-7-hydroxy-4-quinolyl]metanon (350 g, 0,81 mol) trong THF (0,7 L). Khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Làm ngừng phản ứng bằng dung dịch HCl 1 N cho đến khi độ pH=8 và pha loãng bằng EtOAc (4 L). Tách lớp hữu cơ và rửa lớp này bằng nước muối (2 L). Làm khô dung dịch bằng magie sulfat, lọc dung dịch, và cô đến khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này. Sau quá trình điều chế này thu được 415 g (93,8%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu nâu xám với ES/MS ( $m/z$ ) là 543,2 ( $M+H$ ).

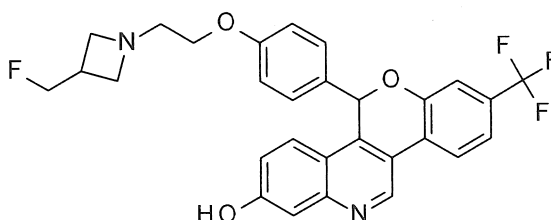
#### Ví dụ thay thế 1

Loại khí/xả khí bằng  $N_2$  x 5 hỗn hợp (3-clo-7-hydroxyquinolin-4-yl)-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)metanon (200 mg, 0,48 mmol), axit 2-flo-4-(triflometyl)phenylboronic (158 mg, 0,72 mmol), kali cacbonat (202 mg, 1,45 mmol), 2-metyl-2-butanol (3 ml), và nước (1 ml) trong lọ dùng được trong lò vi sóng. Bổ sung XPhos Pd G2 (12 mg, 0,015 mmol), đập kín hỗn hợp, và quay vi sóng ở 80°C trong 2

giờ. Phân bố cạn giữa MTBE và dung dịch amoni clorua bão hòa. Tách các lớp và chiết lớp nước bằng MTBE. Kết hợp các phần chiết hữu cơ, làm khô chúng bằng magie sulfat, lọc, và cô phần dịch lọc để thu được cạn màu cam. Tinh chế nguyên liệu thô bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng 5% MeOH/DCM để thu được hợp chất nêu ở đề mục này. Sau quá trình điều chế này thu được 205 mg (78%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng với ES/MS ( $m/z$ ) là 543,2 ( $M+H$ ).

#### Ví dụ 2

5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol triệt quang



Làm lạnh dung dịch chứa (4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl){3-[2-fluoro-4-(triflometyl)phenyl]-7-hydroxyquinolin-4-yl}metanon (5,27 g, 9,71 mmol) trong 1,4-dioxan (100 ml) xuống 5°C. Bổ sung lithi trietylbohđrua (1 M trong THF, 30,0 ml, 30,0 mmol). Lấy bể làm lạnh ra và khuấy trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Làm ngừng hỗn hợp bằng nước. Bổ sung dung dịch NH<sub>4</sub>Cl bão hòa và EtOAc. Tách các lớp và chiết lớp nước bằng EtOAc. Kết hợp các phần chiết hữu cơ, làm khô bằng MgSO<sub>4</sub> khan, lọc, và cô phần dịch lọc. Hòa tan cạn thô trong THF (100 ml). Bổ sung natri hydrua (60% trong dầu khoáng, 1,94 g, 48,5 mmol). Làm nóng hồi lưu dung dịch trong 1,5 giờ. Bổ sung thêm natri hydrua (60% trong dầu khoáng, 1,94 g, 48,5 mmol), sau đó, hồi lưu trong 30 phút nữa. Để nguội dung dịch đến nhiệt độ trong phòng và làm ngừng bằng nước. Bổ sung EtOAc và dung dịch NH<sub>4</sub>Cl bão hòa. Tách các lớp và chiết lớp nước bằng EtOAc. Kết hợp phần chiết hữu cơ, làm khô bằng MgSO<sub>4</sub> khan, lọc, và cô phần dịch lọc. Tinh chế cạn bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng gradien của 5-7% MeOH trong DCM để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (3,70 g, 72%) dưới dạng bột màu vàng nhạt. ES/MS ( $m/z$ ): 525,2 ( $M+H$ ).

Các thử nghiệm sinh học

Mối quan hệ giữa sự biểu hiện của thụ thể estrogen và các bệnh ung thư nhất định đã được báo cáo trong các tài liệu chuyên ngành, (đối với bệnh ung thư vú *xem*, ví dụ, Puhalla S, Bhattacharya S, Davidson N., Hormonal therapy in breast cancer: A model disease for the personalization of cancer care, *Molecular Oncology*, 2012, 6:222-236; Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K, Metastatic behavior of breast cancer subtypes, *J Clin Oncol*, 2010, 28(20):3271-3277; đối với bệnh ung thư buồng trứng *xem*, ví dụ, O'Donnell AJ, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP, Estrogen receptor-alpha mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen, *Endocr Relat Cancer*, 2005;12(4):851-66; Walker G, MacLeod K, Williams AR, Cameron DA, Smyth JF, Langdon SP, Estrogen regulated gene expression predicts response to endocrine therapy in patients with ovarian cancer, *Gynecol Oncol*, 2007, 106(3):461-8; Smyth JF, Gourley C, Walker G, MacKean MJ, Stevenson A, Williams AR, et al., Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: The use of letrozole in estrogen receptor-positive patients, *Clin Cancer Res*, 2007, 13(12):3617-22; đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt *xem*, ví dụ, Bonkohoff H, Fixemer T, Hunsicker I and Remberger K, Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostate lesions, *Am J Pathol*, 1999, 155:641-647; đối với bệnh ung thư nội mạc tử cung và tử cung *xem*, ví dụ, Krasner C, Aromatase inhibitors in gynecologic cancer, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, Aug-Sep;106(1-5):76-80; Boisen MM, Andersen CL, Sreekumar S, et al., Treating gynecologic malignancies with selective estrogen receptor downregulators (SERDs): Promise and challenges, *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 418:322-3330; đối với bệnh ung thư phổi *xem*, ví dụ, Baik CS, Eaton KD et al., Estrogen signaling in lung cancer: An opportunity for novel therapy, *Cancer*, 2012, 4:969-988; Marquez-Garban DC, Chen H-W, Goodglick L, Fishbein MC and Pietras RJ, Targeting aromatase and estrogen signaling in human non-small cell lung cancer. Steroid enzymes and cancer, *Ann. N. Y. Acad Sci*, 2009, 1155:194-205; Hamilton DH, Griner LM, Keller JM, Hu X, Southall N, Marugan J, David JM, Ferrer M and Palena C, Targeting estrogen receptor signaling with fulvestrant enhances immune and chemotherapy mediated cytotoxicity of human lung cancer, *Clin Cancer Res*, 2016, 22(24):6204-16; Rodriguez-Lara V, Hernandez-

Martinez JM, Arrieta O, Influence of estrogen in non-small cell lung cancer and its clinical implications, *J Thoracic Disease*, 2018, 10(1):482-497; đối với bệnh ung thư dạ dày *xem*, ví dụ, Tang W, Liu R, Yan Y, Pan X, Wang M, Han X, Ren H, and Zhang Z, Expression of estrogen receptors and androgen receptor and their clinical significance in gastric cancer, *Oncotarget*, 2017, 8(25) 40765-777).

Các thử nghiệm sau chứng tỏ rằng các hợp chất được nêu làm ví dụ là các chất thoái giáng có hiệu lực của các protein ER $\alpha$  kiểu dại và đột biến. Các kết quả của các thử nghiệm cũng chứng tỏ rằng các hợp chất được nêu làm ví dụ là các chất đối kháng có hiệu lực của các thụ thể ER $\alpha$  kiểu dại và thể đột biến và ức chế hoạt tính phiên mã qua trung gian ER. Ngoài ra, các thử nghiệm chứng tỏ rằng hợp chất của ví dụ 1 ức chế sự tăng sinh của các dòng tế bào ung thư vú ER+, và sự ức chế truyền tín hiệu ER $\alpha$  và sự sinh trưởng của khối u trong mô hình ghép khác loài ung thư vú dương tính với ER.

Thử nghiệm gắn kết cạnh tranh ER $\alpha$  (kiểu dại) và ER $\alpha$  (Y537S đột biến)

Mục đích của các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh ER sau là để xác định ái lực gắn kết của hợp chất thử nghiệm đối với ER $\alpha$  (kiểu dại) và ER $\alpha$  (Y537S đột biến) *Xem* Fanning et al., “Estrogen receptor alpha somatic mutations Y537S and D538G confer breast cancer endocrine resistance by stabilizing the activating function-2 binding conformation,” *eLife* 2016;5:e12792.

Chạy thử nghiệm gắn kết cạnh tranh trong dung dịch đệm chứa 50 mM HEPES, độ pH 7,5, 1,5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mg/ml ovalbumin, và 5 mM DTT, bằng cách sử dụng 0,025  $\mu$ Ci mỗi lỗ  $^3$ H-estradiol (118 Ci/mmol, 1 mCi/ml), 7,2 ng/lỗ ER $\alpha$  (kiểu dại), hoặc 7,2 ng/lỗ ER $\alpha$  (Y537S đột biến). Bổ sung hợp chất thử nghiệm ở 10 nồng độ khác nhau nằm trong khoảng từ 10.000 nM đến 0,5 nM, và xác định việc gắn kết không đặc hiệu với sự có mặt của 1  $\mu$ M 17- $\beta$  estradiol. Ủ phản ứng gắn kết (140  $\mu$ L) trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó bổ sung dung dịch đệm dextran-than lạnh (70  $\mu$ L) (chứa trên mỗi 50 ml dung dịch đệm thử nghiệm, 0,75 g than và 0,25 g dextran) vào mỗi phản ứng. Trộn các đĩa trong 8 phút trên máy lắc quỹ đạo ở 4°C và sau đó ly tâm ở 3000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. Chuyển phần phân ước (120  $\mu$ L) của hỗn hợp sang một đĩa đáy phẳng màu trắng, 96 lỗ khác (Costar) và bổ sung dịch nhấp nháy Perkin Elmer Optiphase Supermix (175  $\mu$ L) vào mỗi lỗ. Đậy kín

các đĩa và lắc mạnh trên máy lắc quỹ đạo. Sau khi ủ trong 2,5 giờ, đọc các đĩa trong máy đếm Wallac Microbeta. Tính  $IC_{50}$  bằng cách sử dụng phương pháp khớp đường cong logistic 4 thông số và tính % ức chế ở 10  $\mu M$ . Chuyển đổi các trị số  $IC_{50}$  đối với hợp chất thành  $K_i$  bằng cách sử dụng phương trình Cheng-Prusoff. Các kết quả của thử nghiệm này chứng tỏ rằng hợp chất của ví dụ 1 gắn kết với  $ER\alpha$  tái tổ hợp kiểu đại với  $K_i$  (nM) là  $3,78 \pm 0,74$  (n=3) và gắn kết với  $ER\alpha$  đột biến (Y537S) với  $K_i$  (nM) là  $21,24 \pm 2,12$  (n=3).

Các kết quả của thử nghiệm này thể hiện ái lực gắn kết và hiệu lực của hợp chất được nêu làm ví dụ đối với các protein  $ER\alpha$  kiểu đại và đột biến (ESR1 Y537S).

#### Thử nghiệm thoái giáng $ER\alpha$ trong các tế bào MCF7

Mục đích của thử nghiệm thoái giáng  $ER\alpha$  sau là để đo sự thoái giáng của  $ER\alpha$  bởi hợp chất thử nghiệm trong dòng tế bào ung thư vú dương tính với  $ER\alpha$  như MCF7.

Nuôi cấy các tế bào MCF7 (được mua từ ATCC HTB-22) trong môi trường DMEM được bổ sung 10% FBS, 0,01 mg/ml insulin người 1 và 1% thuốc kháng sinh penicillin/streptomycin và đặt trong các đĩa đáy phẳng 384 lỗ ở mật độ 4.000 tế bào mỗi lỗ trong môi trường DMEM không chứa đồ phenol (20  $\mu l$ ) chứa 10% FBS được tách bằng than. Ủ các tế bào qua đêm trong tủ ủ nuôi cấy tế bào (5%  $CO_2$ , độ ẩm tương đối 95% và 37°C) và cho phép các tế bào gắn vào đĩa. Ngày tiếp theo, dùng liều cho các tế bào bằng hợp chất thử nghiệm. Sử dụng thiết bị định lượng dùng âm Echo 555 để chuẩn bị các dịch pha loãng theo chuỗi của hợp chất thử nghiệm (1:3) trong khoảng từ 6  $\mu M$  đến 0,0003  $\mu M$ . Dùng liều cho các tế bào bằng cách bổ sung 5  $\mu L$  từ đĩa pha loãng theo chuỗi vào đĩa tế bào tạo ra nồng độ DMSO cuối là 0,2% với khoảng liều của nồng độ hợp chất thử nghiệm cuối nằm trong khoảng từ 2 đến 0,0001  $\mu M$ . Đối với điểm cực đại, sử dụng môi trường chứa 0,2% DMSO và đối với điểm cực tiểu, sử dụng fulvestrant được pha loãng ở nồng độ cuối 2  $\mu M$  trong môi trường phát triển chứa 0,2% DMSO. Sau khi dùng liều bằng hợp chất thử nghiệm, ủ các đĩa tế bào ở 37°C và 5%  $CO_2$  trong 24 giờ. Cố định các tế bào bằng cách bổ sung 14% para-formaldehyt (10  $\mu L$ ) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các tế bào một lần bằng PBS (20  $\mu l$ ) và ủ với PBS (20  $\mu l$ ) chứa 0,5% (thể tích/thể tích) TWEEN® 20 trong 1 giờ. Rửa các tế bào bằng PBS chứa 0,05% TWEEN® 20 (2×) và phong bế bằng 3% BSA trong PBS

chứa 0,05% TWEEN® 20 và 0,1% TRITON™ X-100 (20 µL/lỗ) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung dịch pha loãng 1:500 kháng thể sơ cấp (20 µL) (ERα (Dòng vô tính SP1) kháng thể đơn dòng của thỏ #RM-9101-S, Thermo Scientific) trong 1% BSA trong PBS chứa 0,05% TWEEN® 20 mỗi lỗ, đậy kín các đĩa và ủ qua đêm ở 4°C. Ngày tiếp theo, rửa các tế bào bằng PBS chứa 0,05% TWEEN® 20 (2×) và ủ với kháng thể thứ cấp (20 µL/lỗ) (dịch pha loãng 1:1000, của dê kháng IgM thỏ ALEXA FLUOR™ 488) trong PBS 1% BSA trong 105 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa các đĩa bằng PBS (2×20 µl), bổ sung RNase (Sigma) (20 µL của 50 µg/ml) và dịch pha loãng propidi iodua 1:1000 trong PBS mỗi lỗ (20 µl). Đậy kín các đĩa và ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên bàn thí nghiệm (được bảo quản khỏi ánh sáng). Quét các đĩa bằng ACUMEN EXPLORER™ [Tế bào kế vi đĩa huỳnh quang quét laze do TTP LABTECH LTD sản xuất] để đo ERα. Việc phân tích hình ảnh được dựa trên các tín hiệu huỳnh quang tế bào để nhận diện các tế bào dương tính. Nhận diện các tế bào dương tính với thụ thể estrogen bằng cường độ trung bình. Sử dụng tổng cường độ ở 575-640 nm từ propidi iodua/DNA để nhận diện các tế bào riêng rẽ. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính với thụ thể estrogen. Xác định IC<sub>50</sub> bằng cách khớp đường cong với logistic bốn thông số đối với mỗi đầu ra bằng cách sử dụng GENE DATA™.

Các kết quả của thử nghiệm này chứng tỏ rằng hợp chất có công thức (I) là SERD với hoạt tính thoái giáng ERα có hiệu lực trong các tế bào. Đặc biệt, các kết quả thể hiện sự thoái giáng có hiệu lực của ERα bởi hợp chất của ví dụ 1 trong các tế bào ung thư vú MCF7. Bằng cách sử dụng thử nghiệm này, trị số IC<sub>50</sub> (µM) tương đối đối với hợp chất của ví dụ 1 là  $2,16 \pm 0,96$  nM (n=15).

#### Thử nghiệm cảm ứng PRα trong các tế bào MCF7

Mục đích của thử nghiệm cảm ứng PRα sau là để xác định xem hợp chất thử nghiệm có hoạt tính chủ vận đối với thụ thể ERα hay không (chất chủ vận được mong đợi để hoạt hóa thụ thể.)

Nuôi cấy MCF7 (được mua từ ATCC HTB-22) trong môi trường DMEM được bổ sung 10% FBS, 0,01 mg/ml người insulin 1 và 1% thuốc kháng sinh penicillin/streptomycin và đặt các tế bào (trước khi trở nên hợp dòng 70%) trong các

đĩa đáy phẳng 384 lỗ ở mật độ 4.000 tế bào mỗi lỗ trong thể tích 20  $\mu\text{L}$  trong môi trường DMEM không chứa đồ phenol chứa 10% FBS (được tách bằng than). Ủ các tế bào qua đêm trong tủ ủ nuôi cấy tế bào (5%  $\text{CO}_2$ , độ ẩm tương đối 95% ở  $37^\circ\text{C}$ ) và cho phép các tế bào gắn vào đĩa. Ngày tiếp theo, dùng liều cho các tế bào bằng hợp chất thử nghiệm. Sử dụng thiết bị định lượng dùng âm Echo 555 để chuẩn bị các dịch pha loãng theo chuỗi của hợp chất (1:3) trong khoảng từ 6  $\mu\text{M}$  đến 0,0003  $\mu\text{M}$ . Dùng liều cho các tế bào bằng cách bổ sung hợp chất thử nghiệm (5  $\mu\text{L}$ ) từ đĩa pha loãng theo chuỗi vào đĩa tế bào tạo ra nồng độ DMSO cuối là 0,2% với nồng độ cuối của khoảng liều của hợp chất thử nghiệm nằm trong khoảng từ 2 đến 0,0001  $\mu\text{M}$ . Đối với điểm cực đại, sử dụng môi trường chứa 0,2% DMSO và đối với điểm cực tiểu, sử dụng fulvestrant được pha loãng ở nồng độ cuối 2  $\mu\text{M}$  trong môi trường phát triển chứa 0,2% DMSO. Sau khi dùng liều bằng hợp chất thử nghiệm, ủ các đĩa tế bào ở  $37^\circ\text{C}$  và 5%  $\text{CO}_2$  trong 24 giờ. Cố định các tế bào bằng cách bổ sung 14% para-formaldehyt (10  $\mu\text{L}$ ) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các tế bào một lần bằng PBS (20  $\mu\text{L}$ ) và ủ với PBS (20  $\mu\text{L}$ ) chứa 0,5% (thể tích/thể tích) TWEEN® 20 trong 1 giờ. Rửa các tế bào hai lần bằng PBS (20  $\mu\text{L}$ ) chứa 0,05% TWEEN® 20 và phong bế bằng 3% BSA trong PBS chứa 0,05% TWEEN® 20 và 0,1% TRITON™ X-100 (20  $\mu\text{L}$ /lỗ) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung dịch pha loãng 1:500 kháng thể sơ cấp (20  $\mu\text{L}$ ) (Kháng thể đơn dòng thụ thể progesterone của chuột nhắt kháng người, dòng vô tính PgR 636 Dako, M3569) trong 1% BSA/PBS với 0,05 TWEEN® 20 mỗi lỗ, đậy kín các đĩa và ủ qua đêm ở  $4^\circ\text{C}$ .

Ngày tiếp theo, rửa các tế bào bằng PBS 0,05% TWEEN® 20 ( $2 \times 20 \mu\text{L}$ ) và ủ với kháng thể thứ cấp (20  $\mu\text{L}$ /lỗ) (dịch pha loãng 1:1000, của dê kháng IgM thô ALEXA FLUOR™ 488) trong PBS 1% BSA trong 105 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa bằng PBS ( $2 \times 20 \mu\text{L}$ ), bổ sung RNase (20  $\mu\text{L}$  của 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma) và dịch pha loãng propidi iodua 1:1000 trong PBS mỗi lỗ. Đậy kín các đĩa và ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên bàn thí nghiệm (được bảo quản khỏi ánh sáng). Quét các đĩa bằng ACUMEN EXPLORER™ [Tế bào kế vi đĩa huỳnh quang quét laze do TTP LABTECH LTD sản xuất] để đo thụ thể progesteron alpha. Việc phân tích hình ảnh được dựa trên các tín hiệu huỳnh quang tế bào để nhận diện các tế bào dương tính. Nhận diện các tế bào dương tính với thụ thể progesteron bằng cường độ trung bình. Sử

dụng tổng cường độ ở 575-640 nm từ propidi iodua/DNA để nhận diện các tế bào riêng rẽ. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính với thụ thể progesteron. Xác định  $IC_{50}$  bằng cách khớp đường cong với logistic bốn thông số đối với mỗi đầu ra bằng cách sử dụng GENE DATA™.

Bằng cách sử dụng thử nghiệm này,  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) tương đối của hợp chất của ví dụ 1 là  $> 2 \mu M$ . Các kết quả của thử nghiệm này chứng tỏ hoạt tính chủ vận không đáng kể của ví dụ 1 trong các tế bào ung thư vú MCF7. Các kết quả này cũng chứng tỏ rằng hợp chất của ví dụ 1 là chất đối kháng tinh khiết của  $ER\alpha$  trong các tế bào ung thư vú MCF7.

Thử nghiệm tế bào ức chế  $PR\alpha$  (tính đối kháng chức năng  $ER\alpha$ ) trong các tế bào MCF7-ESR1 Y537N 682 CRISPR

Mục đích của thử nghiệm tế bào ức chế  $PR\alpha$  (tính đối kháng chức năng  $ER\alpha$ ) sau là để xác định hoạt tính đối kháng của hợp chất thử nghiệm đối với thụ thể  $ER\alpha$  đột biến Y537N. Chất đối kháng trong thử nghiệm này được dự tính để phong bế chức năng của thụ thể  $ER\alpha$ .  $PR\alpha$  (PGR) là đích phiên mã phía sau của  $ER\alpha$  và vì vậy, chất đối kháng của  $ER\alpha$  được dự tính để ức chế sự biểu hiện của  $PR\alpha$ .

Nuôi cấy MCF7-ESR1 Y537N-682 (được tạo ra bởi gen CRISPR/Cas9 chỉnh sửa của gen ESR1 trong các tế bào MCF7, dòng vô tính#682) trong môi trường DMEM được bổ sung 10% FBS và 1% thuốc kháng sinh penicillin/streptomycin và đặt các tế bào (trước khi trở nên hợp dòng 70%) trong các đĩa đáy phẳng 384 lỗ ở mật độ 4.000 tế bào mỗi lỗ trong môi trường DMEM không chứa đở phenol 10% FBS (thể tích 20  $\mu L$ ) (được tách bằng than). Ủ các tế bào qua đêm trong tủ ủ nuôi cấy tế bào (5%  $CO_2$ , độ ẩm tương đối 95% và 37°C) và cho phép các tế bào gắn vào đĩa. Ngày tiếp theo, dùng liều cho các tế bào bằng hợp chất thử nghiệm. Sử dụng thiết bị định lượng dùng âm Echo 555 để chuẩn bị các dịch pha loãng theo chuỗi của hợp chất (1:3) trong khoảng từ 6  $\mu M$  đến 0,0003  $\mu M$ . Dùng liều cho các tế bào bằng cách bổ sung 5  $\mu L$  từ đĩa pha loãng theo chuỗi vào đĩa tế bào tạo ra nồng độ DMSO cuối là 0,2% với khoảng liều của nồng độ hợp chất thử nghiệm cuối nằm trong khoảng từ 2 đến 0,0001  $\mu M$ . Đối với điểm cực đại, sử dụng môi trường chứa 0,2% DMSO và đối với điểm cực tiểu, sử dụng fulvestrant được pha loãng ở nồng độ cuối 2  $\mu M$  trong môi trường phát

triển chứa 0,2% DMSO. Sau khi dùng liều bằng hợp chất thử nghiệm, ủ các đĩa tế bào ở 37°C và 5% CO<sub>2</sub> trong 72 giờ. Cố định các tế bào bằng cách bổ sung 14% para-formaldehyt (10 µL) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các tế bào bằng PBS (1×20 µl) và ủ với PBS (20 µl) chứa 0,5% (thể tích/thể tích) TWEEN® 20 trong 1 giờ. Rửa các tế bào bằng PBS (2×20 µL), 0,05% TWEEN® 20, và phong bế bằng 3% BSA/PBS 0,05% TWEEN® 20, 0,1% TRITON™ X-100 (20 µL/lỗ) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung dịch pha loãng 1:500 kháng thể sơ cấp (20 µL) (Kháng thể đơn dòng thụ thể progesterone của chuột nhắt kháng người, dòng vô tính PgR 636 Dako, M3569) trong 1% BSA/PBS 0,05 TWEEN® 20 mỗi lỗ, đậy kín các đĩa và ủ qua đêm ở 4°C.

Ngày tiếp theo, rửa các tế bào bằng PBS 0,05% ® (2×20 µL) và ủ với kháng thể thứ cấp (20 µL/lỗ) (dịch pha loãng 1:1000, của dê kháng IgM thỏ ALEXA FLUOR™ 488) trong PBS 1% BSA trong 105 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa bằng PBS (2×20 µl), bổ sung RNase (20 µL của 50 µg/ml) (Sigma) và dịch pha loãng propidi iodua 1:1000 trong PBS mỗi lỗ. Đậy kín các đĩa và ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên bàn thí nghiệm (được bảo quản khỏi ánh sáng). Quét các đĩa bằng ACUMEN EXPLORER™ [Tế bào kế vi đĩa huỳnh quang quét laze do TTP LABTECH LTD sản xuất] để đo thụ thể progesteron alpha. Việc phân tích hình ảnh được dựa trên các tín hiệu huỳnh quang tế bào để nhận diện các tế bào dương tính. Nhận diện các tế bào dương tính với thụ thể progesteron bằng cường độ trung bình. Sử dụng tổng cường độ ở 575-640 nm từ propidi iodua/DNA để nhận diện các tế bào riêng rẽ. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính với thụ thể progesteron. Xác định IC<sub>50</sub> bằng cách khớp đường cong với logistic bốn thông số đối với mỗi đầu ra bằng cách sử dụng GENE DATA™.

Bằng cách sử dụng thử nghiệm này, IC<sub>50</sub> (nM) tương đối của hợp chất của ví dụ 1 là  $7,602 \pm 4,804$  nM (n=14). Các kết quả này chứng tỏ sự ức chế có hiệu lực của PRα và tính đối kháng chức năng bởi hợp chất ví dụ 1 trong các tế bào ung thư vú MCF7 (ESR1 Y537N, thể đột biến dị hợp tử). Như vậy, hợp chất của ví dụ 1 là chất đối kháng có hiệu lực của thể đột biến ERα (Y537N) và chất ức chế có hiệu lực của sự phiên mã qua trung gian ERα. PRα (PGR) cũng là đích phiên mã của ERα và các kết quả từ thử

thử nghiệm này chứng tỏ sự ức chế có hiệu lực của sự phiên mã qua trung gian ER $\alpha$  của PR $\alpha$ .

Thử nghiệm tế bào ức chế PR $\alpha$  (tính đối kháng chức năng ER $\alpha$ ) trong các tế bào MCF7

Mục đích của thử nghiệm tế bào ức chế PR $\alpha$  (tính đối kháng chức năng ER $\alpha$ ) sau là để xác định hoạt tính đối kháng của hợp chất thử nghiệm đối với thụ thể ER $\alpha$ . Chất đối kháng trong thử nghiệm này được dự tính để phong bế chức năng của thụ thể ER $\alpha$ . PR $\alpha$  là đích phiên mã phía sau của ER $\alpha$  và vì vậy, chất đối kháng của ER $\alpha$  được dự tính để ức chế sự biểu hiện của PR $\alpha$ .

Thực hiện các điều kiện thử nghiệm như được mô tả chi tiết trong thử nghiệm Acumen dựa trên tế bào thoái giáng ER $\alpha$  trên đây, bằng cách sử dụng dòng tế bào MCF7 ngoại trừ rằng, trước khi phân phối hợp chất thử nghiệm, loại bỏ môi trường khỏi đĩa tế bào và tiền xử lý tất cả các lỗ ngoại trừ đối với các lỗ đối chứng âm tính (cột 24 của đĩa) bằng môi trường thử nghiệm chứa 0,47 nM estradiol trong 30 phút. Trong thử nghiệm này, thực hiện nhuộm miễn dịch để phát hiện PR $\alpha$  và quét các đĩa bằng ACUMEN EXPLORER™ [Tế bào kế vi đĩa huỳnh quang quét laze do TTP LABTECH LTD sản xuất] để đo PR $\alpha$ . Việc phân tích hình ảnh được dựa trên các tín hiệu huỳnh quang tế bào để nhận diện các tế bào dương tính. Nhận diện các tế bào dương tính với PR $\alpha$  bằng cường độ trung bình. Sử dụng tổng cường độ ở 575-640 từ propidi iodua/DNA để nhận diện các tế bào riêng rẽ. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính với PR $\alpha$ . Xác định IC<sub>50</sub> bằng cách khớp đường cong với logistic bốn thông số đối với mỗi đầu ra bằng cách sử dụng GENE DATA™.

Bằng cách sử dụng thử nghiệm này, IC<sub>50</sub> (nM) tương đối của hợp chất của ví dụ 1 trong thử nghiệm này là  $15,75 \pm 9,037$  nM (n=15). Các kết quả của thử nghiệm này chứng tỏ sự ức chế có hiệu lực của PR $\alpha$  và tính đối kháng chức năng bởi hợp chất ví dụ 1 trong các tế bào ung thư vú MCF7. Như vậy, hợp chất của ví dụ 1 là chất đối kháng có hiệu lực của protein kiểu đại ER $\alpha$  và chất ức chế có hiệu lực của sự phiên mã qua trung gian ER $\alpha$ . PR $\alpha$  (PGR) cũng là đích phiên mã của ER $\alpha$  và các kết quả từ thử nghiệm này chứng tỏ sự ức chế có hiệu lực của sự phiên mã qua trung gian ER $\alpha$  của PR $\alpha$ .

Thử nghiệm đánh giá sự tăng sinh của tế bào trong MCF7 và MCF7-ESR1 Y537N-682

Mục đích của thử nghiệm đánh giá sự tăng sinh của tế bào sau nói chung để phát hiện xem hợp chất thử nghiệm có tác dụng trên sự tăng sinh của tế bào, khả năng sống của tế bào, và tính độc tế bào đáp ứng với việc điều trị trong các thử nghiệm nuôi cấy tế bào hay không. Sự tăng sinh của tế bào được giám sát bằng cách giám sát số lượng tế bào theo thời gian và thử nghiệm propodeum iodua được sử dụng cho phép đo liên tục khả năng sống của tế bào theo thời gian.

Gieo cấy các tế bào MCF7 (được mua từ ATCC HTB-22) ở mật độ 2.000 tế bào mỗi lỗ trong môi trường DMEM không chứa đồ phenol 10% FBS (thể tích 20  $\mu$ L) (được tách bằng than) vào trong đĩa nuôi cấy tế bào 384 lỗ đáy trong suốt. Đặt MCF7-ESRY537N -682 (được tạo ra bởi gen CRISPR/Cas9 chỉnh sửa của gen ESR1 trong các tế bào MCF7, dòng vô tính#682) trong môi trường DMEM được bổ sung 10% FBS, và 1% thuốc kháng sinh penicillin/streptomycin ở mật độ 1000 tế bào mỗi lỗ. Ủ các đĩa ở 37°C và 5% CO<sub>2</sub>. Ngày tiếp theo, dùng liều cho các tế bào bằng hợp chất thử nghiệm. Sử dụng thiết bị định lượng dùng âm Echo 555 để chuẩn bị các dịch pha loãng theo chuỗi của hợp chất thử nghiệm (1:3) trong khoảng từ 60  $\mu$ M đến 0,003  $\mu$ M. Dùng liều cho các tế bào bằng cách bổ sung 5  $\mu$ L từ đĩa pha loãng theo chuỗi vào đĩa tế bào, tạo ra nồng độ DMSO cuối là 0,2% với khoảng liều của nồng độ hợp chất thử nghiệm cuối nằm trong khoảng từ 20 đến 0,001  $\mu$ M. Đối với điểm cực đại, sử dụng môi trường chứa 0,2% DMSO và đối với điểm cực tiểu, sử dụng fulvestrant được pha loãng ở nồng độ cuối 2  $\mu$ M trong môi trường phát triển chứa 0,2% DMSO. Sau khi dùng liều bằng hợp chất thử nghiệm, ủ các đĩa tế bào ở 37°C và 5% CO<sub>2</sub>. Bảy ngày sau khi bổ sung hợp chất thử nghiệm, lấy các đĩa ra khỏi tủ ủ và bổ sung ethanol lạnh 96% (65  $\mu$ L) vào mỗi lỗ. Sau 30 phút, loại bỏ môi trường và bổ sung RNase (20  $\mu$ L của 50  $\mu$ g/ml) (Sigma) và dịch pha loãng propidi iodua 1:1000 trong PBS mỗi lỗ. Đậy kín các đĩa và ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên bàn thí nghiệm (được bảo quản khỏi ánh sáng). Quét các đĩa bằng ACUMEN EXPLORER™ [Tế bào kế vi đĩa huỳnh quang quét laze do TTP LABTECH LTD sản xuất]. Dòng tế bào MCF-7 phát triển tạo ra khối kết tụ, số lượng tế bào là số lượng của các đối tượng không thể được sử dụng dưới dạng đọc ra; vì vậy số lượng tế bào có thể được đánh giá thông qua số lượng tế bào ước tính

(được tính thông qua thông số diện tích (tỷ lệ của tổng diện tích của toàn bộ quần thể tế bào (khoảng được chỉ định của cường độ pic của FL-1 (PI) và diện tích trung bình của một quần thể tế bào (được xác định bằng chu vi)). Xác định IC<sub>50</sub> bằng cách khớp đường cong với logistic bốn thông số đối với mỗi đầu ra bằng cách sử dụng GENE DATA™.

Bằng cách sử dụng thử nghiệm này, IC<sub>50</sub> (nM) tương đối của hợp chất của ví dụ 1 trong tế bào kiểu đại MCF7 ESR1 là  $9,243 \pm 1,741$  nM (n=2) và trong tế bào đột biến MCF7-ESR1 Y537N là  $7,960 \pm 3,691$  nM (n=6). Các kết quả này chứng tỏ hoạt tính chống tăng sinh và sự ức chế sinh trưởng tế bào có hiệu lực bởi hợp chất ví dụ 1 trong các tế bào ung thư vú MCF7 (ESR1 kiểu đại) và MCF7 (ESR1 Y537N đột biến).

Thử nghiệm ức chế đích *in vivo* (*In Vivo* Target inhibition - IVTI) (thử nghiệm PGR RT-qPCR) trong các khối u MCF7

Mục đích của thử nghiệm IVTI này là để đo khả năng của hợp chất thử nghiệm (SERD) để ức chế sự biểu hiện gen của PGR (thụ thể progesterone alpha) (sự phiên mã) phía sau của ER $\alpha$  trong các khối u ghép khác loài được cấy trong chuột nhắt.

Cấy ghép cho chuột nhắt cái NOD SCID (22-25 g) từ Envigo RMS, Inc., Madison, Wisconsin bằng  $5 \times 10^6$  tế bào ung thư vú MCF7 ER+ve (ATCC, # HTB-22) dưới da ở vùng hông bên phải trong dung dịch HBSS + MATRIGEL™ 1:1 (200  $\mu$ L). Cấy ghép viên 17-  $\beta$  estradiol (0,18 mg/viên, giải phóng trong 90 ngày, từ Innovative research) dưới da 1 ngày trước khi cấy ghép tế bào khối u. Đo mức độ sinh trưởng của khối u và cân nặng cơ thể hai lần mỗi tuần bắt đầu từ ngày thứ bảy sau khi cấy ghép. Khi kích thước khối u đạt 250-350 mm<sup>3</sup>, ngẫu nhiên hóa các động vật và nhóm vào trong các nhóm gồm năm con. Dùng liều cho các động vật bằng mỗi trong số hợp chất thử nghiệm trong chất dẫn cụ thể (1% hydroxyethylxenluloza/0,25% TWEEN® 80/0,05% chất chống tạo bọt trong nước tinh khiết) hoặc chất dẫn riêng rẽ qua đường miệng trong 3 ngày và thu gom các khối u và máu ở các khoảng thời gian mong muốn sau liều cuối cùng. Làm chết các động vật bằng cách sử dụng sự gây mê bằng isofluran cùng với làm sai khớp cổ. Đông lạnh nhanh các khối u và bảo quản ở -80°C cho đến khi xử lý để tách RNA và thử nghiệm RT-qPCR. Thu gom máu trong các ống EDTA,

quay để lấy huyết tương, và đông lạnh ở  $-80^{\circ}\text{C}$  trong đĩa 96 lỗ. Xác định mức độ tiếp xúc của hợp chất thử nghiệm bằng cách sử dụng phép đo khối phổ.

Nghiên các khối u trong nitơ lỏng và dung giải trong dung dịch đệm gây tan  $1\times\text{RNA}$  (từ kit tách RNA) bằng cách sử dụng các hạt Matrix D (MP Biomedical, #6913-500) trong máy phá vỡ tế bào FASTPREP-24<sup>TM</sup> (MP Biomedical). Chuyển dịch tan khối u sang các ống mới sau khi quay ở 14000 vòng/phút trong 20 phút ở  $4^{\circ}\text{C}$ . Tách RNA khỏi dịch tan khối u bằng cách sử dụng PURELINK<sup>®</sup> RNA Mini Kit (Invitrogen #12183018A) hoặc RNeasy Mini Kit (Qiagen #74104 and #74106). Loại bỏ các tạp chất DNA bằng cách sử dụng PURELINK<sup>®</sup> DNase Set (Invitrogen #12185010) hoặc RNase-Free DNase Set (Qiagen #79254). Đo nồng độ RNA tách được bằng cách pha loãng các mẫu trong nước không chứa RNase và đo độ hấp thụ ở 260 nm trên máy đọc đĩa (SpectraMax190). Lấy kết quả đo 260 nm của tất cả các mẫu RNA khác trừ đi kết quả đo độ hấp thụ 260 nm trung bình của mẫu trắng (chỉ có nước không chứa RNase). Pha loãng các mẫu RNA đến các nồng độ bằng nhau trong nước không chứa mase. Tổng hợp cDNA từ RNA đã pha loãng bằng cách sử dụng hệ thống tổng hợp sợi thứ nhất (First-Strand Synthesis System) đối với RT-PCR (Invitrogen, #18080-051). Để thực hiện RT-qPCR, đầu tiên pha loãng cDNA trong nước không chứa RNase. Kết hợp  $2\times$  Absolute Blue qPCR ROX Mix (Thermo, #AB-4139/A), đoạn mồi PGR (Thermo, Hs01556702\_m1), và cDNA đã pha loãng đối với mỗi phản ứng trong đĩa PCR (Applied Biosystems, #4309849). Khuếch đại cDNA bằng cách ủ các mẫu trong 2 phút ở  $50^{\circ}\text{C}$  tiếp theo là 15 phút ở  $95^{\circ}\text{C}$  trong máy luân nhiệt (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System). Tiếp tục ủ ở  $95^{\circ}\text{C}$  trong 15 giây tiếp theo là  $50^{\circ}\text{C}$  trong 60 giây trong tổng số 40 chu trình. Các chu trình được chuẩn hóa với gen giữ nhà và được sử dụng để tính toán % ức chế PGR so với chất dẫn riêng rẽ. Phân tích mỗi mẫu lặp lại hai lần và sử dụng các số trung bình để tính toán. Tính tỷ lệ phần trăm ức chế đích (PGR) bằng cách sử dụng Excel and XL Fit.

Các kết quả của thử nghiệm này chứng tỏ rằng hợp chất của ví dụ 1 ức chế sự biểu hiện của  $\text{PR}\alpha$  (PGR) trong mô hình khối u ghép khác loài. Ngoài ra, hợp chất của ví dụ 1 ức chế sự biểu hiện của  $\text{PR}\alpha$  (PGR) đến 57% trong mô hình khối u ghép khác loài trong 24 giờ với liều 30 mg/kg khi được dùng qua đường miệng. Các kết quả này

chứng tỏ sự ức chế đáng kể và được duy trì liên tục của hoạt tính đối kháng ER $\alpha$  và hoạt tính phiên mã qua trung gian ER $\alpha$  *in vivo* trong mô hình khối u ghép khác loài.

Nghiên cứu sự ức chế sinh trưởng của khối u *in vivo* trong khối u ghép khác loài MCF7 được cấy ở chuột nhắt

Mục đích của thử nghiệm ức chế sự sinh trưởng của khối u ghép khác loài sau là để đo mức độ giảm về thể tích khối u đáp ứng với việc dùng hợp chất thử nghiệm.

Nhân rộng các tế bào ung thư vú của người MCF7 (ATCC # HTB-22) trong môi trường nuôi cấy, thu hoạch và tiêm  $5 \times 10^6$  tế bào trong dung dịch 1:1 HBSS+MATRIGEL™ (200  $\mu$ L) dưới da lên hông phải đằng sau của chuột nhắt cái NOD SCID (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Hai mươi bốn giờ trước khi cấy ghép các tế bào MCF7, cấy ghép các viên estrogen (0,18 mg/viên, 17 $\beta$  estradiol, giải phóng trong 90 ngày, Innovative Research) dưới da. Đo mức độ sinh trưởng của khối u và cân nặng cơ thể hai lần mỗi tuần bắt đầu từ ngày thứ bảy sau khi cấy ghép. Khi kích thước khối u đạt 250-350 mm<sup>3</sup>, ngẫu nhiên hóa các động vật và nhóm vào trong các nhóm gồm 5 con. Chuẩn bị hợp chất thử nghiệm trong chất dẫn thích hợp (1% hydroxyethylxenluloza/0,25% TWEEN® 80/0,05% chất chống tạo bọt trong nước tinh khiết) và dùng bằng cách dùng qua đường miệng vào dạ dày trong 42 ngày. Xác định đáp ứng khối u bằng cách đo thể tích khối u được thực hiện hai lần một tuần trong tiến trình điều trị. Lấy cân nặng cơ thể làm thước đo chung của độc tính bất cứ khi nào thể tích khối u được đo.

Khi được sử dụng trong thử nghiệm này, hợp chất của ví dụ 1 được thấy là có các trị số % delta T/C như được cung cấp trong bảng 6 dưới đây. Các kết quả này cho thấy rằng hợp chất của ví dụ 1 chứng tỏ độ sinh khả dụng tốt qua đường miệng ở chuột nhắt và hoạt tính kháng khối u hoặc mức độ thoái triển khối u đáng kể trong mô hình ung thư vú của người ghép khác loài MCF7.

Nghiên cứu sự ức chế sinh trưởng của khối u *in vivo* trong khối u ghép khác loài MCF7 được cấy ở chuột nhắt

Bảng 6

| Mô hình khối u                   | Liều (mg/kg) | Phác đồ | % Delta T/C hoặc % thoái triển | Trị số p |
|----------------------------------|--------------|---------|--------------------------------|----------|
| MCF7 (ung thư vú ghép khác loài) | 30           | QD      | -36                            | <0,001*  |

Phân tích đối với thể tích khối u được dựa trên Log 10 và cấu trúc hiệp phương sai SpatialPower.

\*: có nghĩa ( $p < 0,05$ ) so với đối chứng chất dẫn.

% Delta T/C được tính toán khi thể tích khối u ở điểm kết thúc trong nhóm được điều trị là ở hoặc trên thể tích khối u ở thời điểm ban đầu. Công thức là  $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$ , tại đó T và C là các thể tích khối u ở điểm kết thúc trung bình lần lượt trong nhóm được điều trị hoặc nhóm đối chứng.  $T_0$  và  $C_0$  là các thể tích khối u ở thời điểm ban đầu trung bình trong các nhóm đó.

% Thoái triển được tính toán khi thể tích ở điểm kết thúc ở dưới thời điểm ban đầu. Công thức là  $100 \cdot (T - T_0) / T_0$ , tại đó  $T_0$  là thể tích khối u ở thời điểm ban đầu trung bình đối với nhóm được điều trị.

Trung bình tổng quát của tất cả các nhóm so với thời điểm ban đầu (ngẫu nhiên hóa) ở ngày 32 được sử dụng để tính toán % thay đổi của T/C.

Thử nghiệm độ sinh khả dụng qua đường miệng của chuột cống

Mục đích của thử nghiệm sau là để chứng tỏ xem hợp chất thử nghiệm có sinh khả dụng qua đường miệng hay không.

Dùng hợp chất thử nghiệm cho chuột cống Sprague-Dawley IV ở 1 mg/kg (bằng cách sử dụng các chất dẫn trong số mỗi chất sau: 20% CAPTISOL® trong 25 mM dung dịch đệm natri phosphat, pH2 *số lượng đủ*; hoặc 25% DMA, 15% EtOH, 10% propylen glycol, 25% 2-pyrrolidon, và 25% nước tinh khiết) và PO ở 10 mg/kg (bằng cách sử dụng chất dẫn là 1% hydroxyetyl xenluloza, 0,25% polysorbate 80, 0,05% chất chống tạo bọt 1510-US, và nước tinh khiết *số lượng đủ*). Thu gom chuỗi các mẫu máu ở 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, và 12 giờ sau khi dùng liều đối với liều lớn IV và ở 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, và 12 giờ sau khi dùng liều sau khi dùng qua đường miệng. Sau khi xử lý bằng

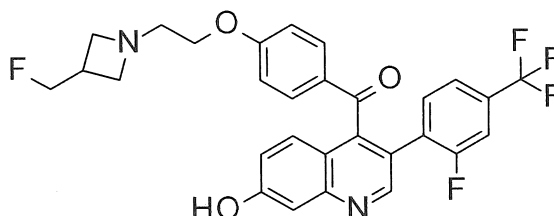
chất làm đông EDTA, thu huyết tương bằng cách ly tâm và được bảo quản ở -70°C cho đến khi phân tích bằng LC-MS/MS. Xác định nồng độ hợp chất thử nghiệm trong huyết tương và tải lên vào trong hệ thống Watson LIMS™ trong đó phân tích không chia ngăn được sử dụng để tính toán diện tích dưới đường cong (Area Under the Curve - AUC) đối với cả hai nhánh IV và PO. Tính độ sinh khả dụng qua đường miệng (%F) bằng phương trình sau,

$$\%F = (AUC_{PO} \times Liều_{IV}) / (AUC_{IV} \times Liều_{PO}) \times 100.$$

Bằng cách sử dụng thử nghiệm này, hợp chất của ví dụ 1 thể hiện trị số %F là 27%. Thử nghiệm này chứng tỏ rằng hợp chất ví dụ 1 có độ sinh khả dụng qua đường miệng tốt.

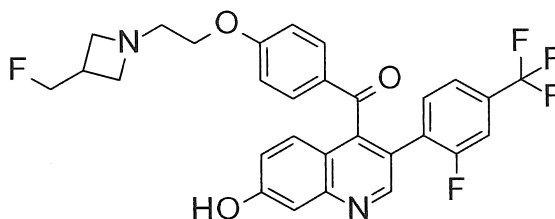
## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức



hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức



3. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, hoặc muối được dụng của nó, kết hợp với một hoặc nhiều tá dược, chất mang, hoặc chất pha loãng được dụng.

4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó dược phẩm này còn chứa một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung.

5. Phương pháp điều chế 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol bao gồm bước làm lạnh dung dịch chứa (4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl){3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]-7-hydroxyquinolin-4-yl}metanon trong 1,4-dioxan đến khoảng 5°C, sau đó bổ sung lithi trietylbohhydraua.

6. Sản phẩm của phương pháp theo điểm 5, trong đó sản phẩm này là 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol.

7. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó chất trị liệu bổ sung là 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol.