



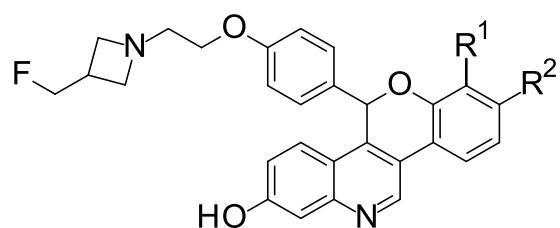
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0045144
(51)^{2020.01} C07D 491/052; A61K 31/436; A61P (13) B
35/00

(21) 1-2021-00709 (22) 11/07/2019
(86) PCT/US2019/041334 11/07/2019 (87) WO 2020/014435 16/01/2020
(30) 62/697,100 12/07/2018 US
(45) 25/04/2025 445 (43) 26/04/2021 397A
(71) ELI LILLY AND COMPANY (US)
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America
(72) BASTIAN, Jolie Anne (US); COHEN, Jeffrey Daniel (US); RUBIO, Almudena
(US); SALL, Daniel Jon (US); Jennifer Anne McMahon (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẤT THOÁI BIẾN THỤ THỂ ESTROGEN CHỌN LỌC VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA CHẤT THOÁI BIẾN NÀY

(21) 1-2021-00709

(57) Sáng chế đề cập đến chất thoái biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERD) có công thức:



,
muối được dụng của hợp chất này và dược phẩm chứa hợp chất này, trong đó R¹ hoặc R² độc lập được chọn từ Cl, F, -CF₃, hoặc -CH₃, và nhóm còn lại là hydro.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

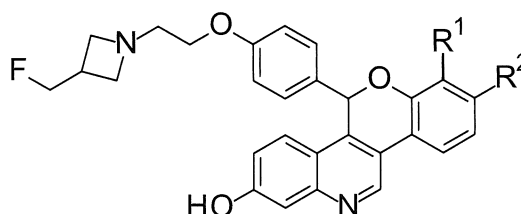
Sáng chế đề cập đến chất thoái biến thụ thể estrogen chọn lọc và dược phẩm chứa chất thoái biến này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chất thoái biến thụ thể estrogen chọn lọc (selective estrogen receptor degrader-SERD) liên kết với thụ thể estrogen (estrogen receptor-ER) và điều hòa giảm hoạt tính phiên mã qua trung gian ER. Quá trình thoái biến và điều chỉnh giảm gây ra bởi SERD này có thể hữu dụng trong điều trị các rối loạn tăng sinh tế bào, như bệnh ung thư. Một số ví dụ về phân tử nhỏ của SERD đã được bộc lộ trong tài liệu (chẳng hạn, xem tài liệu WO2005073204, WO2014205136, và WO2016097071). Tuy nhiên, các SERD đã biết vẫn chưa hữu dụng như mong muốn trong điều trị hiệu quả bệnh ung thư. Chẳng hạn, việc tìm ra các SERD với các đặc điểm về dược động học (pharmacokinetic-PK) và dược lực học (pharmacodynamic-PD) mạnh hơn, hiệu quả cao hơn trên lâm sàng và độ sinh khả dụng theo đường uống thích hợp hơn sẽ rất hữu ích trong điều trị bệnh ung thư. SERD đối kháng tinh khiết với hoạt tính ức chế phiên mã qua trung gian ER hiệu quả sẽ rất có lợi trong điều trị bệnh ung thư. Có nhu cầu về các SERD mới để điều trị bệnh ung thư như bệnh ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tử cung, ung thư dạ dày, và ung thư phổi cũng như các đột biến do tính kháng xuất hiện. Cụ thể, có nhu cầu về các SERD mới để điều trị bệnh ung thư vú, ung thư dạ dày, và/hoặc ung thư phổi dương tính với ER.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức:



và muối được dụng của hợp chất này và được phẩm chứa hợp chất này. Trong công thức này, R^1 hoặc R^2 độc lập được chọn từ Cl, F, $-CF_3$, hoặc $-CH_3$, và nhóm còn lại là hydro.

Sáng chế cũng bộc lộ phương pháp sử dụng hợp chất như được mô tả ở đây, muối được dụng của hợp chất này và được phẩm chứa hợp chất này, để điều trị bệnh ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tử cung, ung thư dạ dày, hoặc ung thư phổi. Phương pháp này bao gồm bước dùng lượng có tác dụng điều trị của hợp chất như được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này, cho bệnh nhân cần điều trị.

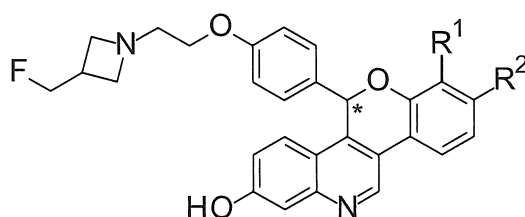
Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến hợp chất như được mô tả ở đây, và muối được dụng của hợp chất này, để sử dụng trong liệu pháp điều trị. Hợp chất được mô tả ở đây, và muối được dụng của hợp chất này, có thể được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tử cung, ung thư dạ dày, hoặc ung thư phổi.

Sáng chế cũng bộc lộ việc sử dụng hợp chất như được mô tả ở đây, và muối được dụng của hợp chất này, trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tử cung, ung thư dạ dày, hoặc ung thư phổi.

Mô tả chi tiết sáng chế

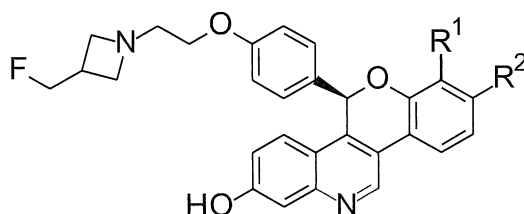
Hợp chất bốn vòng mới và muối được dụng của hợp chất này tác động ở dạng các SERD được bộc lộ trong sáng chế này. Các SERD mới được tạo ra như được mô tả ở đây ức chế sự phiên mã qua trung gian ER, mà là hữu dụng trong điều trị bệnh ung thư như bệnh ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tử cung, ung thư dạ dày, và ung thư phổi cũng như các đột biến do tính kháng xuất hiện. Các SERD này có thể được sử dụng ở dạng tác nhân đơn hoặc kết hợp với các loại thuốc khác bao gồm các chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERM), chất ức chế men aromataza, chất ức chế CDK4, chất ức chế CDK6, chất ức chế PI3K, và chất ức chế mTOR để điều trị các bệnh ung thư dương tính với thụ thể hormon như bệnh ung thư vú, ung thư dạ dày, và/hoặc ung thư phổi.

Các hợp chất mới mô tả ở đây có công thức I:



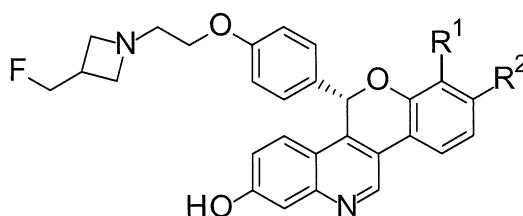
I

và muối được dụng của hợp chất này, trong đó R^1 hoặc R^2 độc lập được chọn từ Cl, F, $-CF_3$, hoặc $-CH_3$, và nhóm còn lại là hydro. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng, hợp chất như được mô tả bằng công thức I, hoặc muối được dụng của hợp chất này, chứa tâm không đối xứng, vị trí của tâm này được chỉ dẫn bằng ký hiệu * nêu trên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng sẽ hiểu rằng, các ký hiệu Cahn-Ingold-Prelog (R) hoặc (S) đối với các tâm không đối xứng sẽ thay đổi tùy thuộc vào các kiểu thế xung quanh tâm không đối xứng. Tâm không đối xứng trong hợp chất có công thức I tạo ra dạng đồng phân đối ảnh R được thể hiện bằng công thức II:



II

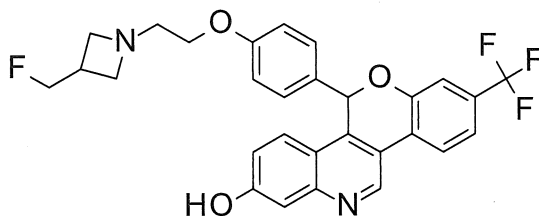
Và dạng đồng phân đối ảnh S được thể hiện bằng công thức III:



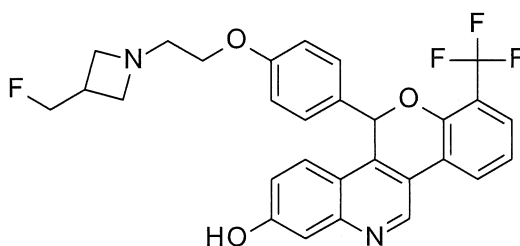
III

Tất cả các chất đồng phân lập thể, chất đồng phân đối ảnh, và chất đồng phân không đối quang riêng biệt, cũng như hỗn hợp của các chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân không đối quang của các hợp chất theo công thức I, công thức II, và công thức III bao gồm các chất triệt quang được bao gồm trong phạm vi của hợp chất được mô tả ở đây. Các hợp chất để sử dụng làm dược phẩm chứa tâm không đối xứng thường được tách phân lập ở dạng các chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang đơn và các hợp chất đã tách phân lập như vậy có công thức I, công thức II, và công thức III được bao gồm trong phạm vi của các hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng sẽ hiểu rằng, các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III mô tả ở đây, và muối được dụng của hợp chất này, có thể được đơtêri hóa (trong đó hydro có thể được thay thế bằng đơtêri) và các phân tử như vậy được xem là được bao gồm trong phạm vi của các hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này.

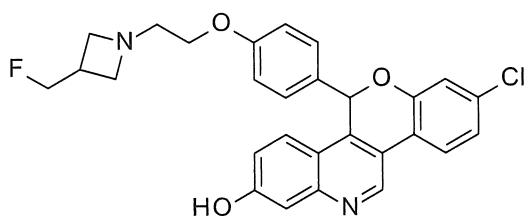
Ví dụ cụ thể về các hợp chất có công thức I (bao gồm các tên gọi theo danh pháp IUPAC) được thể hiện ở đây:



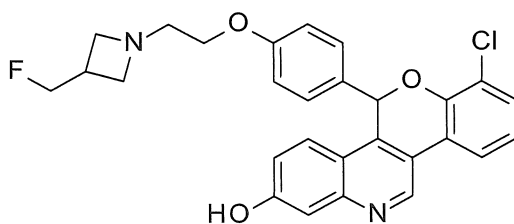
5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol;



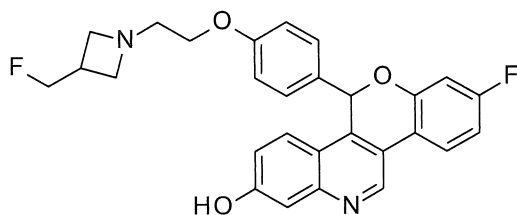
5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol;



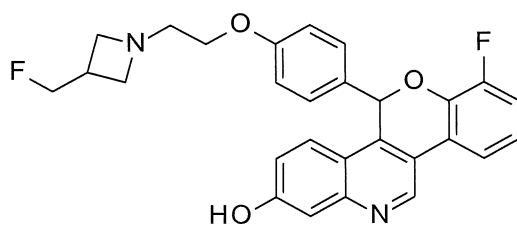
8-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]ethoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol;



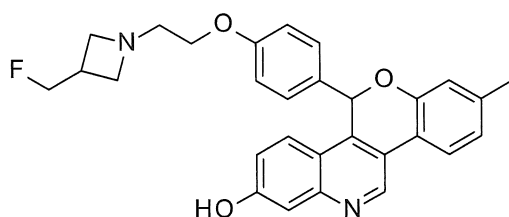
7-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]ethoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol;



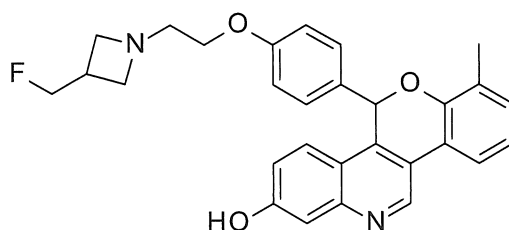
8-flo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]ethoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol;



7-flo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]ethoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol;



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

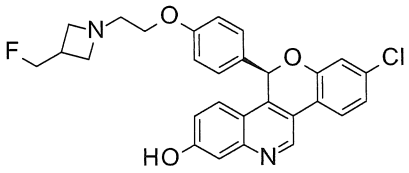
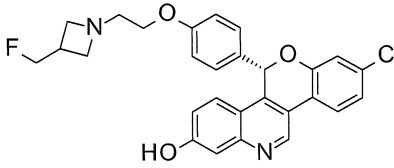
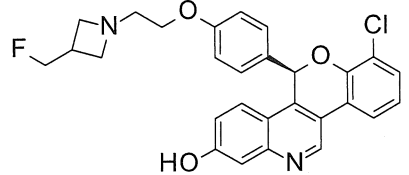
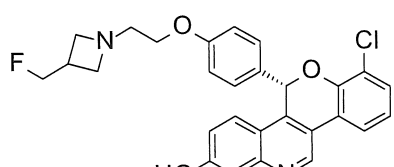
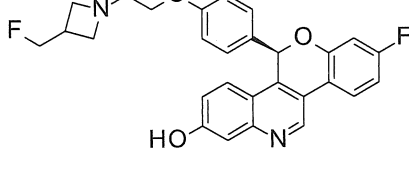
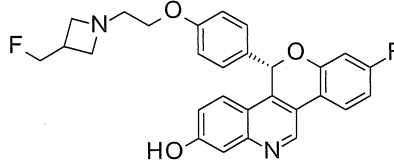
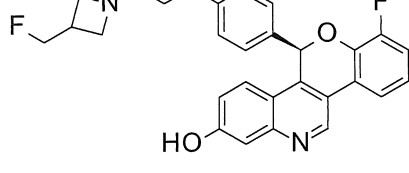
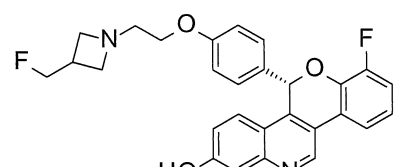
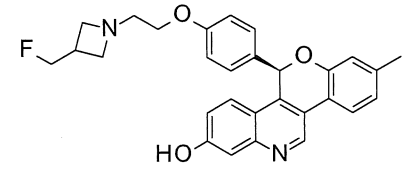
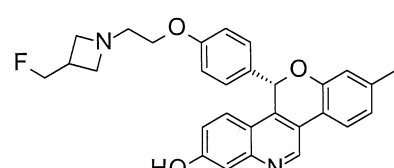
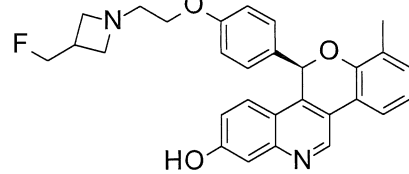
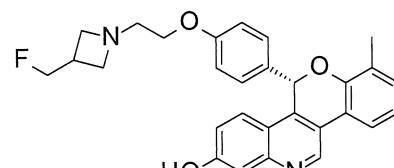


5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-metyl-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol.

Do tâm không đối xứng lưu ý ở trên, mỗi một trong các ví dụ cụ thể về các hợp chất có công thức I thể hiện ở trên này có các dạng đồng phân đối ảnh R và S (tức là, hợp chất đồng phân đối ảnh R có công thức II và hợp chất đồng phân đối ảnh S có công thức III) như được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1: Dạng đồng phân đối ảnh của các hợp chất có công thức I

Tên hóa học	Chất đồng phân đối ảnh R (công thức II)	Chất đồng phân đối ảnh S (công thức III)
5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol		
5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol		

,3-c]quinolin-2-ol		
8-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol		
7-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol		
8-flo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol		
7-flo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol		
5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-methyl-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol		
5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-methyl-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol		

Cũng được mô tả ở đây là dược phẩm chứa các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối dược dụng của hợp chất này, kết hợp với tá dược, chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng. Dược phẩm mô tả ở đây có thể được điều chế bằng cách sử dụng các chất phụ gia dược dụng. Thuật ngữ “(các) chất phụ gia dược dụng” như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, và tá dược tương thích với các chất phụ gia khác của dược phẩm hoặc công thức phối chế và không làm tổn hại cho bệnh nhân. Các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III, hoặc muối dược dụng của hợp chất này, được mô tả ở đây có thể được phối chế làm dược phẩm được dùng theo nhiều đường dùng khác nhau, như đường uống hoặc tiêm tĩnh mạch. Độ sinh khả dụng thường là một yếu tố trong điều trị bệnh ung thư và khả năng lựa chọn các phương pháp dùng và dược phẩm để kiểm soát hoặc tối ưu hóa độ sinh khả dụng của thành phần hoạt tính là hữu dụng. Chẳng hạn, chế phẩm SERD sinh khả dụng theo đường uống sẽ là đặc biệt hữu dụng. Các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III, hoặc muối dược dụng của hợp chất này, như được mô tả ở đây được cho là có độ sinh khả dụng theo đường uống. Ví dụ về dược phẩm và các quy trình điều chế dược phẩm này có thể được tìm thấy trong tài liệu chuyên ngành “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, L. V. Allen Jr, Editor, 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012. Ví dụ không giới hạn về chất mang, chất pha loãng, và tá dược dược dụng bao gồm các loại sau: nước muối, nước, tinh bột, đường, manitol, và các dẫn xuất silic oxit; chất kết dính như carboxymetyl xenluloza và các dẫn xuất xenluloza khác, alginat, gelatin, và polyvinyl-pyrrolidon; kaolin và bentonit; và polyetyl glycol.

Dược mô tả thêm trong bản mô tả này là các phương pháp điều trị bệnh ung thư. Phương pháp mô tả ở đây bao gồm bước dùng cho bệnh nhân cần được điều trị một lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối dược dụng của hợp chất này. Chẳng hạn, phương pháp dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối dược dụng của hợp chất này, có thể là theo đường uống. 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, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tử cung, ung thư dạ dày, hoặc ung thư phổi. Chẳng hạn, bệnh ung thư

có thể là bệnh ung thư vú dương tính với ER, ung thư dạ dày dương tính với ER, hoặc ung thư phổi dương tính với ER.

Cũng được mô tả ở đây là các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này, để sử dụng trong liệu pháp điều trị. Cũng được đề cập ở đây là các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này, để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tử cung, ung thư dạ dày, hoặc ung thư phổi. Cụ thể, bệnh ung thư vú có thể là ung thư vú dương tính với ER, ung thư dạ dày dương tính với ER, hoặc ung thư phổi dương tính với ER. Chẳng hạn, hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III, hoặc muối được dụng của hợp chất này, có thể được dùng theo đường uống.

Ngoài ra, các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này, có thể được sử dụng trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư. Chẳng hạn, thuốc có thể được dùng theo đường uống. Các loại bệnh ung thư mà thuốc như được mô tả ở đây có thể được sử dụng để điều trị bao gồm bệnh ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tử cung, ung thư dạ dày, hoặc ung thư phổi. Cụ thể, 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.

Các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, và muối được dụng của hợp chất này, có thể được sử dụng trên lâm sàng ở dạng tác nhân đơn hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu khác (chẳng hạn, tác nhân chống ung thư), để điều trị bệnh ung thư như bệnh ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tử cung, ung thư dạ dày, hoặc ung thư phổi. Khi được sử dụng kết hợp với các tác nhân trị liệu khác (như tác nhân chống ung thư), các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này, có thể được sử dụng đồng thời, tuần tự, hoặc riêng biệt với các tác nhân trị liệu khác. Ví dụ về các loại thuốc mà các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở

đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này, có thể được kết hợp với thuốc này bao gồm SERM, chất ức chế men aromataza, chất ức chế CDK4, chất ức chế CDK6, chất ức chế PI3K, và chất ức chế mTOR để điều trị bệnh ung thư vú dương tính thụ thể hormon. Ví dụ cụ thể hơn về thuốc mà các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này, có thể được kết hợp với thuốc này bao gồm abemaciclib (thuốc ức chế CDK4/6), everolimus (thuốc ức chế mTOR), alpelisib (thuốc ức chế PIK3CA), và 8-[5-(1-hydroxy-1-metyletyl)pyridin-3-yl]-1-[(2S)-2-metoxypopyl]-3-metyl-1,3-dihydro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-on (thuốc ức chế PI3K/mTOR).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” đề cập đến lượng hoặc liều lượng của hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này, mà khi dùng ở dạng liều đơn hoặc đa liều cho bệnh nhân, tạo ra tác dụng mong muốn ở bệnh nhân được chẩn đoán hoặc điều trị. Tác dụng mong muốn tốt hơn là ức chế sự tăng sinh tế bào khối u, sự chết của tế bào khối u, hoặc cả hai. Các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này, thường có hiệu quả trong một khoảng liều lượng rộng. Chẳng hạn, liều lượng mỗi ngày thường nằm trong khoảng hàng ngày từ khoảng 100 mg đến khoảng 2000 mg.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “điều trị”, “việc điều trị” hoặc “phép điều trị” được dùng để chỉ việc hạn chế, làm chậm, làm ngừng, hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn đã mắc.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “bệnh nhân” để chỉ người mà bị mắc bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh cụ thể.

Các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này, có thể được điều chế bằng nhiều quy trình đã biết trong lĩnh vực, một số quy trình này được minh họa trong các ví dụ điều chế và ví dụ dưới đây. Các bước tổng hợp cụ thể đối với mỗi một trong số các con đường được mô tả có thể được kết hợp theo nhiều cách khác nhau hoặc cùng với các bước từ các quy trình khác nhau, để điều chế các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng của hợp chất này. Các

sản phẩm có thể được thu hồi bằng các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực, bao gồm phương pháp chiết, làm bay hơi, kết tủa, sắc ký, lọc, nghiền, và kết tinh. Các chất phản ứng và nguyên liệu ban đầu là dễ dàng có được đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các hợp chất trung gian và quy trình hữu dụng trong tổng hợp các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây dự định được bao gồm trong phần mô tả này. Ngoài ra, một số hợp chất trung gian mô tả ở đây có thể chứa một hoặc nhiều nhóm bảo vệ. Nhóm bảo vệ biến đổi có thể là giống hoặc khác nhau trong mỗi lần xuất hiện tùy thuộc vào các điều kiện phản ứng cụ thể và sự chuyển dạng cụ thể cần được thực hiện. Các điều kiện bảo vệ và khử bảo vệ đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được mô tả trong tài liệu chuyên ngành (chẳng hạn, xem tài liệu “Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis”, Fourth Edition, của Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Các chất đồng phân, chất đồng phân đối ảnh, và chất đồng phân không đối quang riêng biệt có thể được tách hoặc phân giải bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực ở thời điểm thích hợp bất kỳ trong quá trình tổng hợp các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây, bằng các phương pháp như kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký không đối xứng (chẳng hạn, xem trong tài liệu J. Jacques, et al., “*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*”, John Wiley and Sons, Inc., 1981, and E.L. Eliel and S.H. Wilen, “*Stereochemistry of Organic Compounds*”, Wiley-Interscience, 1994). Trong khi các chất đồng phân, chất đồng phân đối ảnh, và chất đồng phân không đối quang riêng biệt có thể được tách hoặc phân giải như đã lưu ý, các ký hiệu Cahn-Ingold-Prelog (R) hoặc (S) đối với các tâm không đối xứng có thể còn chưa được xác định. Trường hợp các ký hiệu Cahn-Ingold-Prelog (R) hoặc (S) chưa có sẵn, các tên gọi nhận dạng “chất đồng phân 1” và “chất đồng phân 2” được sử dụng và được kết hợp với tên theo danh pháp IUPAC không cần ký hiệu hóa học lập thể Cahn-Ingold-Prelog. Các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III được nhận dạng là “chất đồng phân 1” hoặc “chất đồng phân 2” ở đây được phân lập như được xác định trong phần mô tả thực nghiệm cụ thể dưới đây. Chất đồng phân là “1” hoặc “2” để chỉ thứ tự trong đó các hợp chất có công

thức I, công thức II, và công thức III tách rửa từ cột sắc ký không đối xứng, trong các điều kiện được liệt kê, tức là, “chất đồng phân 1” là chất thứ nhất được rửa giải từ cột trong các điều kiện đã nêu. Nếu phương pháp sắc ký không đối xứng được khởi đầu sớm trong quá trình tổng hợp, ký hiệu tương tự được áp dụng cho các hợp chất trung gian và các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III sau đó.

Trừ khi được lưu ý một cách cụ thể, các chữ viết tắt sử dụng ở đây được xác định theo tạp chí khoa học *Aldrichimica Acta*, Vol. 17, No. 1, 1984. Các ký hiệu viết tắt khác được định nghĩa như dưới đây: “ACN” đề cập đến axetonitril; “BSA” đề cập đến albumin huyết thanh bò; “cataCXium® A Pd G3” đề cập đến [(di(1-adamantyl)-butylphosphin)-2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]paladi(II) metansulfonat; “DCM” đề cập đến diclometan hoặc metylen clorua; “DMA” đề cập đến dimetylaxetamit; “DMEA” đề cập đến dimetyletylamin; “DMEM” đề cập đến môi trường Eagle sửa đổi của Dulbecco; “DMF” đề cập đến N,N-dimetylformamit; “DMSO” đề cập đến dimetyl sulfoxit; “DNA” đề cập đến axit deoxyribonucleic; “cDNA” đề cập đến ADN bổ trợ; “DNase” đề cập đến deoxyribonucleaza; “DTT” đề cập đến dithiothreitol; “EC₅₀” đề cập đến nồng độ của một chất mà nó tạo ra đáp ứng 50% của hoạt tính đích so với hợp chất đối chứng dương xác định trước (EC₅₀ tuyệt đối); “EDTA” đề cập đến axitetylendiamintetraaxetic; “ee” đề cập đến lượng dư chất đồng phân đối ảnh; “ER α ” đề cập đến thụ thể estrogen alpha; “ER β ” đề cập đến thụ thể estrogen beta; “EtOAc” đề cập đến etyl axetat; “EtOH” đề cập đến etanol hoặc rượu etylic; “FBS” đề cập đến huyết thanh thai bò; “HBSS” đề cập đến dung dịch muối cân bằng của Hank; “HEC” đề cập đến hydroxy etyl xenluloza; “HEPES” đề cập đến axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonic; “HPLC” đề cập đến sắc ký lỏng hiệu năng cao; “IC₅₀” đề cập đến nồng độ của một chất mà nó tạo ra 50% đáp ứng ức chế tối đa có thể đối với chất đó, (IC₅₀ tương đối), hoặc nồng độ của một chất mà nó tạo ra sự ức chế 50% của hoạt tính enzym đích so với đối chứng giả dược (IC₅₀ tuyệt đối); “IPA” đề cập đến isopropylamin; “iPrOH” đề cập đến isopropanol hoặc rượu isopropylic; “IV” đề cập đến việc dùng theo đường tĩnh mạch; “K_i” đề cập đến hằng số ức chế; “MEK” đề cập đến metyl etyl keton; “MeOH” đề cập đến rượu metylic hoặc metanol; “MTBE” đề cập đến metyl *t*-butyl ete; “PBS” đề cập đến nước muối đệm phosphat; “PO” đề cập đến việc dùng theo đường uống; “PR α ” đề cập đến thụ thể progesteron alpha; “QD” đề

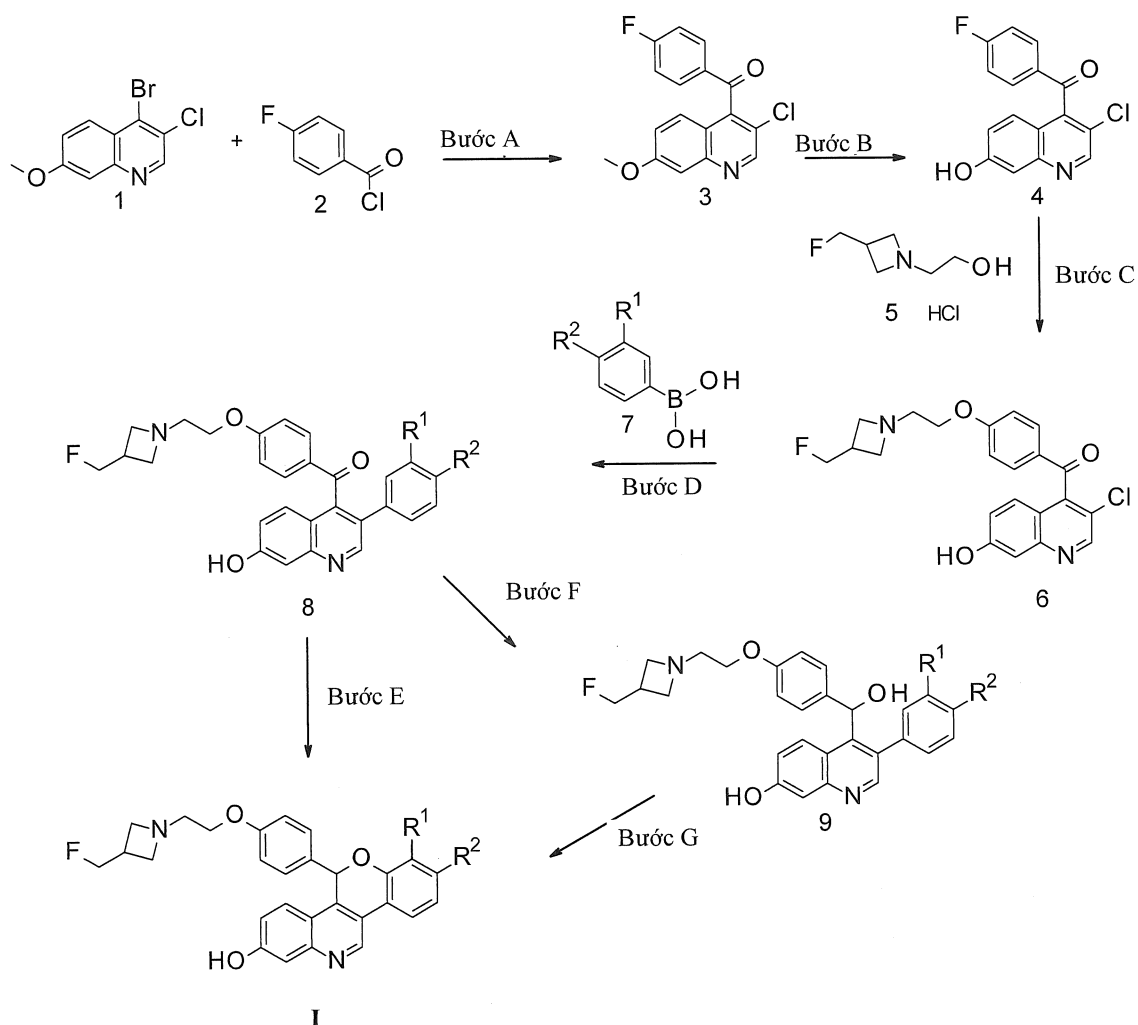
cập đến việc định liều mỗi ngày một lần; “RNA” đề cập đến axit ribonucleic; “RNase” đề cập đến ribonucleaza; “RT-PCR” đề cập đến phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược; “RT-qPCR” đề cập đến phản ứng chuỗi định lượng phiên mã ngược; “SFC” đề cập đến sắc ký lỏng siêu tới hạn; “TED₅₀” đề cập đến liều hiệu quả để đạt được mức độ ức chế 50% của đích trong các khối u; “THF” đề cập đến tetrahydrofuran; “t_(R)” đề cập đến thời gian duy trì; “XantPhos Pd G2” đề cập đến clo[(4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthen)-2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]paladi(II); và “XPhos Pd G2” đề cập đến clo(2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl)[2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]paladi(II).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ điều chế và ví dụ dưới đây nhằm minh họa thêm cho sáng chế.

Ví dụ điều chế và ví dụ

Sơ đồ 1



Sơ đồ 1 mô tả quá trình tổng hợp các hợp chất có công thức I.

Trong bước A, phản ứng Grignard được thực hiện. Phản ứng Grignard đã được biết rõ trong lĩnh vực là phản ứng để hình thành liên kết cacbon-cacbon. Phản ứng bao gồm phản ứng hữu cơ kim loại trong đó aryl magie halogenua, chất phản ứng Grignard bổ sung vào nhóm carbonyl như clorua axit của hợp chất 2 để thu được hợp chất của bước A. Chẳng hạn, quinolon được thế 4-clo, hợp chất 1, được xử lý bằng chất phản ứng Grignard như isopropylmagie clorua để tạo ra hợp chất trung gian Grignard, tiếp theo bằng cách bổ sung axit clorua, 4-flobenzoyl clorua, hợp chất 2, trong dung môi như THF. Khi hoàn thành, phản ứng có thể được làm dừng bằng nước để thu được hợp chất 3.

Trong bước B, aryl methyl ete của hợp chất 3 có thể được khử methyl trong các điều kiện khác nhau mà có thể nhận biết được đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực như việc xử lý bằng bo tribromua. Chẳng hạn, hợp chất 3 được xử lý từ từ bằng bo tribromua ở nhiệt độ khoảng 0°C trong dung môi như DCM. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng và được làm dừng bằng dikali phosphat để thu được hợp chất 4.

Trong bước C, azetidin ete 6 có thể được tạo ra bằng cách xử lý *p*-flophenyl keton 4 tương ứng và muối của rượu azetidin 5, hoặc bazơ tự do tương ứng bằng bazơ thích hợp, chẳng hạn natri hydrua, natri *t*-butoxit hoặc kali *t*-butoxit, trong dung môi không proton phân cực thích hợp như DMF hoặc THF để thu được hợp chất ete 6.

Sau đó, hợp chất 6 được alkyl hóa bằng axit aryl boronic được thể thích hợp, hợp chất 7, trong phản ứng ghép cặp chéo Suzuki để thu được hợp chất 8 trong bước D. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng, có nhiều điều kiện mà có thể hữu dụng để tạo thuận lợi cho các phản ứng ghép cặp chéo như vậy. Các chất phản ứng paladi thích hợp có thể bao gồm XantPhos Pd G2, cataCXium® A Pd G3, bis(triphenylphosphin)paladi(II) clorua, tris(dibenzylidenaxeton)dipaladi (0) với trixyclohexylphosphin, (1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen)paladi(II) clorua, paladi tetrakis(triphenylphosphin), hoặc paladi(II) axetat. Các bazơ thích hợp có thể bao gồm kali florua, xesi cacbonat, natri cacbonat, kali cacbonat, lithi *t*-butoxit, hoặc trikali phosphat monohydrat. Chẳng hạn, hợp chất 6 có thể được phản ứng với axit boronic thích hợp, hợp chất 7, như axit 2-flo-4-(triflometyl)phenylboronic trong dung môi như 2-metyl-2-butanol với bazơ như kali cacbonat và chất xúc tác như XPhos Pd G2 và được gia nhiệt tới khoảng 80 °C trong điều kiện vi sóng để thu được hợp chất 8.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng, bước D, phản ứng ghép cặp chéo Suzuki, có thể được hoàn thành trước khi hình thành azetidin ete trong bước C.

Trong bước E, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng, hợp chất 8 có thể được tạo vòng bằng cách khử keton đầu tiên. Bước này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chất khử, như lithi trietyl bo hydrua trong các dung môi như 1,4-dioxan và THF và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến nhiệt độ trong phòng

để thu được rượu bậc hai tương ứng. Rượu trung gian này có thể được tiếp tục ở dạng thô và được khử proton bằng bazơ thích hợp như xesi cacbonat, natri hydrua, natri *t*-butoxit hoặc kali *t*-butoxit trong dung môi như THF, DMSO, hoặc DMF. Alkoxit thu được có thể đóng vòng thành aryl florua ở nhiệt độ trong phòng, với việc gia nhiệt tới nhiệt độ hồi lưu, hoặc ở nhiệt độ khoảng 60°C. Ete vòng được thế tạo ra khi thay thế florua sau đó có thể đạt được để thu được các hợp chất có công thức I.

Theo cách khác, keton, 8, có thể được khử thành rượu và được tinh chế bất đối xứng ở bước F để thu được rượu không đối xứng 9, và sau đó được đóng vòng trong bước G như được mô tả ở trên trong bước E để thu được các hợp chất có công thức I.

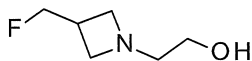
Trong một phản ứng thay thế khác, keton có thể được khử bằng cách sử dụng chất phản ứng không đối xứng như (R)-(+)- α,α -diphenyl-2-pyrrolidinmetanol cùng với trimetyl borat và boran-dimetylsulfua để trực tiếp thu được rượu không đối xứng mong muốn, hợp chất 9 sau đó có thể được đóng vòng trong bước G như được mô tả ở trên đối với bước E để thu được các hợp chất có công thức I.

Trong một bước tùy ý, muối dược dụng của hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây có thể được tạo ra bằng phản ứng của bazơ tự do thích hợp của hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây với axit dược dụng thích hợp trong dung môi thích hợp trong các điều kiện tiêu chuẩn. Ngoài ra, sự tạo thành các muối như vậy có thể xảy ra đồng thời khi loại bỏ bảo vệ của nhóm bảo vệ nitơ. Sự tạo thành có thể của các muối dược dụng là đã được biết rõ. Chẳng hạn, xem trong 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); and Berge, S.M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **66**: 1-19, (1977). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng, hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây dễ dàng được chuyển đổi thành và có thể được tách ở dạng muối dược dụng. Ví dụ về các muối hữu dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, các muối của axit benzensulfonic và các muối của axit 4-

methybenzensulfonic. Các muối của axit 4-metylbenzensulfonic cũng được biết là muối tosylat.

Ví dụ điều chế 1

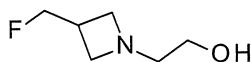
2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etan-1-ol



Bổ sung natri triaxetoxymethydrat (405 g, 1,91 mol) theo từng phần trong thời gian 15 phút vào dung dịch được khuấy ở 0°C chứa 3-(flometyl)azetidin hydroclorua (160 g, 1,28 mol) trong DCM (2,4 L) trong môi trường N₂ và khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 10 phút. Bổ sung 1,4-dioxan-2,5-diol (99 g, 0,83 mol) ở nhiệt độ 0°C theo 6 phần trong thời gian 1 giờ, sau đó khuấy ở nhiệt độ 0-5°C trong 15 phút. Làm ấm phản ứng lên nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 2 giờ trong môi trường N₂. Làm lạnh phản ứng xuống nhiệt độ 10-15°C trong thời gian 20 phút, sau đó làm ấm lên nhiệt độ 25-30°C và duy trì ở nhiệt độ này trong 2 giờ. Bổ sung nước (800 mL) trong thời gian 25-30 phút ở nhiệt độ 10-15°C, làm ấm lên nhiệt độ trong phòng trong 5-10 phút và sau đó tách riêng các lớp. Rửa lớp nước bằng DCM (800 mL), tách riêng các lớp, sau đó làm lạnh các lớp nước kết hợp xuống nhiệt độ 10-15°C và điều chỉnh độ pH tới 13-14 bằng cách sử dụng dung dịch natri hydroxit 50% (~540 mL). Làm ấm lớp nước tới nhiệt độ trong phòng, chiết bằng DCM (4 X 800 mL), làm khô bằng natri sulfat (80 g), lọc, và cô tới trạng thái khô để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (139 g, 82%) ở dạng dầu đặc màu vàng. ES/MS (m/z): 134,1(M+H).

Ví dụ điều chế 2

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



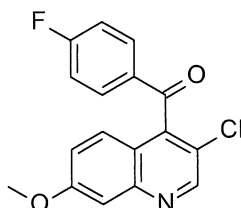
HCl

Hòa tan 2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etan-1-ol (529 g, 4 mol) trong MTBE (2,6 L) và làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C. Bổ sung dung dịch HCl/EtOH (492 mL, 30% khối lượng) theo từng giọt trong 30 phút, sau đó khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 30 phút. Lọc

các chất rắn và rửa bánh lọc bằng MTBE (2 X 200 mL). Làm khô trong môi trường N₂ trong 8 giờ để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (580 g, 86%) ở dạng chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 134,0 (M+H).

Ví dụ điều chế 3

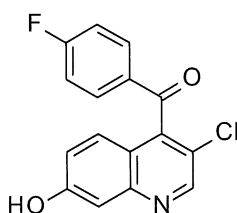
(3-clo-7-metoxiquinolin-4-yl)-(4-flophenyl)metanon



Làm lạnh hỗn hợp của 4-bromo-3-clo-7-metoxiquinolin (70 g, 254 mmol) và THF (1 L) xuống nhiệt độ -40°C trong môi trường N₂ dẫn đến sự kết tủa nguyên liệu. Bổ sung isopropylmagie clorua (2 M trong THF, 254 mL, 509 mmol) trong 20 phút và khuấy hỗn hợp trong 1 giờ. Bổ sung dung dịch của 4-flobenzoyl clorua (66 mL, 559 mmol) trong THF (140 mL) theo từng giọt, sau đó làm ấm lên đến nhiệt độ trong phòng. Làm dừng phản ứng bằng dung dịch NH₄Cl bão hòa (300 mL) và nước (200 mL) và tách riêng các lớp. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch NH₄Cl bão hòa (300 mL), làm khô trên MgSO₄, lọc, và cô để thu được phần cặn dạng dầu. Lọc dầu thô màu nâu qua silicagel, rửa giải bằng hỗn hợp của MTBE/hexan (1:1) để thu được sản phẩm thô ở 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 gom các chất rắn và dự trữ. Cô phần dịch lọc và tinh chế trên silicagel, 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 môi trường chân không qua đêm để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (31 g, 38%) ở dạng chất rắn màu vàng. ES/MS (m/z): 316,0 (M+H).

Ví dụ điều chế 4

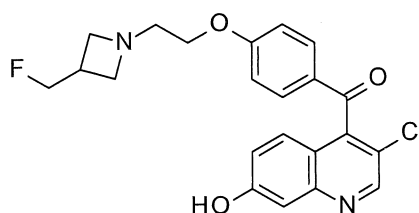
(3-clo-7-hydroxyquinolin-4-yl)-(4-flophenyl)metanon



Bổ sung bo tribromua (1 M trong DCM, 295 mL, 295 mmol) vào hỗn hợp của (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 từ từ vào trong dung dịch ở nhiệt độ 0 °C chứa dikali phosphat (2 M trong nước, 700 mL) và nước (200 mL). Làm ấm hỗn hợp lên đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 1 giờ. Cô dung dịch trong chân không để loại bỏ dung môi hữu cơ, lọc, thu gom phần dịch lọc và làm khô phần dịch lọc trong chân không ở nhiệt độ 45°C qua đêm. Xử lý các chất rắn bằng DCM/heptan (1:1, 450 mL) và khuấy qua đêm. Thu gom các chất rắn và làm khô trong môi trường chân không qua đêm để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (32 g, hiệu suất định lượng) ở dạng chất rắn màu nâu nhạt. ES/MS (m/z): 302,0 (M+H).

Ví dụ điều chế 5

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

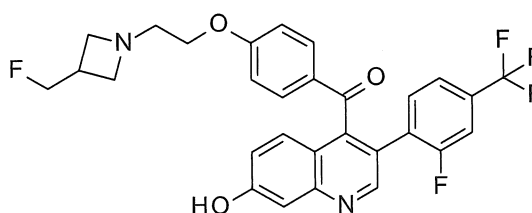


Bổ sung 2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etan-1-ol hydroclorua (3,90 g, 23,0 mmol) vào dung dịch được khuấy của (3-clo-7-hydroxyquinolin-4-yl)-(4-flophenyl)metanon (5,00 g, 15,3 mmol) trong DMF (75 ml) tiếp theo bằng natri hydrua (60% trong dầu khoáng, 3,02 g, 76,8 mmol). Khuấy trong môi trường N₂ và làm ấm lên đến nhiệt độ 40°C trong 45 phút. Làm dừng dung dịch bằng nước và cô. Phân bố phần cạn giữa 20% iPrOH/CHCl₃ và dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa và tách, chiết phần nước bằng 2 x 20% iPrOH/CHCl₃, kết hợp các phần chiết hữu cơ, làm khô các lớp hữu

cơ kết hợp trên magie sulfat, lọc và cô phần dịch lọc để thu được sản phẩm thô ở dạng dầu đỏ thẫm. Tinh chế nguyên liệu thô bằng phương pháp sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng gradien của 5-10% 7N NH₃ trong MeOH/DCM để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (5,31 g, 84%) ở dạng chất rắn màu vàng. ES/MS (m/z): 415,0 (M+H).

Ví dụ điều chế 6

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



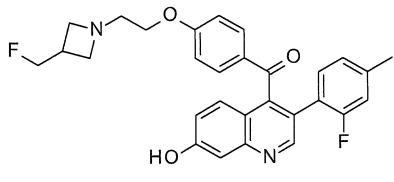
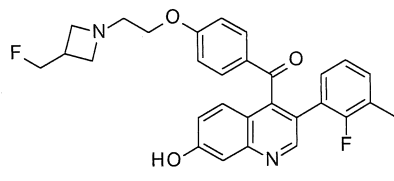
Khử khí bằng N₂ (5x) hỗn hợp (3-clo-7-hydroxyquinolin-4-yl)-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)metanon (200 mg, 0,48 mmol), axit 2-flo-4-(triflometyl)phenylboronic (158 mg, 0,72 mmol), kali cacbonat (202 mg, 1,45 mmol), 2-metyl-2-butanol (3 ml), và nước (1 ml) trong lọ vi sóng. Bổ sung XPhos Pd G2 (12 mg, 0,015 mmol), đậy kín và gia nhiệt bằng vi sóng ở nhiệt độ 80°C trong 2 giờ. Phân bố phần cạn giữa MTBE và dung dịch NH₄Cl bão hòa. Tách các lớp và chiết lớp nước bằng MTBE. Kết hợp các phần chiết hữu cơ, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô phần dịch lọc để thu được phần cạn màu da cam. Tinh chế nguyên liệu thô bằng phương pháp sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng 5% MeOH/DCM để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (205 mg, 78%) ở dạng chất rắn màu vàng. ES/MS (m/z): 543,2 (M+H).

Điều chế các hợp chất sau theo cách cơ bản tương tự như phương pháp trong ví dụ điều chế 6, với các thay đổi sau trong quy trình, thời gian gia nhiệt nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ, chiết bằng MTBE hoặc EtOAc, và làm khô các lớp hữu cơ trên magie sulfat hoặc natri sulfat. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel sử dụng tới 10% (MeOH hoặc 7M MeOH được amoniác hóa) trong DCM (ví dụ điều chế 10: gradien 3-8% 7M MeOH được amoniác hóa trong DCM; các ví dụ điều chế 9 và 11: gradien 4 đến 10% 7M MeOH được amoniác hóa trong DCM) và/hoặc bằng phương

pháp sắc ký pha đảo pH cao như đã lưu ý.

Bảng 2: Các hợp chất được điều chế theo ví dụ điều chế 6

Ví dụ điều chế số	Tên hóa học	Cấu trúc	ES/MS (m/z) (M+H)
7	(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl){3-[2-fluoro-3-(triflometyl)phenyl]-7-hydroxyquinolin-4-yl}metanon		543,0
8 ^a	[3-(4-clo-2-flophenyl)-7-hydroxyquinolin-4-yl](4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)metanon		509,0
9 ^b	[3-(3-clo-2-flophenyl)-7-hydroxyquinolin-4-yl](4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)metanon		509,0
10	[3-(2,4-Diflophenyl)-7-hydroxyquinolin-4-yl](4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)metanon		493,0
11	[3-(2,3-Diflophenyl)-7-hydroxyquinolin-4-yl](4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)metanon		493,0

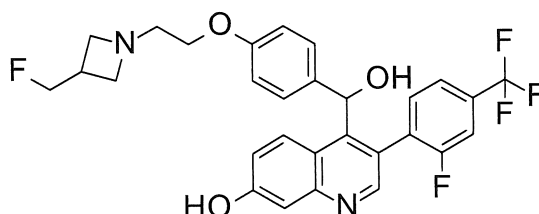
12	(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)[3-(2-flo-4-metylphenyl)-7-hydroxyquinolin-4-yl]metanon		489,2
13	(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)[3-(2-flo-3-metylphenyl)-7-hydroxyquinolin-4-yl]metanon		489,2

^aTinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh pha đảo pH cao (cột C18 hiệu năng cao RediSep Rf GOLD®, rửa giải bằng 35-45% ACN trong 10 mM dung dịch nước amoni bicacbonat với 5% MeOH).

^bSau khi tinh chế trên silic oxit, rửa giải bằng 4-10% 7M MeOH được amoni hóa trong DCM, tinh chế thêm bằng phương pháp sắc ký nhanh pha đảo pH cao (cột C18 cột hiệu năng cao RediSep Rf GOLD®, rửa giải bằng 30-44% ACN trong 10 mM dung dịch nước amoni bicacbonat với 5% MeOH).

Ví dụ điều chế 14

4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl(hydroxy)metyl]-3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]quinolin-7-ol raxemic

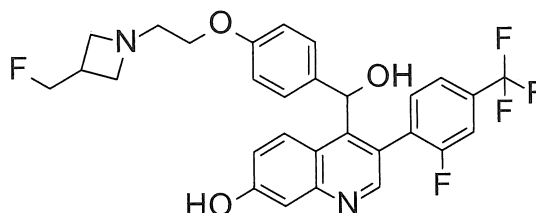


Bổ sung (4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl){3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]-7-hydroxyquinolin-4-yl}metanon (305 g, 562,2 mmol) và THF (1,5 L) cùng nhau trong môi trường N₂ và làm lạnh dung dịch xuống nhiệt độ 0 đến 5°C. Bổ sung lithi trietylbo hydrua (1 M trong THF, 1,5 L, 1,5 mol) theo từng giọt.

Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 0 đến 5°C trong 1 giờ. Bổ sung nước (300 mL) theo từng giọt và NH₄Cl bão hòa (1 L). Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ trong phòng. Bổ sung EtOAc (2 L) và thu gom lớp hữu cơ. Rửa lớp hữu cơ bằng nước muối (500 mL), làm khô trên MgSO₄, lọc, và cô tới trạng thái khô. Hòa tan phần cặn trong hỗn hợp theo tỷ lệ 95:5 của axeton và 2M amoniac trong MeOH và lọc qua silicagel để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (264 g, 86,2%) ở dạng chất rắn màu da cam. ES/MS (m/z): 545,2 (M+H).

Ví dụ điều chế 15

4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)(hydroxy)metyl]-3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]quinolin-7-ol, chất đồng phân 1



Tinh chế 4-{2-[3-flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)(hydroxy)metyl]-3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]quinolin-7-ol raxemic (354 g, 0,62 mol) sử dụng sắc ký không đối xứng trong các điều kiện sau: Cột Chiralpak AD-H, 150 x 50 mm, tốc độ dòng 300 g/phút, UV 350 nm, pha động 35% iPrOH với 0,5% DMEA/CO₂, nhiệt độ cột 40°C để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (171,4 g, 48%) của chất đồng phân rửa giải thứ nhất. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 1 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >98% ee, t_(R) = 0,79 phút, cột: 4,6 x 150 mm Chiralpak AD-H, rửa giải bằng pha động bằng 35% iPrOH với 0,5% DMEA trong CO₂, tốc độ dòng là 0,6 mL/phút, phát hiện UV tại 350 nm.

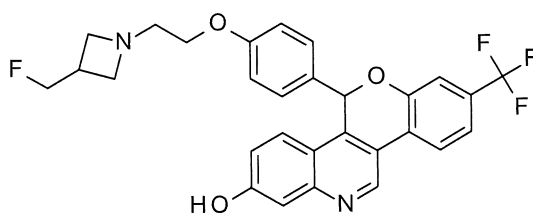
Ví dụ điều chế 15 theo cách khác

Bổ sung trimetyl borat (65 mg, 0,62 mmol) vào dung dịch của (R)-(+)-α.α-diphenyl-2-pyrolidinemetanol (132 mg, 0,52 mmol) trong THF (20 mL). Khuấy hỗn hợp trong môi trường N₂ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Bổ sung boran-dimetylsulfua (2,0 M trong THF, 2,6 mL, 5,2 mmol) tiếp theo bằng (4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl){3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]-7-

hydroxyquinolin-4-yl}metanon (1,0 g, 1,73 mmol). Gia nhiệt phản ứng qua đêm ở nhiệt độ 45°C. Bổ sung thêm boran-dimetylsulfua (2,0 M trong THF, 2,6 mL, 5,2 mmol) và khuấy trong 5 giờ ở nhiệt độ 45°C. Bổ sung từ từ dung dịch NH₄Cl bão hòa (25 mL) và tách pha hữu cơ. Chiết lại phần chiết chứa nước bằng 20% iPrOH/CHCl₃. Kết hợp các phần chiết hữu cơ, làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và làm bay hơi để thu được hợp chất trung gian phức boran (1,2 g). Hòa tan một phần ba lượng hợp chất trung gian phức boran (0,4 g, 0,6 mmol) trong 1,4-dioxan (4 mL) và etanolamin (0,3 mL, 5 mmol) và gia nhiệt phản ứng đến nhiệt độ 70°C trong 3 giờ. Làm dừng phản ứng bằng dung dịch NH₄Cl bão hòa (25 mL) và tách pha hữu cơ. Chiết lại phần chiết chứa nước bằng 20% iPrOH/CHCl₃ (4 x 25 mL). Kết hợp các phần chiết hữu cơ, làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và cô tới trạng thái khô để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề ở dạng chất rắn màu da cam (0,33 g, 0,57 mmol, hiệu suất 100%). LC/MS (m/z): [M+H]⁺ 545. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 1 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, 96% ee, t_(R) = 0,79 phút, cột: 4,6 × 150 mm Chiralpak AD-H, rửa giải bằng pha động bằng 35% iPrOH với 0,5% DMEA trong CO₂, tốc độ dòng là 0,6 mL/phút, phát hiện UV tại 350 nm.

Ví dụ 1

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

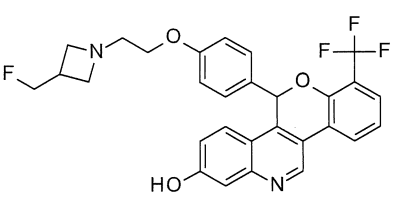


Làm lạnh dung dịch của (4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl){3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]-7-hydroxyquinolin-4-yl}metanon (5,27 g, 9,71 mmol) trong 1,4-dioxan (100 mL) xuống nhiệt độ 5°C. Bổ sung lithi trietylbo hydrua (1 M trong THF, 30,0 mL, 30,0 mmol). Loại bỏ bể làm lạnh và khuấy trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Làm dừng hỗn hợp bằng nước. Bổ sung dung dịch NH₄Cl bão hòa và EtOAc. Tách các lớp và chiết lớp nước bằng EtOAc. Kết hợp các phần chiết hữu cơ, làm khô trên MgSO₄ khan, lọc, và cô phần dịch lọc. Hòa tan phần cặn thô trong THF

(100 mL). Bổ sung natri hydrua (60% trong dầu khoáng, 1,94 g, 48,5 mmol). 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. Làm lạnh dung dịch xuống nhiệt độ trong phòng và làm dừng bằng nước. Bổ sung EtOAc và dung dịch NH_4Cl bão hòa. Tách các lớp và chiết lớp nước bằng EtOAc. Kết hợp phần chiết hữu cơ, làm khô trên MgSO_4 khan, lọc, và cô phần dịch lọc. Tinh chế phần cặn bằng phương pháp sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng gradien của 5-7% MeOH trong DCM để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (3,70 g, 72%) ở dạng bột màu vàng nhạt. ES/MS (m/z): 525,2 (M+H).

Điều chế các hợp chất sau theo cách cơ bản tương tự như phương pháp trong ví dụ 1, với những thay đổi sau trong quy trình. Để khử, sử dụng 3 đến 5 đương lượng của lithi triethylbo hydrua với thời gian phản ứng từ 30 phút đến một giờ và làm khô các lớp hữu cơ trên magie sulfat hoặc natri sulfat. Sử dụng phần cặn thô trực tiếp hoặc tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng gradien của 0-5-7,5-10% MeOH trong DCM trước khi đóng vòng. Hoàn thành quá trình đóng vòng bằng cách hồi lưu trong THF trong thời gian lên đến 16 giờ, hoặc trong DMF, từ 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng đối với ví dụ 2, tới 2 giờ ở nhiệt độ 85°C đối với ví dụ 8. Chiết bằng DCM hoặc EtOAc và làm khô các lớp hữu cơ trên magie sulfat hoặc natri sulfat. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel sử dụng tới 10% (MeOH hoặc 7M MeOH được amoniác hóa) trong DCM (ví dụ 2: gradien 0-10% MeOH trong DCM; ví dụ 5: gradien 4-10% 7M MeOH được amoniác hóa trong DCM; ví dụ 8: gradien 5-7,5% 7M MeOH được amoniác hóa trong DCM) hoặc bằng HPLC pha đảo pH cao như đã lưu ý.

Bảng 3: Các hợp chất ví dụ được điều chế theo ví dụ 1

Ví dụ số	Tên hóa học	Cấu trúc	ES/MS (m/z) (M+H)
2	5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol raxemic		525,2

3 ^a	8-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol raxemic		491,0
4 ^b	7-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol raxemic		491,0
5 ^c	8-flo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol raxemic		475,0
6 ^d	7-flo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol raxemic		475,0
7 ^e	5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-metyl-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol raxemic		471,2
8	5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-metyl-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol raxemic		471,2

^aTinh chế bằng HPLC pha đảo pH cao (cột KINETEX® C18, 5µm, 30 × 250 mm, rửa giải bằng 35-50% ACN trong 10 mM dung dịch nước amoni bicacbonat với 5% MeOH).

^bTinh chế bằng HPLC pha đảo pH cao (cột KINETEX® C18, 5µm, 30 × 250 mm, rửa giải bằng 35-43% ACN trong 10mM dung dịch nước amoni bicacbonat với 5% MeOH)

^cSau khi tinh chế trên silic oxit, rửa giải bằng 4-10% 7M MeOH được amoniac hóa trong DCM, tinh chế thêm bằng HPLC pha đảo pH cao (cột KINETEX® C18, 5µm, 30 × 250 mm, rửa giải bằng 30-44% ACN trong 10mM dung dịch nước amoni bicacbonat với 5% MeOH).

^dTinh chế bằng HPLC pha đảo pH cao (cột XBRIDGE® C18 5µm OBD, 30 × 75 mm, rửa giải bằng 10-75% ACN trong 10mM dung dịch nước amoni bicacbonat với 5% MeOH).

^etinh chế by HPLC pha đảo pH cao (cột XBRIDGE® C18 5 µm OBD, 30 × 75 mm, rửa giải bằng 10-60% ACN trong 10mM dung dịch nước amoni bicacbonat với 5% MeOH).

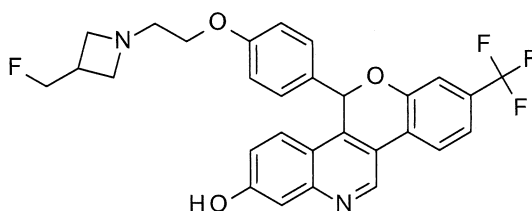
Ví dụ 1A

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

và

Ví dụ 1B

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



Tách hai chất đồng phân đối ảnh của 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol bằng phương pháp SFC không đối xứng với các điều kiện sau: Cột: LUX® Cellulose-1, 5 × 25 cm; rửa giải bằng pha động là 30% iPrOH (với 0,5% DMEA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 300 g/phút; bước sóng phát hiện UV: 270 nm để thu được hợp chất

trong ví dụ 1A ở dạng chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 525,2 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 1 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, $t_{(R)}$: 1,30 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, $4,6 \times 150$ mm; rửa giải bằng pha động là 30% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm. Tách hợp chất nêu ở phần tiêu đề trong ví dụ 1B để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 525,2 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 2 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, 98% ee, $t_{(R)}$: 2,03 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, $4,6 \times 150$ mm; rửa giải bằng pha động là 30% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm.

Ví dụ điều chế 1B theo cách khác

Hợp chất 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol kết tinh, chất đồng phân 2

Khuấy 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, axit 4-metylbenzensulfonic, chất đồng phân 2 (23,8 g, 0,034 mol) trong nước (250 mL) ở tốc độ 1000 vòng/phút. Bổ sung NaOH (76 μ L) và khuấy dung dịch trong 2 giờ. Bổ sung DCM (600 mL). Tách hỗn hợp, làm khô phần chiết DCM bằng magie sulfat, lọc nguyên liệu qua bộ lọc xi-lanh (0,45 μ m), và cô tới trạng thái khô. Để yên nguyên liệu dưới dòng N₂ trong thời gian cuối tuần. Bổ sung EtOH/nước theo tỷ lệ 1:1 (80 mL) và khuấy hỗn hợp bằng siêu âm. Thu gom chất rắn màu nâu vàng bằng cách lọc trên màng nylon để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (10,47 g, 0,02 mol, 59%).

Nhiều xạ bột tia X (X-Ray Powder Diffraction - XRD)

Mô hình nhiễu xạ XRPD của các chất rắn kết tinh thu được trên thiết bị nhiễu xạ bột tia X Bruker D4 Endeavor, có trang bị nguồn CuK α và bộ dò Vantec, vận hành ở điện thế 35 kV và cường độ 50 mA. Mẫu được quét trong khoảng góc nhiễu xạ 2θ từ 4 đến 40°, với kích thước bước góc nhiễu xạ 2θ là 0,008° và tốc độ quét là 0,5 giây/bước, và sử dụng độ phân kỳ 1,0 mm, bộ chống tán xạ cố định 6,6 mm, và các khe dò 11,3 mm. Bột khô được đưa lên bộ chứa mẫu bằng thạch anh và bề mặt tron

thu được bằng cách sử dụng con trượt thủy tinh. Nhiều xạ đồ dạng tinh thể được thu thập ở nhiệt độ môi trường xung quanh và độ ẩm tương đối. Các vị trí đỉnh tinh thể được xác định trong dụng cụ MDI-Jade sau khi toàn bộ dịch chuyển mẫu trên cơ sở chất chuẩn nội NIST 675 với các đỉnh ở 8,853 và 26,774 2 θ . Đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì cường độ tương đối của các đỉnh nhiễu xạ có thể thay đổi do sự định hướng được ưu tiên xuất phát từ các yếu tố như hình thái tinh thể hoặc dạng tinh thể. Khi xuất hiện tác động của sự định hướng được ưu tiên, thì cường độ đỉnh bị thay đổi, nhưng các vị trí đỉnh đặc trưng của dạng đa hình là không thay đổi. Chẳng hạn, xem trong tài liệu The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995. Ngoài ra, cũng đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì các vị trí đỉnh ở góc có thể thay đổi một chút. Chẳng hạn, các vị trí đỉnh có thể dịch chuyển do biến đổi nhiệt độ mà mẫu được phân tích tại đó, sự thay thế mẫu, hoặc sự có mặt hoặc không có mặt chất chuẩn nội. Trong trường hợp này, biến thiên vị trí đỉnh là $\pm 0,2$ 2 θ được coi là có tính đến các biến thiên tiềm năng này gây cản trở việc xác định rõ ràng dạng tinh thể được chỉ ra. Cấu hình của dạng tinh thể có thể được tạo ra dựa trên dạng kết hợp đơn nhất các đỉnh phân biệt.

Mô tả đặc điểm mẫu điều chế của 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol kết tinh, chất đồng phân 2 bằng kiểu XRD sử dụng nguồn phát xạ CuK α có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2-theta) như được mô tả trong bảng 3 dưới đây, và cụ thể, có các đỉnh tại 19,8 kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm 6,8, 16,0, và 22,1; với dung sai đối với các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Bảng 4: Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của hợp chất kết tinh ví dụ 1B

Đỉnh	Góc ($^{\circ}$ 2-Theta) $\pm 0,2^{\circ}$	Cường độ tương đối (% đỉnh cường độ cao nhất)
1	6,8	29,40
2	15,3	8,30
3	16,0	20,10
4	17,4	7,60
5	18,1	16,00
6	19,8	100,00
7	21,1	14,60

8	22,1	28,90
9	24,9	16,40
10	25,4	21,90

Ví dụ điều chế 1B theo cách khác

Hòa tan 4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl(hydroxy)metyl]-3-[2-flo-4-(triflometyl)phenyl]quinolin-7-ol, chất đồng phân 1 (63,05 g, 104,7 mmol) trong DMSO (1,3 L) trong môi trường N₂ ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung theo từng phần xesi cacbonat (108 g, 331 mmol) trong 5 phút. Gia nhiệt hỗn hợp này đến 60 °C trong 15 giờ. Làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng và pha loãng bằng nước (2,1 L) và EtOAc (1,3 L). Khuấy hỗn hợp trong 5 phút và tách. Chiết lại nguyên liệu chứa nước bằng EtOAc (1,3 L) và khuấy trong 5 phút. Tách và kết hợp các phần chiết hữu cơ, rửa bằng nước muối, nước, và EtOAc. Làm khô các phần chiết hữu cơ bằng MgSO₄, cô, và làm khô trong môi trường chân không cao qua đêm ở nhiệt độ trong phòng để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề ở dạng chất rắn màu nâu (52,69 g, 95,9%). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của hợp chất trong ví dụ 1B bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, 98,1% ee, *t*_(R): 2,03 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động là 30% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm.

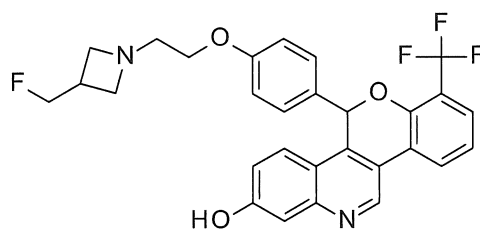
Ví dụ 2A

5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 1

và

Ví dụ 2B

5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2



Tách hai chất đồng phân đối ảnh của 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol bằng phương pháp SFC không đối xứng với các điều kiện sau: Cột: CHIRALPAK® IC, 21×250 cm; rửa giải bằng pha động gồm 30% iPrOH (với 0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 70 g/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm để thu được hợp chất ví dụ 2A ở dạng chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 525,1 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 1 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, $t_{(R)}$: 1,56 phút; cột: CHIRALPAK® IC, $4,6 \times 150$ mm; rửa giải bằng pha động gồm 30% iPrOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm. Tách hợp chất nêu ở phần tiêu đề trong ví dụ 2B để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 525,2 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 2 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, 98% ee, $t_{(R)}$: 2,33 phút; cột: CHIRALPAK® IC, $4,6 \times 150$ mm; rửa giải bằng pha động gồm 30% iPrOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm.

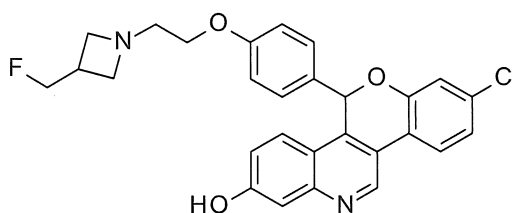
Ví dụ 3A

8-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 1

và

Ví dụ 3B

8-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2



Tách hai chất đồng phân đối ảnh của 8-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol bằng phương pháp SFC không đối xứng với các điều kiện sau: Cột: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; rửa giải bằng pha động gồm 35% MeOH (với 0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 80 g/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm để thu được hợp chất trong ví dụ 3A ở dạng chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 1 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, *t*_(R): 1,55 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động là 35% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm. Tách hợp chất nêu ở phần tiêu đề trong ví dụ 3B để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 2 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, *t*_(R): 2,26 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động là 35% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm.

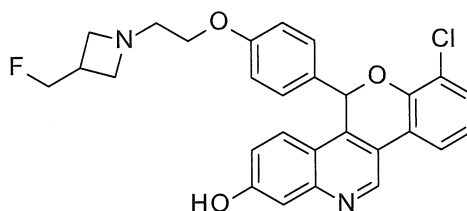
Ví dụ 4A

7-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 1

và

Ví dụ 4B

7-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2



Tách hai chất đồng phân đối ảnh của 7-clo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol bằng phương pháp SFC không đối xứng với các điều kiện sau: Cột: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; rửa giải bằng pha động gồm 35% MeOH (với 0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 80 g/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm để thu được hợp chất trong ví dụ 4A ở dạng chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 1 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, *t*_(R): 1,71 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động là 35% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm. Tách hợp chất nêu ở phần tiêu đề trong ví dụ 4B để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 2 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, *t*_(R): 2,38 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động là 35% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm.

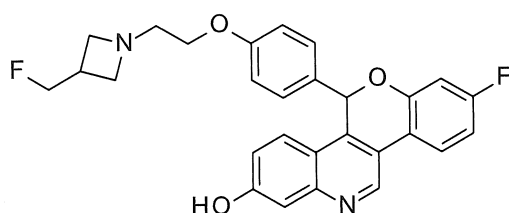
Ví dụ 5A

8-flo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 1

và

Ví dụ 5B

8-flo-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2



Tách hai chất đồng phân đối ảnh của 8-flu-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol bằng phương pháp SFC không đối xứng với các điều kiện sau: Cột: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; rửa giải bằng pha động gồm 30% MeOH (với 0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 80 g/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm để thu được hợp chất trong ví dụ 5A ở dạng chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 1 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, *t*_(R): 1,56 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động là 30% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm. Tách hợp chất nêu ở phần tiêu đề trong ví dụ 5B để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 2 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, *t*_(R): 2,29 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động là 30% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm.

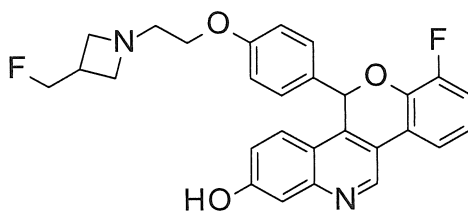
Ví dụ 6A

7-flu-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 1

và

Ví dụ 6B

7-flu-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2



Tách hai chất đồng phân đối ảnh của 7-flu-5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol bằng phương pháp SFC không đối xứng với các điều kiện sau: Cột: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; rửa giải bằng pha động gồm 35% MeOH (với 0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 80 g/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm để thu được hợp chất trong ví dụ 6A ở dạng chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 1 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, *t*_(R): 1,32 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động là 35% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm. Tách hợp chất nêu ở phần tiêu đề trong ví dụ 6B để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 2 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, *t*_(R): 1,95 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động là 35% MeOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm.

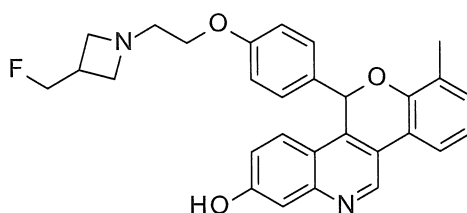
Ví dụ 8A

5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-metyl-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 1

và

Ví dụ 8B

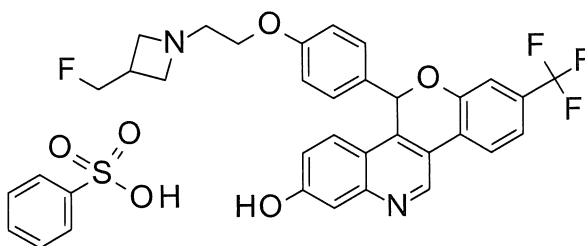
5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-metyl-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2



Tách hai chất đồng phân đối ảnh của 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-7-metyl-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol bằng phương pháp SFC không đối xứng với các điều kiện sau: Cột: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; rửa giải bằng pha động gồm 30% iPrOH (với 0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 80 g/phút; bước sóng phát hiện UV: 265 nm để thu được hợp chất trong ví dụ 8A ở dạng chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 471,2 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 1 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, *t*_(R): 1,47 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động gồm 30% iPrOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm. Tách hợp chất nêu ở phần tiêu đề trong ví dụ 8B để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 471,2 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của chất đồng phân 2 bằng phương pháp SFC phân tích bất đối xứng, >99% ee, *t*_(R): 2,05 phút; cột: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; rửa giải bằng pha động gồm 30% iPrOH (0,2% IPA) trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 5 mL/phút; bước sóng phát hiện UV: 225 nm.

Ví dụ 9

5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2, axit benzensulfonic



Gia nhiệt huyền phù đặc của 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2 (ví dụ 1B) (100 mg, 0,19 mmol) trong ACN (3 mL) ở nhiệt độ 50°C. Bổ sung dung dịch của axit benzensulfonic monohydrat (40 mg, 0,23 mmol) trong ACN (1 mL). Gia nhiệt dung dịch màu vàng trong 10 phút ở nhiệt độ 50°C. Ngừng gia nhiệt, cho hỗn hợp phản ứng làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng, và khuấy hỗn hợp qua đêm. Bổ sung toluen (2 mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng 2 giờ. Lọc dung dịch, thu gom chất rắn tạo ra và rửa chất rắn bằng ACN (1 mL). Làm khô chất rắn trong chân không để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (74 mg, 55%).

Ví dụ điều chế 9 theo cách khác

Gia nhiệt huyền phù đặc của 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2 (ví dụ 1B) (124,1 mg, 0,24 mmol) trong MEK (4 mL) ở nhiệt độ 50°C. Bổ sung dung dịch của monohydrat axit benzensulfonic (50 mg, 0,28 mmol) hòa tan trong MEK (1 mL). Ngừng gia nhiệt, cho hỗn hợp phản ứng làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng, và khuấy hỗn hợp trong thời gian cuối tuần. Cô dưới dòng N₂. Bổ sung MEK (1 mL) và huyền phù đặc để thu được chất rắn kết tinh màu vàng. Thu gom chất rắn, rửa bằng MEK, và làm khô trong môi trường chân không ở nhiệt độ trong phòng để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (78,8 mg, 48%).

XRD, ví dụ 9

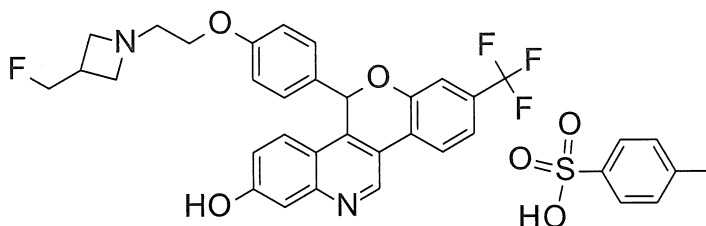
Hoàn thành XRD như được mô tả trong ví dụ 1B. Mô tả đặc điểm mẫu điều chế của -(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2, axit benzensulfonic bằng kiểu XRD sử dụng nguồn phát xạ CuK α có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2-theta) như được mô tả trong bảng 4 dưới đây, và cụ thể, có các đỉnh tại 20,5 kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm 12,3, 22,2, và 23,1; với dung sai đối với các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Bảng 5: Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của hợp chất kết tinh trong ví dụ 9

Đỉnh	Góc ($^{\circ}$ 2-Theta) $\pm$ 0,2 $^{\circ}$	Cường độ tương đối (% của đỉnh có cường độ lớn nhất)
1	7,6	27,10
2	10,6	34,50
3	12,3	42,10
4	12,6	32,30
5	17,7	32,80
6	19,2	26,70
7	20,5	100,00
8	22,2	45,50
9	23,1	36,30
10	24,2	29,80

Ví dụ 10

Hợp chất 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, axit 4-metylbenzensulfonic kết tinh, chất đồng phân 2



Bổ sung 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, chất đồng phân 2 (ví dụ 1B) (204,2 g, 389 mmol) và EtOAc (5 L) cùng nhau và khuấy ở nhiệt độ 60 $^{\circ}$ C, tiếp theo bằng cách bổ sung MeOH (200 mL) ở nhiệt độ 60 $^{\circ}$ C để thu được dung dịch trong màu nâu. Bổ sung sản phẩm nêu ở phần tiêu đề (11,48 g) để gieo mầm kết tinh dung dịch, tiếp theo bằng cách bổ sung dung dịch trộn trước của axit 4-metylbenzensulfonic; hydrat (81,4 g, 428 mmol) trong EtOAc (800 mL) để thu được huyền phù màu vàng. Khuấy huyền phù trong 30 phút ở nhiệt độ 50 $^{\circ}$ C. Cô huyền phù còn ½ thể tích. Làm lạnh dung dịch ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, lọc, thu gom chất rắn, và rửa chất rắn bằng EtOAc. Làm khô chất rắn trong chân không ở nhiệt độ 30 $^{\circ}$ C trong thời gian cuối tuần để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (239 g, 343 mmol). Để tinh chế thêm nguyên liệu, bổ sung hợp chất nêu ở phần tiêu đề (229 g, 328,7 mmol) và 2-propanol (4,6 L) cùng

nhau và gia nhiệt tới 60°C trong 2 giờ. Làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Lọc chất rắn và rửa bằng iPrOH (100 mL). Làm khô chất rắn dưới dòng N₂ qua đêm để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (174,4 g, 76,2%). Kết hợp các mẻ khác nhau của hợp chất nêu ở phần tiêu đề được điều chế cơ bản theo cách tương tự và bổ sung heptan (2 L). Khuấy huyền phù trong 30 phút, lọc chất rắn, và rửa bằng heptan (300 mL). Làm khô chất rắn thu gom dưới dòng N₂ qua đêm để thu được hợp chất nêu ở phần tiêu đề (199,7 g, 99,5%).

XRD, ví dụ 10

Hoàn thành XRD như được mô tả trong ví dụ 1B. Mẫu điều chế của 5-(4-{2-[3-(flometyl)azetidin-1-yl]etoxy}phenyl)-8-(triflometyl)-5H-[1]benzopyrano[4,3-c]quinolin-2-ol, axit 4-metylbenzensulfonic, chất đồng phân 2 (ví dụ 10) được mô tả đặc trưng bằng kiểu XRD sử dụng nguồn phát xạ CuK α có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2-theta) như được mô tả trong bảng 5 dưới đây, và cụ thể, có các đỉnh tại 20,1 kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm 12,8, 19,5, và 22,8; với dung sai đối với các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Bảng 6: Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của hợp chất kết tinh ví dụ 10

Đỉnh	Góc (°2-Theta) +/- 0,2°	Cường độ tương đối (% của đỉnh có cường độ lớn nhất)
1	7,6	25,70
2	12,4	27,90
3	12,8	36,80
4	18,9	26,50
5	19,5	56,90
6	20,1	100,00
7	20,9	41,50
8	21,8	40,90
9	22,8	39,40
10	25,4	29,70

Thử nghiệm sinh học

Bằng chứng về mối quan hệ giữa sự biểu hiện ER và các bệnh ung thư xác định đã được biết rõ trong lĩnh vực.

Kết quả của các thử nghiệm sau đây chứng minh rằng, các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III trong các ví dụ là các chất SERD hoạt tính và được hiểu là hữu dụng trong điều trị bệnh ung thư.

Thử nghiệm gắn kết cạnh tranh ER α (kiểu đại), ER α (đột biến Y537S) và ER β

Mục đích của các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh ER sau là để xác định ái lực của hợp chất thử nghiệm đối với ER α (kiểu đại), ER α (đột biến Y537S), và ER β .

Tiến hành chạy thử nghiệm gắn kết cạnh tranh trong dung dịch đệm chứa 50 mM HEPES, pH 7,5, 1,5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glyxerol, 1 mg/mL ovalbumin, và 5 mM DTT, sử dụng 0,025 μ Ci trên mỗi lỗ 3 H-estradiol (118 Ci/mmol, 1 mCi/mL), 7,2 ng/lỗ ER α (kiểu đại), hoặc 7,2 ng/lỗ ER α (đột biến Y537S) hoặc 7,7 ng/lỗ thụ thể ER β . 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 sự liên kết không đặc hiệu với sự có mặt của 1 μ M 17- β estradiol. Ủ phản ứng gắn kết (140 μ L) trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó bổ sung dung dịch đệm dextran-than lạnh (70 μ L) (chứa mỗi 50 mL dung dịch đệm thử nghiệm, 0,75 g than và 0,25 g dextran) vào mỗi một phản ứng. Trộn các đĩa trong 8 phút trên máy lắc quỹ đạo ở nhiệt độ 4 °C và sau đó ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút ở nhiệt độ 4 °C trong 10 phút. Chuyển phần phân ước (120 μ L) của hỗn hợp sang đĩa đáy phẳng màu trắng 96 lỗ khác (Costar) và bổ sung dịch nhấp nháy Perkin Elmer Optiphase Supermix (175 μ L) vào mỗi một 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 toán IC₅₀ bằng cách sử dụng phương pháp khớp đường cong logistic 4 thông số và tính toán % ức chế ở mức 10 μ M. Chuyển đổi các trị số IC₅₀ của hợp chất thành K_i bằng cách sử dụng phương trình Cheng-Prusoff. Các kết quả của thử nghiệm này chứng minh các ví dụ 1, 1A, và 1B (và các ví dụ khác) gắn kết với ER α kiểu đại và ER α đột biến (Y537S) tái tổ hợp như được thể hiện trong bảng 7 dưới đây và ví dụ 1B cũng được xác định là gắn kết với ER β với K_i (nM) cạnh tranh ER β là $0,11 \pm 0,07$, n=3.

Bảng 7: Các kết quả gắn kết cạnh tranh ER α (kiểu đại), ER α (đột biến Y537S) và ER β

Ví dụ số	K _i (nM) ER α (kiểu đại)	K _i (nM) ER α (đột biến Y537S)
1	0,87	5,80
1A	12,45 $\pm$ 9,32, n=3	57,18 $\pm$ 39,13, n=3
1B	0,31 $\pm$ 0,38, n=5	2,79 $\pm$ 3,00, n=5
2	2,17	6,78
2A	0,65	7,92
2B	60,4	293,6
3	2,36	6,69
3A	8,11	27,23
3B	0,59	2,79
4	0,64	12,11
4A	16,78	54,97
4B	0,34	2,34
5	2,82	19,47
5A	12,54	81,15
5B	1,30	6,56
6	4,14	15,77
6A	8,53	45,99
6B	1,13	5,71
7	1,55	8,55
8	3,20	11,4
8A	9,33	66,94
8B	0,94	5,44

Trong số các hợp chất minh họa được thử nghiệm, K_i đối với ER α kiểu đại nằm trong khoảng từ khoảng 0,300 nM đến khoảng 65 nM. K_i đối với đột biến ER α Y537S nằm trong khoảng từ khoảng 2 nM đến 300 nM. Các kết quả của thử nghiệm này chứng minh ái lực gắn kết và hiệu lực của các hợp chất minh họa đối với các protein

ER α kiểu đại, đột biến (ESR1 Y537S) và ER β .

Thử nghiệm thoái biến ER α trong các tế bào MCF7

Mục đích của thử nghiệm thoái biến ER α sau là để đo sự thoái biến của ER α bởi hợp chất thử nghiệm ở dòng tế bào ung thư vú dương tính với ER α 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 1 của người và 1% kháng sinh penicillin/streptomycin và đặt trong các đĩa đáy phẳng 384 lỗ ở mật độ 4000 tế bào mỗi lỗ trong môi trường DMEM không chứa đồ phenol (20 μ l) chứa 10% FBS được tách bằng than. Ủ tế bào qua đêm trong tủ ủ nuôi cấy tế bào (5% CO₂, độ ẩm tương đối 95% và 37°C) và để cho các tế bào bám dính vào đĩa. Ngày tiếp theo, định liều tế bào bằng hợp chất thử nghiệm. Sử dụng bộ định lượng âm Echo 555 để điều chế các dịch pha loãng hàng loạt của hợp chất thử nghiệm (1:3) trong khoảng từ 6 μ M đến 0,0003 μ M. Định liều các tế bào bằng cách bổ sung 5 μ L từ đĩa pha loãng hàng loạt 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 μ 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 μ M trong môi trường phát triển chứa 0,2% DMSO. Sau khi định liều bằng hợp chất thử nghiệm, ủ các đĩa tế bào ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ trong 24 giờ. Cố định tế bào bằng cách bổ sung 14% para-formaldehyt (10 μ L) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa tế bào một lần bằng PBS (20 μ l) và ủ với PBS (20 μ 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 $\times$) và phong bế bằng 3% BSA trong PBS chứa 0,05% TWEEN® 20 và 0,1% TRITON™ X-100 (20 μ L/lỗ) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung dung dịch pha loãng tỷ lệ 1:500 của kháng thể sơ cấp (20 μ L) (kháng thể đơn dòng ER α (Clone SP1) #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 nhiệt độ 4°C. Ngày hôm sau, rửa tế bào bằng PBS chứa 0,05% TWEEN® 20 (2 $\times$) và ủ với kháng thể thứ cấp (20 μ L/lỗ) (pha loãng tỷ lệ 1:1000, IgM dê kháng thể ALEXA FLUOR™ 488) trong PBS 1% BSA trong thời gian 105 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa các đĩa bằng PBS (2 $\times$ 20 μ L), bổ sung RNase (Sigma) (20 μ L của 50

$\mu\text{g/mL}$) và dung dịch pha loãng propidium 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 vệ tránh ánh sáng). Quét các đĩa bằng thiết bị ACUMEN EXPLORER™ [thiết bị đếm tế bào vi đĩa huỳnh quang quét laze được sản xuất bởi TTP LABTECH LTD] để đo $\text{ER}\alpha$. Phân tích hình ảnh được dựa trên tín hiệu huỳnh quang tế bào để nhận diện các tế bào dương tính. Nhận diện các tế bào dương tính với ER bằng cường độ trung bình. Sử dụng tổng cường độ tại 575-640 nm từ propidium iodua/ADN để nhận diện các tế bào riêng biệt. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính với ER. Xác định IC_{50} bằng cách khớp đường cong vào logistic 4 thông số đối với mỗi đầu ra bằng cách sử dụng GENE DATA™. Các kết quả của thử nghiệm này chứng minh sự thoái biến hiệu quả của $\text{ER}\alpha$ được cảm ứng bởi các hợp chất có công thức I, công thức II, và công thức III như được mô tả ở đây trong các tế bào ung thư vú MCF7. Các trị số IC_{50} tương đối của các ví dụ 1, 1A, và 1B được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8: Thử nghiệm thoái biến $\text{ER}\alpha$ trong các tế bào MCF7

Ví dụ số	Trị số IC_{50} tương đối (μM)
1	$0,003405 \pm 0,001086$, n=3
1A	$0,3940 \pm 0,1941$, n=4
1B	$0,003088 \pm 0,001523$, n=19
2	$0,05220 \pm 0,006508$, n=2
2A	$0,05125 \pm 0,01626$, n=2
2B	>2
3	$0,03347 \pm 0,007830$, n=3
3A	0,3905
3B	0,008664
4	$0,02241 \pm 0,0003553$, n=3
4A	0,4998
4B	0,006892
5	$0,03653 \pm 0,03738$, n=2
5A	0,5221

5B	$0,009493 \pm 0,001103, n=2$
6	$0,05086 \pm 0,006889, n=3$
6A	0,1753
6B	0,009132
7	$0,07879 \pm 0,007379, n=2$
8	$0,01738 \pm 0,008752, n=2$
8A	0,2341
8B	$0,009617 \pm 0,005198, n=2$
10	$0,004216 \pm 0,001619, n=5$

Cụ thể, các kết quả trong bảng 7 thể hiện sự thoái biến hiệu quả của ER α bởi hợp chất trong ví dụ 1 ở các tế bào ung thư vú MCF7. Trong số các hợp chất minh họa được thử nghiệm, trị số IC₅₀ tương đối nằm trong khoảng từ 0,003 đến >2 μ M chỉ ra rằng, tất cả trừ ví dụ 2B thể hiện hoạt tính ở nồng độ thử nghiệm. Các kết quả của thử nghiệm này chứng minh rằng, hợp chất có công thức (I) là SERD với hoạt tính thoái biến ER α hiệu lực trong các tế bào.

Thử nghiệm cảm ứng PR α trong các tế bào MCF7

Mục đích của thử nghiệm cảm ứng PR α sau là để xác định xem hợp chất thử nghiệm có hoạt tính chủ vận đối với thụ thể ER α hay không (chất chủ vận được kỳ vọng kích hoạt thụ thể).

Nuôi cấy MCF7 (được mua từ ATCC HTB-22) trong môi trường DMEM được bổ sung 10% FBS, 0,01 mg/ml insulin 1 của người và 1% thuốc kháng sinh penicillin/streptomycin và cấy các tế bào (trước khi trở nên hợp dòng 70%) vào trong các đĩa đáy phẳng 384 lỗ ở mật độ 4000 tế bào mỗi lỗ với 20 μ L thể tích trong môi trường DMEM không chứa đỏ phenol chứa 10% FBS (được tách bằng than). Ủ tế bào qua đêm trong tủ ủ nuôi cấy tế bào (5% CO₂, độ ẩm tương đối 95% ở nhiệt độ 37°C) và để cho các tế bào bám dính vào đĩa. Ngày tiếp theo, định liều các tế bào bằng hợp chất thử nghiệm. Sử dụng bộ định lượng âm Echo 555 để điều chế các dịch pha loãng hàng loạt của hợp chất (1:3) trong khoảng từ 6 μ M đến 0,0003 μ M. Định liều các tế bào bằng cách bổ sung hợp chất thử nghiệm (5 μ L) từ đĩa pha loãng hàng loạt 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 μM . 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 μM trong môi trường phát triển chứa 0,2% DMSO. Sau khi định liều bằng hợp chất thử nghiệm, ủ các đĩa tế bào ở nhiệt độ 37°C và 5% CO_2 trong 24 giờ. Cố định tế bào bằng cách bổ sung 14% para-formaldehyt (10 μL) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các tế bào một lần bằng PBS (20 μL) và ủ với PBS (20 μL) chứa 0,5% (thể tích/thể tích) TWEEN® 20 trong 1 giờ. Rửa các tế bào hai lần bằng PBS (20 μL) 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 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 chuột kháng người PR, 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 nhiệt độ 4°C.

Ngày tiếp theo, rửa các tế bào bằng PBS 0,05% TWEEN® 20 (2×20 μL) và ủ với kháng thể thứ cấp (20 μL /lỗ) (dịch pha loãng 1:1000, IgM dê kháng thể 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma) và dịch pha loãng propidium 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 tránh ánh sáng). Quét các đĩa bằng thiết bị ACUMEN EXPLORER™ [thiết bị đếm tế bào vi đĩa huỳnh quang quét lazer được sản xuất bởi TTP LABTECH LTD] để đo PR α . Phân tích hình ảnh được dựa trên tín hiệu huỳnh quang tế bào để nhận diện các tế bào dương tính. Nhận diện các tế bào dương tính PR bằng cường độ trung bình. Sử dụng tổng cường độ tại 575-640 nm từ propidium iodua/ADN để nhận diện các tế bào riêng biệt. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính với PR. Xác định IC₅₀ bằng cách khớp đường cong vào logistic 4 thông số đối với mỗi đầu ra bằng cách sử dụng GENE DATA™. Các kết quả của thử nghiệm này chứng minh hoạt tính chủ vận không đáng kể của các ví dụ 1, 1A, và 1B ở các tế bào ung thư vú MCF7. Đối với các hợp chất được thử nghiệm, các trị số IC₅₀ tương đối trong thử nghiệm này là > 2 μM . Các kết quả của thử nghiệm này chứng minh hoạt tính chủ vận không đáng kể của các hợp chất minh họa được thử nghiệm ở các tế bào ung thư vú MCF7. Các kết quả này cũng chứng minh rằng, các hợp chất

minh họa được thử nghiệm là các chất đối kháng của ER α trong các tế bào ung thư vú MCF7 (tức là, chúng có hoạt tính SERD).

Thử nghiệm tế bào ức chế PR α (sự đối kháng chức năng ER α) trong các tế bào MCF7-ESR1 Y537N 682 CRISPR

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

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 4000 tế bào mỗi lỗ trong môi trường DMEM không chứa đồ phenol 10% FBS (thể tích 20 μ L) (được tách bằng than). Ủ tế bào qua đêm trong tủ ủ nuôi cấy tế bào (5% CO₂, độ ẩm tương đối 95% và 37°C) và để cho các tế bào bám dính vào đĩa. Ngày tiếp theo, định liều tế bào bằng hợp chất thử nghiệm. Sử dụng bộ định lượng âm Echo 555 để điều chế các dịch pha loãng hàng loạt của hợp chất (1:3) trong khoảng từ 6 μ M đến 0,0003 μ M. Định liều các tế bào bằng cách bổ sung 5 μ L từ đĩa pha loãng hàng loạt 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 μ 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 μ M trong môi trường phát triển chứa 0,2% DMSO. Sau khi định liều bằng hợp chất thử nghiệm, ủ các đĩa tế bào ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ trong 72 giờ. Cố định tế bào bằng cách bổ sung 14% para-formaldehyt (10 μ L) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các tế bào bằng PBS (1 $\times$ 20 μ L) và ủ với PBS (20 μ L) chứa 0,5% (thể tích/thể tích) TWEEN® 20 trong 1 giờ. Rửa các tế bào bằng PBS (2 $\times$ 20 μ L), 0,05% TWEEN® 20, và phong bế bằng 3% BSA/PBS 0,05% TWEEN® 20, 0,1% TRITON™ X-100 (20 μ L/lỗ) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung dịch pha loãng 1:500 kháng thể sơ cấp (20 μ L) (kháng thể đơn dòng chuột kháng

người PR, 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 nhiệt độ 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, IgM dê kháng thể 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 propidium 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 vệ tránh ánh sáng). Quét các đĩa bằng thiết bị ACUMEN EXPLORER™ [thiết bị đếm tế bào vi đĩa huỳnh quang quét laze được sản xuất bởi TTP LABTECH LTD] để đo PRα. Phân tích hình ảnh được dựa trên tín hiệu huỳnh quang tế bào để nhận diện các tế bào dương tính. Nhận diện các tế bào dương tính PR bằng cường độ trung bình. Sử dụng tổng cường độ tại 575-640 nm từ propidium iodua/ADN để nhận diện các tế bào riêng biệt. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính với PR. Xác định IC₅₀ bằng cách khớp đường cong vào logistic 4 thông số đối với mỗi đầu ra bằng cách sử dụng GENE DATA™.

Các kết quả của thử nghiệm này chứng minh sự ức chế hiệu quả của PRα và sự đối kháng chức năng bởi các ví dụ 1, 1A, và 1B trong các tế bào ung thư vú MCF7 (ESR1 Y537N, đột biến dị hợp tử). Các trị số IC₅₀ tương đối của các ví dụ 1, 1A, và 1B (và các ví dụ khác) trong thử nghiệm này được thể hiện trong bảng 9 dưới đây. Các trị số IC₅₀ tương đối của các hợp chất minh họa được thử nghiệm nằm trong khoảng từ khoảng 0,0118 đến > 1,6 µM chỉ ra rằng, các hợp chất minh họa là chất đối kháng hiệu quả của đột biến ERα (Y537N) và là chất ức chế hiệu quả sự phiên mã qua trung gian ERα ngoại trừ ví dụ 2B 1,6 µM). PRα (PGR) cũng là đích phiên mã của ERα và các kết quả từ thử nghiệm này chứng minh sự ức chế hiệu quả sự phiên mã qua trung gian ERα của PRα.

Bảng 9: Thử nghiệm tế bào ức chế PRα (sự đối kháng chức năng ERα) trong các tế bào MCF7 Y537N 682 CRISPR

Ví dụ số	Trị số IC ₅₀ tương đối (μ M)
1	$0,01679 \pm 0,00003, n=2$
1A	$1,20 \pm 0,29, n=2$
1B	$0,0130 \pm 0,0059, n=14$
2	$0,01451 \pm 0,002619, n=2$
2A	$0,02494 \pm 0,007386, n=3$
2B	$1,639 \pm 0,2228, n=3$
3	$0,07717 \pm 0,01154, n=2$
3A	0,6117
3B	0,016
4	$0,03854 \pm 0,003865, n=2$
4A	0,5052
4B	0,01181
5	$0,06614 \pm 0,01551, n=2$
5A	0,3945
5B	$0,01822 \pm 0,009815, n=2$
6	$0,06319 \pm 0,01609, n=2$
6A	0,2364
6B	0,0136
7	0,1271
8	$0,04124 \pm 0,006572, n=2$
8A	$0,4335 \pm 0,1946, n=3$
8B	$0,008926 \pm 0,003828, n=3$
10	$0,007936 \pm 0,003163, n=3$

Thử nghiệm tế bào ức chế PR α (sự đối kháng chức năng ER α) trong các tế bào MCF7

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

Thực hiện các điều kiện thử nghiệm như được mô tả chi tiết trong thử nghiệm Acumen dựa trên tế bào thoái biến ER α ở trên, 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 xử lý sơ bộ 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, tiến hành thực hiện nhuộm miễn dịch để phát hiện PR α và quét các đĩa bằng ACUMEN EXPLORER™ [tế bào kế vi đĩa huỳnh quang quét laze sản xuất bởi TTP LABTECH LTD] để đo PR α . Việc phân tích hình ảnh được dựa trên tín hiệu huỳnh quang tế bào để nhận diện các tế bào dương tính. Nhận diện các tế bào dương tính PR α bằng cường độ trung bình. Sử dụng tổng cường độ tại 575-640 từ propidium iodua/ADN để nhận diện các tế bào riêng rẽ. Đầu ra của thử nghiệm là % tế bào dương tính với PR α . Xác định IC₅₀ bằng cách khớp đường cong vào logistic 4 thông số đối với mỗi đầu ra bằng cách sử dụng GENE DATA™. Các kết quả của thử nghiệm này chứng minh sự ức chế hiệu quả của PR α và sự đối kháng chức năng bởi các hợp chất trong ví dụ 1, 1A, và 1B trong các tế bào ung thư vú MCF7. Trị số IC₅₀ tương đối của các hợp chất trong ví dụ 1, 1A, và 1B trong thử nghiệm này được thể hiện trong bảng 10 dưới đây. Trị số IC₅₀ tương đối của các hợp chất minh họa nằm trong khoảng từ khoảng 0,029 đến >2 μ M chỉ ra rằng, tất cả các hợp chất minh họa được thử nghiệm ngoại trừ hợp chất trong ví dụ 1A và 2B, là các chất đối kháng hiệu quả của protein kiểu đại ER α và là chất ức chế hiệu quả sự phiên mã qua trung gian ER α . PR α (PGR) cũng là đích phiên mã của ER α và các kết quả từ thử nghiệm này chứng minh sự ức chế hiệu quả quá trình phiên mã qua trung gian ER α của PR α ở nồng độ thử nghiệm.

Bảng 10: Thử nghiệm tế bào ức chế PR α (sự đối kháng chức năng ER α) trong các tế bào MCF7

Ví dụ số	Trị số IC ₅₀ tương đối (μM)
1	0,1283 ± 0,0226, n=3
1A	>2,000
1B	0,04129 ± 0,03370, n=16
2	0,1634
2A	0,1215 ± 0,05368, n=2
2B	>2,000
3	0,07666 ± 0,02101, n=3
3A	0,9274
3B	0,03435
4	0,07626 ± 0,1676, n=3
4A	0,8465
4B	0,02866
5	0,1180 ± 0,01230, n=2
5A	0,6002
5B	0,03203 ± 0,005306, n=2
6	0,08258 ± 0,005682, n=3
6A	0,2528
6B	0,02835
7	0,1134 ± 0,02087, n=2
8	0,06835 ± 0,02273, n=2
8A	0,2058
8B	0,04848 ± 0,02944, n=2
10	0,02633 ± 0,004459, n=3

Thử nghiệm tăng sinh tế bào trong MCF7 và MCF7-ESR1 Y537N-682

Mục đích của các thử nghiệm tăng sinh tế bào sau nói chung là để phát hiện xem hợp chất thử nghiệm có tác dụng lên sự tăng sinh tế bào hay không.

Cấy các tế bào MCF7 (được mua từ ATCC HTB-22) ở mật độ 2000 tế bào mỗi lỗ trong môi trường DMEM không chứa đồ phenol 10% FBS (thể tích 20 μL) (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 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% CO₂. Ngày tiếp theo, định liều tế bào bằng hợp chất thử nghiệm. Sử dụng bộ định lượng âm Echo 555 để điều chế các dịch pha loãng hàng loạt của hợp chất thử nghiệm (1:3) trong khoảng từ 60 μ M đến 0,003 μ M. Định liều các tế bào bằng cách bổ sung 5 μ L từ đĩa pha loãng hàng loạt vào đĩa tế bào, tạo ra nồng độ DMSO cuối là 0,2% với khoảng liều nồng độ của hợp chất thử nghiệm cuối cùng nằm trong khoảng giữa 20 và 0,001 μ 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 μ M trong môi trường phát triển chứa 0,2% DMSO. Sau khi định liều bằng hợp chất thử nghiệm, ủ các đĩa tế bào ở 37°C và 5% CO₂. Bảy ngày sau khi bổ sung hợp chất thử nghiệm, lấy các đĩa ra khỏi tủ ủ và bổ sung EtOH 96% lạnh (65 μ L) vào mỗi một lỗ. Sau 30 phút, loại bỏ môi trường và bổ sung RNase (20 μ L của 50 μ g/mL) (Sigma) và dung dịch pha loãng propidium iodide 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 vệ tránh ánh sáng). Quét các đĩa bằng thiết bị ACUMEN EXPLORER™ [thiết bị đếm tế bào vi đĩa huỳnh quang quét laser được sản xuất bởi TTP LABTECH LTD]. 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 đỉnh của FL-1 (PI) và diện tích trung bình của một quần thể tế bào (được xác định bằng chu vi)). Xác định IC₅₀ bằng cách khớp đường cong vào logistic 4 thông số đối với mỗi đầu ra bằng cách sử dụng GENE DATA™. Trị số IC₅₀ tương đối của các hợp chất trong ví dụ 1, 1A, và 1B (và các ví dụ khác) trong các tế bào MCF7 ESR1 kiểu đại và tế bào đột biến MCF7-ESR1 Y537N được thể hiện trong bảng 10 dưới đây. Các kết quả của thử nghiệm này chứng minh hoạt tính chống tăng sinh và sự ức chế sinh trưởng tế bào hiệu quả bởi các ví dụ 1, 1A, và 1B (và các ví dụ khác) trong các tế bào ung thư vú MCF7 (ESR1 kiểu đại) và MCF7 (ESR1 Y537N đột biến). Trị số IC₅₀ tương đối của các hợp chất minh

hóa nằm trong khoảng từ khoảng 0,0035 đến 1,176 μM trong các tế bào ung thư vú MCF7 ESR1 kiểu dại và 0,014 đến 1,86 μM trong các tế bào ung thư vú MCF7 (ESR1 Y537N đột biến) chỉ ra rằng, tất cả các hợp chất minh họa được thử nghiệm đều chứng tỏ hoạt tính chống tăng sinh và ức chế sinh trưởng tế bào hiệu quả trong các tế bào ung thư vú MCF7 (ESR1 kiểu dại) và MCF7 (ESR1 Y537N đột biến).

Bảng 11: Thử nghiệm tăng sinh tế bào trong MCF7 và MCF7-ESR1Y537N-682

Ví dụ số	IC ₅₀ tương đối (μM) các tế bào MCF7 ESR1 kiểu dại	IC ₅₀ tương đối (μM) các tế bào MCF7 ESR1 Y537N đột biến
1	0,00768 ± 0,01263, n=3	0,0321 ± 0,0068, n=2
1A	1,18 ± 0,68, n=4	1,86 ± 1,03, n=4
1B	0,00349 ± 0,00225, n=11	0,0167 ± 0,0091, n=12
2	0,00425	0,05113
2A	0,00612	0,04284 ± 0,002666, n=2
2B	0,4053	0,7777
3	0,3287	0,02394
3A	0,303	0,6169 ± 0,1735, n=3
3B	0,008785	0,02144 ± 0,008938, n=3
4	0,02861	0,02664
4A	0,2862	0,5442 ± 0,2181, n=3
4B	0,003496	0,01433 ± 0,004925, n=3
5	0,08009	0,07252 ± 0,02632, n=2
5A	0,4095	0,5167 ± 0,09497, n=3
5B	0,007666	0,02131 ± 0,01300, n=3
6	0,05128	0,02362
6A	0,0759	0,3234 ± 0,1758, n=3
6B		0,01539
7	0,01902	0,04479 ± 0,01188, n=2
8	0,04157	0,03290 ± 0,003002, n=2
8A	0,1743	0,6621 ± 0,1173, n=2
8B	0,005083	0,01419 ± 0,01108, n=2
10	0,004379	0,01059

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

Mục đích của thử nghiệm IVTI này là để xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm (SERD) để ức chế sự biểu hiện gen PR α (phiên mã) xuôi dòng của ER α trong các khối u ghép khác loài được cấy ghép vào trong chuột.

Cấy ghép vào chuột cái NOD SCID (22-25 g) từ Envigo RMS, Inc., Madison, Wisconsin bằng 5×10^6 tế bào ung thư vú dương tính MCF7 ER (ATCC, # HTB-22) dưới da ở vùng sườn phải trong dung dịch HBSS + MATRIGEL™ theo tỷ lệ 1:1 (200 μ L). Cấy ghép viên 17- β estradiol (0,18 mg/viên, giải phóng 90 ngày, từ Innovative research) dưới da 1 ngày trước khi cấy ghép tế bào khối u. Đo sự phát triển khối u và thể trọng hai lần/tuần bắt đầu từ ngày thứ bảy sau khi cấy. Khi kích thước trung bình của khối u trung bình đạt đến 250-350 mm³, ngẫu nhiên hóa các động vật và nhóm vào các nhóm gồm 5 động vật. Định liều cho các động vật bằng hợp chất thử nghiệm theo nhiều liều trong chất dẫn riêng biệt của hợp chất thử nghiệm (1% hydroxyetylxenluloza/0,25% TWEEN® 80/0,05% chất chống tạo bọt trong nước tinh khiết) hoặc duy nhất chất dẫn theo đường uống trong 3 ngày và thu gom các khối u và máu tại các khoảng cách thời gian mong muốn sau liều cuối cùng. Giết các động vật sử dụng thuốc gây mê isoflurane và làm trật khớp cổ. Làm đông lạnh nhanh các khối u và bảo quản ở -80°C cho đến khi xử lý để tách ARN và thử nghiệm RT-qPCR. Thu gom máu vào trong các ống EDTA, quay để thu huyết tương, và làm đông lạnh ở -80°C trong đĩa 96 lỗ. Xác định mức độ tiếp xúc của hợp chất thử nghiệm bằng cách sử dụng phép đo khối phổ.

Nghiền các khối u trong nitor lỏng và dung giải trong dung dịch đệm dung giải 1 $\times$ ARN (từ kit tách ARN) bằng cách sử dụng các hạt Matrix D (MP Biomedical, #6913-500) trong máy phá vỡ tế bào FASTPREP-24™ (MP Biomedical). Chuyển các dịch phân giải khối u vào các ống mới sau khi quay ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Tách ARN từ các dịch phân giải khối u bằng cách sử dụng bộ kit mini tách ARN PURELINK® (Invitrogen #12183018A) hoặc bộ kit mini RNeasy (Qiagen #74104 và #74106). Loại bỏ các tạp chất ADN bằng cách sử dụng PURELINK® DNase Set (Invitrogen #12185010) hoặc RNase-Free DNase Set (Qiagen #79254). Đo nồng độ ARN 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 độ hấp thụ ở 260 nm của tất cả các mẫu ARN khác trừ đi kết quả đo độ hấp thụ 260 nm trung

biên của mẫu trống (chỉ có nước không chứa RNase). Pha loãng các mẫu ARN tới các nồng độ bằng nhau trong nước không chứa RNase. Tổng hợp cADN từ ARN đã pha loãng bằng cách sử dụng hệ thống tổng hợp sợi thứ nhất (First-Strand Synthesis System) trong RT-PCR (Invitrogen, #18080-051). Để thực hiện RT-qPCR, đầu tiên pha loãng cADN trong nước không chứa RNase. Kết hợp hỗn hợp 2× Absolute Blue qPCR ROX (Thermo, #AB-4139/A), đoạn mồi PGR (Thermo, Hs01556702_m1), và cADN pha loãng cho mỗi một phản ứng trong đĩa PCR (Applied Biosystems, #4309849). Khuếch đại cADN bằng cách ủ các mẫu trong 2 phút ở 50°C tiếp theo là 15 phút ở 95°C trong máy luân nhiệt (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System). Tiếp tục ủ ở 95°C trong 15 giây tiếp theo là 50°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 với hai bản sao và sử dụng các giá trị trung bình để tính toán. Tính tỷ lệ phần trăm ức chế đích (PGR) bằng cách sử dụng Excel và XL Fit.

Các kết quả của thử nghiệm này chứng minh rằng, ví dụ 1B ức chế sự biểu hiện PRα (PGR) trong mẫu ghép khối u khác loài. Hợp chất trong ví dụ 1B ức chế sự biểu hiện PRα (PGR) tới ~78% trong mẫu ghép khối u khác loài trong 24 giờ với liều 30 mg/kg được dùng theo đường uống. Các kết quả này chứng tỏ sự ức chế đáng kể và được duy trì liên tục của hoạt tính đối kháng ERα và hoạt tính phiên mã qua trung gian ERα *in vivo* trong mẫu khối u ghép khác loài.

Nghiên cứu về sự ức chế phát triển khối u *in vivo* trong các mẫu khối u ung thư vú ghép khác loài dương tính với ER (ESR1 kiểu đại) được cấy ghép vào chuột

Mục đích của thử nghiệm về sự ức chế khối u ghép khác loài sau đây 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 người MCF7 (ATCC # HTB-22) và HCC1428 (ATCC # CRL-2327) trong nuôi cấy, thu hoạch và tiêm 5×10^6 tế bào trong dung dịch HBSS+MATRIGEL™ tỷ lệ 1:1 (200 µL) theo đường dưới da lên vùng sườn phải phía sau của chuột cái NOD SCID (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Hai mươi bốn giờ trước khi cấy ghép tế bào, cấy các viên estrogen (0,18 mg/viên, 17β estradiol, giải phóng 90 ngày, Innovative Research) dưới da. Nhân rộng các tế bào ung thư vú người T47D

(ATCC # HTB-22) trong môi trường nuôi cấy, thu hoạch và tiêm 5×10^6 tế bào trong dung dịch HBSS+MATRIGEL™ tỷ lệ 1:1 (200 L) theo đường dưới da lên vùng sườn phải phía sau của chuột cái NOD SCID (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Hai mươi bốn giờ trước khi cấy ghép tế bào, cấy các viên estrogen (0,38 mg/viên, 17 β estradiol, giải phóng 90 ngày, Innovative Research) dưới da. Nhân rộng các tế bào ung thư vú người ZR-75-1 (ATCC # CRL-1500) trong môi trường nuôi cấy, thu hoạch và tiêm 5×10^6 tế bào trong dung dịch HBSS+MATRIGEL™ tỷ lệ 1:1 (200 L) theo đường dưới da lên vùng sườn phải phía sau của chuột cái NOD SCID (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Hai mươi bốn giờ trước khi cấy ghép tế bào, động vật được dùng bằng 50 μ l dung dịch tiêm trong cơ estradiol valerat (Delestrogen®) (10 mg/mL) và sau đó dùng một lần cứ 14 ngày trong thời gian nghiên cứu. Đo sự phát triển khối u và thể trọng hai lần/tuần bắt đầu từ ngày thứ bảy sau khi cấy. Khi kích thước khối u đạt 250-350 mm³, chọn ngẫu nhiên các động vật và nhóm chúng thành các nhóm gồm 5 con. Điều chế hợp chất thử nghiệm, ví dụ 1B trong chất dẫn thích hợp (1% hydroxyetyl xenluloza/0,25% TWEEN® 80/0,05% chất chống tạo bọt trong nước tinh khiết) và dùng thông qua ống thông đặt qua miệng trong 28 ngày, QD. 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.

Hợp chất trong ví dụ 1B được phát hiện có các trị số % delta T/C như được cung cấp trong bảng 12 dưới đây. Các kết quả này chỉ ra rằng, hợp chất trong ví dụ 1B chứng tỏ độ sinh khả dụng tốt theo đường uống ở chuột và hoạt tính chống khối u hoặc mức độ thoái triển khối u đáng kể trong mẫu ung thư vú của người ghép khác loài ESR1.

Bảng 12: Nghiên cứu về sự ức chế phát triển khối u *in vivo* trong các mẫu khối u ung thư vú ghép khác loài dương tính với ER được cấy ghép vào chuột

Mẫu khối u	Liều dùng (mg/kg)	% Delta T/C hoặc % thoái triển	Giá trị p
MCF7 (ung thư vú ghép khác)	3	-26	0,001*
	10	-46	<0,001*

loài)	30	-36	<0,001*
T47D (ung thư vú ghép khác loài)	3	30	0,008*
	10	-11	<0,001*
	30	-28	<0,001*
ZR-75-1 (ung thư vú ghép khác loài)	3	4	<0,001*
	10	0	<0,001*
	30	19	<0,001*
HCC1428 (ung thư vú ghép khác loài)	10	-45	<0,001*
	30	-22	<0,001*

Phân tích 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 tới hạn trong nhóm điều trị là ở mức hoặc trên mức thể tích khối u mốc cơ sở trên đây. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, trong đó T và C tương ứng là thể tích khối u tới hạn trong nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng T_0 và C_0 là thể tích khối u mốc cơ sở trung bình trong các nhóm này.

Mức thoái triển theo % được tính toán khi thể tích tới hạn là ở dưới mốc cơ sở. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / T_0$, trong đó T_0 là thể tích khối u trung bình mốc cơ sở đối với nhóm được điều trị.

Trung bình tổng quát của tất cả các nhóm so với mốc cơ sở (chọn ngẫu nhiên) ở ngày 32 được sử dụng để tính toán % thay đổi của T/C.

Nghiên cứu về sự ức chế phát triển khối u *in vivo* ở mẫu khối u ung thư vú PDX đột biến ESR1 (Y537S) (ST941/HI) được cấy ghép vào chuột

Mục đích của thử nghiệm ức chế 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 ở mẫu ghép khác loài (PDX) nguồn gốc từ bệnh nhân ung thư vú đột biến ESR1 và phụ thuộc hormon (HI).

Mẫu ST941/HI PDX xuất phát tại và thực hiện tại South Texas Accelerated Research Therapeutics (San Antonio, TX). Các mảnh khối u được thu gom từ các động vật chủ và được cấy ghép vào trong chuột suy giảm miễn dịch (The Jackson Laboratory) và nghiên cứu được khởi đầu ở thể tích khối u trung bình xấp xỉ 125-250 mm³. Điều chế hợp chất thử nghiệm, ví dụ 1B trong chất dẫn thích hợp (1% hydroxyethylxenluloza/0,25% TWEEN® 80/0,05% chất chống tạo bọt trong nước cất) và dùng bằng ống thông đặt qua miệng trong 28 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.

Hợp chất trong ví dụ 1B được phát hiện có các trị số % delta T/C như được cung cấp trong bảng 13 dưới đây. Các kết quả này chỉ ra rằng, hợp chất trong ví dụ 1B chứng tỏ độ sinh khả dụng theo đường uống tốt ở chuột và hoạt tính chống khối u hoặc sự thoái triển khối u đáng kể ở mẫu ghép khác loài ung thư vú người đột biến ESR1 (Y537S).

Bảng 13: Nghiên cứu về sự ức chế phát triển khối u *in vivo* ở mẫu khối u ghép khác loài ung thư vú đột biến ESR1 được cấy ghép vào chuột

Mẫu khối u	Liều dùng (mg/kg)	Phác đồ	% Delta T/C hoặc % thoái triển	Giá trị p
ST941C/HI (mẫu ung thư vú ghép khác loài đột biến ESR1)	3	QD	66	0,213
	10	QD	15	<0,001*
	30	QD	6	<0,001*

Phân tích 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 tới hạn trong nhóm điều trị là ở mức hoặc trên mức thể tích khối u mốc cơ sở trên đây. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, trong đó T và C tương ứng là thể tích khối u tới hạn trong nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng T_0 và C_0 là thể tích khối u mốc cơ sở trung bình trong các nhóm này.

Mức thoái triển theo % được tính toán khi thể tích tới hạn là ở dưới mốc cơ sở. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / T_0$, trong đó T_0 là thể tích khối u trung bình mốc cơ sở đối với nhóm được điều trị.

Trung bình tổng quát của tất cả các nhóm so với mốc cơ sở (chọn ngẫu nhiên) ở ngày 32 được sử dụng để tính toán % thay đổi của T/C.

Các nghiên cứu kết hợp

Do tính không đồng nhất của khối u và tính kháng thu được đối với các trị liệu bằng endocrine, liệu pháp điều trị kết hợp đã trở nên thiết yếu trong điều trị bệnh ung thư vú dương tính với ER và tiến triển/di căn để điều trị hiệu quả hoặc để khắc phục tính kháng thu được. Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm tác dụng kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B với chất ức chế CDK4/6 abemaciclib, chất ức chế mTOR everolimus, chất ức chế PIK3CA alpelisib và chất ức chế PI3K/mTOR 8-[5-(1-hydroxy-1-metyletyl)pyridin-3-yl]-1-[(2S)-2-metoxypopyl]-3-metyl-1,3-dihydro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-on (“hợp chất A”) trong năm dòng tế bào ung thư vú dương tính với ER *in vitro*.

Thử nghiệm về khả năng sống sót tế bào trong các nghiên cứu phối hợp

Cấy tế bào với mật độ được thể hiện trong bảng 14 dưới đây trong 20 μ L thể tích môi trường được mô tả trong bảng vào trong đĩa nuôi cấy tế bào đáy trong 384 lỗ.

Bảng 14: Thông tin tế bào trong thử nghiệm về khả năng sống sót của tế bào

Dòng tế bào	Mật độ cấy	Tham chiếu thương mại	Môi trường nuôi cấy	Thời gian cố định (giờ)
T-47D	1000	ATCC HTB-133	RMPI 10% FBS 1% P/S, 0,008 mg/mL Insulin bò	72

MCF-7	1000	ATCC HTB-22	DMEM 10% FBS 1% P/S 0,01 mg/mL insulin người	96
EFM-19	3000	ACC 231	RMPI 10% FBS 1% P/S	144
ZR-75-1	1000	ATCC CRL-1500	RMPI 10% FBS 1% P/S	144
BT-474	1000	ATCC HTB-20	HYBRI-CARE (1 L H ₂ O, 1,5 g/L natri bicarbonat, 10% FBS, 1% P/S)	144
ZR-75-30	1000	ATCC CRL-1504	RMPI 10% FBS 1% P/S	240

Ủ các đĩa ở 37°C và 5% CO₂. Ngày tiếp theo, định liều tế bào bằng hợp chất thử nghiệm, hợp chất trong ví dụ 1B.

Điều chế hợp chất dưới dạng các dung dịch gốc chứa 10 mM DMSO và sử dụng trong nghiên cứu đáp ứng liều với nồng độ đỉnh bắt đầu ở mức 10 hoặc 1 μ M, hai hợp chất được thử nghiệm cùng nhau ở tỷ lệ cố định, và sau đó các dung dịch pha loãng hàng loạt tỷ lệ 1:3 được điều chế cũng như các hợp chất riêng biệt để xác định IC₅₀ với nồng độ khởi đầu là 20 μ M. Định liều các tế bào bằng cách bổ sung 5 μ L từ đĩa dung dịch pha loãng hàng loạt vào đĩa tế bào, tạo ra nồng độ DMSO cuối cùng là 0,2% với khoảng liều nồng độ của hợp chất thử nghiệm cuối cùng nằm trong khoảng giữa 20 và 0,001 μ M trong liệu pháp điều trị đơn hoặc khoảng thấp hơn trong liệu pháp kết hợp. Đối với điểm cực đại, sử dụng môi trường chứa 0,2% DMSO và đối với điểm cực tiểu, sử dụng staurosporine được pha loãng ở nồng độ cuối 2 μ M trong môi trường phát triển chứa 0,2% DMSO. Sau khi định liều bằng hợp chất thử nghiệm, ủ các đĩa tế bào ở 37°C và 5% CO₂. Sau hai lần gấp đôi thời gian ủ với các hợp chất, lấy các đĩa ra khỏi tủ ủ và bổ sung EtOH 96% lạnh (65 μ L) vào mỗi một lỗ. Sau 30 phút, loại bỏ môi trường và bổ sung RNase (20 μ L của 50 μ g/mL) (Sigma) và dung dịch pha loãng propidium iodua 1:1000 trong PBS mỗi lỗ. Đậy kín các đĩa và ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (được bảo quản tránh ánh sáng). Quét các đĩa bằng thiết bị ACUMEN EXPLORER™ [thiết bị đếm tế bào vi đĩa huỳnh quang quét laze được sản xuất bởi TTP LABTECH LTD]. Vì một số dòng tế bào phát triển tạo ra các khối kết tụ, số lượng tế bào là số lượng các đối tượng không thể được sử dụng dưới dạng đọc ra; do

vậy tổng quần thể diện tích (khoảng định rõ của cường độ đỉnh FL-1 (PI)) hoặc tổng cường độ PI được sử dụng để đánh giá số lượng tế bào.

Dữ liệu kết hợp *in vitro* gợi ý về sự hiệp lực (như được xác định dưới đây) bằng sự kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B với abemaciclib, hoặc everolimus ở 5 trong số 5 dòng tế bào ung thư vú dương tính với ER như được thể hiện trong bảng 15. Sự kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B với hợp chất A hiệp lực ở 4 trong số 4 dòng tế bào ung thư vú dương tính với ER được thử nghiệm. Tác dụng kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B với alpelisib là tác dụng bổ sung ở 2 trong số 4 dòng tế bào ung thư vú dương tính với ER và là tác dụng hiệp lực ở 2 trong số 4 dòng tế bào ung thư vú dương tính với ER.

Bảng 15: Sự kết hợp *in vitro* của hợp chất trong ví dụ 1B với các tác nhân đích khác ở các dòng tế bào ung thư vú dương tính với ER

Dòng tế bào ung thư vú	Điều trị 1	Điều trị 2	Chỉ số kết hợp (CI50)	Diễn giải theo thống kê	Diễn giải theo sinh học
MCF7	Ví dụ 1B	Abemaciclib	0,2675	Hiệp lực	Bổ sung
		Everolimus	0,0389	Hiệp lực	Hiệp lực
T47D	Ví dụ 1B	Abemaciclib	0,2693	Hiệp lực	Hiệp lực
		Everolimus	0,0609	Hiệp lực	Hiệp lực
		alpelisib	0,0818	Hiệp lực	Hiệp lực
		Hợp chất A	0,2401	Hiệp lực	Hiệp lực
ZR-75-1	Ví dụ 1B	Abemaciclib	0,2067	Hiệp lực	Hiệp lực
		Everolimus	0,1853	Hiệp lực	Hiệp lực
		alpelisib	1,3717	Bổ sung	Bổ sung

		Hợp chất A	0,3768	Hiệp lực	Hiệp lực
ZR-75-30	Ví dụ 1B	Abemaciclib	0,3960	Hiệp lực	Hiệp lực
		Everolimus	0,1248	Hiệp lực	Hiệp lực
		alpelisib	0,4149	Bổ sung	Bổ sung
		Hợp chất A	0,7098	Hiệp lực	Hiệp lực
EFM-19	Ví dụ 1B	Abemaciclib	0,3455	Hiệp lực	Hiệp lực
		Everolimus	0,5033	Hiệp lực	Bổ sung
		alpelisib	0,2963	Hiệp lực	Hiệp lực
		Hợp chất A	0,4326	Hiệp lực	Hiệp lực

Phân tích và diễn giải dữ liệu của tác dụng kết hợp

Sử dụng các phương pháp được công bố trong tài liệu chuyên ngành để tính toán tác dụng kết hợp *in vitro* (L. Zhao, et al, Front Biosci, 2010, 2:241-249 và L. Zhao, et al, Clin Cancer Res, 2004, 10(23):7994-8004). Để nhận diện các tương tác hiệp lực hoặc đối kháng giữa hai thuốc, phân tích dịch chuyển đường cong đã được tiến hành bằng cách sử dụng mẫu XL tùy chỉnh với các phần bổ sung XLFit 5. Các đường cong của tác nhân đơn được điều chỉnh bằng cách sử dụng mô hình hồi quy logistic 4 thông số. Các tiêu chuẩn và hạn chế sử dụng để lắp khớp là (i) các đáy < (-20) được cố định thành 0 và (ii) đỉnh >120 được cố định thành 100. Nếu tất cả mọi quan sát đều thấp hơn ngưỡng được thiết lập bởi người sử dụng, thì hằng số ăn khớp với đỉnh = 0 được thực hiện và IC₅₀ được xem là cao hơn giá trị cực đại bao gồm cả nồng độ. Khi mà IC₅₀ tuyệt đối của mỗi một tác nhân đơn đã đạt được, nồng độ tương đương tại mức 50% hoạt tính được tính toán cho các tác nhân đơn và sự kết hợp của chúng. Sử dụng các nồng độ tương đương này cùng với các hoạt tính đo được, các tác giả sáng chế đã tính toán lại IC₅₀ tuyệt đối, đường cong của các tác nhân đơn sẽ đạt tới

50% hoạt tính tại các giá trị nồng độ tương đương bằng 1, trong khi sự kết hợp hiệp lực sẽ đạt tới 50% ở các giá trị thấp hơn dẫn tới sự dịch chuyển sang bên trái, và sự kết hợp đối kháng sẽ thể hiện sự dịch chuyển sang bên phải. Các nồng độ tương đương cũng được sử dụng để tính toán CI_{50} (chỉ số kết hợp ở mức 50% hoạt tính), trong đó CI_{50} bằng với trị số IC_{50} tuyệt đối của đường cong kết hợp. Cùng với CI_{50} , giá trị CI (Combination Indexes) ở các tỷ lệ % hoạt tính khác nhau có thể được tính toán (CI_{10} , CI_{20} , CI_{30} , CI_{40} , CI_{60} , CI_{70} , CI_{80} , CI_{90}). Để tính toán CI_{Inn} , nồng độ tương đương ở các mức tỷ lệ % hoạt tính khác nhau được tính toán. Đối với mỗi một tỷ lệ % hoạt tính, các tác giả sáng chế tính toán giới hạn sai số mà đây là khoảng tin cậy ở mức 95% và sử dụng khoảng tin cậy này, các tác giả sáng chế sẽ tính toán giới hạn trên là phép cộng của giới hạn sai số vào CI và giới hạn dưới là phép trừ của giới hạn sai số cho CI. Giới hạn trên = $CI + \text{khoảng tin cậy } 95\%$ và Giới hạn dưới = $CI - \text{khoảng tin cậy } 95\%$. Sau đó, các giới hạn này được sử dụng để diễn giải các kết quả.

Sự diễn giải theo thống kê ở mỗi một tỷ lệ % hoạt tính là như sau:

Giới hạn dưới <1 và giới hạn trên >1	Bổ sung
Giới hạn trên <1	Hiệp lực
Giới hạn dưới >1	Đối kháng

Diễn giải theo sinh học tại mỗi một tỷ lệ % hoạt tính là như sau:

$CI_{Inn} < 0,5$	Hiệp lực
$CI_{Inn} > 0,5$ và $CI_{Inn} < 2$	Bổ sung
$CI_{Inn} > 2$	Đối kháng

Các nghiên cứu kết hợp *in vivo*

Do tính không đồng nhất của khối u và tính kháng thu được đối với các trị liệu bằng endocrine, liệu pháp điều trị kết hợp đã trở nên thiết yếu trong điều trị bệnh ung

thư vú dương tính với ER và tiến triển/di căn để điều trị hiệu quả hoặc để khắc phục tính kháng thu được. Giả thiết rằng, sự kết hợp của các liệu pháp hướng đích có tiềm năng hữu hiệu hơn trong việc làm chậm hoặc thậm chí làm dừng ung thư vú dương tính với ER. Sự kết hợp của các chất ức chế CDK4/6 và fulvestrant đã được chấp nhận trong điều trị bệnh ung thư vú di căn dương tính với ER nhưng tỷ lệ bệnh nhân cao phát triển tính kháng do các đột biến thu được trong ESR1 hoặc PIK3CA. Đối với chất phân hủy và chất đối kháng hiệu quả của ER α , SERD dùng bằng đường uống như hợp chất trong ví dụ 1B có tiềm năng hữu hiệu hơn trong việc làm chậm hoặc làm dừng các ung thư vú đột biến ESR1 hoặc đột biến PIK3CA ở dạng tác nhân đơn hoặc kết hợp với chất ức chế CDK4/6 như abemaciclib hoặc chất ức chế PI3K/mTOR như hợp chất A. Trong ngữ cảnh đó, hợp chất trong ví dụ 1B được thử nghiệm trong ức chế sự phát triển khối u kết hợp với abemaciclib (patent tham chiếu) hoặc hợp chất A (patent tham chiếu). Cụ thể hơn nữa, hợp chất trong ví dụ 1B được thử nghiệm kết hợp với abemaciclib hoặc hợp chất A trong mẫu ung thư vú ghép khác loài MCF7 kiểu đại ESR1 và đột biến PIK3Ca.

Nhân rộng các tế bào ung thư vú người MCF7 (ATCC # HTB-22) trong môi trường nuôi cấy, thu hoạch và tiêm 5×10^6 tế bào trong dung dịch HBSS+MATRIGEL™ tỷ lệ 1:1 (200 L) theo đường dưới da lên vùng sườn phải phía sau của chuột cái NOD SCID (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Hai mươi bốn giờ trước khi cấy ghép tế bào, cấy các viên estrogen (0,18 mg/viên, 17 β estradiol, giải phóng 90 ngày, Innovative Research) dưới da. Đo sự phát triển khối u và thể trọng hai lần/tuần bắt đầu từ ngày thứ bảy sau khi cấy. Khi kích thước khối u đạt 250-350 mm³, chọn ngẫu nhiên các động vật và nhóm chúng thành các nhóm gồm 5 con. Điều chế hợp chất thử nghiệm của ví dụ 1B trong chất dẫn thích hợp (1% hydroxyethylxenluloza/0,25% TWEEN® 80/0,05% chất chống tạo bọt trong nước cất) và dùng bằng ống thông đặt qua miệng trong 42 ngày. Chất ức chế CDK4/6 (abemaciclib) được phối chế trong 1% HEC trong 25 mM dung dịch đệm natri phosphat, pH 2,0. Chất ức chế PI3K/mTOR (hợp chất A) được phối chế trong 1% hydroxyethylxenluloza/0,25% TWEEN® 80/0,05% chất chống tạo bọt trong nước cất. 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. Thể tích khối u được ước tính bằng cách sử dụng công thức $v = l \times w^2 \times 0,535$ trong đó l = đường kính đo được lớn hơn và w = đường kính vuông góc nhỏ hơn.

Phân tích thống kê

Phân tích thống kê đối với dữ liệu thể tích khối u bắt đầu bằng việc biến đổi dữ liệu sang thang logarit để cân bằng phương sai theo thời gian và nhóm điều trị. Dữ liệu thể tích trên thang logarit được phân tích bằng phương pháp phân tích số đo lặp hai chiều đối với các phương sai theo thời gian và việc điều trị nhờ sử dụng phương thức MIXED trong phần mềm SAS (Version 9.3). Mô hình tương quan của các số đo lặp là Spatial Power. Nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng tại mỗi thời điểm. Phương thức MIXED cũng được sử dụng riêng biệt đối với mỗi nhóm điều trị để tính toán các giá trị trung bình đã hiệu chỉnh và các sai số chuẩn tại mỗi thời điểm. Cả hai phân tích đều tính đến sự tự tương quan trong mỗi con vật và sự thất thoát dữ liệu mà xảy ra khi các con vật có khối u lớn sớm được loại ra khỏi nghiên cứu. Các giá trị trung bình đã được hiệu chỉnh và các sai số chuẩn (standard error - s.e.) được dựng biểu đồ cho mỗi nhóm điều trị theo thời gian. Phân tích về thể tích khối u được dựa trên log10 và cấu trúc hiệp phương sai spatial power. Giá trị P được dựa vào sự so sánh giữa hai nhóm cụ thể.

Phương pháp phân tích kết hợp (phương pháp Bliss Independence trong các nghiên cứu IVEF)

Trước tiên, mẫu các phép đo lặp lại thông thường được lắp khớp vào thể tích log so với nhóm và thời gian. Sau đó, các thông báo kết quả trái ngược được sử dụng để thử nghiệm về tác dụng tương tác tại mỗi một thời điểm bằng cách sử dụng 2 phác đồ điều trị cụ thể được kết hợp. Phương pháp này tương đương với phương pháp Bliss Independence và giả sử rằng, các thể tích khối u có thể, theo lý thuyết, đạt tới 0, tức là, thoái triển hoàn toàn. Đáp ứng bổ sung kỳ vọng (Expected Additive Response - EAR) đối với dạng kết hợp được tính toán trên cơ sở thang đo thể tích khối u là, thể tích đáp ứng (EAR) $EAR = V1 * V2/V0$, trong đó $V0$, $V1$, và $V2$ tương ứng là thể tích khối u trung bình ước lượng của đối chứng chất dẫn, điều trị 1 riêng biệt, và điều trị 2 riêng biệt. Nếu kết quả kiểm tra tương tác là có ý nghĩa thì tác dụng kết hợp được tuyên bố

về mặt thống kê là lớn hơn mức cộng hợp hay nhỏ hơn mức cộng hợp tùy thuộc vào thể tích trung bình kết hợp lần lượt được thấy là nhỏ hơn hay lớn hơn thể tích EAR. Nếu không, kết luận thống kê là có tính cộng hợp. Ngoài ra, khoảng bổ sung thích hợp về mặt sinh học có thể được xác định là X% trên và dưới thể tích EAR. Điển hình, X sẽ nằm trong khoảng từ 25 đến 40%. Sau đó, kết luận về mặt sinh học có thể được đưa ra đối với liệu pháp kết hợp là bổ sung nhiều hơn, bổ sung hoặc ít bổ sung hơn nếu như thể tích trung bình kết hợp quan sát được là ở mức dưới, trong hoặc trên khoảng bổ sung.

Có thể có những tình huống trong đó sự ngưng trệ là đáp ứng kỳ vọng nhất. Trong những tình huống này, phương pháp Bliss có thể được áp dụng trực tiếp cho các trị số % Δ T/C để thu được đáp ứng tỷ lệ % EAR: % EAR Δ T/C = $Y1 * Y2/100$, trong đó Y1 và Y2 là các trị số % Δ T/C của các điều trị bằng tác nhân riêng biệt. Hiện tại, không có thử nghiệm thống kê nào để so sánh % Δ T/C quan sát được trong nhóm kết hợp so với EAR, nhưng tiêu chuẩn sinh học được mô tả ở trên có thể được áp dụng.

Như được thể hiện trong bảng 15 và 16, việc điều trị bằng hợp chất trong ví dụ 1B hoặc abemaciclib riêng biệt làm tác nhân đơn lần lượt dẫn đến 32% (% Δ T/C = -32) và 52% (% Δ T/C = -52) sự thoái triển khối u và cả hai đều có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,001$) so với đối chứng chất dẫn. Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B với abemaciclib là “ít bổ sung hơn” nhưng hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B cộng với abemaciclib tốt hơn nhiều so với hợp chất trong ví dụ 1B riêng biệt ($p < 0,001$). Tuy nhiên, hiệu quả của tác nhân đơn abemaciclib không có ý nghĩa về mặt thống kê so với dạng kết hợp ($P=0,055$). Dạng kết hợp được dung nạp ở các động vật không làm giảm thể trọng đáng kể.

Bảng 15: Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B với abemaciclib trong mẫu ung thư vú dương tính với ER MCF7

Điều trị 1	Điều trị 2	Hiệu số chênh lệch ^b	Sai số chuẩn	Giá trị p
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 1B, 10 mpk, QD x 42, PO	0,628	0,0658	<0,001*
Chất dẫn, QD x 42, PO	Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,479	0,0658	<0,001*
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,756	0,0658	<0,001*
Hợp chất trong ví dụ 1B, 10 mpk, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,128	0,0658	0,055
Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO PO	0,278	0,0658	<0,001*

^b Hiệu số chênh lệch=Điều trị 1 – Điều trị 2; *giá trị p: có ý nghĩa (p < 0,05)

SE – sai số chuẩn

Bảng 16: Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B với abemaciclib trong mẫu ung thư vú dương tính với ER MCF7

Điều trị	% Delta T/C hoặc % thoái triển	Giá trị p	Tác dụng kết hợp	Khối lượng cơ thể
Chất dẫn	Không áp dụng	Không áp dụng		
Hợp chất trong ví dụ 1B	-32	<0,001*		
Abemaciclib	-52	<0,001*		
Hợp chất trong ví dụ 1B / Abemaciclib / (Kết hợp)	-64	<0,001*	Ít bổ sung hơn	Sự thay đổi không đáng kể

Phân tích về thể tích khối u được dựa trên Log10 và cấu trúc hiệp phương sai Spatial Power.

*Giá trị p: có ý nghĩa ($p < 0,05$); NA: Không áp dụng

% Delta T/C được tính toán khi thể tích khối u điểm cuối trong nhóm điều trị là ở mức hoặc trên mức thể tích khối u mốc cơ sở; và % thoái triển được tính toán đối với thể tích khối u ở dưới mốc cơ sở. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, trong đó T và C tương ứng là thể tích khối u tới hạn trong nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng. T_0 và C_0 là thể tích khối u mốc cơ sở trung bình trong các nhóm này.

Như được thể hiện trong các bảng 17 và 18, việc điều trị bằng hợp chất trong ví dụ 1B hoặc hợp chất A riêng biệt làm tác nhân đơn lần lượt dẫn đến 32% ($\%dT/C = -32$) và 36% ($\%dT/C = -36$) sự thoái triển khối u và cả hai đều có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,001$) so với đối chứng chất dẫn. Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B với hợp chất A là “ít bổ sung hơn” nhưng hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B cộng với hợp chất A là tốt hơn đáng kể so với hợp chất trong ví dụ 1B riêng biệt (p

<0,001) hoặc hợp chất A riêng biệt ($p=0,002^*$). Dạng kết hợp được dung nạp ở các động vật không làm giảm thể trọng đáng kể.

Bảng 17: Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B với hợp chất A trong mẫu ung thư vú dương tính với ER MCF7

Điều trị 1	Điều trị 2	Hiệu số chênh lệch ^b	Sai số chuẩn	Giá trị p
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 1B, 10 mpk, QD x 42, PO	0,479	0,0759	<0,001*
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất A, 7,5 mpk, BID x 42, PO	0,504	0,0759	<0,001*
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / hợp chất A, 7,5 mpk, BID x 42, PO	0,761	0,0791	<0,001*
Hợp chất trong ví dụ 1B, 10 mpk, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / hợp chất A, 7,5mpk, BID x 42, PO	0,282	0,0791	<0,001*
Hợp chất A, 7,5 mpk, BID x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / hợp chất A, 7,5 mpk, BID x 42, PO PO	0,257	0,0791	0,002*

^b Hiệu số chênh lệch=Điều trị 1 – Điều trị 2; *giá trị p: có ý nghĩa ($p < 0,05$)

SE – sai số chuẩn

Bảng 18: Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 1B với abemaciclib trong mẫu ung thư vú dương tính với ER MCF7

Điều trị	% Delta T/C hoặc % thoái triển	Giá trị p	Tác dụng kết hợp	Khối lượng cơ thể
Chất dẫn	Không áp dụng	Không áp dụng		
Hợp chất trong ví dụ 1B	-32	<0,001*		
Hợp chất A	-36	<0,001*		
Hợp chất trong ví dụ 1B /hợp chất A / (Kết hợp)	-65	<0,001*	Ít bổ sung hơn	Sự thay đổi không đáng kể

Phân tích về thể tích khối u được dựa trên Log_{10} và cấu trúc hiệp phương sai Spatial Power.

*Giá trị p: có ý nghĩa ($p < 0,05$); NA: Không áp dụng

% Delta T/C được tính toán khi thể tích khối u điểm cuối trong nhóm điều trị là ở mức hoặc trên mức thể tích khối u mốc cơ sở; và % thoái triển được tính toán đối với thể tích khối u ở dưới mốc cơ sở. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, trong đó T và C tương ứng là thể tích khối u tới hạn trong nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng T_0 và C_0 là thể tích khối u mốc cơ sở trung bình trong các nhóm này.

Như được thể hiện trong các bảng 19 và 20, việc điều trị bằng hợp chất trong ví dụ 10 hoặc abemaciclib riêng biệt làm tác nhân đơn lần lượt dẫn đến 51% ($\%dT/C = -51$) và 70% ($\%dT/C = -70$) sự thoái triển khối u và cả hai đều có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,001$) so với đối chứng chất dẫn. Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 với abemaciclib là “ít bổ sung hơn” nhưng hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 cộng với abemaciclib tốt hơn nhiều so với hợp chất trong ví dụ 10 riêng biệt ($p < 0,039$). Tuy nhiên, hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 cộng thêm

abemaciclib không khác nhau có ý nghĩa so với abemaciclib riêng biệt ($p=0,905$).
Dạng kết hợp được dung nạp ở các động vật không làm giảm thể trọng đáng kể.

Bảng 19: Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 với abemaciclib trong mẫu ung thư vú dương tính với ER MCF7

Điều trị 1	Điều trị 2	Hiệu số chênh lệch ^b	Sai số chuẩn	Giá trị p
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO	0,659	0,113	<0,001*
Chất dẫn, QD x 42, PO	Abemaciclib 50 mpk, QD x 42, PO	0,445	0,1054	<0,001*
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO / abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,672	0,1054	<0,001*
Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO / abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,013	0,1103	0,905
Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO / abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,227	0,1054	0,039*

^b Hiệu số chênh lệch=Điều trị 1 – Điều trị 2; *giá trị p: có ý nghĩa ($p < 0,05$)

SE – sai số chuẩn

Bảng 20: Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 với abemaciclib trong mẫu ung thư vú dương tính với ER MCF7

Điều trị	% Delta T/C hoặc % thoái triển	Giá trị p	Tác dụng kết hợp	Khối lượng cơ thể
Chất dẫn	Không áp dụng	Không áp dụng		
Hợp chất trong ví dụ 10	-51	<0,001*		
Abemaciclib	-70	<0,001*		
Hợp chất trong ví dụ 10 / Abemaciclib / (Kết hợp)	-71	<0,001*	Ít bổ sung hơn	Sự thay đổi không đáng kể

Phân tích về thể tích khối u được dựa trên Log_{10} và cấu trúc hiệp phương sai Spatial Power.

*Giá trị p: có ý nghĩa ($p < 0,05$); NA: Không áp dụng

% Delta T/C được tính toán khi thể tích khối u điểm cuối trong nhóm điều trị là ở mức hoặc trên mức thể tích khối u mốc cơ sở; và % thoái triển được tính toán đối với thể tích khối u ở dưới mốc cơ sở. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, trong đó T và C tương ứng là thể tích khối u tới hạn trong nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng T_0 và C_0 là thể tích khối u mốc cơ sở trung bình trong các nhóm này.

Như được thể hiện trong các bảng 21 và 22, việc điều trị bằng hợp chất trong ví dụ 10 hoặc alpelisib riêng biệt làm tác nhân đơn lần lượt dẫn đến 51% ($\%dT/C = -51$) và 21% ($\%dT/C = -21$) sự thoái triển khối u và cả hai đều có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,001$ và $p = 0,013$) so với đối chứng chất dẫn. Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 với alpelisib là “bổ sung” và hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 cộng thêm alpelisib là tốt hơn đáng kể so với hợp chất trong ví dụ 10 riêng biệt ($p = 0,009$). Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 cộng thêm alpelisib cũng tốt hơn

đáng kể so với alpelisib riêng biệt ($p = <0,001$). Dạng kết hợp được dung nạp ở các động vật không làm giảm thể trọng đáng kể.

Bảng 21: Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 với alpelisib trong mẫu ung thư vú dương tính với ER MCF7

Điều trị 1	Điều trị 2	Hiệu số chênh lệch ^b	Sai số chuẩn	Giá trị p
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO	0,241	0,1121	<0,039*
Chất dẫn, QD x 42, PO	alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	0,445	0,1121	<0,001*
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO / alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	0,755	0,1121	<0,001*
Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO / alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	0,514	0,1121	<0,001
alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO / alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	0,310	0,1121	0,009*

^b Hiệu số chênh lệch=Điều trị 1 – Điều trị 2; *giá trị p: có ý nghĩa ($p < 0,05$)

SE – sai số chuẩn

Bảng 22: Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 với alpelisib trong mẫu ung thư vú dương tính với ER MCF7

Điều trị	% Delta T/C hoặc % thoái triển	Giá trị p	Tác dụng kết hợp	Khối lượng cơ thể
Chất dẫn	Không áp dụng	Không áp dụng		
Hợp chất trong ví dụ 10	-51	<0,001*		
alpelisib	-21	<0,013*		
Hợp chất trong ví dụ 10 /alpelisib (Kết hợp)	-76	<0,001*	Bổ sung	Sự thay đổi không đáng kể

Phân tích về thể tích khối u được dựa trên Log_{10} và cấu trúc hiệp phương sai Spatial Power.

*Giá trị p: có ý nghĩa ($p < 0,05$); NA: Không áp dụng

% Delta T/C được tính toán khi thể tích khối u điểm cuối trong nhóm điều trị là ở mức hoặc trên mức thể tích khối u mốc cơ sở; và % thoái triển được tính toán đối với thể tích khối u ở dưới mốc cơ sở. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, trong đó T và C tương ứng là thể tích khối u tới hạn trong nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng T_0 và C_0 là thể tích khối u mốc cơ sở trung bình trong các nhóm này.

Như được thể hiện trong các bảng 23 và 24, việc điều trị bằng hợp chất trong ví dụ 10 hoặc everolimus riêng biệt làm tác nhân đơn lần lượt dẫn đến 51% ($\%dT/C = -51$) và 50% ($\%dT/C = -50$) sự thoái triển khối u và cả hai đều có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,001$ và $p < 0,001$) so với đối chứng chất dẫn. Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 với everolimus là “bổ sung” và hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 cộng thêm everolimus là tốt hơn đáng kể so với hợp chất trong ví dụ 10 riêng biệt ($p = 0,004$). Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 cộng thêm alpelisib

cũng tốt hơn đáng kể so với everolimus riêng biệt ($p=0,04$). Dạng kết hợp được dung nạp ở các động vật không làm giảm thể trọng đáng kể.

Bảng 23: Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 với everolimus trong mẫu ung thư vú dương tính với ER MCF7

Điều trị 1	Điều trị 2	Hiệu số chênh lệch ^b	Sai số chuẩn	Giá trị p
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO	0,445	0,0999	<0,001*
Chất dẫn, QD x 42, PO	Everolimus, 5 mpk, QD x 42, PO	0,433	0,1038	<0,001*
Chất dẫn, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO / Everolimus, 5 mpk, QD x 42, PO	0,748	0,0999	<0,001*
Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO / Everolimus, 5 mpk, QD x 42, PO	0,303	0,0999	0,004*
Everolimus, 5 mpk, QD x 42, PO	Hợp chất trong ví dụ 10, 15 mpk, QD x 42, PO / Everolimus, 5 mpk, QD x 42, PO	0,315	0,138	0,004*

^b Hiệu số chênh lệch=Điều trị 1 – Điều trị 2; *giá trị p: có ý nghĩa ($p < 0,05$)

SE – sai số chuẩn

Bảng 24: Hiệu quả kết hợp của hợp chất trong ví dụ 10 với everolimus trong mẫu ung thư vú dương tính với ER MCF7

Điều trị	% Delta T/C hoặc % thoái triển	Giá trị p	Tác dụng kết hợp	Khối lượng cơ thể
Chất dẫn	Không áp dụng	Không áp dụng		
Hợp chất trong ví dụ 10	-51	<0,001*		
Everolimus	-50	<0,001*		
Hợp chất trong ví dụ 10 /Everolimus (Kết hợp)	-76	<0,001*	Bổ sung	Sự thay đổi không đáng kể

Phân tích về thể tích khối u được dựa trên Log₁₀ và cấu trúc hiệp phương sai Spatial Power.

*Giá trị p: có ý nghĩa (p < 0,05); NA: Không áp dụng

% Delta T/C được tính toán khi thể tích khối u điểm cuối trong nhóm điều trị là ở mức hoặc trên mức thể tích khối u mốc cơ sở; và % thoái triển được tính toán đối với thể tích khối u ở dưới mốc cơ sở. Công thức là $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, trong đó T và C tương ứng là thể tích khối u tối hạn trong nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng T₀ và C₀ là thể tích khối u mốc cơ sở trung bình trong các nhóm này.

Thử nghiệm độ sinh khả dụng theo đường uống của chuột

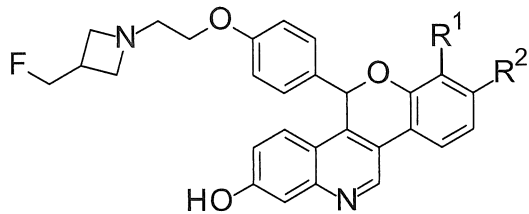
Mục đích của thử nghiệm sau là để chứng tỏ xem hợp chất thử nghiệm có sinh khả dụng theo đường uống hay không.

Dùng hợp chất thử nghiệm cho chuột Sprague-Dawley theo đường tĩnh mạch với liều 1 mg/kg (sử dụng các chất dẫn: 20% CAPTISOL® trong 25 mM dung dịch đệm natri phosphat, pH2 lượng vừa đủ; hoặc 25% DMA, 15% EtOH, 10% propylen glycol, 25% 2-pyrrolidon, và 25% nước cất) và PO ở mức 10 mg/kg (sử dụng chất dẫn là 1% hydroxyetyl xenluloza, 0,25% polysorbate 80, 0,05% chất chống tạo bọt 1510-US, và nước cất lượng vừa đủ). Thu gom các mẫu máu hàng loạt tại 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, và 12 giờ sau định liều trong truyền nhanh tĩnh mạch lượng lớn và tại 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, và 12 giờ sau định liều sau khi dùng theo đường uống. Sau khi xử lý bằng chất đông máu EDTA, thu được huyết tương bằng cách ly tâm và 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 hệ thống Watson LIMS™ trong đó phân tích không 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 toán độ sinh khả dụng theo đường uống (%F) bằng phương trình sau,

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

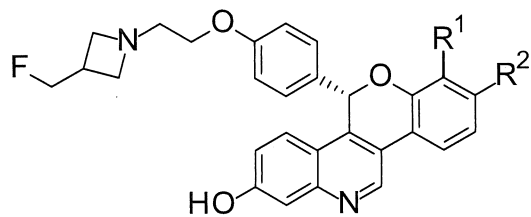
Các hợp chất trong ví dụ 1B thể hiện giá trị %F là ~50% trong thử nghiệm nêu trên. Thử nghiệm này chứng tỏ rằng, hợp chất trong ví dụ 1B có độ sinh khả dụng theo đường uống tốt.

1. Hợp chất có công thức:



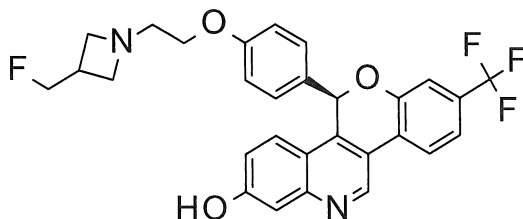
hoặc muối được dùng của hợp chất này.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là



78

4. Hợp chất theo điểm 2, trong đó hợp chất này là

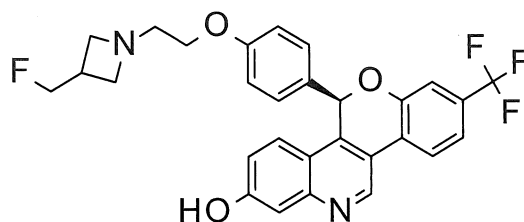


hoặc muối được dụng của hợp chất này.

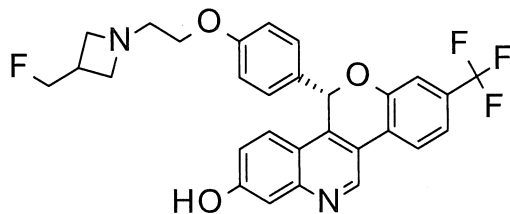
5. Hợp chất theo điểm 4, trong đó muối được dụng là muối của axit benzensulfonic.

6. Hợp chất theo điểm 4, trong đó muối được dụng là muối của axit 4-methylbenzensulfonic.

7. Hợp chất theo điểm 4, trong đó hợp chất này là



8. Hợp chất theo điểm 3, trong đó hợp chất này là

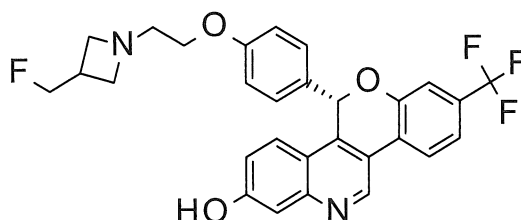


hoặc muối được dụng của hợp chất này.

9. Hợp chất theo điểm 8, trong đó muối được dụng là muối của axit benzensulfonic.

10. Hợp chất theo điểm 8, trong đó muối được dụng là muối của axit 4-methylbenzensulfonic.

11. Hợp chất theo điểm 8, trong đó hợp chất này là



12. Dược phẩm chứa hợp chất hoặc muối được dụng của hợp chất này theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 kết hợp với tá dược, chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó dược phẩm này chứa một hoặc nhiều tác nhân trị liệu khác.