



- (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
1-0051897
(51)^{2022.01} A61K 31/506; A61P 35/00; A61K (13) B
31/505
-

- (21) 1-2022-07782 (22) 28/04/2021
(86) PCT/CN2021/090718 28/04/2021 (87) WO 2021/219040 04/11/2021
(30) 63/018,427 30/04/2020 US
(45) 25/09/2025 450 (43) 25/09/2023 426A
(73) GREAT NOVEL THERAPEUTICS BIOTECH & MEDICALS CORPORATION
(TW)
17F., No.3, Park St., Nangang Dist., Taipei City 115, Taiwan
(72) CHEN, Jia-Shiong (TW); YANG, Mu-Hsuan (TW); WU, Yi-Hong (TW); CHU, Sz-Hao (TW); CHOU, Cheng-Han (TW); CHAO, Ye-Su (TW); CHEN, Chia-Nan (TW).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

- (54) CHẤT ỨC CHẾ HISTON DEAXETYLaza ĐỂ ĐIỀU BIẾN MIỄN DỊCH TRONG VI MÔI TRƯỜNG KHỐI U, DƯỢC PHẨM HOẶC TỔ HỢP DƯỢC PHẨM CHỨA CHẤT ỨC CHẾ NÀY

(21) 1-2022-07782

(57) Sáng chế đề cập chung đến hợp chất ức chế HDAC loại I, quy trình điều chế, dược phẩm hoặc tổ hợp dược phẩm chứa hợp chất này. Các hợp chất này có các hoạt tính điều biến miễn dịch biểu sinh trong vi môi trường khối u (tumor microenvironment-TME) và do đó ức chế sự phát triển của các tế bào khối u.

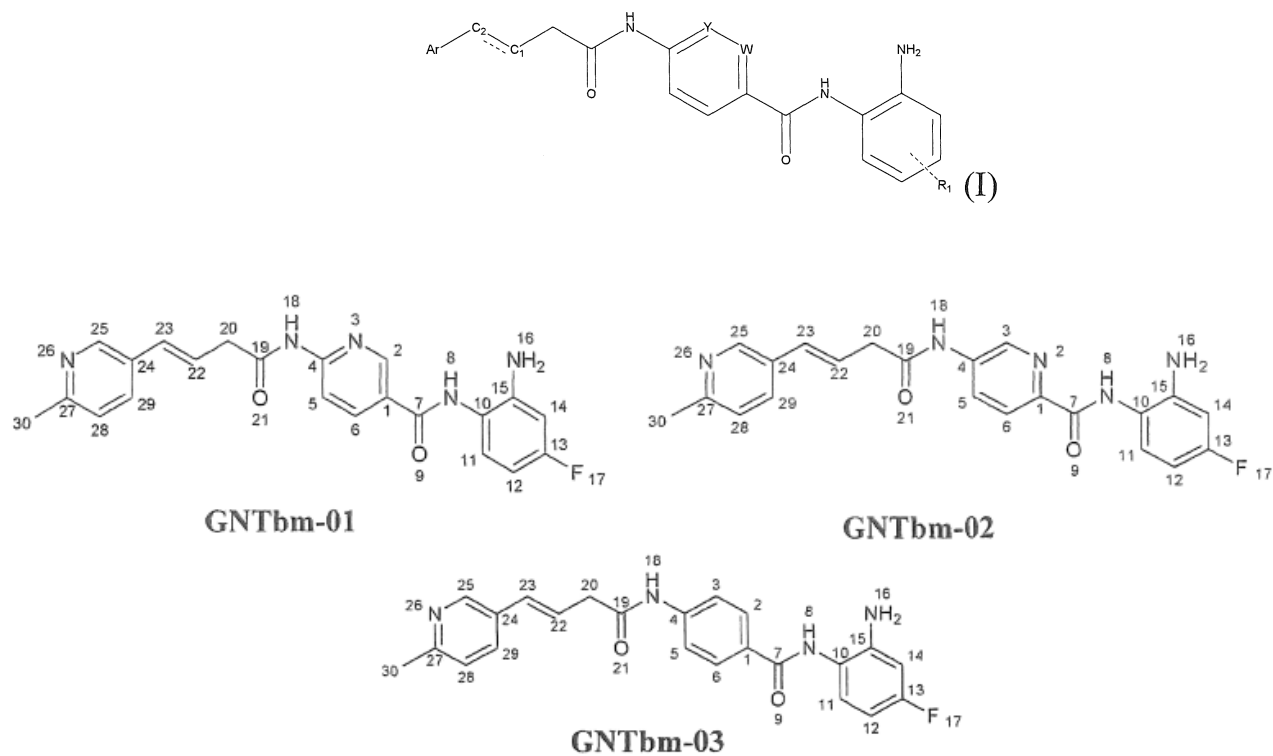


Fig. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến hợp chất ức chế HDAC loại I, quy trình điều chế và ứng dụng của chúng. Cụ thể là, các hợp chất này có các hoạt tính điều biến miễn dịch biểu sinh trong vi môi trường khối u (tumor microenvironment-TME) và do đó ức chế sự phát triển của các tế bào khối u.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Liệu pháp miễn dịch đã trở thành tiêu chuẩn chăm sóc để điều trị một số bệnh ung thư tiến triển. Bước đột phá trong liệu pháp miễn dịch là sự phát triển và ứng dụng lâm sàng của các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch (immune checkpoint inhibitor-ICI) như kháng thể kháng PD-1/kháng PD-L1/kháng CTLA-4. Tuy nhiên, ICI có thể gây ra các tác dụng phụ liên quan đến miễn dịch và quan trọng hơn, chỉ một phần nhỏ bệnh nhân đạt được lợi ích điều trị (tỷ lệ đáp ứng thấp). Vi môi trường khối u (TME) động và phức tạp là yếu tố chính để xác định đáp ứng miễn dịch đối với các khối u. Thành phần của TME bao gồm các tế bào ung thư và nhiều tế bào miễn dịch khác nhau đan xen với các tế bào mô bình thường. Nhiều yếu tố tăng trưởng, xytokin và chemokin được tiết ra bởi các tế bào khác nhau trong TME.

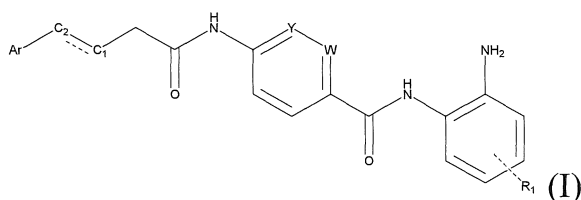
Các tế bào lympho T gây độc tế bào (Cytotoxic T lympho-CTL) là các tế bào miễn dịch sơ cấp của tính miễn dịch thích ứng đặc hiệu để tiêu diệt trực tiếp tế bào ung thư. CTL nhạy với nhiều tế bào ức chế miễn dịch xâm nhập vào TME gây bất hoạt CTL. Các tế bào ức chế miễn dịch đã biết rõ bao gồm Treg (tế bào T điều hòa), tế bào ức chế có nguồn gốc từ tế bào tủy đơn nhân (monocytic-myeloid-derived suppressor cells - M-MDSC), tế bào ức chế có nguồn gốc từ tế bào tủy nhân đa hình (polymorphonuclear-myeloid-derived suppressor cells - PMN-MDSC) và đại thực bào liên quan đến khối u (Tumor-associated macrophages - TAM). Các tế bào ức chế miễn dịch này góp phần ức chế tác dụng gây độc tế bào trong việc tiêu diệt các tế bào ung thư qua trung gian CTL. Có nhiều cơ chế khác nhau được thực hiện bởi các tế bào ức chế miễn dịch này dẫn đến rối loạn chức năng của CTL.

Mặc dù các liệu pháp ICI được chứng minh là có hiệu quả trong việc tăng cường hoạt hóa miễn dịch để tiêu diệt ung thư, nhưng các liệu pháp này vẫn phải đối mặt với các vấn đề chưa được giải quyết về kháng thuốc nguyên phát và mắc phải. Các yếu tố nội tại thúc đẩy sự kháng nguyên phát và mắc phải đối với các liệu pháp miễn dịch này bao gồm các cơ chế di truyền và biểu sinh, mà thông qua các quá trình như chỉnh sửa miễn dịch, thường gây ra sự điều hòa giảm MHC I hoặc mất biểu hiện kháng nguyên, dẫn đến mất toàn bộ sự trình diện kháng nguyên. Do đó, có nhu cầu phát triển các hợp chất có hoạt tính điều biến miễn dịch trong TME để kích thích khả năng miễn dịch chống lại khối u bằng cách điều hòa tăng cơ cấu xử lý và trình diện kháng nguyên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tóm lại, các phương án theo sáng chế đề xuất hợp chất ức chế HDAC loại I, bao gồm muối dược dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền dược chất của chúng, mà có khả năng điều biến miễn dịch biểu sinh trong TME. Sáng chế cũng mô tả về phương pháp sử dụng các hợp chất này để điều trị các bệnh hoặc tình trạng bệnh khác nhau, như bệnh ung thư.

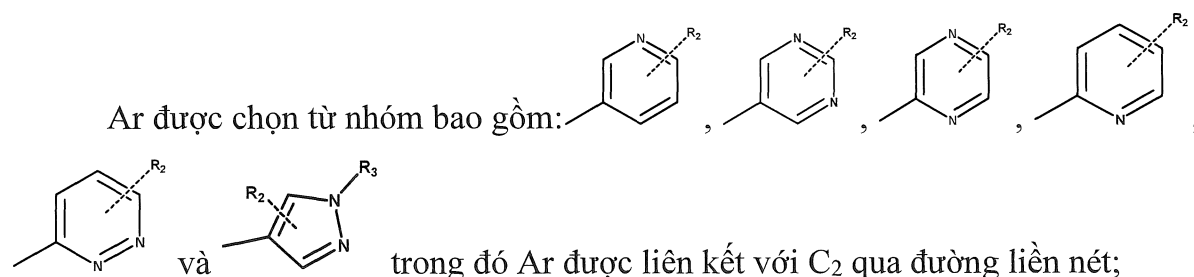
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):



trong đó W và Y mỗi nhóm độc lập được chọn từ CH và N;

R₁ độc lập được chọn từ hydro, halogen, C₁-C₃ alkyl và C₁-C₃ alkyl được halogen hóa, và có thể là sự thế một lần, hai lần, ba lần hoặc bốn lần;

C₁ và C₂ là các nguyên tử C được liên kết bằng liên kết đơn hoặc liên kết đôi;



R₂ có cùng nghĩa như được mô tả đối với R₁; và

R₃ là hydro hoặc C₁-C₃ alkyl;

hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền được chất của chúng.

Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 6-((E)-4-(6-methylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl) pyridin- 3-carboxamit, được đặt tên theo GNTbm-01. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 5-((E)-4-(6-methylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl) pyridin- 2-carboxamit, được đặt tên theo GNTbm-02. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 4-((E)-4-(6-methylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl) benzamit, được đặt tên theo GNTbm-03. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 5-((E)-4-(pyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl)pyridin-2- carboxamit, được đặt tên theo GNTbm-04. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 5-((E)-4-(pyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-aminophenyl)pyridin-2-carboxamit, được đặt tên theo GNTbm-05. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 5-((E)-4-(6-methylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-aminophenyl)pyridin-2-carboxamit, được đặt tên theo GNTbm-06. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 5-(4-(6-methylpyridin-3-yl)butanamido)-N-(2-amino-4-flophenyl)pyridin-2-carboxamit, được đặt tên theo GNTbm-08. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 5-((E)-4-(pyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-(triflometyl)phenyl)pyridin-2-carboxamit, được đặt tên theo GNTbm-11. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 5-((E)-4-(6-methylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-(triflometyl)phenyl)pyridin-2-carboxamit, được đặt tên theo GNTbm-12. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 5-(4-(6-methylpyridin-3-yl)butanamido)-N-(2-aminophenyl)pyridin-2-carboxamit, được đặt tên theo GNTbm-19. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 5-(4-(6-methylpyridin-3-yl)butanamido)-N-(2-amino-4-(triflometyl)phenyl)pyridin-2-carboxamit, được đặt tên theo GNTbm-25. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 4-((E)-4-(pyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-(triflometyl)phenyl)benzamit, được đặt tên theo GNTbm-33. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 4-(4-(pyridin-3-yl)butanamido)-N-(2-amino-4-flophenyl)benzamit, được đặt tên theo GNTbm-37. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 4-((E)-4-(pyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-aminophenyl)benzamit,

được đặt tên theo GNTbm-38. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là 4-((E)-4-(pyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl)benzamid, được đặt tên theo GNTbm-39.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm hoặc tổ hợp được phẩm chứa hợp chất được mô tả ở đây.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều biến miễn dịch biểu sinh TME và/hoặc điều trị bệnh ung thư, phương pháp này bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu của dược phẩm hoặc tổ hợp dược phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền dược chất của chúng cho đối tượng có nhu cầu.

Theo một số phương án, phương pháp này là để gây ra sự kìm hãm chu kỳ tế bào của các tế bào khối u, để gây ra quá trình chết theo chương trình của các tế bào khối u, để gây ra sự axetyl hóa histon H3, để tạo ra sự ghi nhớ miễn dịch, để hoạt hóa CTL, để làm giảm các tế bào ức chế miễn dịch.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất hoặc muối dược dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền dược chất của nó hoặc dược phẩm hoặc tổ hợp dược phẩm để sản xuất thuốc để điều biến miễn dịch biểu sinh đối với TME và/hoặc điều trị bệnh ung thư cho đối tượng có nhu cầu.

Theo một số phương án, thuốc này là để gây ra sự kìm hãm chu kỳ tế bào của các tế bào khối u, để gây ra quá trình chết theo chương trình của các tế bào khối u, để gây ra sự axetyl hóa histon H3, để tạo ra sự ghi nhớ miễn dịch, để hoạt hóa CTL, để làm giảm các tế bào ức chế miễn dịch.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh liên quan đến HDAC loại I ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất hoặc muối dược dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền dược chất của chúng hoặc dược phẩm hoặc tổ hợp dược phẩm cho đối tượng có nhu cầu.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất hoặc muối dược dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền dược chất của chúng hoặc dược phẩm hoặc tổ hợp dược phẩm để sản xuất thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh liên quan đến HDAC loại I cho đối tượng có nhu cầu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 cho thấy cấu trúc của các hợp chất GNTbm-01, GNTbm-02 và GNTbm-03.

Fig. 2 cho thấy phổ NMR và phổ MS độ phân giải cao: (a) dữ liệu quang phổ ^1H -NMR của hợp chất GNTbm-01, (b) dữ liệu quang phổ ^1H -NMR của hợp chất GNTbm-02, (c) dữ liệu quang phổ ^1H -NMR của hợp chất GNTbm-03, (d) dữ liệu quang phổ MS độ phân giải cao của hợp chất GNTbm-01, (e) dữ liệu quang phổ MS độ phân giải cao của hợp chất GNTbm-02, (f) dữ liệu quang phổ MS độ phân giải cao của hợp chất GNTbm-03.

Fig. 3 cho thấy hình thái tế bào được quan sát bằng kính hiển vi ánh sáng tương phản pha sau khi xử lý: Sự thay đổi hình thái tế bào được quan sát bằng kính hiển vi ánh sáng tương phản pha. (a) các tế bào MDA-MB-231, (b) các tế bào SW48, (c) các tế bào M10.

Fig. 4 cho thấy kết quả từ việc đánh giá sự kìm hãm chu kỳ tế bào do GNTbm-02 gây ra trong pha G0/G1 trong các tế bào MDA-MB-231: việc đánh giá được thực hiện sau khi xử lý bằng GNTbm-02 và Entinostat trong các tế bào MDA-MB-231 theo cách phụ thuộc vào liều lượng và phụ thuộc vào thời gian. Các tế bào được nhuộm bằng PI và bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng, tỷ lệ phần trăm của các tế bào trong các pha của chu kỳ tế bào khác nhau được phân tích. (a) & (b) cách thức phụ thuộc vào liều lượng. (c) & (d) cách thức phụ thuộc vào thời gian.

Fig. 5 cho thấy kết quả từ việc đánh giá sự kìm hãm chu kỳ tế bào do GNTbm-02 gây ra trong pha G0/G1 trong các tế bào SW48: việc đánh giá được thực hiện sau khi xử lý bằng GNTbm-02 và Entinostat trong các tế bào SW48 theo cách phụ thuộc vào liều lượng và phụ thuộc vào thời gian. Các tế bào được nhuộm bằng PI và bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng, tỷ lệ phần trăm của các tế bào trong các pha của chu kỳ tế bào khác nhau được phân tích. (a) & (b) cách thức phụ thuộc vào liều lượng. (c) & (d) cách thức phụ thuộc vào thời gian.

Fig. 6 cho thấy kết quả từ việc đánh giá sự kìm hãm chu kỳ tế bào do GNTbm-02 gây ra trong pha G2/M trong các tế bào M10: việc đánh giá được thực hiện sau khi xử lý bằng GNTbm-02 và Entinostat trong các tế bào M10 theo cách phụ thuộc vào liều lượng và phụ thuộc vào thời gian. Các tế bào được nhuộm bằng PI và bằng cách sử dụng

máy đếm tế bào theo dòng, tỷ lệ phần trăm của các tế bào trong các pha của chu kỳ tế bào khác nhau được phân tích. (a) & (b) cách thức phụ thuộc vào liều lượng. (c) & (d) cách thức phụ thuộc vào thời gian.

Fig. 7 cho thấy kết quả từ việc đánh giá sự chết tế bào theo chương trình do GNTbm-02 gây ra trong các tế bào MDA-MB-231: việc đánh giá được thực hiện sau khi xử lý bằng GNTbm-02 và Entinostat trong các tế bào MDA-MB-231 theo cách phụ thuộc vào liều lượng và phụ thuộc vào thời gian. Các tế bào được nhuộm bằng PI và bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng, tỷ lệ phần trăm của các tế bào trong pha dưới G1 được phân tích. (a) & (b) cách thức phụ thuộc vào liều lượng. (c) & (d) cách thức phụ thuộc vào thời gian.

Fig. 8 cho thấy kết quả từ việc đánh giá sự chết tế bào theo chương trình do GNTbm-02 gây ra trong các tế bào SW48: việc đánh giá được thực hiện sau khi xử lý bằng GNTbm-02 và Entinostat trong các tế bào SW48 theo cách phụ thuộc vào liều lượng và phụ thuộc vào thời gian. Các tế bào được nhuộm bằng PI và bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng, tỷ lệ phần trăm của các tế bào trong pha dưới G1 được phân tích. (a) & (b) cách thức phụ thuộc vào liều lượng. (c) & (d) cách thức phụ thuộc vào thời gian.

Fig. 9 cho thấy kết quả từ việc đánh giá sự chết tế bào theo chương trình do GNTbm-02 gây ra trong các tế bào M10: việc đánh giá được thực hiện sau khi xử lý bằng GNTbm-02 và Entinostat trong các tế bào M10 theo cách phụ thuộc vào liều lượng và phụ thuộc vào thời gian. Các tế bào được nhuộm bằng PI và bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng, tỷ lệ phần trăm của các tế bào trong pha dưới G1 được phân tích. (a) & (b) cách thức phụ thuộc vào liều lượng. (c) & (d) cách thức phụ thuộc vào thời gian.

Fig. 10 cho thấy kết quả phân tích thẩm tách Western đối với mức độ axetyl hóa histon H3 trong các tế bào được xử lý bằng GNTbm-02 và Entinostat: phân tích thẩm miễn dịch đại diện đối với axetyl histon H3, β -actin trong các tế bào MDA-MB-231 hoặc SW48. Các tế bào được điều trị bằng các nồng độ GNTbm-02 và Entinostat được chỉ định trong 24 giờ. Các tế bào đối chứng được ủ với chất dẫn. (a) (c) Các chất chiết của các tế bào MDA-MB-231 hoặc SW48 được điều trị bằng GNTbm-02 hoặc Entinostat như được chỉ định được phân giải bằng SDS-PAGE, sau đó thẩm tách western

và nhuộm màu miễn dịch sau khi phát hiện bằng kháng thể để axetyl hóa histon H3 (AcH3). (b) (d) Định lượng mức độ biểu hiện protein AcH3 được chuẩn hóa theo β -actin, được thể hiện dưới dạng số lần thay đổi.

Fig. 11 minh họa khoảng thời gian gây ra quá trình axetyl hóa histon H3 bằng chất ức chế HDAC loại I GNTbm-02: Các tế bào MDA-MB-231 hoặc SW48 được xử lý bằng GNTbm-02 ở nồng độ 1 μ M trong 2, 6, 24, 48, 72 giờ. (a) (c) Các chất chiết của các tế bào MDA-MB-231 hoặc SW48 được xử lý bằng GNTbm-02 như được chỉ định được phân giải bằng SDS-PAGE, sau đó thẩm tách western và nhuộm màu miễn dịch sau khi phát hiện bằng kháng thể để axetyl hóa histon H3 (AcH3). (b) (d) Định lượng mức độ biểu hiện protein AcH3 được chuẩn hóa theo β -actin, được thể hiện dưới dạng số lần thay đổi.

Fig. 12 cho thấy kết quả phân tích thẩm tách Western đối với mức độ axetyl hóa của histon H3 trong các tế bào được xử lý bằng GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-06, GNTbm-11, GNTbm-38, GNTbm-39 và Chidamide (dưới dạng đối chứng dương): phân tích thẩm miễn dịch đại diện đối với axetyl histon H3, β -actin trong các tế bào SW48. Các tế bào được xử lý với nồng độ hợp chất được chỉ định trong 24 giờ. Các tế bào đối chứng được ủ với chất dẫn. (a) Các chất chiết của các tế bào SW48 được xử lý bằng GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-11 và Chidamide như được chỉ định được phân giải bằng SDS-PAGE, sau đó thẩm tách western và nhuộm màu miễn dịch sau khi phát hiện bằng kháng thể để axetyl hóa histon H3 (AcH3). (b) Các chất chiết của các tế bào SW48 được xử lý bằng GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-06 và Chidamide như được chỉ định được phân giải bằng SDS-PAGE, sau đó thẩm tách western và nhuộm màu miễn dịch sau khi phát hiện bằng kháng thể để axetyl hóa histon H3 (AcH3). (c) Các chất chiết của các tế bào SW48 được xử lý bằng GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-38, GNTbm-39 và Chidamide như được chỉ định được phân giải bằng SDS-PAGE, sau đó thẩm tách western và nhuộm màu miễn dịch sau khi phát hiện bằng kháng thể để axetyl hóa histon H3 (AcH3). Tất cả những dữ liệu này thể hiện quá trình định lượng mức độ biểu hiện protein AcH3 được chuẩn hóa theo β -actin, được thể hiện dưới dạng số lần thay đổi.

Fig.13 cho thấy kết quả từ việc đánh giá đáp ứng điều trị của GNTbm-02 cộng với Celecoxib ở các liều khác nhau kết hợp với kháng thể kháng PD-1 ở chuột mang khối u CT26: Chuột BALB/c mang khối u CT26 được điều trị bằng nhiều phương thức

trị liệu khác nhau theo chỉ định. IgG, đối chứng kháng IgG (2,5 mg/kg); PD-1, kháng thể đơn dòng kháng PD-1 (2,5 mg/kg); Celecoxib (50 mg/kg); GNTbm-02 (12,5, 25 mg/kg). Tổng thể tích khối u (a) & (b), thể tích khối u riêng lẻ (c), khối lượng cơ thể chuột (d) và tỷ lệ sống sót (e) được ghi lại. Chuột mang khối u CT26 được điều trị theo chỉ định và được làm chết êm ái khi thể tích khối u đạt 3000 mm³ sau khi cấy ghép khối u. Dữ liệu được cung cấp dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM; * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, ANOVA một yếu tố với kiểm định Tukey. Thử nghiệm Gehan-Breslow-Wilcoxon (e). *, so với đối chứng IgG. #, so với nhóm PD-1.

Fig. 14 cho thấy đánh giá về đáp ứng trị liệu kết hợp của chuỗi hợp chất GNTbm ở chuột mang khối u CT26. Chuột BALB/c mang khối u CT26 được điều trị bằng nhiều phương thức trị liệu khác nhau theo chỉ định. IgG, đối chứng kháng IgG (2,5 mg/kg); PD-1, kháng thể đơn dòng kháng PD-1 (2,5 mg/kg); Chidamide (50 mg/kg); Celecoxib (50 mg/kg); GNTbm-02 (5, 10, 20, 25, 50 mg/kg); GNTbm-03 (50 mg/kg); GNTbm-04 (50 mg/kg); GNTbm-06 (50 mg/kg); Regorafenib (30 mg/kg). Tổng thể tích khối u (a), (b), (f), (j), (n), (r), thể tích khối u riêng lẻ (c), (g), (k), (o), (s), khối lượng cơ thể chuột (d), (h), (l), (p), (t) và tỷ lệ sống sót (e), (i), (m), (q), (u) được ghi lại. Chuột mang khối u CT26 được điều trị theo chỉ định và được làm chết êm ái khi thể tích khối u đạt 3000 mm³ sau khi cấy ghép khối u. Dữ liệu được cung cấp dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM; ANOVA một yếu tố một chiều với kiểm định Tukey (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 so với đối chứng kháng IgG). Thử nghiệm Gehan-Breslow-Wilcoxon (e).

Fig. 15 cho thấy kết quả điều trị từ chuột trại lông BALB/c mang khối u CT26 được điều trị bằng nhiều phương thức điều trị khác nhau: đối chứng kháng IgG (2,5 mg/kg); kháng thể đơn dòng kháng PD-1 (2,5 mg/kg); Celecoxib (50 mg/kg); GNTbm-02 (10 mg/kg). (a) Sơ đồ tiêm dưới da cho khối u CT26 và các nhóm điều trị khác nhau (n = 6 con chuột mỗi nhóm). (b) Tổng thể tích khối u. (c) Số lần thay đổi thể tích khối u. (d) Khối lượng cơ thể chuột. (e) Thể tích khối u riêng lẻ. Chuột trại lông mang khối u CT26 được điều trị theo chỉ định và được làm chết êm ái khi thể tích khối u đạt 3000 mm³ sau khi cấy ghép khối u.

Fig. 16 cho thấy tác dụng của GNTbm-02 ức chế hoạt tính của enzym HDAC3: (a) Việc đánh giá được thực hiện sau khi ủ 2 μ M GNTbm-02, Chidamide hoặc Entinostat với enzym HDAC3 (bao gồm dung dịch đệm thử nghiệm) trong 20 phút, 40 phút và 60

phút. GNTbm-02 được chứng minh là liên kết với HDAC3 và ức chế HDAC3 mạnh hơn Entinostat. (b) Việc đánh giá được thực hiện sau khi ủ 2 μ M GNTbm-02, GNTbm-03 hoặc GNTbm-01 với enzym HDAC3 (bao gồm dung dịch đệm thử nghiệm) trong 20 phút, 40 phút và 60 phút. GNTbm-02 được chứng minh là liên kết với HDAC3 và ức chế HDAC3 mạnh hơn GNTbm-03 và GNTbm-01.

Fig. 17 cho thấy GNTbm-02 (10 mg/kg) cộng với Celecoxib (50 mg/kg) điều biến đáp ứng của tế bào đơn nhân và tế bào T trong các mô hình mang CT26: Chuột BALB/c mang khối u CT26 được điều trị bằng các phương thức trị liệu được chỉ định, sau đó là phân tích FACS để đánh giá các tế bào miễn dịch tuần hoàn. Giá trị trung bình và SD được thể hiện, với các giá trị P được chỉ định. Các mẫu máu được phân lập vào ngày thứ 16 sau khi điều trị ở chuột mang CT26. (a) Kết quả FACS cho các tế bào lympho tuần hoàn. (b) Kết quả FACS cho các tế bào đơn nhân tuần hoàn. (c) Kết quả FACS cho các tế bào bạch cầu hạt tuần hoàn. (d) Kết quả FACS cho các tế bào T CD3⁺ tuần hoàn. (e) Kết quả FACS cho các tế bào T CD4⁺ tuần hoàn. (f) Kết quả FACS cho các tế bào T CD8⁺ tuần hoàn. (g) Kết quả FACS cho các tế bào Treg tuần hoàn. (h) Kết quả FACS cho các tế bào CD11b⁺ tuần hoàn. (i) Kết quả FACS cho các tế bào M-MDSC (CD11b⁺Ly6C⁺) tuần hoàn. (j) Kết quả FACS cho các tế bào CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺ tuần hoàn. (k) Kết quả FACS cho các tế bào PMN-MDSC (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁻) tuần hoàn. Giá trị trung bình $\pm$ SD được thể hiện cho n = 8–12 con chuột mỗi nhóm. Kiểm định so sánh nhiều nhóm Dunnett và ANOVA một yếu tố (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 so với đối chứng IgG).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Trừ khi được xác định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực của sáng chế này, áp dụng các thuật ngữ trong ngữ cảnh để sử dụng chúng trong việc mô tả sáng chế. Thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả sáng chế chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và không dự định để giới hạn sáng chế.

Khi một khoảng giá trị được cung cấp, có thể hiểu rằng, mỗi một giá trị xen ở giữa, tới 10 đơn vị của giới hạn dưới - trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ theo cách khác (như trong

trường hợp nhóm chứa một số nguyên tử cacbon, trong đó mỗi số nguyên tử cacbon nằm trong khoảng được cung cấp) - nằm giữa giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng này và giá trị thông báo hoặc xen ở giữa bất kỳ khác trong khoảng thông báo đó được bao hàm trong sáng chế. Các giới hạn trên và dưới của các khoảng nhỏ hơn này có thể được bao gồm một cách độc lập trong các khoảng nhỏ hơn và cũng được bao gồm trong sáng chế, tuân thủ bất kỳ giới hạn loại trừ cụ thể nào trong khoảng được thông báo. Trường hợp khoảng thông báo bao gồm một hoặc cả hai giới hạn, thì các khoảng ngoại trừ một trong hai hoặc cả hai giới hạn được bao gồm này cũng được bao gồm trong sáng chế.

Mạo từ "một" như được sử dụng ở đây và trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo được sử dụng để chỉ một hoặc nhiều hơn một (tức là, ít nhất một) đối tượng ngữ pháp của mạo từ trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ theo cách khác. Để làm ví dụ, "một yếu tố" dùng để chỉ một hoặc nhiều hơn một yếu tố.

Cụm từ "và/hoặc", như được sử dụng ở đây trong bản mô tả và trong các yêu cầu bảo hộ, nên được hiểu là "một trong hai hoặc cả hai" của các yếu tố đi kèm với nhau, tức là các yếu tố có mặt cùng nhau trong một số trường hợp và có mặt riêng rẽ trong các trường hợp khác. Nhiều yếu tố được liệt kê bằng "và/hoặc" được xây dựng theo cách giống nhau, tức là, "một hoặc nhiều" yếu tố cùng được kết hợp với nhau. Các yếu tố khác có thể có mặt tùy ý ngoài các yếu tố được xác định cụ thể bởi mệnh đề "và/hoặc", cho dù có liên quan hoặc không liên quan đến các yếu tố được xác định cụ thể đó.

Thuật ngữ "halo" và "halogen" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ nguyên tử được chọn từ flo, clo, brom và iot.

Thuật ngữ "alkyl" dùng để chỉ gốc hydrocacbon mạch thẳng hoặc phân nhánh chỉ bao gồm các nguyên tử cacbon và hydro, không chứa phần không no, có từ một đến mười lăm nguyên tử cacbon (ví dụ, C₁-C₁₅ alkyl). Theo các phương án nhất định, alkyl bao gồm từ một đến mười ba nguyên tử cacbon (ví dụ, C₁-C₁₃ alkyl). Theo các phương án nhất định, alkyl bao gồm từ một đến tám nguyên tử cacbon (ví dụ, C₁-C₈ alkyl). Theo các phương án khác, alkyl bao gồm từ một đến năm nguyên tử cacbon (ví dụ, C₁-C₅ alkyl). Theo các phương án khác, alkyl bao gồm từ một đến bốn nguyên tử cacbon (ví dụ, C₁-C₄ alkyl). Theo các phương án khác, alkyl bao gồm từ một đến ba nguyên tử cacbon (ví dụ, C₁-C₃ alkyl). Theo các phương án khác, alkyl bao gồm từ một đến hai

nguyên tử cacbon (ví dụ, C₁-C₂ alkyl). Theo các phương án khác, alkyl bao gồm một nguyên tử cacbon (ví dụ, C₁ alkyl). Theo các phương án khác, alkyl bao gồm từ năm đến mười lăm nguyên tử cacbon (ví dụ, C₅-C₁₅ alkyl). Theo các phương án khác, alkyl bao gồm từ năm đến tám nguyên tử cacbon (ví dụ, C₅-C₈ alkyl). Theo các phương án khác, alkyl bao gồm từ hai đến năm nguyên tử cacbon (ví dụ, C₂-C₅ alkyl). Theo các phương án khác, alkyl bao gồm từ ba đến năm nguyên tử cacbon (ví dụ, C₃-C₅ alkyl). Theo các phương án khác, nhóm alkyl được chọn từ metyl, etyl, 1-propyl (n-propyl), 1-metyletyl (iso-propyl), 1-butyl (n-butyl), 1-metylpropyl (sec-butyl), 2-metylpropyl (iso-butyl), 1,1-dimetyletyl (tert-butyl), 1-pentyl (n-pentyl). Alkyl được gắn với phần còn lại của phân tử bằng liên kết đơn. Trừ khi có quy định cụ thể khác trong bản mô tả, nhóm alkyl tùy ý được thể bằng một hoặc nhiều phần tử thế. Thuật ngữ "alkenyl", như được sử dụng ở đây, là nhóm hóa trị một thu được từ gốc hydrocacbon chứa, theo một số phương án nhất định, từ hai đến sáu, hoặc từ hai đến tám nguyên tử cacbon có ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon. Liên kết đôi có thể là điểm gắn kết với nhóm khác hoặc không. Các nhóm alkenyl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ví dụ, etenyl, propenyl, butenyl, 1-metyl-2-buten-1-yl, heptenyl, octenyl và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ "alkoxy" dùng để chỉ một gốc được liên kết thông qua một nguyên tử oxy có công thức -O-alkyl, trong đó alkyl là mạch alkyl như được định nghĩa ở trên.

Thuật ngữ "alkenyl" dùng để chỉ nhóm gốc mạch hydrocacbon thẳng hoặc phân nhánh chỉ bao gồm các nguyên tử cacbon và hydro, chứa ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon và có từ hai đến mười hai nguyên tử cacbon. Theo các phương án nhất định, alkenyl chứa từ hai đến tám nguyên tử cacbon. Theo các phương án khác, alkenyl chứa từ hai đến bốn nguyên tử cacbon. Alkenyl được gắn với phần còn lại của phân tử bằng một liên kết đơn, ví dụ, etenyl (tức là vinyl), prop-1-enyl (tức là allyl), but-1-enyl, pent-1-enyl, penta-1,4-dienyl, và các nhóm tương tự. Trừ khi có quy định cụ thể khác trong bản mô tả, nhóm alkenyl tùy ý được thể bằng một hoặc nhiều phần tử thế.

Thuật ngữ "xycloalkyl," như được sử dụng ở đây, biểu thị nhóm hóa trị một thu được từ hợp chất nhân vòng cacbon một vòng hoặc nhiều vòng no hoặc không no một phần. Ví dụ về C₃-C₈-xycloalkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xyclopentyl, và xyclooctyl.

Thuật ngữ "aryl," như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ hệ nhân vòng cacbon một vòng hoặc nhiều vòng có một hoặc nhiều vòng thơm, được dung hợp hoặc không được dung hợp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phenyl, naphtyl, tetrahydronaphtyl, indanyl, indenyl và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ "heteroaryl," như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ hệ vòng hoặc gốc đơn vòng hoặc đa vòng (ví dụ, hai vòng, hoặc ba vòng trở lên) được dung hợp hoặc không dung hợp, có ít nhất một vòng thơm, có từ năm đến mười nguyên tử trên vòng, trong đó một nguyên tử trên vòng được chọn từ S, O và N; không, một hoặc hai nguyên tử trên vòng là các nguyên tử khác loại khác độc lập được chọn từ S, O và N; còn các nguyên tử trên vòng còn lại là cacbon. Heteroaryl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, pyridinyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, pyrrolyl, pyrazolyl, imidazolyl, thiazolyl, oxazolyl, isooxazolyl, thiadiazolyl, oxadiazolyl, thiophenyl, furanyl, quinolinyl, isoquinolinyl, benzimidazolyl, benzooxazolyl, quinoxalinyl, và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ "heteroxycloalkyl," như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ vòng không thơm 3-, 4-, 5-, 6- hoặc 7 cạnh hoặc nhóm hai vòng hoặc ba vòng được dung hợp của hệ không dung hợp, trong đó (i) ít nhất một vòng chứa từ một đến ba nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ oxy, lưu huỳnh và nitơ, (ii) mỗi vòng 5 cạnh có từ 0 đến 1 liên kết đôi và mỗi vòng 6 cạnh có từ 0 đến 2 liên kết đôi, (iii) các nguyên tử khác loại nitơ và lưu huỳnh có thể tùy ý được oxy hóa, (iv) nguyên tử khác loại nitơ có thể tùy ý được tạo bậc bốn, và (iv) vòng bất kỳ trong số các vòng nêu trên có thể được dung hợp với vòng benzen. Các nhóm heteroxycloalkyl đại diện bao gồm, nhưng không giới hạn ở, [1,3]dioxolan, pyrrolidinyl, pyrazolinyl, pyrazolidinyl, imidazolinyl, imidazolidinyl, piperidinyl, piperazinyl, oxazolidinyl, isoxazolidinyl, morpholinyl, thiazolidinyl, isothiazolidinyl, và tetrahydrofuryl.

Thuật ngữ "muối được dụng" được dùng để chỉ các muối được điều chế từ các axit hoặc bazơ được dụng không độc gồm các bazơ hữu cơ hoặc vô cơ và các axit hữu cơ hoặc vô cơ. Các muối của các hợp chất bazơ được bao hàm trong thuật ngữ "muối được dụng" chỉ các muối không độc của các hợp chất theo sáng chế mà thường được điều chế bằng cách cho bazơ tự do phản ứng với axit hữu cơ hoặc vô cơ thích hợp. Muối đại diện của các hợp chất bazơ theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các hợp chất sau: axetat, ascorbat, adipat, alginat, aspirat, benzensulfonat, benzoat, bicarbonat,

bisulfat, bitartrat, borat, bromua, butyrat, camphorat, camphorsulfonat, camsylat, cacbonat, clorua, clavulanat, xitrat, xyclopentan propionat, dietylaxetic, digluconat, dihydroclorua, dodexylsulfanat, edetat, edisylat, estolat, esylat, etansulfonat, format, fumarat, gluceptat, glucoheptanoat, gluconat, glutamat, glyxerophosphat, glycollylarsanilat, hemisulfat, heptanoat, hexanoat, hexylresorxinat, hydrabamat, hydrobromua, hydroclorua, 2-hydroxyetansulfonat, hydroxynaphtoat, hydroiodua, iodua, isonicotinat, isothionat, lactat, lactobionat, laurat, malat, maleat, mandelat, mesylat, metylnitrat, metylsulfat, metansulfonat, mucat, 2-naphtalensulfonat, napsylat, nicotinat, nitrat, oleat, oxalat, pamoat (embonat), palmitat, pantothenat, pectinat, persulfat, phosphat/diphosphat, pimelat, phenylpropanoat, polygalacturonat, propionat, salixylat, stearat, sulfat, subaxetat, succinat, tannat, tartrat, teoclat, thioxyanat, tosylat, triethiodua, trifloaxetat, undeconat, valerat và các loại tương tự. Ngoài ra, khi các hợp chất theo sáng chế mang một gốc axit, muối được dùng thích hợp của chúng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối có nguồn gốc từ các bazơ vô cơ bao gồm nhôm, amoni, canxi, đồng, sắt (III), sắt (II), lithi, magie, mangan (III), mangan (II), kali, natri, kẽm, và các loại tương tự. Các muối thu được từ các bazơ hữu cơ không độc được dùng bao gồm các muối của các amin bậc một, bậc hai và bậc ba, các amin vòng, các amin dicyclohexyl và các nhựa trao đổi ion bazơ, như arginin, betain, caffein, cholin, N,N'-dibenzyletylendiamin, dietylamin, 2-dietylaminooctanol, 2-dimetylaminooctanol, etanolamin, etylamin, etylendiamin, N-etylmorpholin, N-etylpiperidin, glucamin, glucosamin, histidin, hydrabamin, isopropylamin, lysin, metylglucamin, morpholin, piperazin, piperidin, các nhựa polyamin, procain, purin, theobromin, trietylamin, trimetylamin, tripropylamin, trometamin và các loại tương tự. Cũng được bao gồm là các nhóm chứa nitơ bazơ có thể được tạo bậc bốn với các chất như alkyl halogenua bậc thấp như metyl, etyl, propyl, và butyl clorua, bromua và iodua; dialkyl sulfat như dimetyl, dietyl, dibutyl; và diamyl sulfat, các halogenua mạch dài như dexyl, lauryl, myristyl và stearyl clorua, bromua và iodua; aralkyl halogenua như benzyl và phenetyl bromua và các chất khác.

Thuật ngữ "đối tượng" bao gồm các sinh vật sống như người, khỉ, bò, cừu, ngựa, lợn, gia súc, dê, chó, mèo, chuột nhắt, chuột cống, tế bào nuôi cấy và các loài chuyển gen của chúng. Theo các phương án được ưu tiên, đối tượng là người.

Thuật ngữ "sử dụng" bao gồm các đường sử dụng mà cho phép các hoạt chất theo sáng chế thực hiện chức năng dự định của chúng.

Thuật ngữ "điều trị" hoặc "việc điều trị" dùng để chỉ phương pháp làm giảm ảnh hưởng của bệnh hoặc tình trạng. Điều trị cũng có thể đề cập đến phương pháp làm giảm nguyên nhân cơ bản của bệnh hoặc tình trạng bệnh hơn là chỉ các triệu chứng. Việc điều trị có thể là sự giảm bớt bất kỳ so với mức ban đầu và có thể, nhưng không giới hạn ở, việc loại bỏ hoàn toàn bệnh, tình trạng hoặc các triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng.

Thuật ngữ "ngăn ngừa", "sự ngăn ngừa" hoặc "việc ngăn ngừa" có nghĩa là ức chế hoặc đẩy lùi các triệu chứng liên quan đến bệnh mục tiêu.

Cụm từ "lượng có hiệu quả điều trị" dùng để chỉ lượng hợp chất, nguyên liệu hoặc chế phẩm chứa hợp chất theo sáng chế mà hữu hiệu để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn, với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý có thể áp dụng cho việc điều trị y tế bất kỳ.

Các hợp chất ức chế HDAC loại I

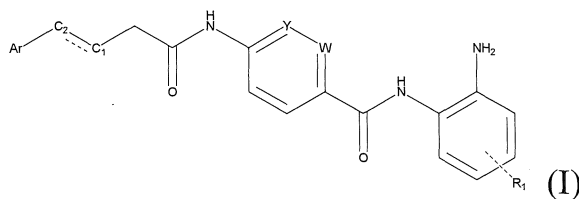
Các liệu pháp biểu sinh cho bệnh ung thư như chất ức chế histon deacetylaza có thể kích thích khả năng miễn dịch chống khối u bằng cách điều hòa giảm cơ cấu xử lý và trình diện kháng nguyên. Các điều biến biểu sinh đóng một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sự khởi phát và tiến triển của các khối u. Sự điều hòa biểu sinh được thực hiện chủ yếu thông qua hai cơ chế chính ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen: Quá trình methyl hóa/khử methyl ADN xảy ra bằng cách thêm/loại bỏ nhóm methyl vào ADN và quá trình axetyl hóa/khử axetyl histon xảy ra bằng cách thêm/loại bỏ nhóm axetyl nhờ enzym vào các protein histon được bao bởi ADN. Các chất ức chế histon deacetylaza (HDACis) được cho là mục tiêu đầy hứa hẹn để phát triển thuốc mới. Cơ chế cơ bản để HDAC đóng một vai trò quan trọng trong bệnh ung thư là bằng cách kiểm soát mức độ axetyl hóa trong histon hoặc protein không phải histon, mà tham gia vào quá trình điều hòa chu kỳ tế bào, quá trình biệt hóa, quá trình chết theo chương trình, sự đáp ứng tổn thương ADN, sự hình thành mạch, di căn và các quá trình tế bào khác.

Các HDAC loại I chủ yếu nằm trong nhân và được biểu hiện khắp nơi trong các mô người và đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sự tăng sinh tế bào, biệt hóa và tiến triển của chu kỳ tế bào. HDAC loại I được biểu hiện cao trong một số bệnh ung thư. Ví dụ, HDAC1 được biểu hiện cao trong ung thư tuyến tiền liệt, dạ dày, ruột kết, vú, phổi và thực quản; HDAC2 được biểu hiện cao trong các khối u ác tính ở dạ dày, cổ

tử cung và đại trực tràng; HDAC3 được biểu hiện cao trong ung thư ruột kết và ung thư vú. Sự biểu hiện không kiểm soát của HDAC sẽ gây ra sự im lặng của nhiều gen mà ức chế sự phát triển của tế bào và do đó làm mất khả năng theo dõi sự phát triển của tế bào và kiểm soát sự biệt hóa tế bào, kìm hãm chu kỳ tế bào và quá trình chết theo chương trình. Sự rối loạn điều hòa trong việc biểu hiện quá mức HDAC có tương quan đáng kể với khối u ác tính và tiên lượng xấu. Nhiều chất ức chế HDAC loại I có đặc tính điều biến miễn dịch biểu sinh.

Các cơ chế điều biến miễn dịch bằng chất ức chế HDAC trong TME được báo cáo là có sự tham gia của các thành phần của cả yếu tố hòa tan và tế bào miễn dịch. Sự biểu hiện của các loại gen và protein thông qua sự điều hòa biểu sinh của các chất ức chế HDAC bằng cách dạng tương đồng HDAC cụ thể được thay đổi theo cách mà kết quả là tình trạng của TME sẽ được chuyển sang chế độ có lợi cho việc tiêu diệt tế bào ung thư. Từ các nghiên cứu đã công bố trước đây, đã chứng minh được rằng một số chất ức chế HDAC có các đặc tính điều biến miễn dịch sẽ kiểm soát việc tiết ra các xytokin/chemokin, các tế bào trình diện kháng nguyên, làm giảm số lượng hoặc chức năng của Treg và kích hoạt sự hoạt hóa các tế bào NK. Các nghiên cứu khác cho thấy các cơ chế giúp tăng cường sự biểu hiện của các kháng nguyên ung thư và điều biến hoạt tính của các tế bào ức chế miễn dịch như MDSC. Các chất ức chế chọn lọc HDAC loại I có thể làm tăng sự biểu hiện PD-L1 và MHC I ở các tế bào ung thư. Hơn nữa, các chất ức chế HDAC loại I điều hòa giảm các tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy (MDSC) xâm nhập vào vi môi trường khối u.

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

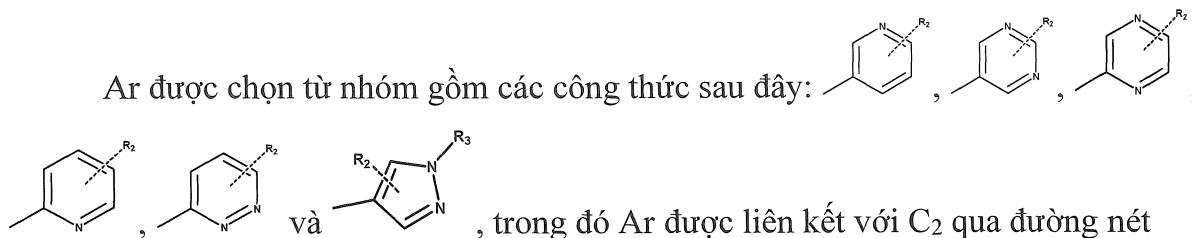


trong đó W và Y mỗi nhóm độc lập được chọn từ CH và N;

Mỗi nhóm R₁ độc lập được chọn từ hydro, halogen, C₁-C₃ alkyl và C₁-C₃ alkyl được halogen hóa, và có thể là sự thế một lần, hai lần, ba lần hoặc bốn lần;

C₁ và C₂ là các nguyên tử C được liên kết bằng liên kết đơn hoặc liên kết đôi;

Ar được chọn từ nhóm gồm các công thức sau đây:



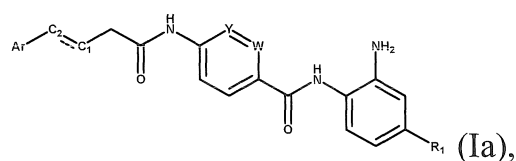
liên;

R₂ có cùng nghĩa như được mô tả đối với R₁; và

R₃ là hydro hoặc C₁-C₃ alkyl;

hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền được chất của chúng.

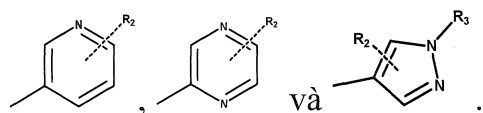
Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) có công thức (Ia):



trong đó W, Y, R₁, C₁, C₂ và Ar có cùng nghĩa như được mô tả; hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền được chất của chúng.

Theo một phương án, Ar được chọn từ các vòng sáu cạnh. Theo một phương án, R₂ và nguyên tử của Ar được liên kết với C₂ là ở vị trí para.

Theo một phương án, Ar được chọn từ nhóm bao gồm các công thức sau:



Theo một phương án, W và Y được chọn từ các tổ hợp sau: (1) W là N và Y là CH, (2) W là CH và Y là N, và (3) W và Y là CH. Theo một phương án được ưu tiên, W là N hoặc CH và Y là CH.

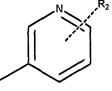
Theo một phương án, R₁ là F hoặc C₁-C₃ alkyl được flo hóa. Theo một phương án, C₁-C₃ alkyl được flo hóa là CF₃.

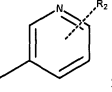
Theo một phương án, R₁ là hydro.

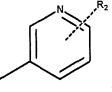
Theo một phương án, C₁ và C₂ là các nguyên tử C được liên kết bằng liên kết đôi. Theo một phương án khác, C₁ và C₂ là các nguyên tử C được liên kết bằng liên kết đơn.

Theo một phương án, R₂ là C₁-C₃-alkyl hoặc C₁-C₃ alkyl được flo hóa. Theo một phương án, C₁-C₃ alkyl là CH₃. Theo một phương án, C₁-C₃ alkyl được flo hóa là CF₃.

Theo một phương án, R₂ là hydro.

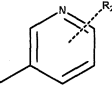
Theo một phương án, Ar là , R₂ và nguyên tử của Ar được liên kết với C₂ là ở vị trí para, và C₁ và C₂ là các nguyên tử C được liên kết bằng liên kết đôi.

Theo một phương án, Ar là , R₂ và nguyên tử của Ar được liên kết với C₂ là ở vị trí para, và R₁ là hydro hoặc F.

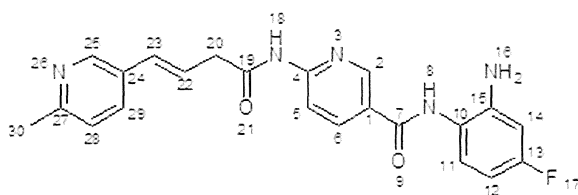
Theo một phương án, Ar là , R₂ và nguyên tử của Ar được liên kết với C₂ là ở vị trí para, và R₂ là hydro hoặc CH₃.

Theo một phương án, R₁ là hydro hoặc F, và R₂ là hydro hoặc CH₃.

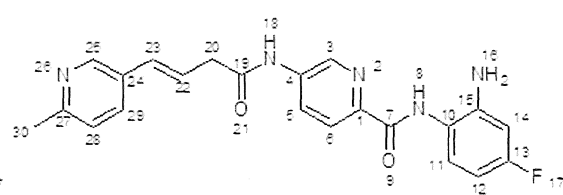
Theo một phương án, R₁ là hydro hoặc F, R₂ là hydro hoặc CH₃, và C₁ và C₂ là các nguyên tử C được liên kết bằng liên kết đôi.

Theo một phương án, Ar là , R₂ và nguyên tử của Ar được liên kết với C₂ là ở vị trí para, R₁ là hydro hoặc F, R₂ là hydro hoặc CH₃, và C₁ và C₂ là các nguyên tử C được liên kết bằng liên kết đôi.

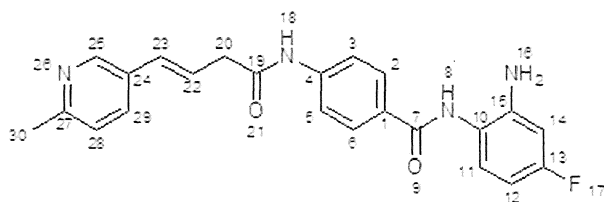
Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) có thể là các hợp chất sau:



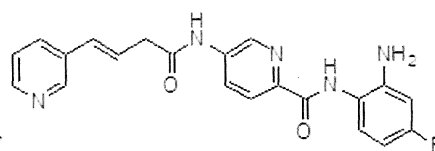
GNTbm-01;



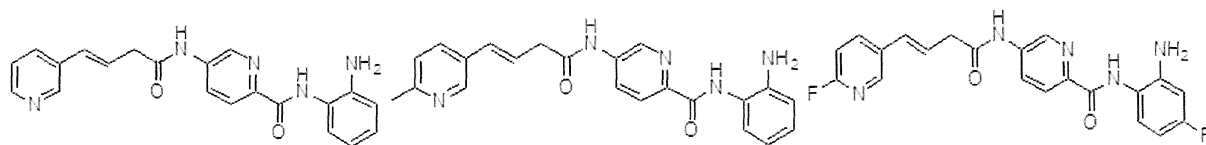
GNTbm-02;



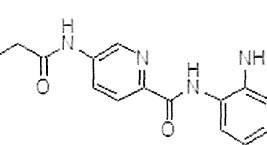
GNTbm-03;



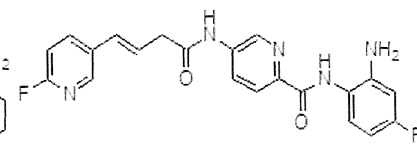
GNTbm-04;



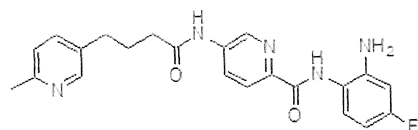
GNTbm-05;



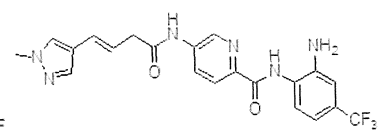
GNTbm-06;



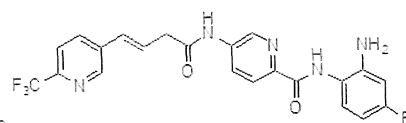
GNTbm-07;



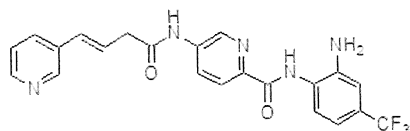
GNTbm-08;



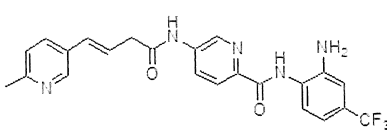
GNTbm-09;



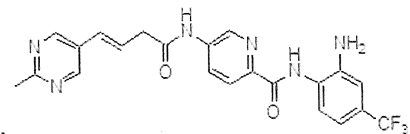
GNTbm-10;



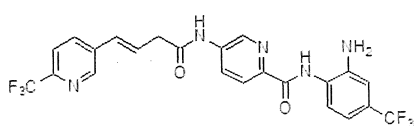
GNTbm-11;



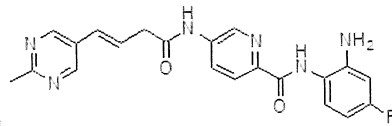
GNTbm-12;



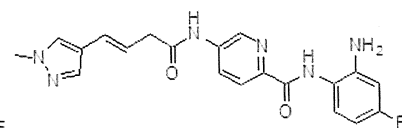
GNTbm-13;



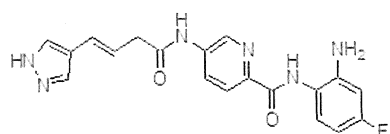
GNTbm-14;



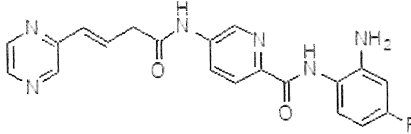
GNTbm-15;



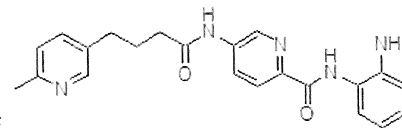
GNTbm-16;



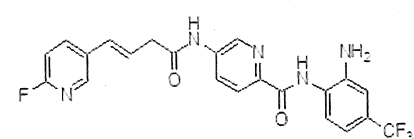
GNTbm-17;



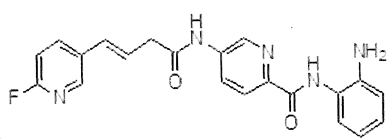
GNTbm-18;



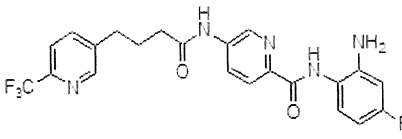
GNTbm-19;



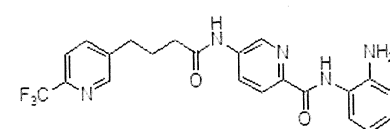
GNTbm-20;



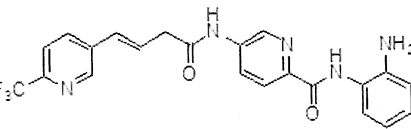
GNTbm-21;



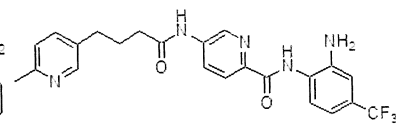
GNTbm-22;



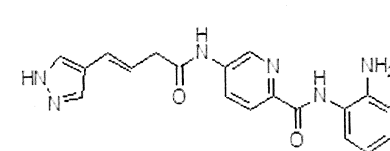
GNTbm-23;



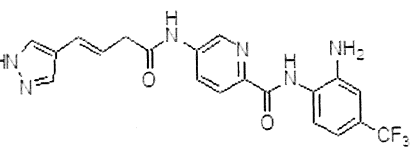
GNTbm-24;



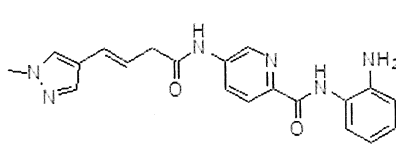
GNTbm-25;



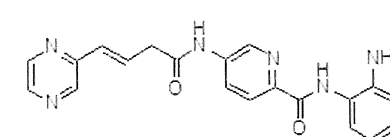
GNTbm-26;



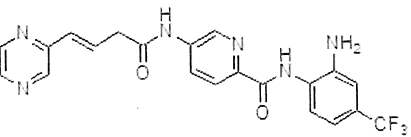
GNTbm-27;



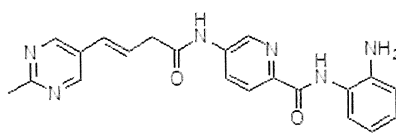
GNTbm-28;



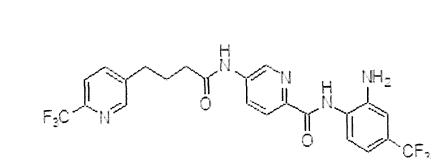
GNTbm-29;



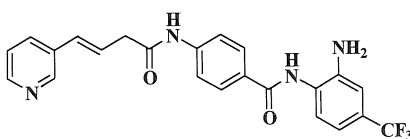
GNTbm-30;



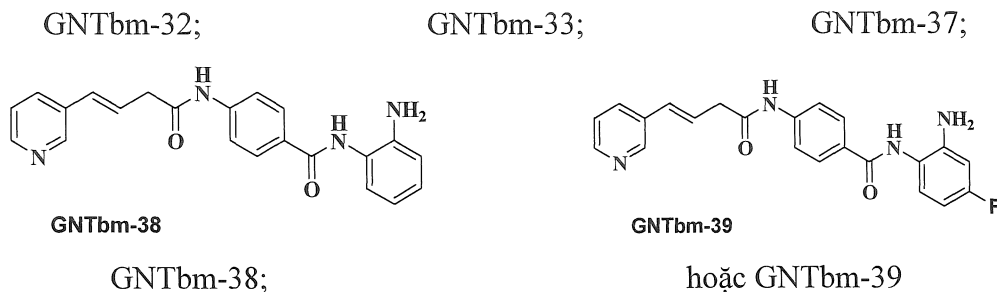
GNTbm-31;



GNTbm-33



GNTbm-37



hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền được chất của chúng.

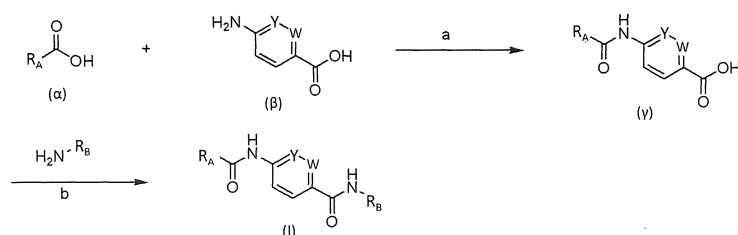
Sáng chế bao gồm tất cả các dạng đồng phân lập thể của các hợp chất có công thức (I). Các tâm bất đối xứng có mặt trong các hợp chất có công thức (I) đều độc lập với nhau có thể có cấu hình (R) hoặc cấu hình (S). Khi các liên kết với cacbon bất đối được mô tả là các đường thẳng trong công thức cấu trúc của sáng chế, cần phải hiểu rằng cả (R) và (S) đều là các cấu hình của cacbon bất đối, và do đó, cả chất đồng phân đối ảnh và các hỗn hợp của chúng, đều được bao hàm trong các công thức. Khi một cấu hình cụ thể được mô tả, thì chất đồng phân đối ảnh đó (hoặc (R) hoặc (S), ở tâm đó)) được dự định. Tương tự, khi một tên hợp chất được đưa ra mà không có ký hiệu bất đối cho cacbon bất đối, thì cần phải hiểu rằng cả (R) và (S) đều là cấu hình của cacbon bất đối, và do đó, các chất đồng phân đối quang riêng lẻ và các hỗn hợp của chúng, được bao hàm bởi tên này.

Sáng chế bao gồm tất cả các chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân vị trí, và chất đồng phân không đối quang và các hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất đồng phân lập thể, ví dụ, hỗn hợp của chất đồng phân đối ảnh và/hoặc chất đồng phân không đối quang, theo mọi tỷ lệ. Do đó, các chất đồng phân đối ảnh là đối tượng của sáng chế ở dạng tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh, cả ở dạng chất dị cấu quay trái và chất dị cấu quay phải, ở dạng raxemat và ở dạng hỗn hợp của hai chất đồng phân đối ảnh theo mọi tỷ lệ. Trong trường hợp đồng phân cis/trans, sáng chế bao gồm cả dạng cis và dạng trans cũng như hỗn hợp của các dạng này theo mọi tỷ lệ. Việc điều chế các đồng phân lập thể riêng lẻ có thể được thực hiện, nếu muốn, bằng cách tách hỗn hợp bằng các phương pháp thông thường, ví dụ bằng sắc ký hoặc kết tinh, bằng cách sử dụng các nguyên liệu ban đầu đồng nhất về mặt hóa học lập thể để tổng hợp hoặc bằng tổng hợp chọn lọc lập thể. Tùy ý, có thể tiến hành tạo dẫn xuất trước khi tách các chất đồng phân lập thể. Việc tách hỗn hợp các đồng chất phân lập thể có thể được thực hiện ở bước trung gian trong quá trình

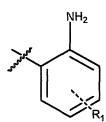
tổng hợp hợp chất có công thức (I) hoặc có thể được thực hiện đối với sản phẩm raxemic cuối cùng. Hóa học lập thể tuyệt đối có thể được xác định bằng phương pháp tinh thể học tia X của các sản phẩm kết tinh hoặc chất trung gian kết tinh được tạo dẫn xuất, nếu cần, bằng chất phản ứng chứa tâm lập thể có cấu hình đã biết. Khi các hợp chất của sáng chế này có khả năng tautome hóa, thì tất cả các tautome riêng lẻ cũng như hỗn hợp của chúng đều thuộc phạm vi của sáng chế này. Sáng chế đề cập đến tất cả các chất đồng phân như vậy, cũng như muối, solvat (kể cả hydrat) và muối được solvat hóa của raxemat, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang và tautome này và các hỗn hợp của chúng.

Như được sử dụng ở đây, các ký hiệu và các quy ước được sử dụng trong các quy trình, sơ đồ và ví dụ này, bất kể một chữ viết tắt cụ thể có được xác định cụ thể hay không, là nhất quán với những cái được sử dụng trong các tài liệu khoa học đương thời, ví dụ, the Journal of the American Chemical Society hoặc the Journal of Biological Chemistry. Cụ thể, nhưng không giới hạn, các chữ viết tắt sau đây có thể được sử dụng trong các ví dụ và trong toàn bộ bản mô tả: g (gam); mg (miligam); mL (mililit); μ L (microlit); mM (millimolar); M (micromolar); Hz (héc); MHz (mega héc); mmol (milimol); hr hoặc hrs (giờ); min (phút); MS (khối phổ); ESI (ion hóa phun điện); TLC (sắc ký lớp mỏng); và HPLC (sắc ký lỏng cao áp). Đối với tất cả các ví dụ sau đây, có thể sử dụng các phương pháp tinh chế và xử lý tiêu chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Trừ khi được xác định rõ theo cách khác, tất cả nhiệt độ được biểu thị là $^{\circ}\text{C}$. (độ bách phân). Tất cả các phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trừ khi được quy định rõ theo cách khác. Các hệ phương pháp tổng hợp được minh họa ở đây nhằm minh họa hóa học có thể áp dụng thông qua việc sử dụng các ví dụ cụ thể và không biểu thị phạm vi của sáng chế.

Các hợp chất có công thức (I) theo sáng chế được điều chế theo quy trình tổng hợp hóa học thông thường. Phương pháp tổng hợp làm ví dụ được thể hiện dưới đây:



trong đó R_A tương ứng với nhóm $-C-C_1\equiv C_2-Ar$ và R_B tương ứng với nhóm



trong công thức (I).

Trong phương pháp này, N,N'-dixyclohexylcarbodiimide (DCC) và diclometan (DCM) có thể được sử dụng trong điều kiện a, và 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), hydroxybenzotriazol (HOBT) và N,N-Dimethylformamide (DMF) có thể được sử dụng trong điều kiện b.

Những cải biến thích hợp khác đối với quy trình, ví dụ, sử dụng các tác nhân bảo vệ/khử bảo vệ phù hợp cho các nhóm dễ bị ảnh hưởng bởi các điều kiện phản ứng nhất định trong quá trình tổng hợp, tách và tinh chế các chất trung gian cho các phản ứng tiếp theo, chọn dung môi thích hợp, v.v., cũng có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa trên nhu cầu. Ví dụ, nhóm $-OH$ của hợp chất (β) trong phương pháp được mô tả ở trên có thể được bảo vệ trước khi cho phản ứng với hợp chất (α) và sản phẩm thu được có thể được khử bảo vệ để tạo ra hợp chất (γ), v.v..

Dược phẩm/tổ hợp

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm/tổ hợp chứa hợp chất có công thức (I) bất kỳ, hoặc muối dược dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc tiền dược chất của chúng, cùng với chất mang dược dụng.

Dược phẩm/tổ hợp này có thể còn chứa một hoặc nhiều tác nhân thứ hai. Theo một phương án, tác nhân thứ hai là chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, NSAID, chất ức chế tyrosin kinaza (TKI) hoặc chất chống ung thư. Theo một phương án khác, dược phẩm/tổ hợp này chứa hợp chất được mô tả ở đây và chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch và/hoặc NSAID hoặc tùy ý là chất ức chế tyrosin kinaza (TKI).

Theo một phương án, chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch có thể được sử dụng kết hợp với dược phẩm được mô tả ở đây để kích thích hệ thống miễn dịch chống lại tế bào ung thư và để điều trị bệnh ung thư. Chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch là tác nhân hoặc kháng thể kháng kháng nguyên tế bào lympho T gây độc tế bào 4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 - CTLA-4), tác nhân hoặc kháng thể kháng protein chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1), tác nhân hoặc kháng thể kháng phối tử chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1), tác nhân hoặc kháng thể kháng globulin miễn dịch tế bào T và miễn dịch 3 (TIM-3), tác nhân hoặc kháng thể kháng chất làm giảm tế bào lympho T

và B (BTLA), tác nhân hoặc kháng thể kháng chất ức chế sự hoạt hóa tế bào T chứa Ig miền V (VISTA), tác nhân hoặc kháng thể kháng gen hoạt hoá tế bào lympho 3 (LAG-3), kháng thể hoặc chất ức chế KIR (thụ thể giống globulin miễn dịch tế bào tiêu diệt), kháng thể hoặc chất ức chế A2AR (thụ thể adenosin A2A), kháng thể hoặc chất ức chế CD276, hoặc kháng thể hoặc chất ức chế VTCN1. Tốt hơn nữa, chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch là pembrolizumab, lambrolizumab, pidilizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab, hoặc atezolizumab. Ví dụ về chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1 bao gồm, nhưng không giới hạn, các kháng thể được làm tương thích với người phong bế PD-1 của người như lambrolizumab (kháng-PD-1 Ab, tên thương mại là Keytruda) hoặc pidilizumab (kháng-PD-1 Ab), Bavencio (kháng-PD-L1 Ab, avelumab), Imfinzi (kháng-PD-L1 Ab, durvalumab) và Tecentriq (kháng-PD-L1 Ab, atezolizumab) cũng như các kháng thể hoàn toàn của người như nivolumab (kháng-PD-1 Ab, tên thương mại Opdivo) và cemiplimab-rwlc (kháng-PD-1 Ab, tên thương mại Libtayo). Các chất ức chế PD-1 khác có thể bao gồm sự trình diện của phối tử PD-1 hòa tan bao gồm, nhưng không giới hạn, protein dung hợp PD-L2 Fc còn được gọi là B7-DC-Ig hoặc AMP-244 và các chất ức chế PD-1 khác hiện đang được nghiên cứu và/hoặc phát triển để sử dụng trong trị liệu. Ngoài ra, các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch có thể bao gồm, nhưng không giới hạn, các kháng thể được làm tương thích với người hoặc hoàn toàn của người phong bế PD-L1 như durvalumab và MIH1 (kháng thể đơn dòng kháng CD274 (PD-L1, B7-H1)) và các chất ức chế PD-L1 khác hiện đang được nghiên cứu.

NSAID là nhóm thuốc giúp giảm đau, hạ sốt và giảm viêm ở liều cao hơn. Hầu hết các NSAID ức chế hoạt tính của xyclooxygenaza-1 (COX-1) và xyclooxygenaza-2 (COX-2), và do đó ức chế quá trình tổng hợp thromboxan và prostaglandin. Cho rằng việc ức chế COX-2 dẫn đến tác dụng chống viêm, giảm đau và hạ sốt, trong khi những NSAID đó cũng ức chế COX-1, đặc biệt là aspirin, có thể gây chảy máu và loét đường tiêu hóa với liều lượng lớn. Thuốc ức chế COX-2 được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh tự miễn dịch và viêm nhiễm. Xyclooxygenaza (COX), có hai dạng tương đồng, COX-1 và COX-2, là enzym chịu trách nhiệm cho bước quyết định tốc độ trong quá trình tổng hợp lipid có hoạt tính sinh học của các prostanoid bao gồm prostaglandin D2 (PGD2), PGE2, PGF2 α , prostacyclin PGI2 và thromboxan TXA2. COX-1 được biểu hiện chủ yếu trong các mô cơ thể để duy trì các prostanoid cân bằng nội môi và tham

gia vào một số chức năng sinh học như tạo mạch, giãn mạch và duy trì mô. Tuy nhiên, COX-2 được thể hiện ở mức độ thấp trong các điều kiện bình thường. COX-2 nhanh chóng được tạo ra bởi các kích thích như nhiễm trùng, chấn thương và đau để bắt đầu các quá trình tiền viêm. Chất ức chế chọn lọc COX-2 là một loại thuốc chống viêm không steroid (NSAID). Theo một số phương án, NSAID bao gồm, nhưng không giới hạn ở, aspirin, ibuprofen, indomethacin, naproxen và chất ức chế COX-2. Theo một số phương án của sáng chế, NSAID là chất ức chế COX2. Theo một số phương án, chất ức chế COX2 bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Celebrex (tên chung là celecoxib), Rofecoxib, Imrecoxib và Etoricoxib. Tốt hơn, nếu chất ức chế COX2 là Celecoxib.

Các chất ức chế tyrosin kinaza (TKI) là họ các phân tử nhỏ có hoạt tính ức chế tyrosin kinaza thụ thể hoặc bào tương. TKI ức chế các con đường truyền tín hiệu của yếu tố tăng trưởng này bằng nhiều cơ chế khác nhau. Chúng cạnh tranh với ATP, cơ chất hoặc các vị trí để dime hóa và cũng có thể tác động theo kiểu dị lập thể. Sự ức chế tyrosin kinaza thụ thể hoặc bào tương được chứng minh bằng một số loại TKI khác nhau, chẳng hạn như thông qua cạnh tranh trực tiếp để ATP liên kết với tyrosin kinaza, ức chế dị lập thể tyrosin kinaza và ức chế phối tử liên kết với tyrosin kinaza thụ thể. TKI đang đóng một vai trò ngày càng quan trọng trong điều trị ung thư, đặc biệt là các chất ức chế VEGFR như Axitinib, Lenvatinib, Cabozantinib và Regorafenib. Theo một số phương án của sáng chế, TKI là chất ức chế các tyrosin kinaza thụ thể. Tốt hơn là, TKI là chất ức chế thụ thể yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGFR). Tốt hơn nữa là, TKI là Cabozantinib, Regorafenib, Axitinib, Afatinib, Ninetedanib, Crizotinib, Alectinib, Trametinib, Dabrafenib, Sunitinib, Ruxolitinib, Vemurafenib, Sorafenib, Ponatinib, Encorafenib, Brigatinib, Pazopanib, Dasatinib, Imatinib, Lenvatinib, Vandetanib, surufatinib hoặc Sitravatinib.

Tác nhân chống ung thư bổ sung là tác nhân chống ung thư bất kỳ được mô tả ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án, tác nhân chống ung thư bổ sung là hóa trị liệu hoặc hóa trị liệu kép dựa trên bạch kim. Theo các phương án nhất định, tác nhân chống ung thư bổ sung là chất ức chế tyrosin kinaza (TKI). Theo một phương án, tác nhân chống ung thư bổ sung là hợp chất hoặc kháng thể kháng VEGF hoặc kháng VEGFR. Theo các phương án khác, tác nhân chống ung thư là tác nhân platin (ví dụ, cisplatin, carboplatin), chất ức chế gián phân (ví dụ, paclitaxel, paclitaxel

liên kết với albumin, docetaxel, taxotere, docecad), alkaloit Vinca được flo hóa (ví dụ, vinflunin, javlor), vinorelbine, vinblastine, etoposide, hoặc pemetrexed gemcitabin. Theo một phương án, tác nhân chống ung thư bổ sung là 5-fluorouracil (5-FU). Theo các phương án nhất định, tác nhân chống ung thư bổ sung là tác nhân chống ung thư bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Để bào chế được phẩm/tổ hợp theo sáng chế này, một hoặc nhiều hợp chất theo sáng chế làm thành phần hoạt tính được trộn kỹ với chất mang dược theo kỹ thuật phối chế được thông thường, chất mang này có thể có nhiều dạng khác nhau tùy thuộc vào dạng chế phẩm mong muốn để sử dụng, ví dụ, qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa như tiêm trong bắp. Để bào chế các chế phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng, có thể sử dụng môi trường dược bất kỳ trong số các môi trường dược thông thường. Do đó, đối với các chế phẩm dạng lỏng uống, chẳng hạn như hỗn dịch, cồn ngọt và dung dịch, chất mang và chất phụ gia thích hợp bao gồm nước, glycol, dầu, rượu, chất tạo hương vị, chất bảo quản, chất tạo màu và các chất tương tự; đối với các chế phẩm dạng rắn để uống chẳng hạn như bột, viên nang, viên nén nhỏ, viên nang gelatin và viên nén, chất mang và chất phụ gia thích hợp bao gồm tinh bột, đường, chất pha loãng, chất tạo hạt, chất bôi trơn, chất kết dính, chất gây rã và các chất tương tự. Do dễ sử dụng, viên nén và viên nang là dạng đơn vị liều uống thuận lợi nhất, trong trường hợp đó, chất mang dược rắn rõ ràng được sử dụng. Nếu muốn, viên nén có thể được bao đường hoặc bao tan trong ruột bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn. Đối với thuốc dùng ngoài đường tiêu hóa, chất mang thường bao gồm nước vô trùng, mặc dù có thể bao gồm các thành phần khác, ví dụ, cho các mục đích như hỗ trợ khả năng hòa tan hoặc để bảo quản. Các huyền phù tiêm được cũng có thể được bào chế, trong trường hợp đó, các chất mang chất lỏng thích hợp, các chất tạo huyền phù và các chất tương tự có thể được sử dụng. Các dược phẩm trong bản mô tả này sẽ chứa, trên một đơn vị liều, ví dụ, viên nén, viên nang, bột, thuốc tiêm, đầy thìa cà phê và tương tự, lượng hoạt chất cần để phân phối liều hữu hiệu như được mô tả ở trên.

Các dạng chất lỏng trong đó các chế phẩm mới theo sáng chế có thể được kết hợp để sử dụng bằng đường uống hoặc tiêm bao gồm: dung dịch nước, xi-rô có hương vị thích hợp, huyền phù chứa nước hoặc dầu, và nhũ tương có hương vị với dầu ăn được như dầu hạt bông, dầu mè, dầu dừa hoặc dầu đậu phộng, cũng như cồn ngọt và các chất

dẫn được tương tự. Các chất phân tán hoặc chất tạo huyền phù thích hợp cho huyền phù chứa nước bao gồm: gồm tự nhiên và tổng hợp như tragacanth, acaxia, alginat, dextran, natri carboxymetylxenluloza, metyloxenluloza, polyvinyl-pyrrolidon hoặc gelatin.

Viên nén và viên nang để uống thường được bào chế ở dạng liều đơn vị và chứa các tá dược thông thường như chất kết dính, chất độn (bao gồm xenluloza, mannitol, lactoza), chất pha loãng, chất tạo viên, chất bôi trơn (bao gồm magie stearat), chất tẩy rửa, chất gây rã (ví dụ, polyvinylpyrrolidon) và các dẫn xuất tinh bột như tinh bột natri glycolat), chất tạo màu, chất tạo hương vị và chất thấm ướt (ví dụ, natri lauryl sulfat).

Các chế phẩm dạng rắn dùng qua đường miệng có thể được bào chế bằng các phương pháp thông thường gồm pha trộn, làm đầy hoặc tạo viên. Thao tác pha trộn có thể được lặp lại để phân phối hoạt chất trong các chế phẩm có chứa một lượng lớn chất độn. Các thao tác như vậy là thông thường.

Để dùng ngoài đường tiêu hóa, liều đơn vị dạng lỏng có thể được bào chế, chứa hợp chất và chất dẫn vô trùng. Hợp chất có thể được tạo huyền phù hoặc hòa tan, tùy thuộc vào chất dẫn và nồng độ. Các dung dịch ngoài đường tiêu hóa thường được bào chế bằng cách hòa tan hợp chất trong chất dẫn, khử trùng bằng cách lọc, đổ đầy các lọ nhỏ thích hợp và niêm phong. Một cách thuận lợi, các chất bổ trợ như chất gây tê cục bộ, chất bảo quản và chất đệm cũng có thể được hòa tan trong chất dẫn. Để tăng độ ổn định, chế phẩm có thể được làm đông lạnh sau khi đã đổ đầy các lọ nhỏ và được loại bỏ nước trong điều kiện chân không. Huyền phù dùng ngoài đường tiêu hóa được bào chế theo cách về cơ bản giống như vậy, ngoại trừ việc hợp chất có thể được tạo huyền phù trong chất dẫn thay vì được hòa tan, và được khử trùng bằng cách tiếp xúc với etylen oxit trước khi tạo huyền phù trong chất dẫn vô trùng. Một cách thuận lợi, chất hoạt tính bề mặt hoặc chất thấm ướt có thể được đưa vào chế phẩm để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân phối đồng đều hợp chất khi sử dụng.

Dược phẩm để sử dụng bằng cách hít có thể được cung cấp từ khí cụ bơm hoặc gói được tạo áp bằng khí dung.

Ứng dụng trị liệu

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều biến miễn dịch biểu sinh TME, bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất hoặc dược phẩm/tổ hợp được mô tả ở đây cho đối tượng có nhu cầu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh liên quan đến HDAC loại I ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất hoặc dược phẩm/tổ hợp được mô tả ở đây cho đối tượng có nhu cầu.

Theo một phương án, các phương pháp này bao gồm việc sử dụng thêm một hoặc nhiều tác nhân thứ hai. Theo một số phương án, tác nhân thứ hai là chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, NSAID, TKI hoặc tác nhân chống ung thư. Theo một phương án khác, dược phẩm/tổ hợp chứa hợp chất được mô tả ở đây và chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch và/hoặc NSAID hoặc tùy ý là TKI. Các phương án của chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, NSAID, TKI hoặc tác nhân chống ung thư là những phương án được mô tả ở đây.

Các hợp chất theo sáng chế là hữu ích để điều trị hoặc ngăn ngừa bất kỳ bệnh và/hoặc tình trạng nào, trong đó sự ức chế HDAC loại I được mong muốn. Đặc biệt, các hợp chất theo sáng chế có khả năng điều biến miễn dịch biểu sinh TME, do đó cải thiện các liệu pháp miễn dịch. Sự ức chế hoạt tính của enzym HDAC có thể dẫn đến suy giảm sự phát triển của khối u. Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp để điều trị hoặc ngăn ngừa khối u hoặc bệnh ung thư.

Ví dụ về bệnh ung thư mà có thể được điều trị theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ung thư biểu mô vú xâm lấn, ung thư biểu mô tuyến, ung thư phổi (không phải tế bào nhỏ, ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư biểu mô tuyến và ung thư phổi tế bào lớn), ung thư gan, ung thư đại trực tràng, ung thư não, đầu và cổ (ví dụ, u nguyên bào thần kinh/u nguyên bào đệm), ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp của bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào vảy ở miệng, sácôm xương, ung thư vỏ thượng thận, khối u đường tiêu hóa bao gồm cả ung thư đại trực tràng, ung thư đường mật như ung thư biểu mô túi mật (GBC), ung thư bàng quang, ung thư thực quản, ung thư dạ dày, ung thư cổ tử cung, ung thư tuyến nước bọt, u lành tính tiêu chảy, ung thư biểu mô ống tại chỗ, viêm mé móng, ung thư đường mật, ung thư thận, ung thư tuyến tụy, u nguyên bào tủy, u nguyên bào thần kinh đệm, ung thư vú luminal, khối u vú HER2 dương tính và bộ ba âm tính, khối u ác tính về huyết học và bệnh bạch cầu (bệnh bạch cầu tủy cấp tính (AML), bệnh bạch cầu

lympho bào cấp tính tế bào tiền chất B (ALL), một phần của ALL tế bào T và bệnh bạch cầu dòng tủy mãn tính (CML)).

Các hợp chất, hoặc các muối được dùng của chúng, được dùng qua đường miệng, qua mũi, qua da, phổi, xông hít, qua má, dưới lưỡi, trong màng bụng, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, qua trực tràng, trong màng phổi, nội tủy mạc và ngoài đường tiêu hóa. Theo một phương án, hợp chất này được dùng qua đường miệng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận thấy các ưu điểm của các đường dùng nhất định.

Chế độ liều sử dụng các hợp chất này được chọn theo nhiều yếu tố bao gồm loại, loài, tuổi, khối lượng, giới tính và tình trạng bệnh lý của bệnh nhân; mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh cần điều trị; đường dùng; chức năng thận và gan của bệnh nhân; và hợp chất cụ thể hoặc muối của nó được dùng. Thầy thuốc hoặc bác sĩ thú y có trình độ trung bình có thể dễ dàng xác định và kê đơn lượng có hiệu quả của dược chất cần để ngăn ngừa, chống lại, hoặc kìm hãm sự tiến triển của tình trạng bệnh.

Giờ đây sáng chế được mô tả bằng phần mô tả, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết rằng sáng chế có thể được thực hiện theo nhiều phương án và phần mô tả nêu trên và các ví dụ dưới đây để nhằm mục đích minh họa và không giới hạn phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu và phương pháp điều chế các hợp chất được lấy làm ví dụ theo sáng chế được mô tả dưới đây.

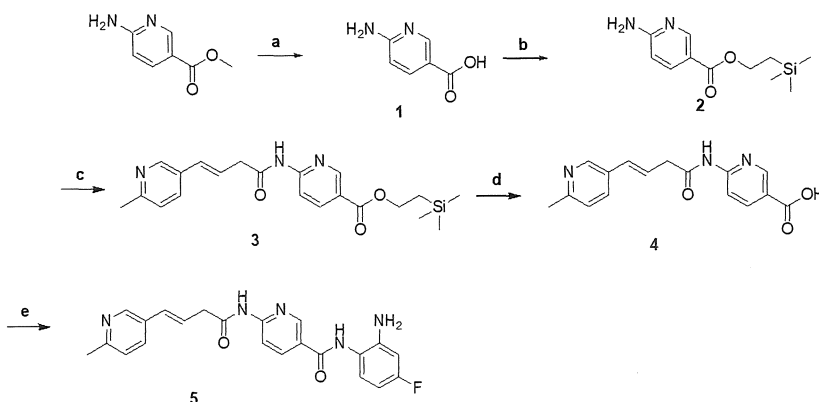
GNTbm-01, GNTbm-02, GNTbm-03, GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-06, GNTbm-08, GNTbm-11, GNTbm-12, GNTbm-19, GNTbm-25, GNTbm-33, GNTbm-37, GNTbm-38, GNTbm-39, Entinostat-API (thành phần có hoạt tính được), và Chidamide-API được cung cấp bởi GNTbm [GNT Biotech & Medicals Co. Ltd (Taiwan)]. Sản phẩm viên nang Celecoxib (Celebrex[®], 200 mg) được mua từ (Pfizer, Taiwan). Regorafenib (HY-1031, 30 mg/kg, dùng qua đường miệng hàng ngày, MedChemExpress USA). Các kháng thể và chất phản ứng sau đây được sử dụng cho các thí nghiệm trên động vật: kháng thể đơn dòng chuột kháng PD-1 (CD279) (RMP1-14; Bio X Cell) và kháng thể đơn dòng isotyp chuột kháng IgG2a (2A3; Bio X Cell). Khối ion hóa phun điện tử được ghi lại trên Bruker microTOF và phổ khối phổ phun

điện tử (ESMS) được ghi lại dưới dạng giá trị m/z bằng máy quang phổ khối Waters. Tất cả các hóa chất và dung môi thương mại đều là cấp độ chất phản ứng và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm trừ khi có quy định khác. Tất cả các phản ứng được theo dõi để hoàn thành bằng sắc ký lớp mỏng sử dụng tấm nền thủy tinh silicagel Merck 60 F254 (20 × 20 cm). Sự hiện hình sắc ký đồ thu được được phát hiện trực quan dưới bức xạ UV (254nm). ^1H NMR và ^{13}C NMR được ghi lại trên máy quang phổ Bruker AVANCE 400 MHz PLUS và Bruker AVANCE III HD 600 Mhz và thiết bị và độ dịch chuyển hóa học được ghi lại theo phần triệu (ppm, δ). Các bội số được ghi lại dưới dạng s (vạch đơn), brs (vạch đơn rộng), d (vạch đôi), t (vạch ba), q (vạch bốn), dd (hai vạch đôi), td (ba vạch đôi) và m (đa vạch). Hằng số ghép cặp (J) được biểu thị bằng héc. Độ tinh khiết của hợp chất cuối cùng được xác định bằng hệ thống Waters ACQUITY Arc sử dụng cột C_{18} (Waters XSelect HSS T3 5 μm , 4,6 mm x 250 mm) hoạt động ở 40°C. Quá trình rửa giải được thực hiện bằng nước chứa 0,1% axit trifloaxetic làm pha động A và metanol làm pha động B. Điều kiện rửa giải: ở 0 phút, pha A 90% + pha B 10%; sau 6 phút, pha A 70% + pha B 30%; sau 12 phút, pha A 50% + pha B 50%; sau 18 phút, pha A 10% + pha B 90%; sau 23 phút, pha A 90% + pha B 10%. Tốc độ dòng của pha động là 1 mL/phút, thể tích tiêm mẫu là 10 μL và thời gian chạy là 30 phút. Các đỉnh được phát hiện ở 254nm. Độ tinh khiết của hợp chất cuối cùng được phát hiện là > 90%.

Các ví dụ điều chế

Ví dụ 1 GNTbm-01

Quy trình tổng hợp được thể hiện dưới đây:



Axit 6-aminopyridin-3-carboxylic (1).

Dung dịch chứa metyl 6-aminopyridin-3-carboxylat (1,2 g) được bổ sung LiOH (3,309 g) trong MeOH, và hỗn hợp này được khuấy ở 40~65 °C trong 4~8 giờ. Sau khi

làm nguội đến RT, được điều chỉnh thành điều kiện axit bằng 10% HCl (dung dịch chứa nước), lọc bằng cách hút, và sản phẩm được sấy khô bằng tủ sấy trong khoảng 24 giờ để tạo thành sản phẩm rắn là hợp chất có công thức 1.

2-(trimetylsilyl)etyl 6-aminopyridin-3-carboxylat (2).

Dung dịch chứa hợp chất có công thức 1 (1,5 g) và triphenylphosphin (2,848 g) trong THF được bổ sung 2-(trimetylsilyl)ethanol (1,84 mL mmol) và Diisopropyl azodicarboxylat (DIAD, 2,56 mL) ở -5~10 °C. Và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 8 giờ. Hỗn hợp này được cô, và tinh chế bằng sắc ký cột silicagel để tạo ra hợp chất có công thức 2.

2-(trimetylsilyl)etyl 6-((E)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enamido)pyridin-3-carboxylat (3).

Dung dịch chứa DCC (86,9 mg) trong DCM được bổ sung hợp chất có công thức 2 (50 mg) và axit (E)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enoic (67,2 mg) trong DCM ở bể nước đá. Và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 8 giờ. Sản phẩm được chiết bằng cách sử dụng etyl axetat và lớp hữu cơ được rửa bằng nước. Các lớp hữu cơ thu gom được sấy khô bằng MgSO₄, cô đặc, và tinh chế bằng sắc ký cột silicagel để tạo ra hợp chất có công thức 3.

Axit 6-((E)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enamido)pyridin-3-carboxylic (4).

Dung dịch chứa hợp chất có công thức 3 (50 mg) trong THF (11 mL) được bổ sung 12 N HCl (11 mL), và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4~10 giờ. Hỗn hợp này được cô, và tinh chế bằng sắc ký cột silicagel để tạo ra hợp chất có công thức 4.

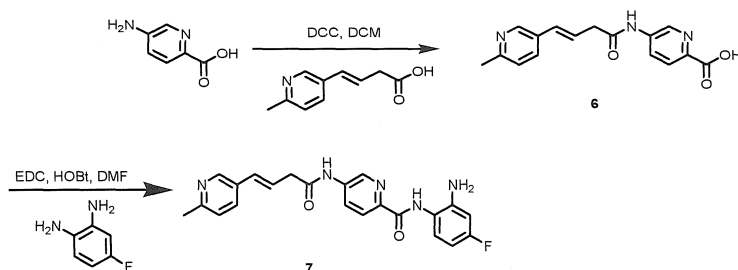
6-((E)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl)pyridin-3-carboxamit (5).

Dung dịch chứa 4-flobenzen-1,2-diamin (72,9 mg), EDC (89,7 mg), HOBT (46,8 mg) trong DMF được khuấy ở -10~10 °C trong 20~60 phút. Hợp chất có công thức 4 (85,9 mg) trong DMF và Et₃N (161 µL) được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 72 giờ. Hỗn hợp này được pha loãng với nước và chiết bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ thu gom được sấy khô bằng MgSO₄, cô đặc, và tinh chế bằng sắc ký cột silicagel để tạo ra hợp chất có công thức 5. ¹H NMR (400 MHz, axeton-d₆): δ2,46(3H, s), 3,52(2H, d), 4,95(2H, br), 6,39(1H, td), 6,59(3H, m), 7,21(1H,

t), 7,77(1H, dd), 8,38(3H, m), 9,08(1H, s), 9,75(1H, s). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 23,77, 40,47, 101,16, 101,41, 101,80, 102,03, 123,05, 124,73, 125,54, 128,76, 128,86, 129,21, 129,56, 132,84, 136,68, 138,02, 145,71, 147,16, 148,12, 156,82, 163,76, 170,27; ESI-MS m/z : 428,1496 $[M+Na^+]$.

Ví dụ 2 GNTbm-02

Quy trình tổng hợp được thể hiện dưới đây:



5-((*E*)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enamido)pyridin-2-carboxylic acid (6).

Dung dịch chứa axit (*E*)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enoic (769 mg) và DCC (895 mg) trong DCM được khuấy ở $-10\sim 10^\circ\text{C}$ trong 20~60 phút. Axit 6-aminopyridin-3-carboxylic (500 mg) trong DCM được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 48 giờ. Hỗn hợp này được lọc để thu gom bột rắn. Bột rắn được hòa tan trong MeOH, lọc và cô đặc bằng thiết bị làm bay hơi quay để tạo ra hợp chất 6 dạng thô.

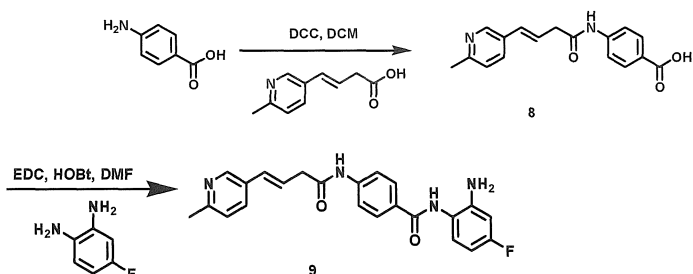
5-((*E*)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl)pyridin-2-carboxamit (7).

Dung dịch chứa 4-flobenzen-1,2-diamin (42,4 mg) và EDC (52,2 mg, HOBT (26 mg) trong DMF được khuấy ở $-10\sim 10^\circ\text{C}$ trong 20~60 phút. Axit 5-((*E*)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enamido)pyridin-2-carboxylic (hợp chất có công thức 6) (50 mg) trong DMF được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 16 giờ. Hỗn hợp này được pha loãng với nước và chiết bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ thu gom được sấy khô bằng MgSO_4 , cô đặc, và tinh chế bằng sắc ký cột silicagel để tạo ra hợp chất có công thức 7. ^1H NMR (400 MHz, axeton- d_6): δ 2,46(3H, s), 3,45(2H, d), 4,90(1H, br), 6,45(1H, m), 6,55(2H, m), 6,66(1H, dd), 7,19(1H, d), 7,53(1H, dd), 7,76(1H, dd), 8,15(1H, d), 8,31(1H, dd), 8,47(1H, d), 8,91(1H, s), 9,66(1H, s), 9,72(1H, s). ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD- d): δ 41,93, 104,06, 104,32, 105,16, 105,39,

124,08, 125,12, 125,94, 128,14, 128,41, 128,65, 130,93, 132,17, 135,42, 139,91, 141,19, 146,07, 147,83, 158,38, 165,26, 168,08, 172,56, ESI-MS m/z : 428,1479 $[M+Na^+]$.

Ví dụ 3 GNTbm-03

Quy trình tổng hợp được thể hiện dưới đây:



Axit 4-((E)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enamido)benzoic (8).

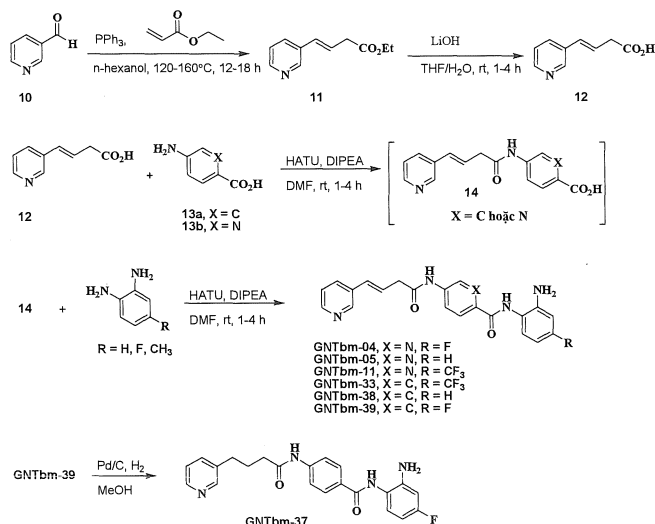
Dung dịch chứa axit (E)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enoic (671,9 mg) và DCC (782,4 mg) trong DCM được khuấy ở $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$ trong 20~60 phút. Axit 4-aminobenzoic (400 mg) trong DCM được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5~10 giờ nữa. Hỗn hợp này được lọc để thu gom bột rắn. Bột rắn được hòa tan trong MeOH, lọc và cô đặc bằng thiết bị làm bay hơi quay để tạo ra hợp chất có công thức 8 dạng thô.

4-((E)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl)benzamid (9).

Dung dịch chứa 4-flobenzen-1,2-diamin (255,4 mg), EDC (314,4 mg) và HOBT (164 mg) trong DMF được khuấy ở $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$ trong 20~60 phút. Axit 4-((E)-4-(6-metylpyridin-3-yl)but-3-enamido)benzoic (hợp chất có công thức 8) (300 mg) trong DMF được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 24 giờ. Hỗn hợp này được pha loãng với nước và chiết bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ thu gom được sấy khô bằng MgSO_4 , cô đặc, và tinh chế bằng sắc ký cột silicagel để tạo ra hợp chất có công thức 9. ^1H NMR (400 MHz, axeton- d_6): δ 2,46(3H, s), 3,39(2H, d), 4,90(1H, br), 6,39(1H, td), 6,56(3H, m), 7,20(2H, m), 7,77(3H, m), 8,00(2H, m), 8,46(1H, s), 8,95(1H, s), 9,46(1H, s). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 23,75, 40,77, 101,48, 102,55, 118,23, 119,42, 123,07, 124,98, 128,51, 128,62, 128,76, 128,90, 129,05, 129,59, 132,85, 141,97, 145,51, 147,14, 156,79, 159,82, 162,19, 165,03, 169,36, ESI-MS m/z : 405,1731 $[M+H^+]$.

Ví dụ 4 GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-11, GNTbm-33, GNTbm-37, GNTbm-38, và GNTbm-39

Quy trình tổng hợp được thể hiện dưới đây:



Etyl (*E*)-4-(pyridin-3-yl)but-3-enoat (11). Dung dịch chứa nicotinaldehyt **10** (10 g, 93 mmol), PPh₃ (36,7 g, 140 mmol), etyl acrylat (15,3 mL, 140 mmol) trong n-hexanol (50 mL) được khuấy ở 120~160 °C trong 12~18 h. Hỗn hợp này được pha loãng với EA, rửa bằng nước, nước muối, và sấy khô bằng Na₂SO₄. Hỗn hợp này được lọc và cô đến khô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột để tạo ra hợp chất có công thức **11** (6 g, 34%) dưới dạng chất lỏng màu vàng. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8,58 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,46 (dd, *J* = 4,8, 1,5 Hz, 1H), 7,70 (dt, *J* = 7,9, 1,8 Hz, 1H), 7,24 (dd, *J* = 7,9, 4,9 Hz, 1H), 6,48 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 6,38 (dt, *J* = 15,9, 7,0 Hz, 1H), 4,18 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,27 (dd, *J* = 7,0, 1,3 Hz, 2H), 1,29 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

Axit (*E*)-4-(Pyridin-3-yl)but-3-enoic (12) Dung dịch chứa hợp chất có công thức **11** (6 g, 31 mmol) trong THF (100 mL) được bổ sung LiOH (2,25 g trong 50 mL H₂O, 94 mmol) và khuấy ở RT (nhiệt độ trong phòng) trong 1~4 h. Hỗn hợp này được cô để loại bỏ THF. Dung dịch chứa nước được axit hóa bằng 1N HCl (dung dịch chứa nước). Hỗn hợp này được cô đến khô và sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột để tạo ra hợp chất có công thức **12** (3,7 g, 72%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,58 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 8,42 (dd, *J* = 4,7, 1,5 Hz, 1H), 7,87 (dt, *J* = 8,0, 1,9 Hz, 1H), 7,34 (dd, *J* = 8,0, 4,7 Hz, 1H), 6,52 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 6,45 (dt, *J* = 16,0, 6,5 Hz, 1H), 3,21 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H).

Quy trình để tổng hợp GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-11, GNTbm-33, GNTbm-38, và GNTbm-39. Dung dịch chứa hợp chất có công thức 12 (1 đương lượng), hợp chất có công thức 13 (1,1 đương lượng), và HATU (1,1 đương lượng) trong DMF được bổ sung DIPEA (1~2,5 đương lượng). Hỗn hợp này được khuấy ở RT trong 1~4 h (được kiểm tra bằng LCMS). Anilin (1,1 đương lượng), HATU (1,1 đương lượng), và DIPEA (1~2,5 đương lượng) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp này được khuấy ở RT trong 1~4 h nữa (được kiểm tra bằng LCMS). Hỗn hợp này được pha loãng với EA, rửa bằng nước, nước muối, và sấy khô bằng Na₂SO₄. Hỗn hợp này được lọc và cô đến khô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột để tạo ra sản phẩm mong muốn.

GNTbm-04, Hiệu suất: 45 mg, 40%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,60 (s, 1H), 9,86 (s, 1H), 8,92 (d, *J*=1,8 Hz, 1H), 8,63 (d, *J*= 1,8 Hz, 1H), 8,44 (d, *J*= 4,8 Hz, 1H), 8,25 (dd, *J*= 8,7, 2,1 Hz, 1H), 8,09 (d, *J*= 9 Hz, 1H), 7,91 (d, *J*= 7,8 Hz, 1H), 7,38-7,32 (m, 2H), 6,62-6,55 (m, 3H), 6,39(td, *J*= 8,7, 2,4 Hz, 1H), 5,20 (s, 2H), 3,42 (d, *J*= 6 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 40,48, 101,95, 102,12, 102,41, 102,56, 119,74, 122,81, 123,69, 125,78, 126,52, 126,73, 126,79, 129,29, 132,28, 132,57, 138,25, 138,95, 144,37, 144,41, 147,80, 148,40, 159,74, 161,33, 162,27, 169,76, LCMS (ESI) *m/z* 392,4 [M+H]⁺. Độ tinh khiết HPLC: 96,12%.

GNTbm-05, Hiệu suất: 88 mg, 53%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,60 (s, 1H), 9,94 (s, 1H), 8,92 (d, *J*= 1,6 Hz, 1H), 8,63 (d, *J*= 1,5 Hz, 1H), 8,44 (d, *J*= 4,7 Hz, 1H), 8,26 (dd, *J*= 8,5, 2,0 Hz, 1H), 8,11 (d, *J*= 8,6 Hz, 1H), 7,91 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 7,50 (d, *J*= 7,9 Hz, 1H), 7,36 (dd, *J*= 7,9, 4,8 Hz, 1H), 6,94 (t, *J*= 7,6 Hz, 1H), 6,82 (d, *J*= 7,9 Hz, 1H), 6,65 (t, *J*= 7,9 Hz, 1H), 6,61-6,57 (m, 2H), 4,88 (s, 2H), 3,42 (d, *J*= 6,0 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 40,49, 116,75, 117,01, 122,76, 123,68, 124,16, 124,29, 125,67, 125,78, 126,58, 129,29, 132,28, 132,56, 138,26, 138,97, 141,56, 144,44, 147,80, 148,39, 161,86, 169,76, LCMS (ESI) *m/z* 374,3 [M+H]⁺. Độ tinh khiết HPLC: 99,32%.

GNTbm-11, Hiệu suất: 48 mg, 22%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,62 (s, 1H), 10,01 (s, 1H), 8,94 (d, *J*= 1,9 Hz, 1H), 8,63 (d, *J*= 1,6 Hz, 1H), 8,44 (d, *J*= 4,6 Hz, 1H), 8,26 (dd, *J*= 8,6, 2,3 Hz, 1H), 8,11 (d, *J*= 8,6 Hz, 1H), 7,91 (d, *J*= 8,0 Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,36 (dd, *J*= 7,9, 4,7 Hz, 1H), 7,27 (d, *J*= 8,5 Hz, 1H), 6,91 (d, *J*= 8,4 Hz, 1H), 6,62-6,55 (m, 2H), 5,63 (s, 2H), 3,42 (d, *J*= 6,0 Hz, 2H). ¹³C NMR (100

MHz, DMSO- d_6): δ 40,49, 115,71, 121,95, 122,90, 122,94, 123,68, 125,76, 126,55, 129,30, 132,28, 132,57, 138,42, 138,97, 144,13, 145,75, 147,80, 162,50, 169,79, LCMS (ESI) m/z 442,4 $[M+H]^+$. Độ tinh khiết HPLC: 93,63%.

GNTbm-33 Hiệu suất: 63 mg, 16%. 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 10,32 (s, 1H), 9,60 (s, 1H), 8,63 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 8,44 (dd, $J = 4,7, 1,5$ Hz, 1H), 7,97 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,91 (dt, $J = 8,0, 1,8$ Hz, 1H), 7,74 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,51 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H), 7,36 (dd, $J = 7,9, 4,8$ Hz, 1H), 7,27 (dd, $J = 8,5, 1,7$ Hz, 1H), 6,88 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,62-6,55 (m, 2H), 5,65 (s, 2H), 3,38 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 40,70, 115,22, 115,42, 115,63, 118,21, 122,44, 123,33, 123,69, 123,79, 124,10, 125,89, 126,19, 128,71, 128,82, 129,06, 132,34, 132,54, 142,05, 146,76, 147,78, 148,35, 165,15, 169,21, LCMS (ESI) m/z 441,4 $[M+H]^+$. Độ tinh khiết HPLC: 96,40%.

GNTbm-33, Hiệu suất: 108 mg, 47%. 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 10,30 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,63 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 8,44 (dd, $J = 4,7, 1,4$ Hz, 1H), 7,96 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,91 (dt, $J = 8,0, 1,9$ Hz, 1H), 7,73 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,36 (dd, $J = 7,9, 4,7$ Hz, 1H), 7,16 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,96 (dt, $J = 7,9, 1,4$ Hz, 1H), 6,78 (dd, $J = 8,0, 1,2$ Hz, 1H), 6,62-6,57 (m, 3H), 4,87 (s, 2H), 3,37 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 40,69, 116,10, 116,24, 118,23, 118,34, 123,46, 123,68, 126,20, 126,32, 126,60, 128,66, 129,0, 129,04, 132,33, 132,53, 141,87, 143,08, 147,78, 148,34, 164,67, 169,17, LCMS (ESI) m/z 373,4 $[M+H]^+$. Độ tinh khiết HPLC: 94,41%.

GNTbm-39, Hiệu suất: 60 mg, 25%. 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 10,30 (s, 1H), 9,49 (s, 1H), 8,62 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 8,44 (dd, $J = 4,7, 1,6$ Hz, 1H), 7,95 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,90 (dt, $J = 8,0, 1,9$ Hz, 1H), 7,72 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,36 (dd, $J = 7,9, 4,8$ Hz, 1H), 7,11 (dd, $J = 8,4, 6,6$ Hz, 1H), 6,62-6,57 (m, 2H), 6,54 (dd, $J = 11,2, 2,9$ Hz, 1H), 6,35 (td, $J = 8,5, 2,8$ Hz, 1H), 5,20 (s, 2H), 3,37 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 40,69, 101,35, 101,52, 101,92, 102,07, 118,20, 118,32, 119,40, 123,68, 126,20, 128,42, 128,49, 128,68, 128,89, 129,05, 132,33, 132,53, 141,89, 145,38, 145,45, 147,78, 148,34, 160,14, 161,73, 164,95, 169,17, LCMS (ESI) m/z 391,4 $[M+H]^+$. Độ tinh khiết HPLC: 94,66%.

Tổng hợp GNTbm-37

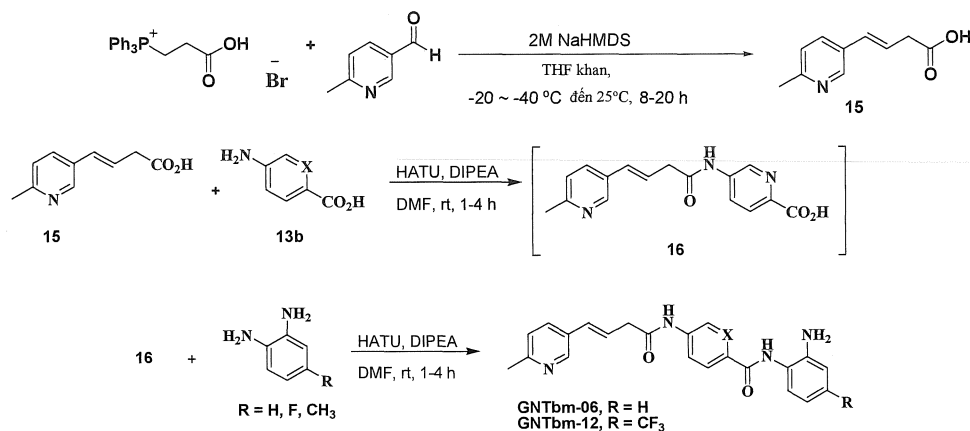
Dung dịch chứa GNTbm-39 (0,11 g, 0,3 mmol), trong MeOH (2 mL) được bổ sung Pd/C (22 mg) và khuấy ở RT trong 8~16 h. Hỗn hợp này được lọc qua đệm xelit

và nước lọc được cô đến khô để tạo ra GNTbm-37 (95 mg, 86%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

GNTbm-37, Hiệu suất: 110 mg, 49%. ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,20 (s, 1H), 9,52 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,41 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,93 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,70 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,66 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,32 (dd, $J = 7,3, 4,9$ Hz, 1H), 7,10 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), 6,54 (dd, $J = 11,1, 2,0$ Hz, 1H), 6,35 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 2,66 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,38 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,93 (m, $J = 7,4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 26,20, 31,56, 35,63, 99,13, 101,36, 101,52, 101,91, 102,06, 118,07, 119,44, 123,45, 128,44, 128,64, 135,84, 136,95, 142,06, 145,39, 145,47, 147,22, 149,63, 160,13, 161,71, 164,98, 171,20, LCMS (ESI) m/z 393,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Độ tinh khiết HPLC: 95,87%.

GNTbm-06 và GNTbm-12.

Quy trình tổng hợp được thể hiện dưới đây:



Axit (*E*)-4-(6-metyl-3-pyridyl)but-3-enoic (15), Bình đáy tròn được sấy khô với 2-carboxyetyl(triphenyl)phosphoni bromua (37,7g, 90,8 mmol) THF khan (200ml) được bổ sung vào và dung dịch được làm lạnh xuống $-20 \sim -40^\circ\text{C}$. Huyền phù màu trắng được bổ sung 2,00M NaHMDS trong THF (82,6ml) từng giọt. Dung dịch màu cam thu được được khuấy trong 1-5 h ở $-20 \sim -40^\circ\text{C}$. 6-metylpyridin-3-carbaldehyt (10,0g, 82,6 mmol) được bổ sung vào, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 8-20 h. Hỗn hợp phản ứng được làm dừng bằng nước (10 mL) và cô đến khô. Hỗn hợp này được bổ sung nước (300 mL) và rửa bằng EA (200 mL) và DCM (200 mL). Lớp hữu cơ được loại bỏ và lớp nước được axit hóa bằng 6N HCl (dung dịch chứa nước), và rửa bằng EA (200 mL) và DCM (200 mL). Lớp hữu cơ được loại bỏ và lớp nước được điều chỉnh pH bằng 4N NaOH (dung dịch chứa nước) và cô đến khô. Cặn được tinh chế bằng

sắc ký cột để tạo ra axit (E)-4-(6-metyl-3-pyridyl)but-3-enoic (5,10g, 35%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

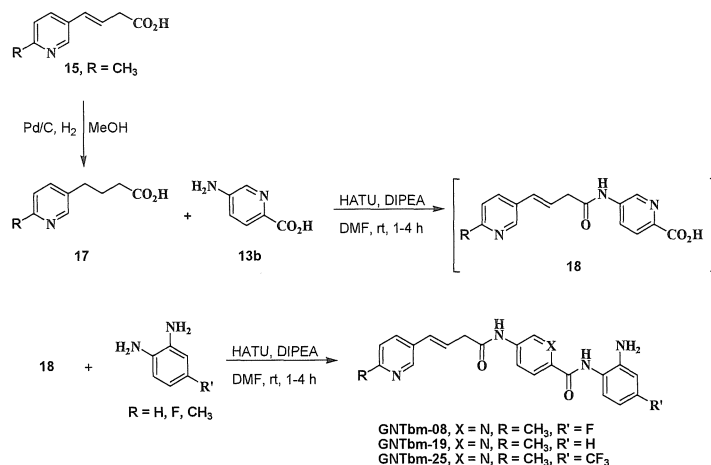
Quy trình để tổng hợp GNTbm-06, và GNTbm-12. Dung dịch chứa hợp chất có công thức 15 (1 đương lượng), hợp chất có công thức 13b (1,1 đương lượng), và HATU (1,1 đương lượng) trong DMF được bổ sung DIPEA (1~2,5 đương lượng). Hỗn hợp này được khuấy ở RT trong 1~4 h (được kiểm tra bằng LCMS). Anilin (1,1 đương lượng), HATU (1,1 đương lượng), và DIPEA (1~2,5 đương lượng) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp này được khuấy ở RT trong 1~4 h nữa (được kiểm tra bằng LCMS). Hỗn hợp này được pha loãng với EA, rửa bằng nước, nước muối, và sấy khô bằng Na₂SO₄. Hỗn hợp này được lọc và cô đến khô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột để tạo ra sản phẩm mong muốn.

GNTbm-06, Hiệu suất: 95 mg, 43%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,59 (s, 1H), 9,94 (s, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,26 (dd, *J* = 8,7, 2,0 Hz, 1H), 8,11 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,50 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,94 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,82 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,65 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,57 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 6,50 (dt, *J* = 15,5, 7,0 Hz, 1H), 4,88 (s, 2H), 3,40 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,45 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23,71, 40,49, 116,75, 117,01, 122,75, 122,98, 124,16, 124,29, 124,48, 125,66, 126,56, 129,25, 129,47, 132,80, 138,28, 138,96, 139,05, 141,55, 144,43, 147,12, 156,80, 161,86, 169,87, LCMS (ESI) *m/z* 388,4 [M+H]⁺. Độ tinh khiết HPLC: 94,56%.

GNTbm-12, Hiệu suất: 45 mg, 14%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,61 (s, 1H), 10,01 (s, 1H), 8,94 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 8,48 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 8,26 (dd, *J* = 8,6, 2,3 Hz, 1H), 8,11 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,80 (dd, *J* = 8,1, 2,0 Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,27 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 6,91 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,57 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 6,50 (dt, *J* = 15,8, 6,9 Hz, 1H), 5,63 (s, 2H), 3,40 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,45 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23,70, 40,49, 115,71, 121,92, 122,90, 122,94, 122,98, 124,46, 126,53, 129,26, 129,47, 132,80, 138,43, 138,96, 144,11, 145,74, 147,12, 156,81, 162,49, 169,89, LCMS (ESI) *m/z* 456,5 [M+H]⁺. Độ tinh khiết HPLC: 92,94%.

Ví dụ 6 GNTbm-08, GNTbm-19, và GNTbm-25

Quy trình tổng hợp được thể hiện dưới đây:



Axit 4-(6-Metylpyridin-3-yl)butanoic (17) Dung dịch chứa hợp chất có công thức **15** (1 g, 5,6 mmol), trong MeOH (10 mL) được bổ sung Pd/C (200 mg) và khuấy ở RT trong 1~8 h. Hỗn hợp này được lọc qua đệm xelit và nước lọc được cô đến khô để tạo ra hợp chất có công thức **17** (1 g, 99%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,07 (s, 1H), 8,26 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,49 (dd, *J* = 7,9, 2,3 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 2,55 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 2,41 (s, 1H), 2,20 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 1,77 (quint, *J* = 7,5 Hz, 1H).

Quy trình để tổng hợp GNTbm-08, GNTbm-19, và GNTbm-25. Dung dịch chứa hợp chất **17** (1 đương lượng), hợp chất **13b** (1,1 đương lượng), và HATU (1,1 đương lượng) trong DMF được bổ sung DIPEA (1~2,5 đương lượng). Hỗn hợp này được khuấy ở RT trong 1~4 h (được kiểm tra bằng LCMS). Anilin (1,1 đương lượng), HATU (1,1 đương lượng), và DIPEA (1~2,5 đương lượng) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp này được khuấy ở RT trong 1~4 h nữa (được kiểm tra bằng LCMS). Hỗn hợp này được pha loãng với EA, rửa bằng nước, nước muối, và sấy khô bằng Na₂SO₄. Hỗn hợp này được lọc và cô đến khô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột để tạo ra sản phẩm mong muốn.

GNTbm-8, Hiệu suất: 35 mg, 25%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,41 (s, 1H), 9,85 (s, 1H), 8,86 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 8,31 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 8,23 (dd, *J* = 8,6, 2,4 Hz, 1H), 8,07 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,53 (dd, *J* = 7,9, 2,1 Hz, 1H), 7,34 (dd, *J* = 8,6, 6,4 Hz, 1H), 7,17 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,58 (dd, *J* = 11,1, 2,9 Hz, 1H), 6,39 (td, *J* = 12,8, 2,8 Hz, 1H), 5,19 (s, 2H), 2,62 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,42 (s, 3H), 2,40 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,92 (quint, *J* = 7,5 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23,54, 26,90, 31,10, 35,47, 101,97, 102,14, 102,42, 102,57, 119,78, 122,68, 126,31, 126,67, 126,74, 133,58,

136,13, 138,53, 138,83, 144,16, 144,33, 148,78, 155,29, 159,72, 161,31, 162,29, 171,76, LCMS (ESI) m/z 408,5 $[M+H]^+$. Độ tinh khiết HPLC: 93,92%.

GNTbm-19, Hiệu suất: 43 mg, 20%. 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 10,42 (s, 1H), 9,92 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,25 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 8,09 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,53 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,50 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,17 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,94 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,82 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,65 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 4,88 (s, 2H), 2,62 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,42 (s, 3H), 2,40 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,92 (quint, $J = 7,4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 23,53, 26,09, 31,10, 35,47, 116,76, 117,02, 122,68, 124,20, 124,23, 125,63, 126,36, 133,25, 136,14, 138,36, 136,85, 141,51, 144,20, 148,77, 155,28, 161,87, 171,77, LCMS (ESI) m/z 390,4 $[M+H]^+$. Độ tinh khiết HPLC: 99,12%.

GNTbm-25, Hiệu suất: 30 mg, 12%. 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 10,43 (s, 1H), 10,00 (s, 1H), 8,88 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,24 (dd, $J = 8,7, 1,8$ Hz, 1H), 8,09 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,53 (dd, $J = 8,1, 1,8$ Hz, 1H), 7,26 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,17 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 5,62 (s, 2H), 2,62 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,42 (s, 3H), 2,40 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,92 (quint, $J = 7,4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 23,54, 26,09, 31,11, 35,48, 115,73, 116,07, 116,28, 131,89, 122,69, 122,89, 122,94, 124,06, 125,85, 126,34, 133,58, 136,14, 138,52, 138,86, 143,88, 145,71, 148,78, 155,30, 162,52, 171,80, LCMS (ESI) m/z 458,5 $[M+H]^+$. Độ tinh khiết HPLC: 92,03%.

Ví dụ 7 Xác định độ tan bão hòa của Chidamide, GNTbm-02, GNTbm-03, GNTbm-04 và GNTbm-06

Các mẫu chứa 5 mg hợp chất được thêm vào bình định mức 5 ml chứa ddH₂O và được lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong tủ ủ ở 25°C trong 90 phút. Huyền phù thu được được lọc qua bộ lọc 0,22 μm . Nồng độ của các hợp chất được xác định bằng phổ quang kế ở bước sóng 256 nm. Độ tan bão hòa của từng mẫu được xác định ba lần và giá trị trung bình và độ lệch chuẩn được báo cáo.

Ví dụ 8 Thử nghiệm tính độc tế bào in vitro

Sáu dòng tế bào khác nhau được sử dụng, bao gồm dòng tế bào ung thư vú ở người MDA-MB-231 (6×10^3), MDA-MB-453 ($2,4 \times 10^4$), SK-BR-3 (6×10^3), dòng tế bào biểu mô vú ở người M10 (6×10^3), ung thư biểu mô dạ dày ở người NCI-N87 ($2,4 \times 10^4$)

và ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng ở người SW48 ($2,4 \times 10^4$) và được cấy vào đĩa 96 lỗ. Các dòng tế bào được lấy từ Trung tâm nghiên cứu và thu thập nguồn sinh học, BCRC (Bioresource Collection and Research Center), Đài Loan. Tất cả các dòng tế bào được xử lý bằng các hợp chất bao gồm chuỗi hợp chất GNTbm, Chidamide (làm đối chứng dương tính) và Entinostat (làm đối chứng dương tính), với liều lượng nằm trong khoảng từ 50 μM đến 0,39 μM , sau đó được ủ ở 37°C dưới 5% CO_2 trong 72 giờ. Sau 72 giờ, xét nghiệm MTT (CaymanTM) được sử dụng để xác định khả năng tồn tại của tế bào. Các dòng tế bào MDA-MB-231, MDA-MB-453, SK-BR-3 được duy trì trong DMEM/F12 được bổ sung 10% FBS, 0,2% thuốc kháng sinh (MycoZapTM, Pluse-CL). Dòng tế bào M10 được duy trì trong MEM Alpha (gibcoTM) được bổ sung 10% FBS, 0,2% thuốc kháng sinh (MycoZapTM, Pluse-CL). Dòng tế bào NCI-N87 được duy trì trong RPMI 1640 (CORNINGTM) được bổ sung 10% FBS, 0,2% thuốc kháng sinh (MycoZapTM, Pluse-CL). Dòng tế bào SK-BR-3 được duy trì trong DMEM (CORNINGTM) được bổ sung 10% FBS, 0,2% thuốc kháng sinh (MycoZapTM, Pluse-CL).

Ví dụ 9 Xác định IC_{50} đối với sự ức chế bằng enzym HDAC 1, 2 và 3 được xác định

Xét nghiệm HDAC được thực hiện theo các quy trình chuẩn (kit xét nghiệm HDAC 1, 2 và 3 sinh huỳnh quang, BPS BioscienceTM). Tất cả các hợp chất, với Chidamide và Entinostat làm đối chứng dương tính, ở liều lượng từ 20 μM đến 1,28 nM, được trộn với dung dịch đệm trong kit và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau 1 giờ, chất phát triển xét nghiệm được thêm vào các mẫu và độ hấp thụ được đọc ở bước sóng sinh huỳnh quang. Sự ức chế tương đối đối với các hoạt tính HDAC 1, 2 và 3 trong mỗi mẫu được xác định.

Ví dụ 10 Động học ức chế enzym của HDAC3 bởi GNTbm-02 được xác định

Xét nghiệm động học enzym HDAC3 được thực hiện theo các quy trình tiêu chuẩn (kit xét nghiệm HDAC3 sinh huỳnh quang, BPS BioscienceTM). Chuỗi hợp chất GNTbm-01, GNTbm-02, và GNTbm-03, Chidamide và Entinostat ở liều 2 μM được trộn với dung dịch đệm trong kit và ủ ở 37°C trong 20 phút, 40 phút và 60 phút. Sau khi ủ, chất phát triển xét nghiệm được thêm vào các mẫu và độ hấp thụ được đọc ở bước

sóng sinh huỳnh quang. Sự ức chế tương đối đối với hoạt tính HDAC3 trong mỗi mẫu được xác định.

Ví dụ 11 So sánh IC₅₀ giữa GNTbm-02 và Entinostat (MS-275) đối với sự ức chế bằng enzym HDAC 1-11 được xác định

Báo cáo xét nghiệm đã hoàn thành là của BPS Bioscience Inc. (6042 Cornerstone Court West, Ste. B, San Diego, CA 92121, USA). Mục đích của nghiên cứu là xác định ảnh hưởng của hai hợp chất GNTbm-02 và Entinostat làm đối chứng dương (MS-275) đối với hoạt tính của các HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, và HDAC11 tái tổ hợp bằng cách sử dụng xét nghiệm enzym in vitro. Xét nghiệm HDAC được thực hiện theo các quy trình chuẩn (kit xét nghiệm HDAC 1-11 sinh huỳnh quang, BPS Bioscience™). GNTbm-02 và Entinostat (đối chứng dương tính) ở liều lượng từ 10 μ M đến 0,51 nM được trộn với dung dịch đệm trong kit và ủ ở 37°C trong 0,5 giờ. Sau 0,5 giờ, chất phát triển xét nghiệm được thêm vào các mẫu và độ hấp thụ được đọc ở bước sóng sinh huỳnh quang. Sự ức chế tương đối đối với các hoạt tính của HDAC 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 11 được xác định trong mỗi mẫu. Các chi tiết thêm nữa được mô tả dưới đây. Tất cả các hợp chất được hòa tan trong DMSO. Pha loãng theo dãy các hợp chất đầu tiên được thực hiện trong 100% DMSO với nồng độ cao nhất là 1 mM. Mỗi dung dịch pha loãng hợp chất trung gian (trong 100% DMSO) sau đó sẽ được pha loãng trực tiếp gấp 10 lần vào dung dịch đệm xét nghiệm để tạo thành dung dịch pha loãng trung gian chứa 10% DMSO trong dung dịch đệm xét nghiệm HDAC và 5 μ l dung dịch pha loãng được thêm vào phản ứng 50 μ l để đạt được nồng độ cuối cùng của DMSO là 1% trong tất cả các phản ứng. Các phản ứng enzym đối với enzym HDAC được tiến hành lặp lại hai lần ở 37°C trong 30 phút trong hỗn hợp 50 μ l chứa dung dịch đệm xét nghiệm HDAC, 5 μ g BSA, cơ chất HDAC, enzym HDAC và hợp chất thử nghiệm. Sau các phản ứng enzym, 50 μ l 2 x chất phát triển HDAC được thêm vào từng lỗ cho các enzym HDAC và đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút nữa. Cường độ huỳnh quang được đo ở mức kích thích 360nm và mức phát xạ 460nm bằng đầu đọc vi đĩa Tecan Infinite M1000. Các xét nghiệm hoạt tính HDAC được thực hiện lặp lại hai lần với mỗi nồng độ. Dữ liệu cường độ huỳnh quang được phân tích bằng phần mềm máy tính, Graphpad Prism. Trong trường hợp không có hợp chất, cường độ huỳnh quang (Ft) trong mỗi bộ dữ liệu được

xác định là hoạt tính 100%. Trong trường hợp không có HDAC, cường độ huỳnh quang (Fb) trong mỗi bộ dữ liệu được xác định là hoạt tính 0%. Phần trăm hoạt tính với sự có mặt của mỗi hợp chất được tính toán theo phương trình sau: % hoạt tính = $(F - F_b) / (F_t - F_b)$, trong đó F = cường độ huỳnh quang khi có mặt hợp chất. Sau đó, các giá trị của % hoạt tính so với một loạt nồng độ hợp chất được vẽ bằng cách sử dụng phân tích hồi quy phi tuyến tính của đường cong đáp ứng liều Sigmoidal được tạo ra bằng phương trình $Y = B + (T - B) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) \times \text{Hill Slope}))}$, trong đó Y = phần trăm hoạt tính, B = phần trăm hoạt tính tối thiểu, T = phần trăm hoạt tính tối đa, X = logarit của hợp chất và Hill Slope = hệ số độ dốc hoặc hệ số Hill. Giá trị IC_{50} được xác định bởi nồng độ gây ra phần trăm hoạt tính bán tối đa.

Ví dụ 12 Sự chết theo chương trình của tế bào và sự kìm hãm chu kỳ tế bào được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng

Xét nghiệm nhuộm PI/RNaza (BD Bioscience™) được thực hiện để cho thấy sự hiện diện của quá trình kìm hãm chu kỳ tế bào và các tế bào chết theo chương trình sau khi xử lý bằng các hợp chất GNTbm, Chidamide và Entinostat. Dòng tế bào ung thư vú ở người MDA-MB-231 ($1,5 \times 10^5$) và dòng tế bào biểu mô vú ở người M10 ($1,5 \times 10^5$) được xử lý bằng các hợp chất GNTbm, Chidamide và Entinostat (1,625 đến 25 μM), tương ứng, trong 72 giờ hoặc được điều trị bằng các liều chỉ định từ 3 giờ đến 72 giờ. Các tế bào SW48 ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng ở người (5×10^5) được điều trị bằng loạt hợp chất GNTbm, Chidamide và Entinostat (với liều chỉ định) trong 72 giờ hoặc được điều trị ở nồng độ của liều chỉ định từ 3 giờ đến 72 giờ. Sau khi điều trị, các tế bào được thu gom, cố định bằng etanol 80% trong 24 giờ, rửa bằng PBS 1X và nhuộm bằng PI/RNaza trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các tế bào sau đó được phân tích bằng máy đếm tế bào theo dòng trong vòng 1 giờ.

Ví dụ 13 Xét nghiệm thẩm tách Western

Các tế bào MDA-MB-231 ung thư vú ở người và tế bào SW48 ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng ở người được phân tích. MDA-MB-231 và SW48 được lấy từ Trung tâm nghiên cứu và thu thập nguồn sinh học (BCRC, Đài Loan). MDA-MB-231 và SW48 được phát triển ở 37°C trong điều kiện không khí ẩm không được bổ sung CO_2 trong Leibovitz's L-15 (cat. #11415114, Thermo Fisher Scientific) chứa 10% huyết thanh thai bê được bất hoạt bằng nhiệt (Thermo Science), 1X nồng độ thuốc kháng sinh MycoZap

(cat.# VZA-2011, Lonza). Các tế bào được điều trị bằng loạt hợp chất GNTbm, Chidamide hoặc Entinostat trong các khoảng thời gian khác nhau hoặc ở các liều lượng khác nhau. Các tế bào được điều trị với các liều chỉ định trong 24 giờ hoặc các tế bào được điều trị với các liều chỉ định trong các khoảng thời gian khác nhau. Các viên tế bào được hòa tan với dung dịch đệm RIPA (cat. #20-188, Merck) với chất ức chế proteaza và phosphatase (cat. #K272, BioVision) và được làm trong bằng cách ly tâm. Lượng protein tổng bằng nhau được phân giải bằng SDS-PAGE và được chuyển đến màng polyvinyliden florua (cat. #1620177, BIO-RAD). Các vết thấm được ủ với các kháng thể sơ cấp kháng β -actin (cat. #sc-47778, Santa Cruz Biotechnology), Histone 3ac (cat. #61637, Active Motif) và kháng thể thứ cấp HRP kháng thể (ab6721, Abcam) và kháng chuột (sc-2005, Santa Cruz). Các vết thấm được phát triển bằng cách sử dụng cơ chất thấm tách Western ECL (cat. #sc-2048, Santa Cruz Biotechnology). Các vết thấm hiện hình được phân tích với hệ thống tạo hình ảnh iBright FL1000 (Thermo Fisher Scientific).

Ví dụ 14 Hoạt tính chống ung thư trong các mô hình động vật

Nghiên cứu trên động vật được phê duyệt và giám sát bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật thuộc tổ chức của Đại học y khoa Đài Bắc (Taipei Medical University Institutional Animal Care and Use Committee-TMU IACUC, NO: LAC-2019-0286, LAC-2020-0306). Chuột BALB/c được từ sáu đến tám tuần tuổi (Trung tâm Động vật Phòng thí nghiệm Quốc gia, Đài Loan) được sử dụng trong mỗi nhóm điều trị cho tất cả các thí nghiệm trên động vật. Các khối u được tạo thành bằng cách tiêm dưới da 1×10^6 hoặc 5×10^6 tế bào CT26 [(CRL-2638; ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng ở chuột). Dòng tế bào CT26 được mua từ ATCC. Các tế bào khối u CT26 được nuôi cấy trong McCoy's 5A được bổ sung 10% (thể tích/thể tích) FBS ở 37°C, 5% CO₂. Các tế bào CT26 được trộn với Matrigel (cat. #354248, Corning®) và được cấy vào sườn trái của chuột và sự phát triển của khối u được xác định bằng cách đo hai đường kính vuông góc. Các khối u được phép phát triển trong 8-11 ngày (kích thước khối u khoảng 150-250 mm³) trước khi phân ngẫu nhiên và điều trị. Động vật được làm chết êm ái khi khối u đạt đường kính hơn 3000 mm³. Chuột mang CT26 được cho dùng 2,5 mg/kg kháng thể kháng IgG (cat. #BE0089, Lot# 716719J3, Bio X Cell) và kháng PD-1 (cat. #BE0146, Lot# 735019J3, Bio X Cell) bằng cách tiêm trong màng bụng vào các ngày 8, 11, 14,

17, 20 và 23 sau khi cấy ghép khối u và tất cả các kháng thể được pha loãng đến nồng độ thích hợp trong 100 μL PBS vô trùng (pH 7,4) (Invitrogen Life Technologies). Regorafenib (HY-1031, 30 mg/kg, uống hàng ngày, MedChemExpress USA), Celecoxib (50 mg/kg, viên nang uống hàng ngày/Celebrex®), Chidamide-K30 (50 mg/kg, uống hàng ngày, sản xuất từ GNTbm, Đài Bắc, Đài Loan) và các hợp chất GNTbm-02/k30, GNTbm-03/k30, GNTbm-04/k30, GNTbm-05/k30, GNTbm-06/k30, GNTbm-11/k30, GNTbm-38/k30, GNTbm-39/k30 (50, 25 hoặc 12,5 mg/kg, được hòa tan trong nước để tạo thành dung dịch gốc, uống hàng ngày) được sử dụng bằng đường uống để điều trị chuột mang khối u với các liều lượng khác nhau hàng ngày từ ngày thứ 8 đến ngày 23 trong 16 ngày. Hoạt tính chống ung thư được xác định từ khi bắt đầu điều trị cho đến khi thể tích khối u đạt 3.000 mm^3 . Thể tích khối u được tính bằng chiều dài $\times$ chiều rộng² $\times 0,5$.

Ví dụ 15 Tỷ lệ sống sót trong các mô hình động vật

Việc sử dụng kháng thể hoặc thuốc được thực hiện trong 16 ngày từ ngày 8 đến ngày 23. Khối u tiếp tục phát triển ở những con chuột mang khối u. Thể tích khối u của chuột được đo ba hoặc bốn ngày một lần (hai lần/tuần). Chuột mang khối u được coi là chết khi thể tích khối u đạt 3.000 mm^3 . Tất cả các nhóm điều trị được ghi lại và phân tích.

Ví dụ 16 Nghiên cứu thử thách lại khối u trong mô hình động vật chuột mang khối u

Tất cả những con chuột có đáp ứng PR/CR sau khi điều trị đều được thử thách lại với các tế bào CT26 ở phía đối diện (vui lòng xem Bảng 6). Thử thách lại với CT26 được thực hiện vào ngày 33, tức là 7 ngày (ngày 33) sau lần đánh giá khối u đầu tiên (ngày 26), với việc tiêm 5×10^6 tế bào CT26 vào sườn phải của mỗi con chuột. Sau khi thử thách lại với các tế bào CT26, khối u được phép phát triển thêm 7 ngày nữa (ngày 40) để xác định đường cơ sở là 1 lần. Sau 10 ngày nữa (ngày thứ 50), sự phát triển của khối u được đánh giá để thử thách lại. Nếu đáp ứng cả hai tiêu chí sau, đáp ứng sẽ được coi là tái phát: thứ nhất, kích thước khối u tăng gấp 2 lần khi so với đường cơ sở; thứ hai, thể tích khối u ở ngày thứ 50 là hơn 300 mm^3 . Sự tái phát xảy ra khi hoạt tính ghi nhớ miễn dịch không được kích hoạt đầy đủ. Nếu sự phát triển của khối u bị ức chế, điều đó có nghĩa là sự ghi nhớ miễn dịch được kích hoạt.

Ví dụ 17 Đếm tế bào theo dòng

Các kháng thể và chất phản ứng sau đây được sử dụng cho phương pháp đếm tế bào theo dòng: CD8a PerCP-Cy5.5 (53-6.7; BioLegend), CD4 PE (GK 1.5; BioLegend), CD25 PerCP-Cy5.5 (PC61; BioLegend), Foxp3 PE (MF14; BioLegend), CD3 APC (17A2; BioLegend), CD11b APC (M1/70; BioLegend), Ly-6C PerCP-Cy5.5 (HK 1.4; BioLegend), Ly-6G PE (1A8; BioLegend), MHC-II-PE (BM8; BioLegend), CD45 FITC (30-F11; BioLegend). Phép đếm tế bào theo dòng được thực hiện trên máy đếm tế bào theo dòng FACS Calibre (BD Biosciences) và dữ liệu được phân tích bằng phần mềm FACS Diva (BD Biosciences). Để đánh giá mức độ quần thể tế bào tuần hoàn, các mẫu máu được thu thập từ chuột vào các ngày 8, 12, 16 sau khi bắt đầu điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) có hoặc không có GNTbm-02 (12,5-50 mg/kg) hoặc Chidamide (50 mg/kg, làm đối chứng dương tính) cộng với Celecoxib (50 mg/kg). Một trăm năm mươi microlit máu được thu thập trong K2EDTA BD Microtainer (BD Biosciences) từ tĩnh mạch mắt phải hoặc trái. RBC từ các mẫu máu đã được chống đông ngay lập tức được phân giải bằng cách sử dụng 2 mL $1\times$ dung dịch đệm phân giải RBC (Qiagen, Valencia, CA) trong 10 phút và các mẫu được rửa hai lần trong PBS lạnh bằng (BD Biosciences). Các mẫu được nhuộm với các kháng thể thích hợp. Để phân tích, chúng tôi đã sử dụng các tiêu chí kiểu hình được thiết lập trước đó của các tế bào này làm các tế bào $CD45^+CD11b^+Ly6G^+Ly6C^-$ (PMN-MDSC), $CD45^+CD11b^+Ly6G^-Ly6C^+$ (M-MDSC), tế bào $CD45^+CD3^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg), tế bào $CD45^+CD11b^+MHC-II^+Ly6C^+$ (TAM), và tế bào $CD45^+CD3^+CD4^+/CD45^+CD3^+CD8^+$ (tế bào T $CD4^+$ hoặc $CD8^+$). Tổng số tế bào đơn nhân được sử dụng làm mẫu số chung. Để đánh giá mức độ tế bào lympho thâm nhiễm khối u trong khối u, các tế bào $CD8^+$, $CD4^+$, tế bào T điều hòa (Treg), PMN-MDSC, M-MDSC và TAM đầu tiên được tinh chế từ các mẫu khối u được lấy ra từ chuột 12 ngày sau khi bắt đầu điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 có hoặc không có GNTbm-02 hoặc Chidamide cộng với celecoxib. Tóm lại, các mô khối u nguyên phát được thu gom, cân và băm nhỏ thành các mảnh nhỏ. Collagenase IV (Sigma-Aldrich) ở mức 1 mg/mL trong HBSS (Invitrogen Life Technologies) được thêm vào từng mẫu với tỷ lệ 1 mL trên 200 mg mô khối u. Các mẫu được ủ trên máy lắc đầu cuối trong 150 phút ở 37°C . Các mô đồng nhất thu được được lọc $0,4\text{ }\mu\text{m}$ và rửa ba lần trong PBS (BD Biosciences), được phân tách qua gradien Percoll để phân lập các tế

bào đơn nhân, và 1×10^6 tế bào trên mỗi mẫu được sử dụng để đánh dấu kháng thể. Mức tế bào T CD8⁺ được đánh giá bằng cách sử dụng các tiêu chí về kiểu hình đã thiết lập trước đó của CD45⁺CD3⁺CD8⁺. Mức tế bào Treg được đánh giá bằng cách sử dụng tiêu chí kiểu hình đã thiết lập trước đó của CD45⁺CD3⁺CD25⁺Foxp3⁺. Mức tế bào PMN-MDSC/M-MDSC được đánh giá bằng cách sử dụng các tiêu chí về kiểu hình đã thiết lập trước đó của CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁻/CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁺. Mức tế bào TAM được đánh giá bằng cách sử dụng tiêu chí kiểu hình đã thiết lập trước đó của CD45⁺CD11b⁺MHC-II⁺Ly6C⁺ và tổng số tế bào đơn nhân được sử dụng làm mẫu số chung.

Ví dụ 18 Hoạt tính chống ung thư trong mô hình chuột trụi lông

Nghiên cứu trên động vật được phê duyệt và giám sát bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật thuộc tổ chức của Đại học y khoa Đài Bắc (Taipei Medical University Institutional Animal Care and Use Committee-TMU IACUC, NO: LAC-2019-0086). Chuột BALB/C đực từ sáu đến tám tuần tuổi (Trung tâm Động vật Phòng thí nghiệm Quốc gia, Đài Loan) được sử dụng trong mỗi nhóm điều trị cho tất cả các thí nghiệm trên động vật. Các khối u được tạo thành bằng cách tiêm dưới da 5×10^6 tế bào CT26 với matrigel (cat. #354248, Corning®) vào sườn trái của chuột và sự phát triển được xác định bằng cách đo hai đường kính vuông góc. Các khối u được phép phát triển trong 8 ngày (kích thước khối u khoảng 100~150 mm³) trước khi phân ngẫu nhiên và điều trị. Động vật được làm chết êm ái khi thể tích khối u đạt 3000 mm³. Chuột mang CT26 được cho dùng 2,5 mg/kg kháng thể kháng IgG (cat. #BE0089, Lot# 716719J3, Bio X Cell) và kháng PD-1 (cat. #BE0146, Lot# 735019J3, Bio X Cell) bằng cách tiêm trong màng bụng vào các ngày 8, 11, 14, 17, 20 và 23 sau khi cấy ghép và tất cả các kháng thể được pha loãng đến nồng độ thích hợp trong 100 µL PBS vô trùng (pH 7,4) (Invitrogen Life Technologies). Hợp chất GNTbm và celecoxib (viên nang/Celebrex®, 200 mg) được dùng bằng đường uống vào ngày thứ 8 sau khi cấy ghép. Các hợp chất GNTbm (được hòa tan trong DMSO để tạo dung dịch gốc) được pha loãng hoặc tạo huyền phù bằng nước và dùng bằng đường uống để điều trị chuột mang khối u ở các liều lượng khác nhau hàng ngày từ ngày 8 đến ngày 23. Celecoxib từ viên nang được dùng theo đường uống để điều trị cho chuột mang khối u ở liều 50 mg/kg từ ngày 8 đến ngày 23. Hoạt

tính chống ung thư được xác định từ khi bắt đầu điều trị cho đến khi thể tích khối u đạt 3.000 mm³. Thể tích khối u được tính bằng chiều dài $\times$ chiều rộng² $\times$ 0,5.

Kết quả

Một loạt các dẫn xuất Picolinamit và Benzamit tổng hợp của các chất ức chế HDAC loại I mới và hữu hiệu (được gọi là loạt hợp chất GNTbm)

GNTbm đã phát triển một loạt chất ức chế HDAC loại I mới có các đặc tính điều biến miễn dịch biểu sinh hữu hiệu, có thể ức chế hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện ra rằng các chất ức chế HDAC loại I có khả năng điều hòa hữu hiệu trong vi môi trường khối u (TME) đã thúc đẩy đáng kể đáp ứng miễn dịch chống lại sự phát triển của khối u. Do đó, để thiết kế và tổng hợp các chất ức chế HDAC loại I mới này là nhiệm vụ hấp dẫn để tăng cường hiệu quả điều trị trong liệu pháp miễn dịch. Các chất ức chế HDAC loại I dựa trên benzamit đã được nghiên cứu trong lĩnh vực kiểm soát TME, chẳng hạn như Entinostat (MS-275), Tucidinostat (Chidamide/HBI-8000) và Mocetinostat, v.v.. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế và tổng hợp một loạt các chất ức chế HDAC loại I mới và hữu hiệu dựa trên cấu trúc của picolinamit. GNTbm-01 [6-((E)-4-(6-methylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl)pyridin-3-carboxamit] là hợp chất tổng hợp mới đầu tiên dựa trên cấu trúc lõi của carboxamit như được thể hiện trên Fig. 1 và Bảng 1. Hợp chất GNTbm-01 được thử nghiệm về khả năng ức chế enzym của HDAC 1, 2 và 3 như được thể hiện trong Bảng 4. Kết quả đã chứng minh rằng hợp chất GNTbm-01 là chất ức chế HDAC loại I yếu hơn khi so sánh với Entinostat hoặc Chidamide. Chúng tôi đã tối ưu hóa cấu trúc và thay đổi vị trí của nguyên tử N để tạo ra hợp chất mới GNTbm-02 [5-((E)-4-(6-methylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl)picolinamit] như được thể hiện trên Fig. 1 và Bảng 1. Hợp chất GNTbm-02 có cùng công thức phân tử (C₂₂H₂₀FN₅O₂) với hợp chất GNTbm-01 nhưng chỉ có sự thay đổi về vị trí của nguyên tử N trong lõi picolinamit. Như được thể hiện trong Bảng 4, hợp chất GNTbm-02 rất mạnh trong việc ức chế hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3 khi so sánh với Entinostat hoặc Chidamide. Kết quả cũng chứng minh rằng GNTbm-02 ức chế hoạt tính của enzym HDAC 1, 2 và 3 mạnh hơn so với GNTbm-01. Tiếp theo, chúng tôi đã thiết kế hợp chất GNTbm-03 dựa trên benzamit với việc loại bỏ một nguyên tử N (nghĩa là thay thế bằng một nguyên tử C) và kiểm tra sự khác biệt về khả năng ức chế hoạt tính enzym của

HDAC 1, 2 và 3, so với GNTbm-02. Chất ức chế HDAC loại I tổng hợp dựa trên benzamit GNTbm-03 [[4-((E)-4-(6-methylpyridin-3-yl)but-3-enamido)-N-(2-amino-4-flophenyl) benzamit]] được thể hiện trên Fig. 1 và Bảng 1. Như được thể hiện trong Bảng 4, GNTbm-03 được chứng minh là ức chế hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3. Kết quả đã chứng minh rằng GNTbm-03 có khả năng ức chế mạnh các hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3 loại I khi so sánh với Entinostat hoặc Chidamide. Cũng chứng minh được rằng GNTbm-03 có khả năng ức chế tương tự hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3 khi so sánh với GNTbm-02. Được kết hợp với nhau, dẫn xuất GNTbm-02 dựa trên picolinamit là chất đầu tiên trong nhóm hóa học của nó với vai trò là chất ức chế HDAC loại I. Chúng tôi rất quan tâm đến việc thiết kế các dẫn xuất dựa trên picolinamit và benzamit của các chất ức chế HDAC loại I mới và hữu hiệu. Hàng loạt hợp chất GNTbm mới được tổng hợp và thử nghiệm như GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-06, GNTbm-08, GNTbm-11, GNTbm-12, GNTbm-19, GNTbm-25, GNTbm-33, GNTbm-37, GNTbm-38, và GNTbm-39.

Đề phân tích độ tan bão hòa của GNTbm-02, GNTbm-03, GNTbm-04 và GNTbm-06

Độ hòa tan là một thông số quyết định rất quan trọng đối với độ sinh khả dụng đường uống. Phân tích độ tan bão hòa của GNTbm-02, GNTbm-03, GNTbm-04 và GNTbm-06 được thể hiện trong Bảng 2. Kết quả cho thấy Chidamide có độ tan bão hòa giảm khi so sánh với GNTbm-02 và GNTbm-04. Độ tan bão hòa của GNTbm-02 và GNTbm-04 lần lượt là 33,6 và 7,2 µg/mL. Những kết quả này gợi ý rằng GNTbm-02 và GNTbm-04 có thể có độ sinh khả dụng đường uống tốt hơn so với Chidamide.

Xét nghiệm tính gây độc tế bào in vitro của loạt hợp chất GNTbm

Chúng tôi đã đánh giá tác dụng gây độc tế bào của chuỗi hợp chất GNTbm trong một số dòng tế bào ung thư bao gồm ba dòng tế bào ung thư vú ở người (SK-BR-3, MDA-MB-453 và MDA-MB-231), ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng ở người SW48, ung thư biểu mô dạ dày ở người NCI-N87, và dòng tế bào biểu mô vú người M10 (dòng tế bào bình thường). Kết quả đã chứng minh rằng Chidamide hoặc Entinostat ở dạng đối chứng dương gây ra tác dụng gây độc tế bào rõ rệt, đặc biệt là trong các tế bào SK-BR-3 và MDA-MB-453. Tổng cộng, sáu dòng tế bào nhạy với điều trị như được thể hiện trong Bảng 3, 8 và 9. Hợp chất GNTbm-01 gây ra một phần tác dụng gây độc tế bào khi

so sánh với Entinostat. Như được nêu trong Bảng 3, kết quả đã chứng minh rằng GNTbm-02 rất hữu hiệu trong việc gây ra tác dụng gây độc tế bào, đặc biệt là trong các tế bào SK-BR-3, MDA-MB-453 và SW48 so với GNTbm-01. Kết quả này chứng minh rằng cấu trúc chứa lõi picolinamit trong GNTbm-02 là rất quan trọng. Việc thay thế cấu trúc lõi picolinamit bằng benzamit sẽ cản trở tác dụng gây độc tế bào. Như được nêu trong Bảng 3, hợp chất GNTbm-03 yếu hơn trong việc gây ra tác dụng gây độc tế bào so với GNTbm-02 trong các tế bào SK-BR-3, MDA-MB-231 và SW48. Kết quả này đề xuất rằng GNTbm-02 có cấu trúc lõi picolinamit vượt trội hơn trong việc gây độc tế bào so với GNTbm-03 có cấu trúc lõi benzamit. Kết hợp lại với nhau, những kết quả này cho thấy GNTbm-02 là chất ức chế HDAC loại I mới và hữu hiệu và có khả năng gây độc tế bào ở một số tế bào ung thư ở người hữu hiệu. Hơn nữa, chúng tôi quan tâm đến việc đánh giá tác dụng gây độc tế bào của một số dẫn xuất dựa trên picolinamit và benzamit tổng hợp mới. Như thể hiện trong Bảng 8, tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất dựa trên picolinamit được phân tích. GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-06 và GNTbm-11 mạnh hơn trong việc gây ra tác dụng gây độc tế bào ở sáu dòng tế bào so với Chidamide hoặc Entinostat. Trong các hợp chất dựa trên benzamit, GNTbm-33, GNTbm-38 và GNTbm-39 hữu hiệu hơn trong việc gây ra tác dụng gây độc tế bào so với Chidamide hoặc Entinostat. Những dữ liệu này đã chứng minh rằng các dẫn xuất dựa trên picolinamit và benzamit mới này có tác dụng gây độc tế bào hữu hiệu so với chất ức chế HDAC loại I đã biết rõ là Chidamide hoặc Entinostat.

Chuỗi hợp chất GNTbm dựa trên picolinamit để ức chế HDAC 1, 2 và 3

Đã chứng minh được rằng chuỗi hợp chất GNTbm ức chế hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3. Như được trình bày trong Bảng 4 và 10, Entinostat ở dạng đối chứng dương là chất ức chế HDAC loại I hữu hiệu ức chế chọn lọc các hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3. Chidamide (Tucidinostat) là chất ức chế HDAC hữu hiệu khác được phê duyệt cho u lympho tế bào T ngoại vi (peripheral T cell lymphoma-PTCL) tái phát hoặc khó chữa và ung thư vú ER⁺/Her-2⁻ tiến triển bởi NMPA ở Trung Quốc. Chidamide là chất ức chế chọn lọc phân nhóm để ức chế hoạt tính enzym của HDAC 1, 2, 3 và 10. Cả Entinostat và Chidamide đều cho thấy sự ức chế hữu hiệu hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3 trong Bảng 4. Tiếp theo, GNTbm-01 được đánh giá và chứng minh là có hiệu lực nhẹ trong việc ức chế hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3 so với Entinostat như

được thể hiện trong Bảng 4. Đáng chú ý là, GNTbm-02 có các hoạt tính rất hữu hiệu để ức chế các hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3 ở cấp độ nanomol. So sánh GNTbm-02 với Entinostat hoặc Chidamide trong việc ức chế hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3 cho thấy tác dụng ức chế tương tự. Những kết quả này cho thấy GNTbm-02 là chất ức chế HDAC loại I hữu hiệu và chọn lọc. Như được trình bày trong Bảng 4, GNTbm-03 là chất ức chế HDAC hữu hiệu với tác dụng ức chế tương tự như GNTbm-02. Tiếp theo, sự ức chế động học enzym HDAC 3 được nghiên cứu. Như được thể hiện trên Fig. 16a, Chidamide và GNTbm-02 cho thấy sự ức chế hoạt tính enzym của HDAC 3 mạnh hơn so với Entinostat. Như được thể hiện trên Fig. 16b, GNTbm-02 và GNTbm-03 cho thấy sự ức chế hoạt tính enzym của HDAC 3 mạnh hơn so với GNTbm-01. Kết hợp lại với nhau, tất cả những kết quả này cho thấy rằng GNTbm-02 chứa cấu trúc lõi picolinamit có thể có khả năng ức chế hoạt tính enzym của HDAC 1, 2 và 3 hữu hiệu hơn. Hơn nữa, chúng tôi quan tâm đến việc đánh giá tất cả các hợp chất GNTbm dựa trên picolinamit tổng hợp mới như nêu trong Bảng 10. GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-06, GNTbm-08 và GNTbm-11 ức chế hoạt tính enzym của HDAC 3 hữu hiệu hơn so với Chidamide hoặc Entinostat. GNTbm-05 và GNTbm-06 ức chế hoạt tính enzym của HDAC 1 hữu hiệu hơn so với Chidamide hoặc Entinostat. Tuy nhiên, chúng tôi cũng đã đánh giá hợp chất GNTbm tổng hợp mới dựa trên benzamit như thể hiện trong Bảng 11. GNTbm-38 và GNTbm-39 dường như yếu hơn về mặt ức chế hoạt tính của HDAC 1, 2 và 3 so với Chidamide hoặc Entinostat.

GNTbm-02 là chất ức chế HDAC loại I chọn lọc phân nhóm dựa trên Picolinamit

Để xác nhận thêm khả năng ức chế chọn lọc phân nhóm đối với các hoạt tính enzym của HDAC 1-11, GNTbm-02 được thử nghiệm bởi BPS Bioscience Inc. (6042 Cornerstone Court West, Ste. B, San Diego, CA 92121, USA). Như được thể hiện trong Bảng 5, sự ức chế hoạt tính enzym của HDAC 1-11 (ngoại trừ HDAC 10) được phân tích với Entinostat (MS-275) làm đối chứng dương. Kết quả này đã chứng minh rằng GNTbm-02 ức chế HDAC 1, 2 và 3 hữu hiệu hơn so với Entinostat trong cùng điều kiện. GNTbm-02 ức chế HDAC1, HDAC2 và HDAC3 loại I với IC_{50} lần lượt là 0,39, 0,91 và 0,73 μ M. Tuy nhiên, Entinostat ức chế HDAC1, HDAC2 và HDAC3 loại I với IC_{50} lần lượt là 0,95, 2,3 và 4,6 μ M. Các HDAC khác bao gồm 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 11 không bị ức

chế bởi GNTbm-02 hoặc Entinostat ở nồng độ lên tới 10 μM . Những kết quả này cho thấy GNTbm-02 là chất ức chế HDAC loại I hữu hiệu và chọn lọc phân nhóm. GNTbm-02 là chất ức chế HDAC loại I dựa trên picolinamit. Tuy nhiên, Entinostat là chất ức chế HDAC loại I dựa trên benzamit. GNTbm-02 hữu hiệu hơn trong việc ức chế các hoạt tính enzym của HDACS 1, 2 và 3 so với Entinostat.

Chuỗi hợp chất GNTbm tác động đáng kể đến sự tăng sinh và hình thái tế bào ung thư ở người.

Tác dụng ức chế của GNTbm-02 đối với sự tăng sinh tế bào ung thư ở người được thể hiện trên Fig. 3. GNTbm-02 và Entinostat ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để điều trị các tế bào MDA-MB-231 trong 72 giờ. Như được thể hiện trên Fig. 3a, khả năng ức chế của GNTbm-02 và Entinostat là tương tự nhau, ở nồng độ 12,5 μM ức chế đáng kể sự tăng sinh tế bào. Như được thể hiện trên Fig. 3b, khả năng ức chế là rõ ràng hơn đối với các tế bào SW48 khi được điều trị bằng GNTbm-02 hoặc Entinostat ở nồng độ 3,125 μM trong 72 giờ. Tiếp theo, các tế bào M10 được điều trị bằng GNTbm-02 hoặc Entinostat ở nồng độ 12,5 μM , giúp ức chế đáng kể sự tăng sinh tế bào như được thể hiện trên Fig. 3c. Kết hợp lại với nhau, những kết quả này cho thấy rằng GNTbm-02 có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào hữu hiệu.

Sự kìm hãm chu kỳ tế bào do chuỗi hợp chất GNTbm gây ra ở pha G0/G1 hoặc G2/M trong các tế bào MDA-MB-231 và SW48 ung thư ở người

Để nghiên cứu cơ chế ức chế sự tăng sinh tế bào, phép đếm tế bào theo dòng được sử dụng để phân tích sự kìm hãm chu kỳ tế bào. Như được thể hiện trên Fig. 4a, GNTbm-02 và Entinostat ở các nồng độ khác nhau từ 1,625 đến 25 μM được sử dụng để điều trị các tế bào MDA-MB-231 trong 72 giờ. Kết quả đã chứng minh rằng GNTbm-02 và Entinostat có cơ chế tương tự, gây ra sự kìm hãm đáng kể chu kỳ tế bào trong pha G0/G1 ở nồng độ 3,125 μM như trên Fig. 4a và b. Như được thể hiện trên Fig. 4c và d, chu kỳ tế bào bị kìm hãm ở pha G0/G1 bằng cách điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ 12,5 μM theo cách phụ thuộc vào thời gian. Kết quả chỉ ra rằng việc điều trị bằng GNTbm-02 hoặc Entinostat trong 1 ngày đã gây ra sự kìm hãm chu kỳ tế bào đáng kể trong pha G0/G1. Trong các tế bào SW48, cơ chế tương tự cũng được thể hiện. Như được thể hiện trên Fig. 5a và b, GNTbm-02 và Entinostat ở các nồng độ khác nhau từ 0,39 đến 6,25 μM được sử dụng để điều trị các tế bào SW48 trong 72 giờ. Kết quả đã

chứng minh rằng GNTbm-02 và Entinostat gây ra sự kìm hãm chu kỳ tế bào đáng kể trong pha G0/G1 ở nồng độ 3,125 μM như trên Fig. 5a và b. Kết quả cho thấy GNTbm-02 (76,9%) dường như hữu hiệu hơn trong việc gây ra sự kìm hãm chu kỳ tế bào ở pha G0/G1 so với Entinostat (72,1%) ở cùng nồng độ 3,125 μM . Như được thể hiện trên Fig. 5c và d, chu kỳ tế bào bị kìm hãm ở pha G0/G1 bằng cách điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ 6,25 μM theo cách phụ thuộc vào thời gian. Kết quả chỉ ra rằng việc điều trị bằng GNTbm-02 hoặc Entinostat trong 2 ngày đã gây ra sự kìm hãm chu kỳ tế bào đáng kể trong pha G0/G1. Kết hợp lại với nhau, tất cả các dữ liệu này chỉ ra rằng GNTbm-02 và Entinostat có cơ chế tương tự để ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư ở người thông qua việc kìm hãm chu kỳ tế bào được cảm ứng trong pha G0/G1. Hơn nữa, chúng tôi quan tâm đến việc đánh giá một số dẫn xuất tổng hợp mới dựa trên picolinamit và benzamit như GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-38 và GNTbm-39. Như thể hiện trong Bảng 12, GNTbm-04 gây ra sự kìm hãm chu kỳ tế bào đáng kể trong pha G0/G1 trong các tế bào SW48. Điều này tương tự như sự kìm hãm chu kỳ tế bào do Chidamide gây ra trong pha G0/G1. Tuy nhiên, các cấu trúc hóa học tương tự của GNTbm-05, GNTbm-38 và GNTbm-39 gây ra sự kìm hãm chu kỳ tế bào một cách đáng kể trong pha G2/M trong các tế bào SW48. Do đó, cấu trúc hóa học của các hợp chất hữu hiệu này rất giống nhau, nhưng cơ chế kìm hãm chu kỳ tế bào lại rất khác nhau.

Sự kìm hãm chu kỳ tế bào do GNTbm-02 gây ra trong pha G2/M trong các tế bào M10

Dòng tế bào biểu mô vú của người M10 được điều trị với các liều khác nhau từ 1,625 đến 25,0 μM GNTbm-02 hoặc Entinostat trong 72 giờ như được thể hiện trên Fig. 6a và b. Kết quả đã chứng minh rằng GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ 12,5 μM gây ra sự kìm hãm đáng kể chu kỳ tế bào của các tế bào M10 trong pha G2/M. Entinostat (20,2%) hữu hiệu hơn so với GNTbm-02 (16,2%) khi gây ra sự kìm hãm chu kỳ tế bào trong pha G2/M như được thể hiện trên Fig. 6a và b. Như được thể hiện trên Fig. 6c và d, chu kỳ tế bào bị kìm hãm trong pha G2/M bằng cách điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ 12,5 μM theo cách phụ thuộc vào thời gian. Kết quả chỉ ra rằng việc điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat trong 2 ngày đã gây ra sự kìm hãm chu kỳ tế bào đáng kể trong pha G2/M trong các tế bào M10. Những kết quả này cho thấy rằng điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat đối với tế bào ung thư ở người đã ức chế đáng

kể sự tăng sinh tế bào ung thư thông qua việc kiểm soát chu kỳ tế bào cảm ứng trong pha G0/G1; tuy nhiên, điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat đối với các tế bào bình thường của người đã ức chế đáng kể sự tăng sinh tế bào thông qua việc kiểm soát chu kỳ tế bào cảm ứng trong pha G2/M.

Sự chết theo chương trình do chuỗi hợp chất GNTbm gây ra ở một số dòng tế bào

Để nghiên cứu xem liệu GNTbm-02 có gây ra quá trình chết theo chương trình trong các tế bào ung thư hay không, kết quả sau khi điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat (dưới dạng đối chứng dương tính) đối với các tế bào MDA-MB-231 ở các nồng độ khác nhau từ 1,625 đến 25,0 μM trong 72 giờ được thể hiện trên Fig. 7a và B. Kết quả đã chứng minh rằng GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ 6,25 μM gây ra quá trình chết theo chương trình đáng kể (tăng tỷ lệ phần trăm của pha phụ G1) như được thể hiện trên Fig. 7a và b. Như được thể hiện trên Fig. 7c và d, quá trình chết theo chương trình của tế bào được gây ra bằng cách điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat cho các tế bào MDA-MB-231 theo cách phụ thuộc vào thời gian. Kết quả chỉ ra rằng GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ 12,5 μM trong 72 giờ (3 ngày) gây ra quá trình chết theo chương trình đáng kể trong các tế bào MDA-MB-231. Entionstat rất hữu hiệu trong việc gây ra quá trình chết theo chương trình theo cách phụ thuộc vào liều lượng hoặc thời gian khi so sánh với GNTbm-02 như được thể hiện trên Fig. 7. Tiếp theo, quá trình chết theo chương trình của tế bào cũng được đánh giá trong các tế bào SW48. Như được thể hiện trên Fig. 8a và b, GNTbm-02 và Entinostat gây ra quá trình chết theo chương trình theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Kết quả chỉ ra rằng điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat ở các nồng độ khác nhau từ 0,39 đến 6,25 μM trong 72 giờ gây ra quá trình chết theo chương trình của tế bào trong các tế bào SW48. GNTbm-02 và Entinostat gây ra quá trình chết theo chương trình đáng kể ở nồng độ 6,25 μM trong 72 giờ như được thể hiện trên Fig. 8a và b. Như được thể hiện trên Fig. 8c và d, đã chứng minh được rằng việc điều trị bằng Entinostat và GNTbm-02 gây ra quá trình chết theo chương trình ở nồng độ cố định là 6,25 μM theo cách phụ thuộc vào thời gian. GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ 6,25 μM trong 72 giờ (3 ngày) gây ra quá trình chết theo chương trình đáng kể trong các tế bào SW48. Entinostat rất hữu hiệu trong việc gây ra quá trình chết theo chương trình trong các tế bào SW48 theo cách phụ thuộc vào liều lượng hoặc phụ thuộc

vào thời gian so với GNTbm-02 như thể hiện trên Fig. 8. Cuối cùng, việc gây ra quá trình chết theo chương trình của tế bào bằng GNTbm-02 và Entinostat trong dòng tế bào bình thường M10 cũng được nghiên cứu. Như được thể hiện trên Fig. 9a và b, điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat ở các nồng độ khác nhau từ 1,625 đến 25,0 μM trong 72 giờ gây ra quá trình chết theo chương trình của tế bào. GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ 12,5 μM trong 72 giờ gây ra quá trình chết theo chương trình đáng kể trong các tế bào M10. Như được thể hiện trên Fig. 9c và d, điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat gây ra quá trình chết theo chương trình ở nồng độ 12,5 μM theo cách phụ thuộc vào thời gian. Kết quả chỉ ra rằng điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ cố định 12,5 μM trong các tế bào M10 trong 72 giờ (3 ngày) gây ra quá trình chết theo chương trình đáng kể như được thể hiện trên Fig. 9c và d. Entinostat cho thấy quá trình chết theo chương trình được gây ra rất hữu hiệu trong các tế bào M10 theo cách phụ thuộc vào liều lượng hoặc phụ thuộc vào thời gian so với GNTbm-02 như được thể hiện trên Fig. 9. Tuy nhiên, các tế bào M10 dường như có khả năng chống lại quá trình chết theo chương trình gây ra cao hơn khi được điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ 25,0 μM trong 72 giờ, so với kết quả của các tế bào MDA-MB-231 như được thể hiện trên Fig. 7. Tiếp theo, chúng tôi quan tâm đến việc nghiên cứu hoạt tính gây ra quá trình chết theo chương trình của GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-38 và GNTbm-39 trong các tế bào SW48. Quá trình chết theo chương trình gây ra bởi các hợp chất này được đánh giá trong các tế bào SW48 được điều trị với các liều chỉ định trong 72 giờ. Như được trình bày trong Bảng 13, GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-38 và GNTbm-39 là hữu hiệu trong việc gây ra quá trình chết theo chương trình trong các tế bào SW48.

Sự axetyl hóa histon H3 do chuỗi hợp chất GNTbm gây ra trong một số dòng tế bào ung thư ở người

GNTbm-02 và Entinostat được chứng minh là chất ức chế HDAC loại I hữu hiệu. Quá trình axetyl hóa histon H3 gây ra bởi GNTbm-02 và Entinostat theo cách phụ thuộc vào liều lượng hoặc phụ thuộc vào thời gian trong các tế bào MDA-MB-231 và SW48 được nghiên cứu. Như được thể hiện trên Fig. 10a và b, điều trị bằng GNTbm-02 và Entinostat cho các tế bào MDA-MB-231 ở các nồng độ khác nhau từ 0,1 đến 10,0 μM trong 24 giờ gây ra quá trình axetyl hóa histon H3. Kết quả chỉ ra rằng GNTbm-02 và Entinostat ở nồng độ 1,0 μM làm tăng đáng kể mức độ axetyl hóa histon H3. Như được

thể hiện trên Fig. 10c và d, các tế bào SW48 nhạy hơn trong việc gây ra axetyl hóa histon H3 bằng cách điều trị với GNTbm-02 và Entinostat ở các nồng độ khác nhau từ 0,1 đến 10,0 μM trong 24 giờ. Như được thể hiện trên Fig. 11a và b, xử lý bằng GNTbm-02 ở nồng độ 1,0 μM trong 2, 6, 24, 48 và 72 giờ gây ra sự axetyl hóa histon H3 trong các tế bào MDA-MB-231 theo cách phụ thuộc vào thời gian. Kết quả chỉ ra rằng GNTbm-02 gây ra axetyl hóa histon H3 một cách hữu hiệu trong tế bào MDA-MB-231 sau 6 giờ điều trị. Các kết quả tương tự cũng được thể hiện trong các tế bào SW48 như được thể hiện trên Fig. 11c và d. Điều trị bằng GNTbm-02 ở nồng độ 1,0 μM trong các tế bào SW48 trong 2, 6, 24, 48 và 72 giờ cho thấy quá trình axetyl hóa histon H3 theo cách phụ thuộc vào thời gian. GNTbm-02 gây ra mức axetyl hóa histon H3 một cách hữu hiệu trong các tế bào SW48 sau 6 giờ điều trị. Kết hợp lại với nhau, tất cả các dữ liệu này cho thấy GNTbm-02 là chất ức chế HDAC loại I hữu hiệu và gây ra quá trình axetyl hóa histon H3 trong một số dòng tế bào ung thư ở người. Hơn nữa, chúng tôi quan tâm đến việc phân tích xem liệu các hợp chất mới có hoạt tính mạnh hơn để tăng biểu hiện axetyl hóa histon 3 trong các tế bào SW48 như được thể hiện trên Fig. 12 hay không. Các tế bào được điều trị với cùng liều lượng GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-11 và Chidamide làm đối chứng dương tính trong 24 giờ trong các tế bào SW48 như được thể hiện trên Fig.12a. GNTbm-05 và GNTbm-04 ở liều 0,25 μM rất hữu hiệu trong việc gây ra axetyl hóa histon 3 so với đối chứng dương Chidamide trong các tế bào SW48. Các kết quả tương tự cũng chứng minh rằng GNTbm-04, GNTbm-05 và GNTbm-06 ở liều 0,25 μM rất hữu hiệu trong việc gây ra axetyl hóa histon 3 trong các tế bào SW48 như được thể hiện trên Fig.12b. Hơn nữa, bốn hợp chất hữu hiệu (GNTbm-04, GNTbm-05, GNTbm-38, GNTbm-39) gây ra quá trình axetyl hóa histon 3 được đánh giá như được thể hiện trên Fig.12c. Kết quả đã chứng minh rằng GNTbm-05, GNTbm-04, GNTbm-38 và GNTbm-39 hữu hiệu hơn trong việc gây ra sự biểu hiện axetyl hóa histon 3 trong các tế bào SW48 so với Chidamide.

Chuỗi hợp chất GNTbm có các đặc tính điều biến miễn dịch biểu sinh trong mô hình chuột mang CT26

Để nghiên cứu xem liệu GNTbm-02 có các đặc tính điều biến miễn dịch biểu sinh hay không, mô hình động vật in vivo của chuột mang khối u ruột kết CT26 BALB/c được sử dụng để đánh giá. Chuột BALB/c mang khối u đại tràng CT26 ở chuột được điều trị bằng nhiều phương thức trị liệu khác nhau theo chỉ định. IgG, đối chứng kháng IgG (chất dẫn, 2,5 mg/kg); PD-1, kháng thể đơn dòng kháng PD-1 (2,5 mg/kg); GNTbm-02 12,5 và 25,0 mg/kg; Celecoxib-viên nang 50 mg/kg (Celebrex®). Kích thước khối u ở chuột mang khối u CT26 tăng lên khoảng 150-200 mm³ vào ngày thứ 8. Tổng thể tích khối u và số lần thay đổi của kích thước khối u được thể hiện trên Fig. 13a và b. Kết quả chỉ ra rằng phác đồ kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) cộng với GNTbm-02 (12,5 mg/kg) kết hợp với celecoxib (50 mg/kg) có tác dụng ức chế sự phát triển khối u đáng kể hơn so với phác đồ kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) cộng với GNTbm-02 (25,0 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) hoặc phác đồ GNTbm-02 25 mg/kg cộng với Celecoxib 50 mg/kg khi không có kháng thể kháng PD-1. Vì vậy, tác dụng ức chế sự phát triển của khối u là kháng thể kháng PD-1 cộng với GNTbm-02 (12,5 mg/kg) kết hợp với phác đồ Celecoxib > kháng thể kháng PD-1 cộng với GNTbm-02 (25,0 mg/kg) kết hợp với phác đồ Celecoxib > GNTbm-02 (25,0 mg/kg) kết hợp với phác đồ Celecoxib > kháng thể kháng PD-1 > phác đồ kháng IgG. Tuy nhiên, kết quả cũng chỉ ra rằng GNTbm-02 kết hợp với Celecoxib có tác dụng ức chế hữu hiệu để ngăn chặn sự phát triển của khối u. Trước đây, nghiên cứu của chúng tôi đã chứng minh rằng chất ức chế HDAC kết hợp với chất ức chế COX-2 điều hòa đáng kể TME và do đó cải thiện hiệu quả ức chế sự phát triển của khối u và tốc độ đáp ứng miễn dịch. Những kết quả này đã chứng minh rằng GNTbm-02 là chất điều biến miễn dịch biểu sinh mới và hữu hiệu. Thể tích khối u riêng lẻ được phân tích như được thể hiện trên Fig. 13c. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định Đáp ứng hoàn toàn (CR, $\leq 0,5$ lần sự phát triển khối u ở chuột mang khối u vào ba ngày sau khi kết thúc điều trị); Đáp ứng một phần (PR, kích thước khối u $>0,5$ lần sự phát triển khối u, nhưng ≤ 2 lần sự phát triển khối u ở chuột mang khối u vào ba ngày sau khi kết thúc điều trị); Bệnh ổn định (SD, từ hai đến năm lần sự phát triển khối u ở chuột mang khối u vào ba ngày sau khi kết thúc điều trị); Bệnh tiến triển (PD, bằng hoặc lớn hơn năm lần sự phát triển của khối u ở chuột mang khối u vào ba ngày sau khi kết thúc điều trị) để đánh giá hiệu quả điều trị. Kết quả chỉ ra rằng nhóm kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) đạt được 5 CR, 1 PR, 3 SD và 8

PD, với ORR (tỷ lệ đáp ứng khách quan) 35,3%; nhóm kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) cộng với GNTbm-02 (25 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt 3 CR, 3 PR, 2 SD và 1 PD, với ORR 66,7%; nhóm kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) cộng với GNTbm-02 (12,5 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt được 5 CR, 2PR, 1 SD và 0 PD, với ORR 87,5%; nhóm GNTbm-02 (25 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt 2 CR, 4 PR, 2 SD và 1 PD, với ORR 66,7%. Những kết quả này cho thấy GNTbm-02 ở liều 12,5 mg/kg là liều tối ưu và GNTbm-02 có hoạt tính điều biến miễn dịch hữu hiệu. Khối lượng cơ thể của chuột mang khối u CT26 như được thể hiện trên Fig. 13d chỉ ra rằng các phác đồ này không có độc tính rõ ràng để gây giảm khối lượng cơ thể. Cuối cùng, tỷ lệ sống sót được phân tích như được thể hiện trên Fig. 13e. Chuột mang khối u CT26 được làm chết êm ái khi thể tích khối u đạt 3000 mm³ sau khi cấy ghép khối u. Kết quả cho thấy nhóm kháng thể kháng PD-1 đạt tỷ lệ sống sót 30%; nhóm kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) cộng với GNTbm-02 (25 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt tỷ lệ sống sót tỷ lệ sống 33%; nhóm GNTbm-02 (25 mg/kg) kết hợp Celecoxib (50 mg/kg) đạt tỷ lệ sống sót 56%; nhóm kháng thể anti-PD-1 (2,5 mg/kg) cộng với GNTbm-02 (12,5 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt tỷ lệ sống sót 63%. Kết hợp lại với nhau, những dữ liệu này gợi ý rằng GNTbm-02 cộng với Celecoxib hoặc GNTbm-02 cộng với Celecoxib kết hợp với kháng thể kháng PD-1 đã cải thiện đáng kể ORR và tỷ lệ sống sót so với một mình kháng thể kháng PD-1. Dữ liệu của chúng tôi cũng chứng minh rằng GNTbm-02 ở liều 12,5 mg/kg cho hiệu quả tốt hơn so với liều 25,0 mg/kg trong phác đồ kết hợp kháng thể kháng PD-1 cộng với GNTbm-02 kết hợp với Celecoxib. Tiếp theo, chúng tôi quan tâm đến việc đánh giá sự điều hòa các hoạt tính của vi môi trường khối u bằng cách sử dụng các hợp chất tổng hợp mới như GNTbm-02, GNTbm-03, GNTbm-04, GNTbm-06 và Chidamide làm đối chứng dương. Thở phân tán rắn của Chidamide được điều chế bằng cách phủ lên PVP-K30 được sử dụng để cải thiện khả năng hòa tan trong nước của Chidamide-API, mà cuối cùng sẽ cải thiện profin PK (dược động học). Do đó, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật điều chế phổ biến trong lĩnh vực này để tạo ra các thể phân tán rắn của các hợp chất thử nghiệm như GNTbm-02, GNTbm-03, GNTbm-04, GNTbm-06, và Chidamide làm đối chứng dương tính. Tất cả các hợp chất thử nghiệm được phủ lên PVP-K30 để điều chế các thể phân tán rắn có tên GNTbm-02/k30, GNTbm-03/k30, GNTbm-04/k30, GNTbm-

06/k30, và Chidamide/k30. Nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng Chidamide/k-30 kết hợp với Regorafenib có hoạt tính chống ung thư rất hữu hiệu thông qua cơ chế điều biến miễn dịch ở chuột mang khối u CT-26. Hoạt tính chống ung thư của GNTbm-02/k-30 kết hợp với Regorafenib được nghiên cứu thêm để xác nhận hiệu lực của nó ở chuột mang khối u CT26. Chúng tôi đã xác định tiêu chuẩn nghiêm ngặt hơn về CR ($\leq 0,5$ lần sự phát triển khối u ở chuột mang khối u vào ba ngày sau khi kết thúc điều trị); PR (kích thước khối u $>0,5$ lần sự phát triển khối u, nhưng ≤ 1 lần sự phát triển khối u ở chuột mang khối u vào ba ngày sau khi kết thúc điều trị); SD (từ một đến năm lần sự phát triển khối u ở chuột mang khối u vào ba ngày sau khi kết thúc điều trị); PD (bằng hoặc lớn hơn năm lần sự phát triển của khối u ở chuột mang khối u vào ba ngày sau khi kết thúc điều trị) để đánh giá hiệu quả điều trị. Như được thể hiện từ Fig. 14(f) đến Fig. 14(i), GNTbm-02/k-30 kết hợp với Regorafenib so với Chidamide/k-30 kết hợp với Regorafenib được đánh giá. Kết quả đã chứng minh rằng GNTbm-02/k-30 (50 mg/kg) kết hợp với Regorafenib (30 mg/kg) có khả năng ức chế hữu hiệu sự phát triển của khối u, nhưng yếu hơn so với Chidamide/k-30 kết hợp với Regorafenib (ORR: 10% so với 30%). Tuy nhiên, GNTbm-03/k-30 như được thể hiện trên Fig. 14(i) đến Fig. (m) đã chứng minh rằng GNTbm-03/k-30 kết hợp với Regorafenib có hoạt tính chống ung thư tương tự khi so với Chidamide/k-30 kết hợp với Regorafenib (ORR: 40% so với 30%). GNTbm-04/k-30 kết hợp với Regorafenib hiệu quả hơn trong việc ức chế sự phát triển của khối u so với Chidamide/k-30 kết hợp với Regorafenib như được thể hiện từ Fig. 14(n) đến Fig. 14(q) (ORR: 50% so với 30%). GNTbm-06/k-30 kết hợp với Regorafenib có hoạt tính chống ung thư tương tự so với Chidamide/k-30 kết hợp với Regorafenib như được thể hiện từ Fig.14(r) đến Fig.14(u) (ORR: 50% so với 30%). Sau 16 ngày điều trị, chúng tôi tiếp tục theo dõi kích thước khối u đến ngày thứ 60. Khi sự phát triển của khối u xuất hiện trở lại và kích thước khối u đạt ít nhất gấp 5 lần ở những con chuột có đáp ứng CR hoặc PR sau lần đánh giá khối u đầu tiên, nó được định nghĩa là tái phát/lặp lại. Như được trình bày trong Bảng 14, Chidamide/k-30 kết hợp với Regorafenib cho thấy 0% khối u tái phát, GNTbm-02/k-30 kết hợp với Regorafenib cho thấy 100% khối u tái phát, GNTbm-03/k-30 kết hợp với Regorafenib cho thấy 25% khối u tái phát, GNTbm-04/k-30 kết hợp với Regorafenib cho thấy 20% khối u tái phát, GNTbm-06/k-30 kết hợp với Regorafenib cho thấy 0% khối u tái phát. Ngoại trừ GNTbm-02/k-30 kết

hợp với nhóm Regorafenib, chỉ có 1 con chuột có PR trong nghiên cứu, kết quả cho thấy các hợp chất GNTbm kết hợp với Regorafenib có thể có hoạt tính hữu hiệu hơn trong việc kích hoạt hệ thống miễn dịch để tránh tái phát. Hơn nữa, chúng tôi cũng nghiên cứu các đặc tính điều biến miễn dịch biểu sinh trong chuỗi các hợp chất GNTbm bao gồm GNTbm-05/k-30, GNTbm-11/k-30, GNTbm-38/k-30 và GNTbm-39/k-30. Như được trình bày trong Bảng 14, so sánh hiệu quả của GNTbm-05/k-30, GNTbm-11/k-30, GNTbm-38/k-30, GNTbm-39/k-30 và Chidamide/k-30 kết hợp với Regorafenib được đánh giá. Kết quả đã chứng minh rằng nhóm Chidamide/k30 (50 mg/kg) kết hợp với Regorafenib (30 mg/kg) đạt được 2 CR, 4 PR, 4 SD và 0 PD, với ORR 60%; Nhóm GNTbm-05/k30 (50 mg/kg) kết hợp với Regorafenib (30 mg/kg) đạt 3 CR, 0 PR, 4 SD và 3 PD, với ORR 30%; Nhóm GNTbm-11/k30 (50 mg/kg) kết hợp với Regorafenib (30 mg/kg) đạt 1 CR, 1 PR, 4 SD và 4 PD, với ORR 20%; Nhóm GNTbm-38/k30 (50 mg/kg) kết hợp với Regorafenib (30 mg/kg) đạt được 8 CR, 0 PR, 2 SD và 0 PD, với ORR 80%; GNTbm-39/k30 (50 mg/kg) kết hợp với nhóm Regorafenib (30 mg/kg) đạt được 2 CR, 1 PR, 5 SD và 2 PD, với ORR 30%. Kết hợp lại với nhau, những dữ liệu động vật in vivo này đã chứng minh rằng khi so sánh tất cả các hợp chất GNTbm với Chidamide đối chứng dương tính, kết hợp với Regorafenib, GNTbm-38/k-30 cho thấy hoạt tính điều biến miễn dịch biểu sinh vượt trội đạt được ORR là 80% và không có sự kết hợp với Regorafenib, một mình GNTbm-38/k-30 đạt được ORR là 56%.

Để xác nhận các đặc tính điều biến miễn dịch biểu sinh của chuỗi hợp chất GNTbm

Liều tối ưu của GNTbm-02 kết hợp với Celecoxib (chất ức chế chọn lọc COX-2) được phân tích và xác nhận. IgG, đối chứng kháng IgG (chất dẫn, 2,5 mg/kg); PD-1, kháng thể đơn dòng kháng PD-1 (2,5 mg/kg); GNTbm-02, 5, 10, 20 và 25,0 mg/kg; Celecoxib-viên nang 50 mg/kg (Celebrex®). Kích thước khối u ở chuột mang khối u CT26 tăng lên khoảng 150-200 mm³ vào ngày thứ 8. Tổng thể tích khối u và số lần thay đổi của kích thước khối u như được thể hiện trên Fig. 14a và b cho thấy nhóm GNTbm-02 (10 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) ức chế sự phát triển của khối u mạnh hơn so với nhóm GNTbm-02 (20 mg/kg) kết hợp Celecoxib (50 mg/kg) hoặc nhóm GNTbm-02 (5 mg/kg) kết hợp Celecoxib (50 mg/kg). Kết quả này cũng đề xuất rằng GNTbm-02 kết hợp với Celecoxib theo tỷ lệ tối ưu là cần thiết để kiểm soát TME và cải

thiện tác dụng ức chế sự phát triển khối u ở mô hình chuột mang CT26. Thể tích khối u riêng lẻ và ORR như được thể hiện trên Fig. 14c chỉ ra rằng nhóm kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) đạt được 5 CR, 1 PR, 3 SD và 8 PD, với ORR (tỷ lệ đáp ứng khách quan) 35,3%; nhóm GNTbm-02 (5 mg/kg) kết hợp Celecoxib (50 mg/kg) đạt 2 CR và 1 PR, 1 SD và 5 PD, với ORR 33,3%; nhóm GNTbm-02 (10 mg/kg) kết hợp Celecoxib (50 mg/kg) đạt 2 CR, 6 PR, 0 SD và 1 PD, với ORR 88,9%; nhóm GNTbm-02 (20 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt 2 CR, 3 PR, 1 SD và 3 PD, với ORR 55,6%; nhóm GNTbm-02 (25 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt 2 CR, 4 PR, 2 SD và 1PD, với ORR 66,7%. Những dữ liệu này cho thấy rằng nhóm GNTbm-02 (10 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt được ORR tốt nhất, là kết quả của tỷ lệ tối ưu để kiểm soát TME. Kết quả này cũng được quan sát thấy trên Fig. 13, trong đó phác đồ dùng kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) cộng với GNTbm-02 (12,5 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt được ORR tốt hơn. Từ những dữ liệu này, đề xuất rằng GNTbm-02 10 mg/kg kết hợp với Celecoxib 50 mg/kg có hoạt tính hữu hiệu đối với sự điều hòa TME và do đó cải thiện tỷ lệ đáp ứng miễn dịch. Khối lượng cơ thể của chuột mang khối u CT26 như được thể hiện trên Fig. 14d chỉ ra rằng các phác đồ này không có độc tính rõ rệt để gây giảm khối lượng cơ thể. Cuối cùng, tỷ lệ sống sót được phân tích như được thể hiện trên Fig. 14e. Chuột mang khối u CT26 được làm chết êm ái khi thể tích khối u đạt 3000 mm³ sau khi cấy ghép khối u. Kết quả cho thấy nhóm kháng thể kháng PD-1 đạt tỷ lệ sống sót 30%; Nhóm GNTbm-02 (5 mg/kg) kết hợp Celecoxib (50 mg/kg) đạt tỷ lệ sống sót 22%; GNTbm-02 (10 mg/kg) kết hợp Celecoxib (50 mg/kg) đạt tỷ lệ sống sót 44%; Nhóm GNTbm-02 (20 mg/kg) kết hợp Celecoxib (50 mg/kg) đạt tỷ lệ sống sót 33%; Nhóm GNTbm-02 (25 mg/kg) kết hợp Celecoxib (50 mg/kg) đạt tỷ lệ sống sót 56%. Kết hợp lại với nhau, những dữ liệu này gợi ý rằng GNTbm-02 cộng với Celecoxib đã cải thiện đáng kể ORR và tỷ lệ sống sót so với một mình kháng thể kháng PD-1. Dữ liệu của chúng tôi cũng chứng minh rằng GNTbm-02 ở liều 10 mg/kg tốt hơn so với các liều khác khi GNTbm-02 được kết hợp với Celecoxib.

GNTbm-02 cộng với Celecoxib có hoặc không có chuỗi hợp chất GNTbm hoặc kháng PD-1 kết hợp với Regorafenib gây ra sự ghi nhớ miễn dịch rõ rệt

Sự ghi nhớ miễn dịch được tạo ra sau khi điều trị bằng các phác đồ khác nhau như được thể hiện trên Fig. 13 và 14 được nghiên cứu về tình trạng như trong Bảng 6

và 7. Những con chuột được điều trị bằng các chế độ khác nhau trong 16 ngày, sau đó việc đánh giá khối u đầu tiên được thực hiện (ngày 26). Những con chuột có CR hoặc PR đã chuyển sang giai đoạn rửa trôi trong 7 ngày (cho đến ngày 33) mà không cần điều trị thêm. Sau đó, thử thách lại được thực hiện với cùng loại tế bào ung thư (CT26; 5×10^6) được cấy ở sườn đối diện trong khoảng 7 ngày nữa (ngày 40), và sau đó thể tích khối u sẽ được xác định là đường cơ sở (1 lần). Khối u thử thách được phép phát triển trong 10 ngày (ngày thứ 50), và sau đó kích thước khối u được xác định để đánh giá sự ghi nhớ miễn dịch dưới dạng dương tính hoặc âm tính. Nếu đánh giá là âm tính thì phải đáp ứng cả 2 điều kiện: thể tích khối u trên 300 mm^3 và kích thước khối u gấp 2 lần so với đường cơ sở. Nếu sự ghi nhớ miễn dịch được tạo ra sau khi điều trị trước đó là tích cực và đặc hiệu để nhận biết các tế bào ung thư có cùng kháng nguyên, thì sự phát triển của các khối u được cấy trong quá trình thử thách lại sẽ bị ức chế và do đó, sự ghi nhớ miễn dịch được xác định là dương tính. Nếu sự ghi nhớ miễn dịch không được tạo ra hoặc không được hoạt động hoàn toàn, thì sự phát triển của các khối u được cấy trong quá trình thử thách lại sẽ không bị ức chế. Bảng quy trình đánh giá này, phác đồ GNTbm-02 cộng với Celecoxib kết hợp với hoặc không với kháng thể kháng PD-1 được nghiên cứu để trả lời liệu các phác đồ này có đặc tính tạo ra sự ghi nhớ miễn dịch hay không. Như được thể hiện trong Bảng 6, nhóm kháng thể kháng PD-1 chỉ có 2 con chuột đạt được CR, sau khi thử thách lại cho thấy sự tiến triển của khối u là 0%. Kết quả này đã chứng minh rằng những con chuột CR này đạt được 100% sự ghi nhớ miễn dịch tích cực. Phác đồ gồm nhóm GNTbm-02 (25 mg/kg) cộng với Celecoxib (50 mg/kg) kết hợp với kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) đạt 4 chuột có CR/PR, mà sau khi thử thách lại cũng cho kết quả sự tiến triển của khối u 0%. Phác đồ này cũng thể hiện 100% sự ghi nhớ miễn dịch tích cực. Phác đồ gồm nhóm GNTbm-02 (12,5 mg/kg) cộng với Celecoxib (50 mg/kg) kết hợp với kháng thể kháng PD-1 (2,5 mg/kg) thu được 7 chuột có CR/PR, mà sau khi thử thách lại thể hiện sự tiến triển của khối u 29%. Phác đồ này thể hiện 71% sự ghi nhớ miễn dịch tích cực. Phác đồ gồm nhóm GNTbm-02 (25 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt 6 chuột có CR/PR, mà sau thử thách lại thể hiện sự tiến triển khối u là 17%. Phác đồ này cũng thể hiện 83% sự ghi nhớ miễn dịch tích cực. Tuy nhiên, như được nêu trong bảng 7, phác đồ gồm nhóm GNTbm-02 (10 mg/kg) kết hợp với Celecoxib (50 mg/kg) đạt 7 chuột có CR/PR, mà sau thử thách lại thể hiện sự tiến triển

khối u là 14%. Phác đồ này thể hiện 86% sự ghi nhớ miễn dịch tích cực. Những con chuột có CR có hoạt tính ghi nhớ miễn dịch mạnh hơn so với những con chuột có PR từ những dữ liệu này. Kết hợp lại với nhau, GNTbm-02 cộng với Celecoxib kết hợp với hoặc không với ICI gây ra hoạt tính ghi nhớ miễn dịch hữu hiệu. Hiện tượng tương tự cũng được phản ánh trong các hợp chất GNTbm khác kết hợp với Regorafenib. Như được trình bày trong Bảng 14, nhóm GNTbm-02/k-30 (50 mg/kg) kết hợp với Regorafenib (30 mg/kg) đã thu được 1 con chuột có CR/PR, mà sau khi thử thách lại cũng cho thấy sự tiến triển khối u 0%; Nhóm GNTbm-03/k-30 (50 mg/kg) kết hợp với Regorafenib (30 mg/kg) đạt được 4 con chuột CR/PR, mà sau khi thử thách lại cũng cho thấy sự tiến triển của khối u là 0%; Nhóm GNTbm-04/k-30 (50 mg/kg) kết hợp với Regorafenib (30 mg/kg) đạt được 5 con chuột CR/PR, mà sau khi thử thách lại cũng cho thấy sự tiến triển của khối u là 0%; Nhóm GNTbm-06/k-30 (50 mg/kg) kết hợp với Regorafenib (30 mg/kg) đạt được 5 con chuột CR/PR, mà sau khi thử thách lại cũng cho thấy sự tiến triển của khối u là 0%. Những kết quả này chỉ ra rằng các hợp chất GNTbm kết hợp với Regorafenib có ý nghĩa quan trọng trong việc tạo ra sự ghi nhớ miễn dịch.

Hoạt tính chống khối u sau khi điều trị bằng GNTbm-02 cộng với Celecoxib thông qua tác dụng điều biến miễn dịch, dẫn đến kích hoạt CTL

Những con chuột được điều trị như được thể hiện trên Fig. 13 và 14 là những con chuột bình thường có hệ thống miễn dịch hoàn chỉnh. Phác đồ GNTbm-02 cộng với Celecoxib kết hợp với hoặc không với kháng thể kháng PD-1 đã đạt được tỷ lệ đáp ứng tổng thể (ORR) cao đáng kể ở chuột kiểu đại bình thường. Tiếp theo, điều trị bằng phác đồ GNTbm-02 cộng với Celecoxib kết hợp với hoặc không với kháng thể kháng PD-1 trong mô hình chuột trụi lông BALB/C (có chức năng tế bào T bị suy giảm) được nghiên cứu. Như được thể hiện trên Fig. 15a, những con chuột trụi lông được cấy tế bào CT26 bằng phương pháp tiêm dưới da. Sau 8 ngày, khi thể tích khối u trung bình khoảng 123,8 mm³, chuột được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm và được điều trị bằng kháng thể kháng IgG, kháng thể kháng PD-1, GNTbm-02 cộng với Celecoxib kết hợp với kháng thể kháng PD-1, và GNTbm-02 cộng với celecoxib trong 15 ngày. Như được thể hiện trên Fig. 15b và c, tất cả các nhóm điều trị này không ức chế đáng kể sự phát triển của khối u ở chuột trụi lông có chức năng tế bào T bị thiếu hụt. Những kết quả này cho thấy GNTbm-02 cộng với Celecoxib có hoạt tính hữu hiệu trong việc ức chế sự phát triển

của khối u bằng cách điều hòa sự hoạt hóa CTL (tế bào lympho T gây độc tế bào) trong TME. Như được thể hiện trên Fig. 15d, tất cả các nhóm điều trị không cho thấy sự giảm khối lượng cơ thể đáng kể. Như được thể hiện trên Fig. 15e, tất cả chuột của các nhóm điều trị được chứng minh là có hoạt tính chống ung thư thấp ở chuột trụi lông và không con nào đạt được ORR. Những kết quả này đã chứng minh rằng để đạt được sự ức chế đáng kể sự phát triển của khối u bằng phác đồ kết hợp GNTbm-02 cộng với Celecoxib kết hợp với hoặc không với kháng thể kháng PD-1, thì một hệ thống miễn dịch với các tế bào T chức năng là điều cần thiết (Fig. 13, 14 và 15). Điều này cũng chứng minh rằng GNTbm-02 cộng với Celecoxib đã ức chế sự phát triển của khối u bằng cách điều hòa sự hoạt hóa tế bào T (CTL) trong TME để tiêu diệt tế bào ung thư. Hoạt tính chống ung thư này là nhờ tác dụng điều biến miễn dịch hơn là tác dụng gây độc tế bào. Kết hợp lại với nhau, chúng tôi xác nhận rằng GNTbm-02 có hoạt tính điều biến miễn dịch biểu sinh hữu hiệu và khi được kết hợp với Celecoxib, sẽ hiệu quả hơn trong việc điều hòa TME so với một mình GNTbm-02.

Hoạt tính chống khối u của GNTbm-02 cộng với Celecoxib có liên quan đến việc giảm các tế bào ức chế miễn dịch

Việc điều trị bằng HDACi được chứng minh là làm thay đổi TME bằng cách giảm hoạt tính của tế bào Treg và tăng cường sự xâm nhập của tế bào T CD8. Để xác định liệu việc ức chế sự phát triển của khối u do điều trị bằng GNTbm-02 cộng với Celecoxib có liên quan đến đáp ứng miễn dịch tăng cường hay không, chúng tôi đã kiểm tra các quần thể tế bào bạch cầu tuần hoàn. Vào ngày điều trị cuối cùng (tức là vào ngày thứ 16 của thời gian điều trị), các mẫu máu được thu thập từ những con chuột mang khối u CT26 và được nghiên cứu bằng phân tích FACS. Chúng tôi đã quan sát thấy sự gia tăng đáng kể của tế bào lympho và giảm bạch cầu hạt trong máu tuần hoàn sau khi điều trị bằng GNTbm-02 cộng với Celecoxib (Fig. 17a và c). Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể trong các tế bào bạch cầu đơn nhân tuần hoàn (Fig. 17b). Chúng tôi cũng quan sát thấy sự gia tăng đáng kể các tế bào T CD3⁺ trong máu tuần hoàn sau khi điều trị bằng GNTbm-02 cộng với Celecoxib (Fig. 17d). Sự gia tăng vừa phải của các tế bào T CD8⁺ được quan sát sau khi điều trị bằng kháng PD-1 hoặc GNTbm-02 cộng với Celecoxib (Fig. 17f). Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể trong các tế bào T CD4⁺ tuần hoàn và Treg (Fig. 17e và g). Ngoài FoxP3⁺ Treg, có các tế bào tủy ức chế miễn

dịch khác được tuyển dụng vào TME bao gồm các đại thực bào liên quan đến khối u (TAM) và các tế bào ức chế thu được từ tủy (MDSC). Khi di chuyển các tế bào tủy chưa trưởng thành đến khối u, các tế bào này thường được mời để trở thành TAM để đáp ứng với chemokin và xytokin được giải phóng từ các tế bào ung thư. MDSC phát triển từ các tế bào tủy chưa trưởng thành và góp phần ức chế miễn dịch trong TME bằng cách ức chế hoạt tính của tế bào T chống ung thư. MDSC có mặt trong hai quần thể phụ được xác định theo kiểu hình: $\text{Ly6G}^+\text{Ly6C}^-$ bạch cầu hạt (PMN-MDSC) và $\text{Ly6C}^+\text{Ly6G}^-$ MDSC bạch cầu đơn nhân (M-MDSC). Điều trị bằng GNTbm-02 cộng với Celecoxib làm giảm nhẹ $\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+\text{Ly6C}^+$ và M-MDSC được xác định theo kiểu hình trong quá trình tuần hoàn, trong khi việc chỉ điều trị bằng kháng PD-1 dẫn đến giảm quần thể CD11b^+ (Fig. 17h, i và j). Không có sự giảm PMN-MDSC sau khi điều trị bằng GNTbm-02 cộng với Celecoxib (Fig. 17k).

Tóm lại, vì liệu pháp miễn dịch là một lĩnh vực quan trọng đầy triển vọng đối với liệu pháp chống ung thư, đặc biệt là đối với việc điều trị ung thư giai đoạn cuối, nên sáng chế được yêu cầu bảo hộ được đánh giá về các ứng dụng tiềm năng trong liệu pháp miễn dịch. Khi kết hợp với Celecoxib, GNTbm-02 được phát hiện có hoạt tính điều biến miễn dịch mạnh hơn để ức chế sự phát triển của khối u trong vi môi trường khối u (TME) khi so sánh với GNTbm-02. Hơn nữa, khi GNTbm-02 cộng với Celecoxib được sử dụng kết hợp với các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, chẳng hạn như kháng thể kháng PD-1/kháng PD-L1/kháng CTLA-4, nó được chứng minh là có hoạt tính chống ung thư mạnh hơn, tăng đáng kể tốc độ đáp ứng thông qua tác dụng hiệp đồng do sự phong bế các tín hiệu ức chế CTL (tế bào lympho T gây độc tế bào) bằng kháng thể kháng PD-1/kháng PD-L1/kháng CTLA-4 và các hoạt tính điều biến miễn dịch của GNTbm-02 cộng với Celecoxib trong TME. Dựa trên các nghiên cứu này, GNTbm-02 là một chất điều biến miễn dịch biểu sinh mới có tiềm năng lớn trong điều trị ung thư. Hơn nữa, chúng tôi quan tâm đến các hoạt tính điều biến miễn dịch của chuỗi hợp chất GNTbm. Dữ liệu của chúng tôi chứng minh rằng GNTbm-02, GNTbm-03, GNTbm-04, GNTbm-06 và GNTbm-38 rất hữu hiệu trong việc có các hoạt tính điều biến miễn dịch biểu sinh để kiểm soát TME khi kết hợp với Celecoxib hoặc Regorafenib. Những kết quả này đề xuất rằng chuỗi hợp chất GNTbm là các chất điều biến miễn dịch biểu sinh mới và mạnh mẽ.

Các bảng được đề cập ở trên được nêu dưới đây:

Bảng 1. Nghiên cứu quang phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR (400 MHz, d_6 -Axeton) đối với các hợp chất GNTbm-01, GNTbm-02 và GNTbm-03.

GNTbm-01			GNTbm-02			GNTbm-03		
Vị trí		δ_{H} (J theo Hz)	Vị trí		δ_{H} (J theo Hz)	Vị trí		δ_{H} (J theo Hz)
30	CH ₃	2,46, s	30	CH ₃	2,46, s	30	CH ₃	2,46, s
20	CH ₂	3,52, d	20	CH ₂	3,45, d	20	CH ₂	3,39, d
16	NH ₂	4,95, br	16	NH ₂	4,90, br	16	NH ₂	4,90, br
12	CH	6,39, td	12	CH	6,45, m	12	CH	6,39, td
11,22,2	CH	6,59, m	22,23	CH	6,55, m	11,22,	CH	6,56, m
3	CH	7,21, t	11	CH	6,66, dd	23	CH	7,20, m
14,28	CH	7,77, dd	28	CH	7,19 d	14,28	CH	7,77, m
5	CH	8,38, m	14	CH	7,53, dd	3, 5,	CH	8,00, m
2,6,29	CH	8,92, s	29	CH	7,76, dd	29	CH	8,46, s
25	NH	9,08, s	5	CH	8,15 d	2,6	NH	8,95, s
18	NH	9,75, s	6	CH	8,31, dd	25	NH	9,46, s
8			25	CH	8,47, d	18		
			3	CH	8,91, s	8		
			18	NH	9,66, s			
			8	NH	9,72, s			

Bảng 2. Phân tích độ tan bão hòa của GNTbm-02, GNTbm-03, GNTbm-04, và GNTbm-06

Hợp chất	Độ tan bão hòa ($\mu\text{g/mL}$)
Chidamide	BDL
GNTbm-02	$33,6 \pm 6,4$
GNTbm-03	BDL
GNTbm-04	$7,2 \pm 2,9$
GNTbm-06	BDL

*BDL: dưới giới hạn phát hiện

Bảng 3. Các giá trị IC_{50} của Entinostat, GNTbm-01, GNTbm-02 và GNTbm-03 chống lại các dòng tế bào bình thường và ung thư khác nhau.

Dòng tế bào	SK-BR-3	M10	MDA-MB-453	MDA-MB-231	SW48
Entinostat (đối chứng dương) $IC_{50} \pm SD$ (μM)	$1,94 \pm 0,1$	$4,34 \pm 0,01$	$1,82 \pm 0,024$	$13,16 \pm 1,34$	$5,21 \pm 0,37$
Chidamide (đối chứng dương) $IC_{50} \pm SD$ (μM)	$3,24 \pm 0,98$	$2,72 \pm 2,6$	$1,77 \pm 0,02$	$25,6 \pm 3,05$	$2,66 \pm 0,08$
GNTbm-01 $IC_{50} \pm SD$ (μM)	$28,5 \pm 1,85$	$24,8 \pm 1,15$	$20,9 \pm 4,44$	$49,8 \pm 4,9$	>50
GNTbm-02 $IC_{50} \pm SD$ (μM)	$2 \pm 0,015$	$4,31 \pm 0,16$	$1,69 \pm 0,008$	$13,5 \pm 1,78$	$2,51 \pm 0,11$
GNTbm-03 $IC_{50} \pm SD$ (μM)	$4,07 \pm 0,68$	$6,1 \pm 0,134$	$1,81 \pm 0,008$	$26,7 \pm 5,8$	$5,26 \pm 0,9$

IC_{50} , nồng độ gây độc tế bào bán tối đa.

SD, sai số chuẩn

$\pm$, là khoảng IC_{50} ước tính

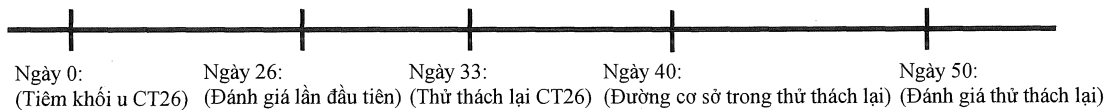
Bảng 4. Hiệu quả ức chế của Chidamide, Entinostat, GNTbm-01, GNTbm-02 và GNTbm-03 đối với các dạng tương đồng HDAC1-3 riêng lẻ.

Hợp chất	HDAC 1 IC_{50} , μM	HDAC 2 IC_{50} , μM	HDAC 3 IC_{50} , μM
Chidamide	$0,4 \pm 0,011$	$0,263 \pm 0,009$	$0,69 \pm 0,02$
Entinostat (đối chứng dương)	$0,25 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,06$	$0,98 \pm 0,19$
GNTbm-01	$6,77 \pm 0,76$	$2,68 \pm 0,2$	$2,75 \pm 0,13$
GNTbm-02	$0,52 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,06$	$0,67 \pm 0,005$
GNTbm-03	$0,56 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,06$

Bảng 5. Hiệu quả ức chế của Entinostat và GNTbm-02 đối với các dạng tương đồng HDAC1-11 riêng lẻ (không bao gồm HDAC10)

Enzym	IC ₅₀ (μM)	
	GNTbm-02	MS-275 (Entinostat, đối chứng dương)
HDAC1	0,39	0,95
HDAC2	0,91	~ 2,3
HDAC3/NCOR2	0,73	~ 4,6
HDAC4	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM
HDAC5	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM
HDAC6	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM
HDAC7	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM
HDAC8	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM	> 10 μM Ức chế 17% ở 10 μM
HDAC9	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM
HDAC11	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM	> 10 μM Không ức chế ở 10 μM

Bảng 6. Điều trị bằng GNTbm-02 cộng với Celecoxib với kháng thể kháng PD-1 gây ra sự ghi nhớ miễn dịch rõ rệt



Tình trạng	Nhóm	Ngày 40		Ngày 43		Ngày 47		Ngày 50			
	PD-1	mm ³	Số lần thay đổi	mm ³	Số lần thay đổi	mm ³	Số lần thay đổi	mm ³	Số lần thay đổi	Điểm	Tiến triển khối u (%)
CR	31	52,06	1	48,33	0,93	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0% (0/2)
CR	37	119,26	1	85,33	0,72	47,90	0,40	0,00	0,00	-	
	PD-1+GNTbm-02(25)+celecoxib-viên nang(50)										
CR	54	52,69	1	64,24	1,22	20,58	0,39	0,00	0,00	-	0% (0/4)
CR	55	73,18	1	98,12	1,34	17,77	0,24	0,00	0,00	-	
PR	56	133,08	1	64,50	0,48	23,45	0,18	0,00	0,00	-	
CR	57	62,94	1	57,47	0,91	26,07	0,41	0,00	0,00	-	
	PD-1+GNTbm-02(12,5)+celecoxib-viên nang(50)										
CR	61	42,53	1	42,92	1,01	40,68	0,96	0,00	0,00	-	

CR	64	85,73	1	47,85	0,56	41,30	0,48	0,00	0,00	-	29% (2/7)
CR	65	109,45	1	54,55	0,50	43,41	0,40	0,00	0,00	-	
PR	66	61,73	1	135,01	2,19	118,42	1,92	492,51	7,98	+	
PR	68	101,19	1	96,71	0,96	110,46	1,09	291,76	2,88	+	
CR	69	60,28	1	22,84	0,38	22,48	0,37	58,56	0,97	-	
CR	70	79,08	1	57,91	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	-	
GNTbm-02(25)+celecoxib-viên nang(50)											
PR	74	69,04	1	34,31	0,50	29,31	0,42	0,00	0,00	-	17% (1/6)
CR	75	92,10	1	62,55	0,68	63,40	0,69	43,36	0,47	-	
PR	76	69,64	1	38,35	0,55	25,11	0,36	0,00	0,00	-	
PR	78	143,14	1	172,17	1,20	225,62	1,58	483,98	3,38	+	
CR	79	112,36	1	57,07	0,51	86,40	0,77	0,00	0,00	-	
PR	80	105,83	1	30,91	0,29	14,91	0,14	0,00	0,00	-	

+: kích thước khối u lớn hơn 300 mm³ và ≥ 2 lần (chuẩn hóa theo kích thước khối u được đo 7 ngày sau khi thử thách lại khối u)

Bảng 7. Điều trị bằng GNTbm-02 kết hợp với Celecoxib tạo ra sự ghi nhớ miễn dịch rõ rệt.

Tình trạng	Nhóm	Ngày 40		Ngày 50			
		mm ³	Số lần thay đổi	mm ³	Số lần thay đổi	Điểm	Tiến triển khối u (%)
	GNTbm-02(10)+celecoxib-viên nang(50)						
PR	21	84,12	1	32,26	0,38	-	14% (1/7)
PR	22	97,9	1	46,85	0,48	-	
PR	24	131,26	1	87,34	0,67	-	
CR	25	85,02	1	36,85	0,43	-	
PR	26	82,04	1	0	0	-	
PR	28	116,9	1	343,76	2,94	+	
CR	29	140,75	1	22,92	0,16	-	

+: kích thước khối u lớn hơn 300 mm³ và ≥ 2 lần (chuẩn hóa theo kích thước khối u được đo 7 ngày sau khi thử thách lại khối u)

Bảng 8. Các giá trị IC₅₀ của các chất ức chế HDAC dựa trên picolinamit chống lại các dòng tế bào ung thư khác nhau.

IC ₅₀ của hợp chất (μM)	Các dòng tế bào					
	NCI-N87	M10	MDA-MB-453	MDA-MB-231	SW48	SK-BR-3

Chidamide (Đối chứng dương)	3,09 ± 0,2	4,94 ± 0,87	1,36 ± 0,12	17,4 ± 1,98	5,43 ± 1,057	3,24 ± 0,98
Entinostat (Đối chứng dương)	-	4,34 ± 0,01	1,82 ± 0,02	13,16 ± 1,34	5,21 ± 0,37	1,94 ± 0,1
GNTbm-01	-	24,8 ± 1,15	20,9 ± 4,44	49,8 ± 4,9	>50	28,5 ± 1,85
GNTbm-02	4,01 ± 0,49	4,31 ± 0,16	1,69 ± 0,01	13,5 ± 1,78	2,51 ± 0,11	2 ± 0,02
GNTbm-04	0,34 ± 0,04	1,81 ± 0,06	1,59 ± 0,003	1,64 ± 0,004	0,6 ± 0,09	-
GNTbm-05	0,28± 0,01	0,43 ± 0,03	1,58 ± 0,003	1,66 ± 0,02	1,64 ± 0,02	-
GNTbm-06	2,2 ± 0,03	1,95 ± 0,03	1,59 ± 0,01	3,87 ± 0,7	2,32 ± 0,08	-
GNTbm-08	15,5 ± 1,7	20,8 ± 0,14	3,78 ± 0,5	>50	18,44 ± 1,0	-
GNTbm-11	1,87 ± 0,04	1,65 ± 0,2	2,28 ± 0,06	1,71 ± 0,04	2,6 ± 0,45	-
GNTbm-12	>50	38,48 ± 5,9	15,8 ± 3,9	>50	>50	-
GNTbm-19	4,3 ± 1,4	2,89 ± 0,12	1,81 ± 0,02	5,69 ± 1,7	8,73 ± 0,24	-
GNTbm-25	>50	>50	19,12 ± 2,07	>50	>50	-

IC₅₀, nồng độ gây độc tế bào bán tối đa.

SD, sai số chuẩn

IC ₅₀ của hợp chất (μM)	Các dòng tế bào					
	NCI-N87	M10	MDA-MB-453	MDA-MB-231	SW48	SK-BR-3
Chidamide (Đối chứng dương)	3,09 ± 0,2	4,94 ± 0,87	1,36 ± 0,12	17,4 ± 1,98	5,43 ± 1,06	3,24 ± 0,98
Entinostat (Đối chứng dương)	-	4,34 ± 0,01	1,82 ± 0,024	13,16 ± 1,34	5,21 ± 0,37	1,94 ± 0,1
GNTbm-03	-	6,1 ± 0,13	1,81 ± 0,01	26,7 ± 5,8	5,26 ± 0,9	4,07 ± 0,68
GNTbm-33	1,75 ± 0,02	2,01 ± 0,09	1,94 ± 0,22	1,62 ± 0,02	1,79 ± 0,03	-
GNTbm-37	10,65 ± 0,6	8,85 ± 0,59	4,89 ± 0,34	8,07 ± 0,54	21,3 ± 1,64	-
GNTbm-38	0,42 ± 0,08	1,99 ± 0,06	1,67 ± 0,01	3,55 ± 0,45	1,64 ± 0,005	-
GNTbm-39	0,64 ± 0,03	1,96 ± 0,02	1,84 ± 0,02	2,93 ± 0,45	1,73 ± 0,01	-

±, là các khoảng IC₅₀ được ước tính

Bảng 9. Các giá trị IC₅₀ của các chất ức chế HDAC dựa trên benzamit chống lại các dòng tế bào ung thư khác nhau.

IC₅₀, nồng độ gây độc tế bào bán tối đa.

SD, sai số chuẩn

±, là các khoảng IC₅₀ được ước tính

Bảng 10. Tác dụng ức chế của các hợp chất dựa trên picolinamit đối với các dạng tương đồng HDAC1-3 riêng lẻ.

Compounds IC₅₀ (μM)	HDAC 1	HDAC 2	HDAC 3
Chidamide (Đối chứng dương)	0,14 ± 0,004	0,22 ± 0,04	0,62 ± 0,06
Entinostat (Đối chứng dương)	0,25 ± 0,05	0,21 ± 0,06	0,98 ± 0,19
GNTbm-01	6,77 ± 0,76	2,68 ± 0,2	2,75 ± 0,13
GNTbm-02	0,52 ± 0,02	0,55 ± 0,06	0,67 ± 0,005
GNTbm-04	0,38 ± 0,04	0,54 ± 0,007	0,20 ± 0,1
GNTbm-05	0,14 ± 0,002	0,36 ± 0,02	0,001 ± 0,00004
GNTbm-06	0,1 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,009 ± 0,01
GNTbm-08	0,37 ± 0,31	1,54 ± 0,28	0,001 ± 0,00002
GNTbm-11	>20	>20	0,001
GNTbm-12	>20	>20	>20
GNTbm-19	0,48 ± 0,03	1,42 ± 0,19	2,98 ± 0,08
GNTbm-25	>20	>20	>20

Bảng 11. Tác dụng ức chế của các hợp chất dựa trên benzamit đối với các dạng tương đồng HDAC1-3 riêng lẻ.

IC₅₀ của hợp chất (μM)	HDAC 1	HDAC 2	HDAC 3
Chidamide (Đối chứng dương)	0,14 ± 0,004	0,22 ± 0,037	0,62 ± 0,056
Entinostat (Đối chứng dương)	0,25 ± 0,05	0,21 ± 0,06	0,98 ± 0,19
GNTbm-03	0,56 ± 0,04	0,51 ± 0,05	0,67 ± 0,06

GNTbm-33	>20	>20	>20
GNTbm-37	9,04 ± 0,6	3,15 ± 0,31	1,74 ± 0,29
GNTbm-38	0,69 ± 0,03	0,28 ± 0,01	1,2 ± 0,01
GNTbm-39	3,7 ± 0,04	0,68 ± 0,03	0,89 ± 0,13

Bảng 12. Sự kìm hãm chu kỳ tế bào do chuỗi hợp chất GNTbm gây ra trong pha G0/G1 hoặc G2/M trong các tế bào SW48.

Các hợp chất	Liều điều trị (μ M)	Phần trăm phân bố chu kỳ tế bào (%)		
		G0/G1	S	G2/M
Chidamide (Đối chứng dương)	0	64,7	17,9	17,4
	0,3125	65,7	17,6	16,7
	0,625	68,1	14,4	17,5
	1,25	70,6	14,1	15,3
	2,5	76,5	10,8	12,7
	5	79,9	8,5	11,6
GNTbm-04	0	59,5	14,7	25,8
	0,125	56,9	17,9	25,2
	0,25	57,9	18,2	23,9
	0,5	63,2	17,5	19,3
	1	67,2	13,9	18,9
	2	70,5	10,8	18,7
GNTbm-05	0	61,6	17,2	21,2
	0,125	61,5	19,8	18,7
	0,25	57,8	19,3	22,9
	0,5	59,2	18,6	22,2
	1	55,4	12,8	31,8
	2	53,6	11,8	34,6
GNTbm-38	0	64,7	17,9	17,4
	0,125	63,3	19,3	17,4

	0,25	62,4	15,7	21,9
	0,5	61,8	10,4	27,8
	1	57,7	12,5	29,8
	2	53,9	13,6	32,5
GNTbm-39	0	64,7	17,9	17,4
	0,125	57,2	20,5	22,3
	0,25	57,8	17,7	24,5
	0,5	58,8	16,5	24,7
	1	46,5	20,7	32,8
	2	42,3	18,8	38,9

Bảng 13. Sự chết tế bào theo chương trình do chuỗi hợp chất GNTbm gây ra trong các tế bào SW48.

Các hợp chất	Liều điều trị (μM)	Phần trăm chết tế bào theo chương trình của tế bào (%)
Chidamide (Đối chứng dương)	0	3,2
	0,3125	9,0
	0,625	10,2
	1,25	15,1
	2,5	21,2
	5	35,4
GNTbm-04	0	2,6
	0,125	2,9
	0,25	4,4
	0,5	10,8
	1	20,8
	2	32
GNTbm-05	0	7,9
	0,125	9,0

	0,25	14,4
	0,5	17,9
	1	27,2
	2	42,4
GNTbm-38	0	3,2
	0,125	8,5
	0,25	9,1
	0,5	18,3
	1	24,4
	2	37,3
GNTbm-39	0	3,2
	0,125	9,5
	0,25	10,8
	0,5	17,8
	1	25,4
	2	37,8

Bảng 14. Hiệu quả của chuỗi hợp chất GNTbm kết hợp với chất ức chế tyrosin kinaza Regorafenib trong mô hình chuột mang khối u CT26.

Phác đồ làm ví dụ	Thể tích khối u ban đầu (mm ³)	ORR (%)	PD	SD	PR	CR	ORR (%)&	PD&	SD&	PR&	CR&	Tỷ lệ sống sót (%)	Tái phát* (lặp lại)	Tính sinh miễn dịch [#] (thử thách lại)
Ví dụ 1	245													
Chất dẫn		0%	7	1	0	0	0%	8	0	0	0	0%	-	-
Regorafenib		11%	1	7	0	1	22%	5	2	0	2	11%	0% (0/1)	100% (1/1)
Chidamide/k-30		11%	7	1	1	0	0%	7	2	0	0	0%	100% (1/1)	-
Chidamide/k-30 kết hợp với Regorafenib		30%	0	7	1	2	40%	2	4	0	4	40%	0% (0/3)	100% (3/3)
GNTbm-02/k-30		0%	8	1	0	0	0%	9	0	0	0	0%	0% (0/0)	-

GNTbm-02/k-30 kết hợp với Regorafenib	10%	1	8	1	0	10%	6	3	1	0	10%	100% (1/1)	100% (1/1)
GNTbm-03/k-30	0%	9	0	0	0	0%	9	0	0	0	0%	0% (0/0)	-
GNTbm-03/k-30 kết hợp với Regorafenib	40%	1	5	1	3	30%	5	2	0	3	30%	25% (1/4)	100% (3/3)
GNTbm-04/k-30	10%	8	1	0	1	10%	9	0	0	1	10%	0% (0/1)	100% (1/1)
GNTbm-04/k-30 kết hợp với Regorafenib	50%	1	4	1	4	40%	4	2	0	4	40%	20% (1/5)	100% (4/4)
GNTbm-06/k-30	0%	8	2	0	0	0%	10	0	0	0	0%	0% (0/0)	-
GNTbm-06/k-30 kết hợp với Regorafenib	50%	2	3	1	4	50%	5	0	0	5	50%	0% (0/5)	100% (5/5)
Ví dụ 2													
Chất dẫn	0%	8	1	0	0	0%	9	0	0	0	-	-	-
Regorafenib	0%	8	1	0	0	0%	9	0	0	0	-	-	-
Chidamide/k-30	44%	4	1	1	3	33%	5	1	0	3	-	-	-
Chidamide/k-30 kết hợp với Regorafenib	60%	0	4	4	2	60%	1	3	0	6	-	-	-
GNTbm-05/k-30	0%	8	1	0	0	0%	8	1	0	0	-	-	-
GNTbm-05/k-30 kết hợp với Regorafenib	30%	3	4	0	3	20%	7	1	0	2	-	-	-
GNTbm-11/k-30	11%	7	1	0	1	0%	8	1	0	0	-	-	-
GNTbm-11/k-30 kết hợp với Regorafenib	20%	4	4	1	1	20%	7	1	1	1	-	-	-
GNTbm-38/k-30	56%	3	1	0	5	56%	4	0	0	5	-	-	-
GNTbm-38/k-30 kết hợp với Regorafenib	80%	0	2	0	8	100%	0	0	1	9	-	-	-
GNTbm-39/k-30	0%	7	2	0	0	0%	9	0	0	0	-	-	-
GNTbm-39/k-30 kết hợp với Regorafenib	30%	2	5	1	2	30%	4	3	1	2	-	-	-

192

*: Sự tái phát/lặp lại được xác định khi có sự phát triển khối u ít nhất 5 lần đối với chuột có đáp ứng CR hoặc PR sau đánh giá khối u lần đầu tiên.

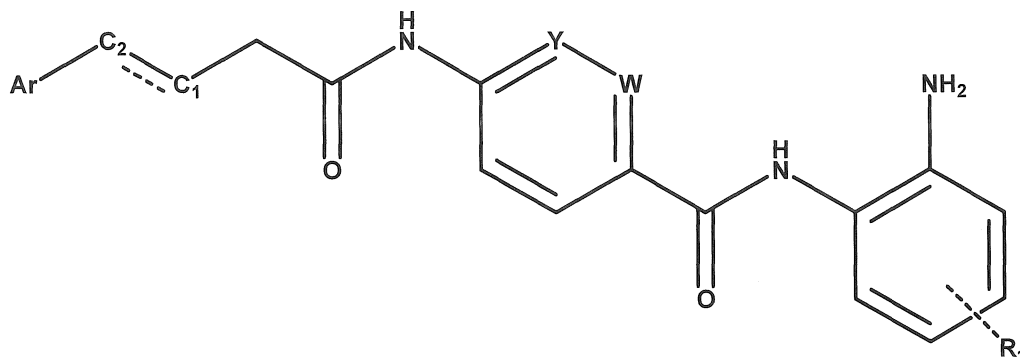
#: chuột kháng với sự thử thách lại CT26.

&: đánh giá khối u lần thứ hai vào ngày 40

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế nên hiểu rằng các thay đổi và cải biến có thể được thực hiện đối với việc đề xuất và phân mô tả của sáng chế mà không nằm ngoài tinh thần và phạm vi của đơn này. Dựa trên các nội dung trên, đơn này dự định bao gồm các biến đổi và cải biến bất kỳ của chúng với điều kiện là các biến đổi hoặc cải biến đó nằm trong phạm vi như được xác định trong các yêu cầu bảo hộ đi kèm hoặc dạng tương đương của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I):

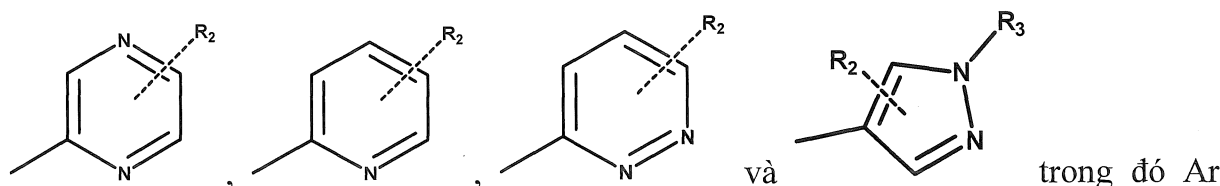


trong đó W và Y mỗi nhóm độc lập được chọn từ CH và N;

mỗi nhóm R₁ độc lập được chọn từ hydro, halogen, C₁-C₃ alkyl và C₁-C₃ alkyl được halogen hóa, và có thể là sự thế một lần, hai lần, ba lần hoặc bốn lần;

C₁ và C₂ là các nguyên tử C được liên kết bằng liên kết đôi;

Ar được chọn từ nhóm gồm các công thức sau đây:



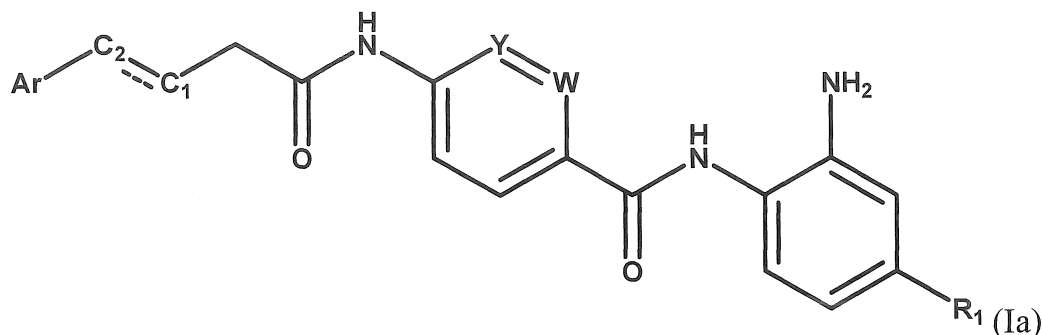
được liên kết với C₂ qua đường nét liền;

R₂ có cùng nghĩa như được mô tả đối với R₁; và

R₃ là hydro hoặc C₁-C₃ alkyl;

hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể hoặc solvat của chúng.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức (Ia):



trong đó W, Y, R₁, C₁, C₂ và Ar có cùng nghĩa như được mô tả trong công thức (I); hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể hoặc solvat của chúng.

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể hoặc solvat của chúng, trong đó Ar được chọn từ các vòng sáu cạnh, và R₂ và nguyên tử của Ar được liên kết với C₂ nằm ở vị trí para.

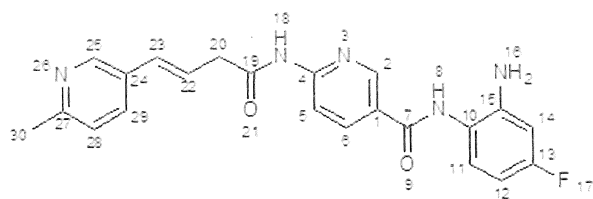
4. Hợp chất theo điểm 1 hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể hoặc solvat của chúng, trong đó W và Y được chọn từ các tổ hợp sau: (1) W là N và Y là CH, (2) W là CH và Y là N, và (3) W và Y là CH.

5. Hợp chất theo điểm 1 hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể hoặc solvat của chúng, trong đó W là N và Y là CH.

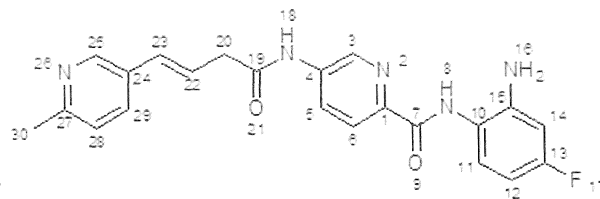
6. Hợp chất theo điểm 1 hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể hoặc solvat của chúng, trong đó R₁ là F hoặc C₁-C₃ alkyl được flo hóa.

7. Hợp chất theo điểm 1 hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể hoặc solvat của chúng, trong đó R₂ là C₁-C₃ alkyl hoặc C₁-C₃ alkyl được flo hóa.

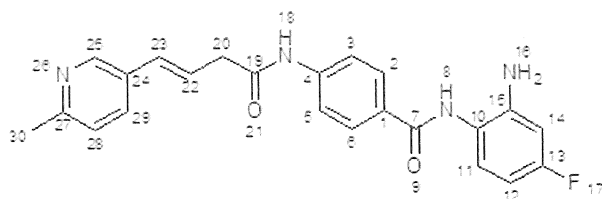
8. Hợp chất theo điểm 1 hoặc muối được dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể hoặc solvat của chúng, trong đó hợp chất này là:



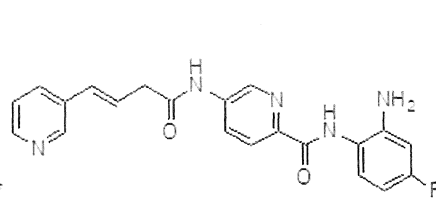
GNTbm-01;



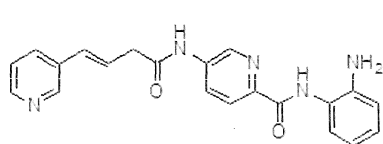
GNTbm-02;



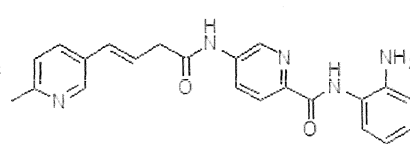
GNTbm-03;



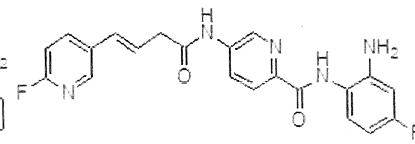
GNTbm-04;



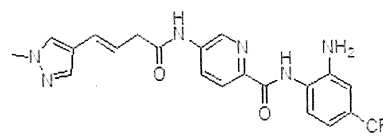
GNTbm-05;



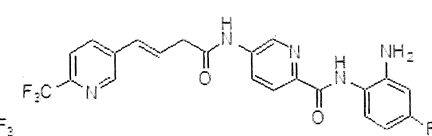
GNTbm-06;



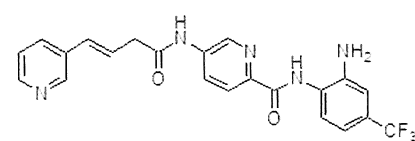
GNTbm-07;



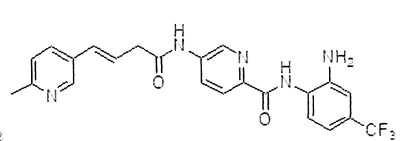
GNTbm-09;



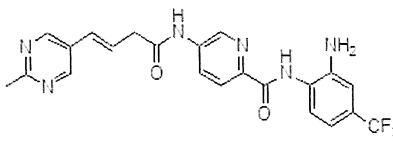
GNTbm-10;



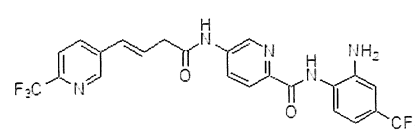
GNTbm-11;



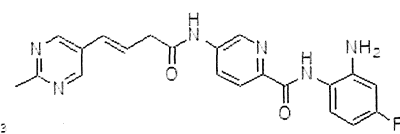
GNTbm-12;



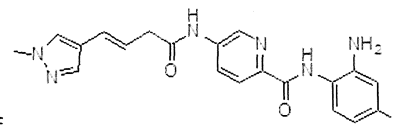
GNTbm-13;



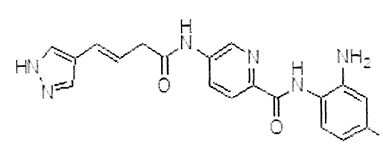
GNTbm-14;



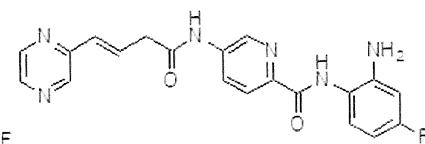
GNTbm-15;



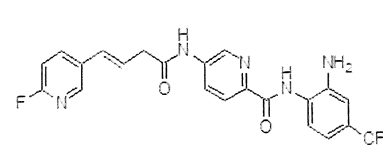
GNTbm-16;



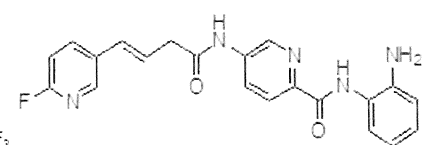
GNTbm-17;



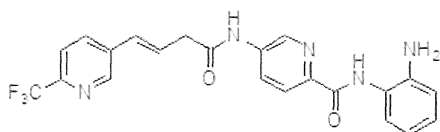
GNTbm-18;



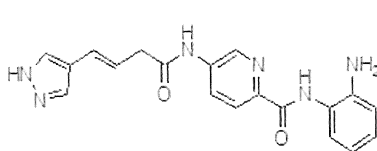
GNTbm-20;



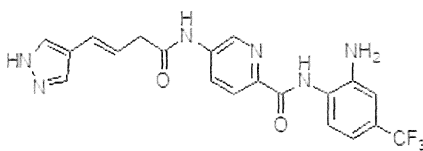
GNTbm-21;



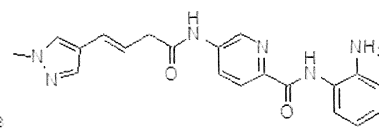
GNTbm-24;



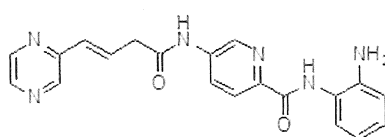
GNTbm-26;



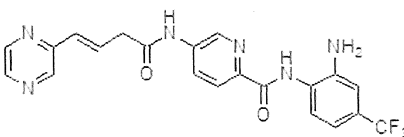
GNTbm-27;



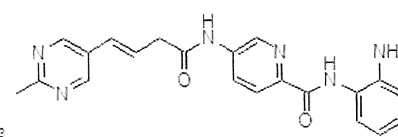
GNTbm-28;



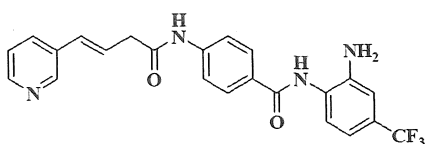
GNTbm-29;



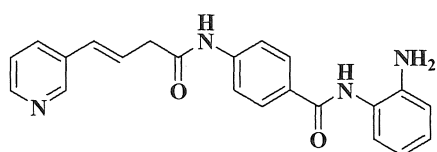
GNTbm-30;



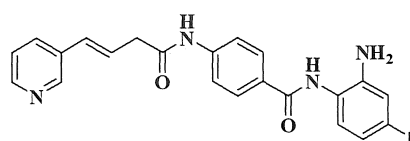
GNTbm-31;



GNTbm-33;



GNTbm-38;



hoặc GNTbm-39.

9. Dược phẩm hoặc tổ hợp dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 hoặc muối dược dụng, hydrat, chất đồng phân lập thể hoặc solvat của chúng, và chất mang dược dụng.

10. Dược phẩm hoặc tổ hợp dược phẩm theo điểm 9, còn chứa một hoặc nhiều tác nhân thứ hai.

11. Dược phẩm hoặc tổ hợp dược phẩm theo điểm 10, trong đó tác nhân thứ hai là chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, NSAID, TKI hoặc chất chống ung thư hoặc sự kết hợp của chúng.

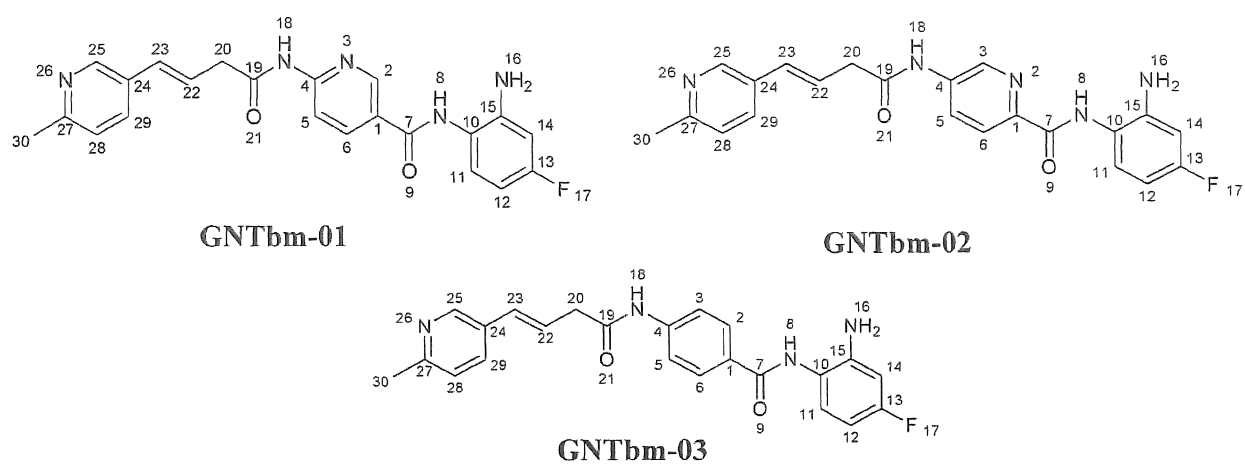


Fig. 1

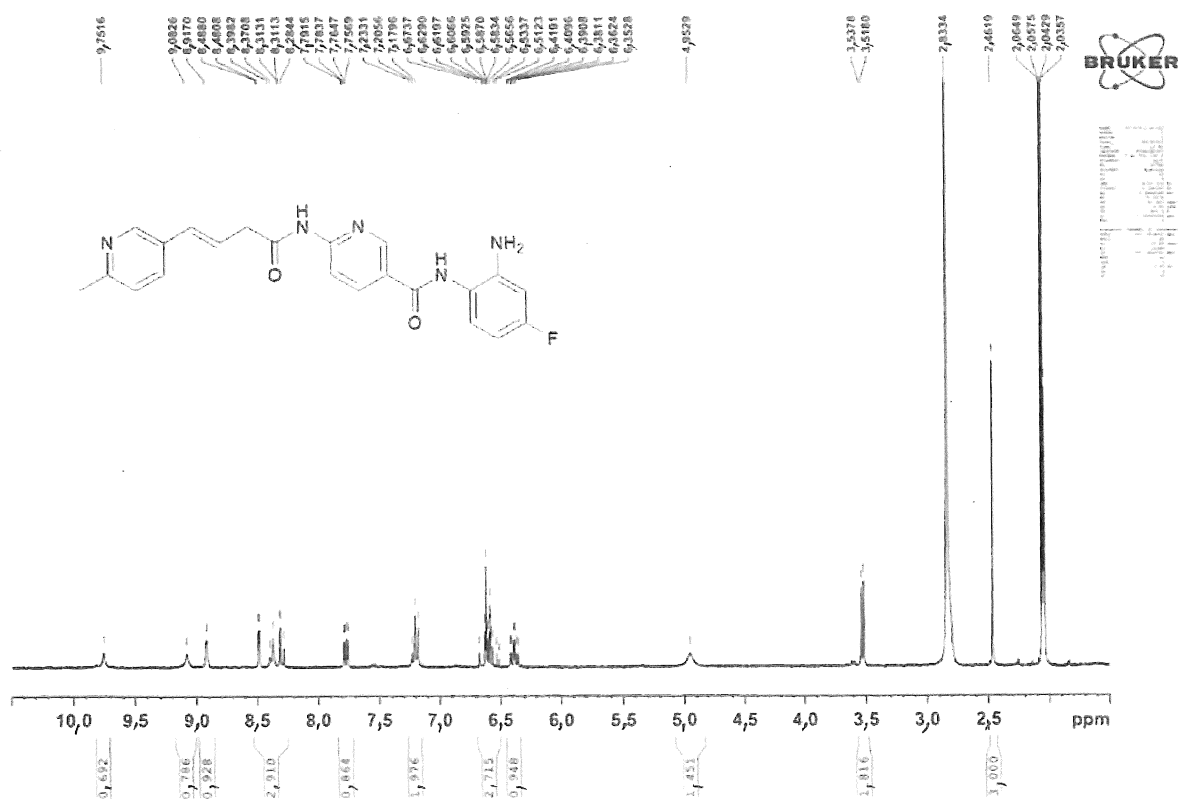


Fig. 2 (a)

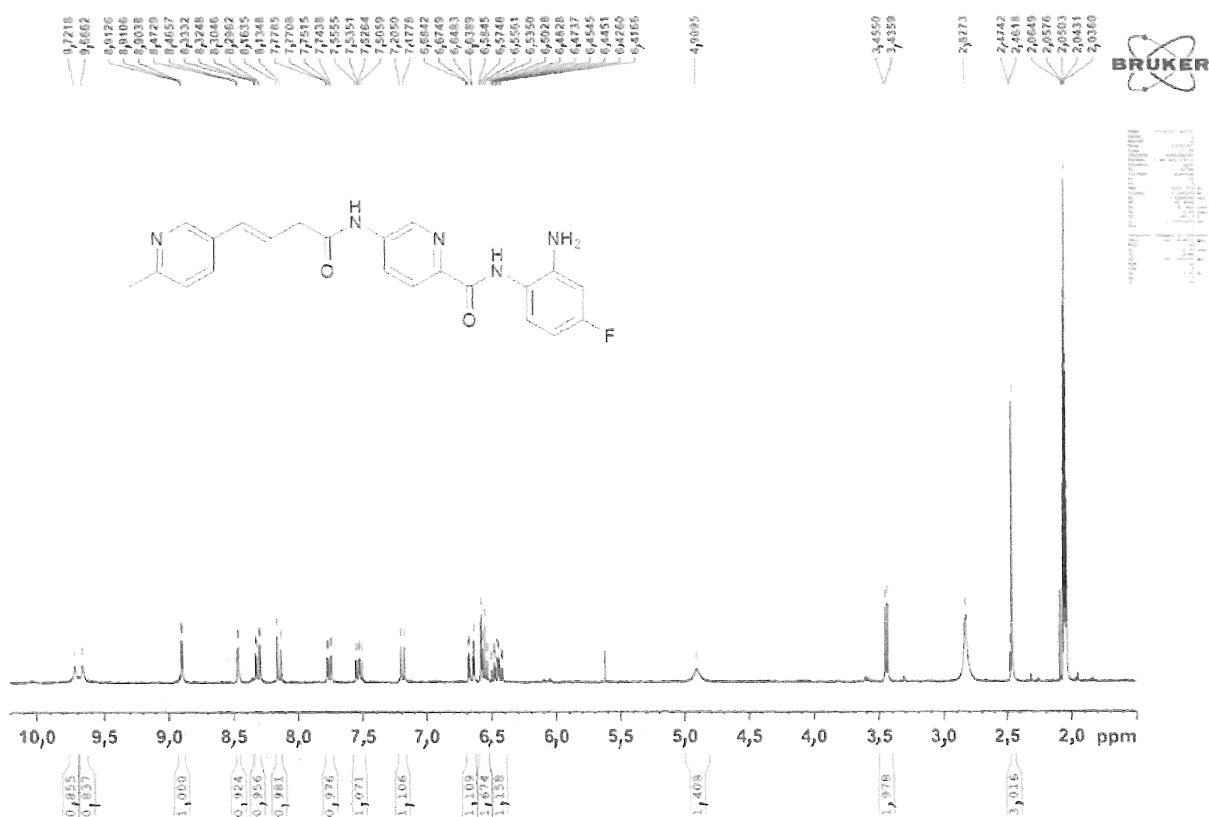


Fig. 2 (b)

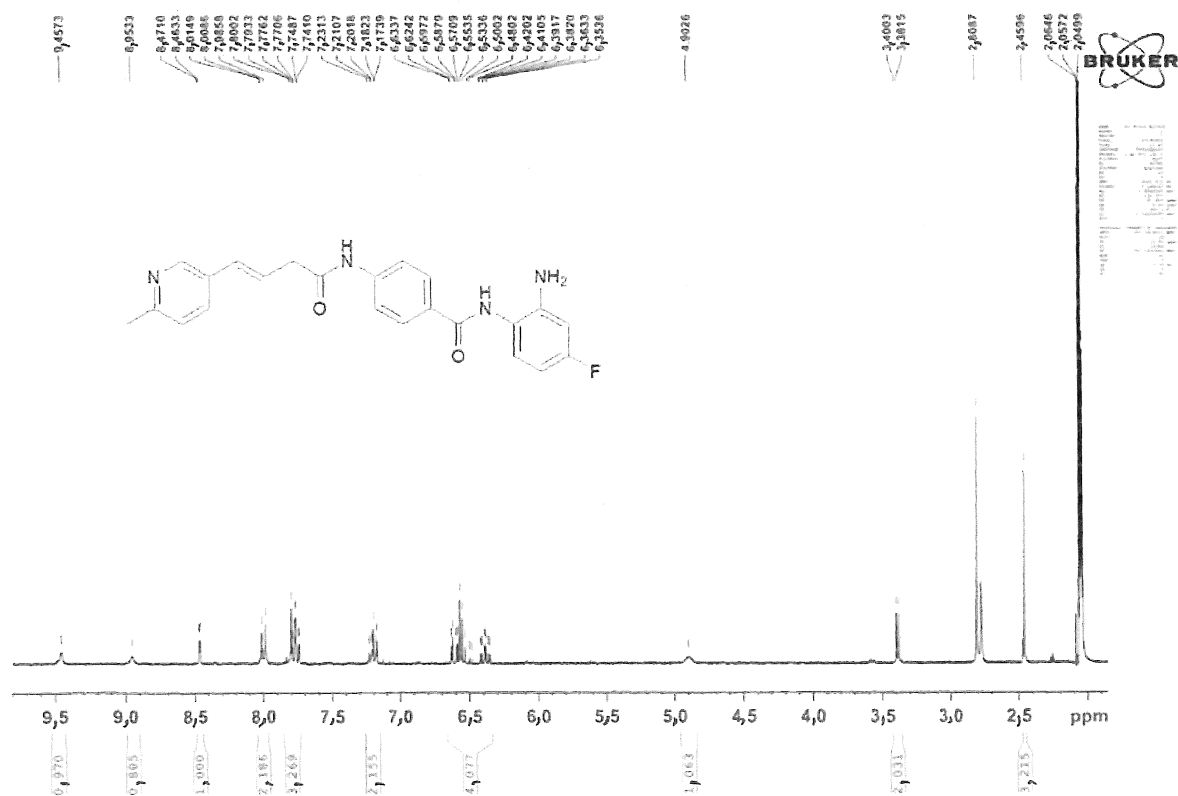


Fig. 2 (c)

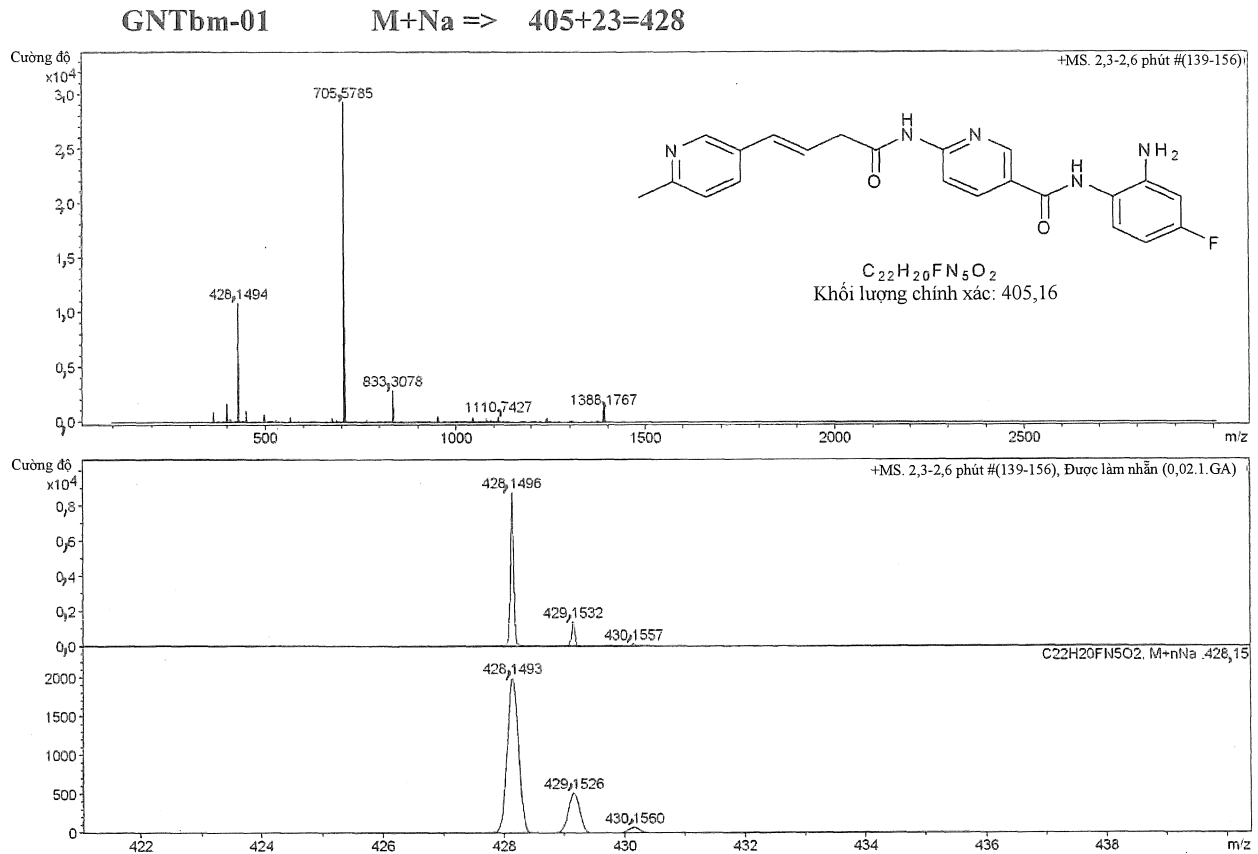


Fig. 2 (d)

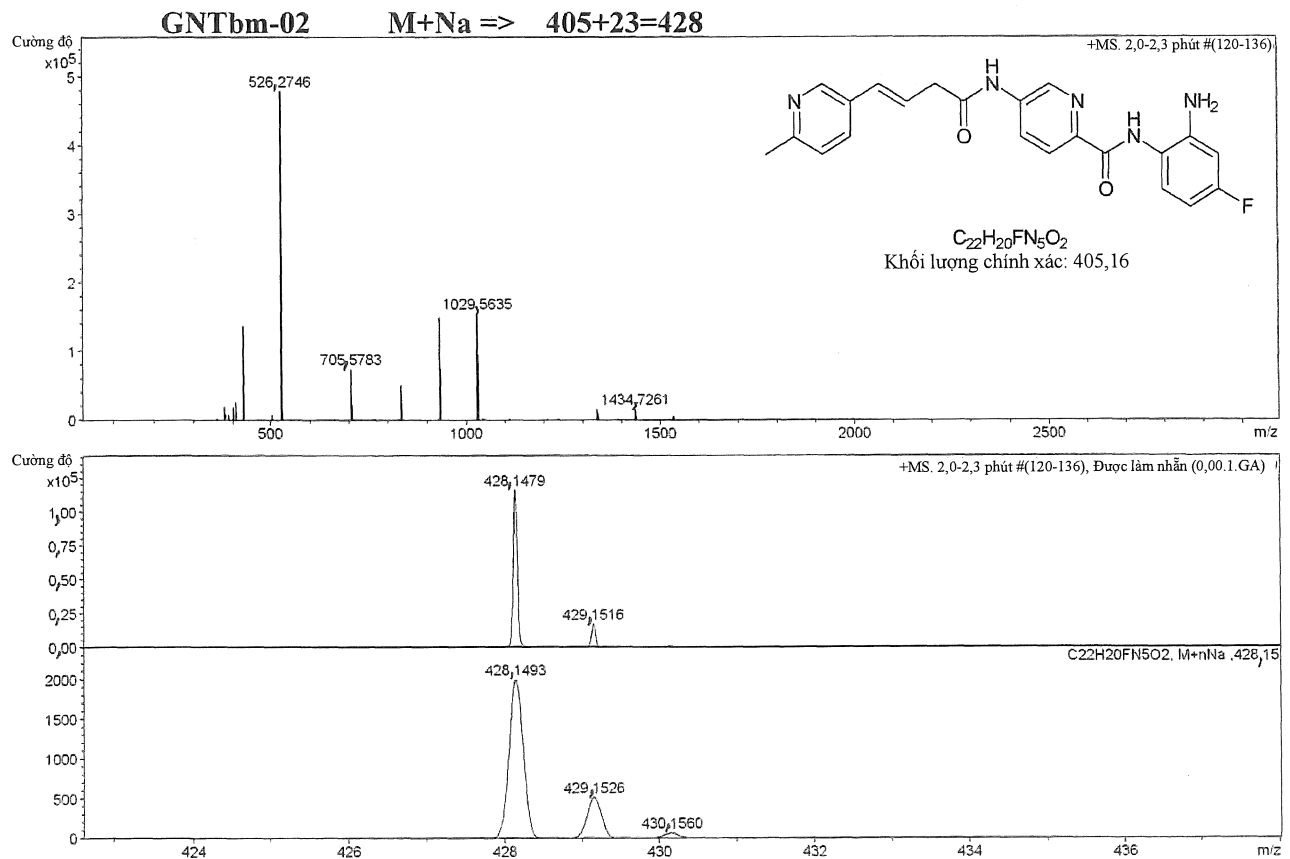


Fig. 2 (e)

GNTbm-03 M+H => 404+1=405

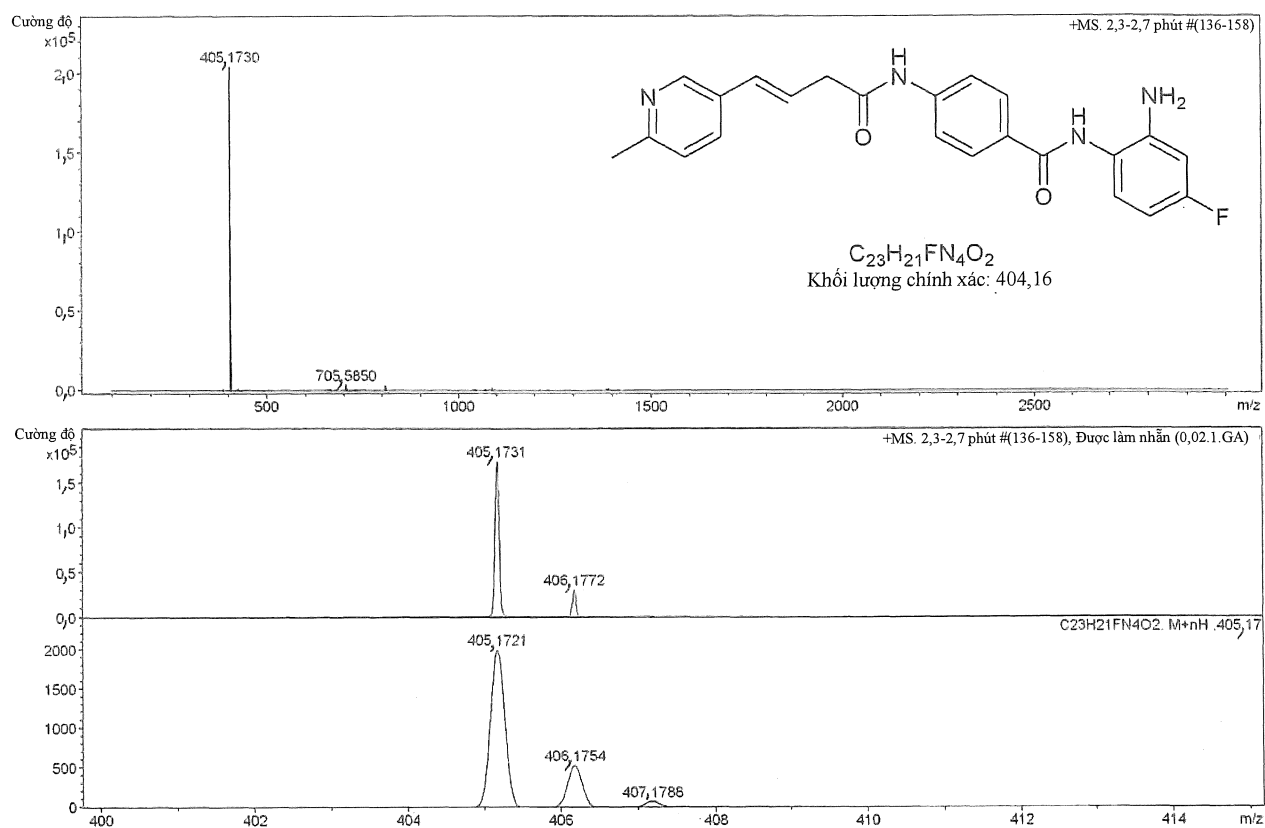


Fig. 2 (f)

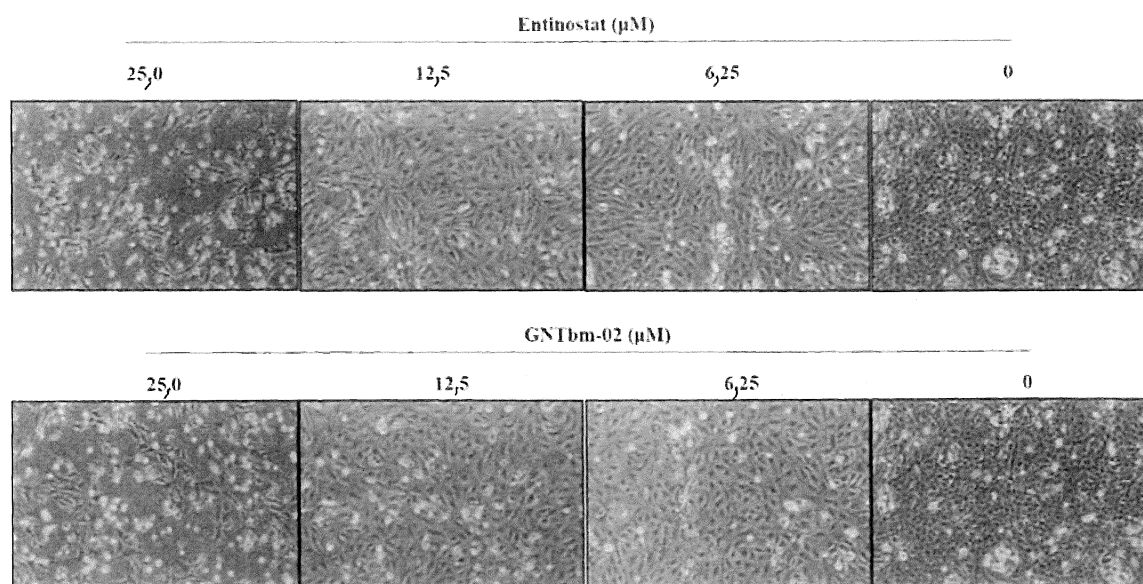


Fig. 3 (a)

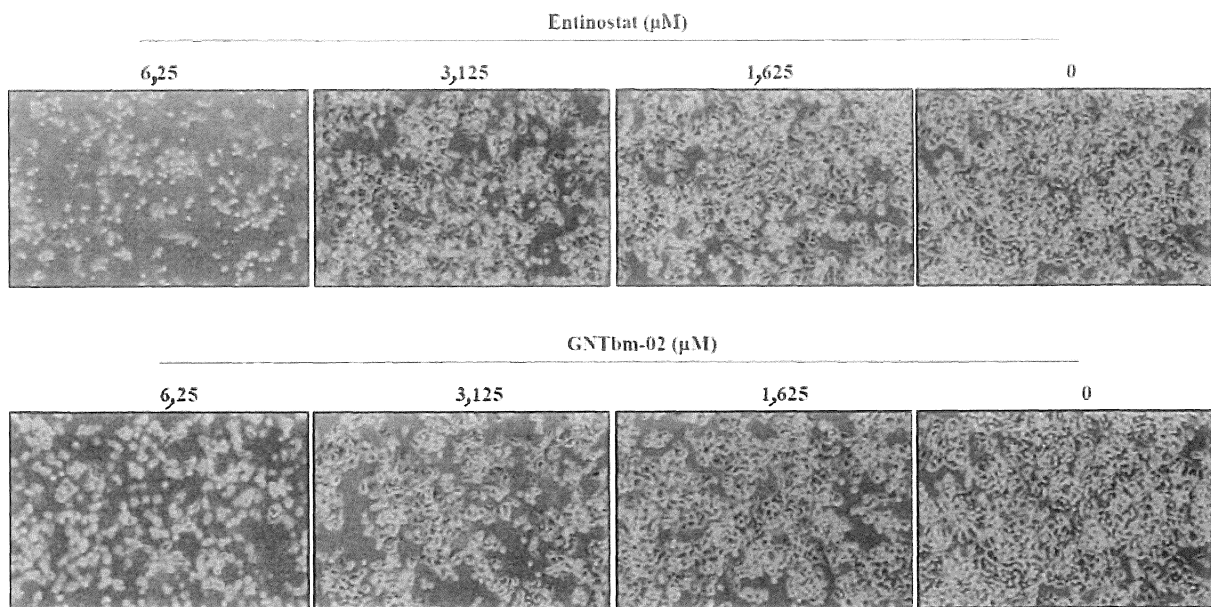


Fig. 3 (b)

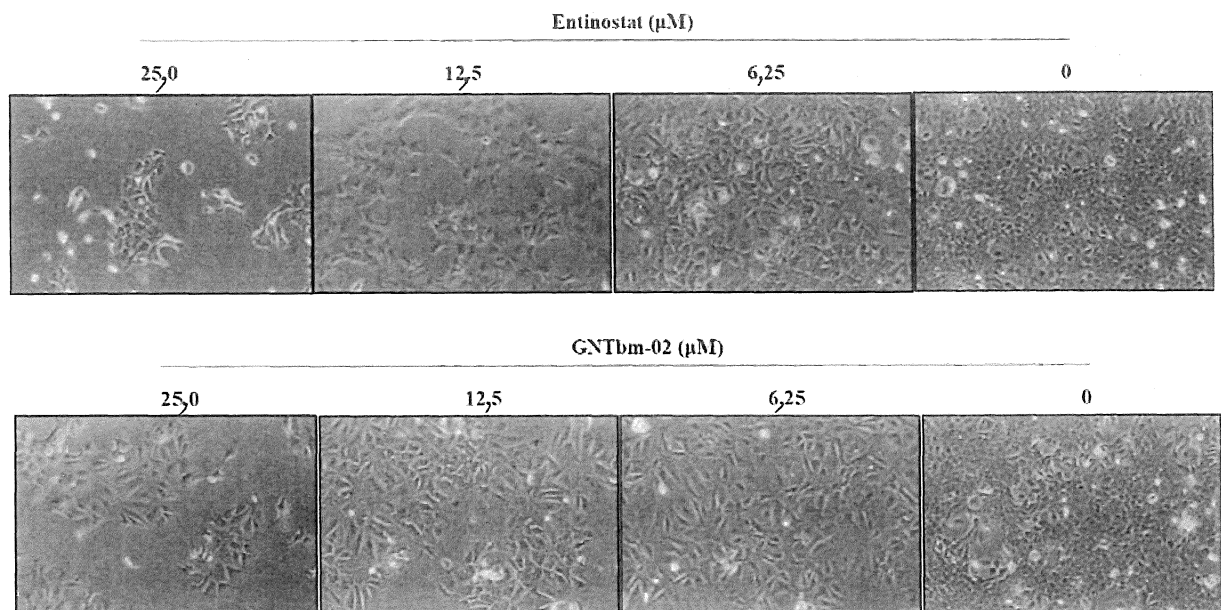
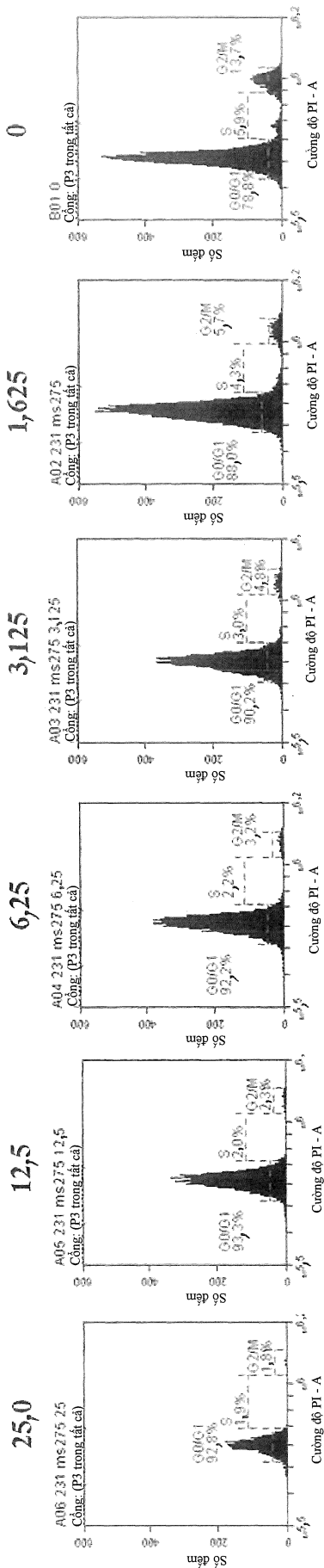


Fig. 3 (c)

Entinostat (μM)



GNTbm-02 (μM)

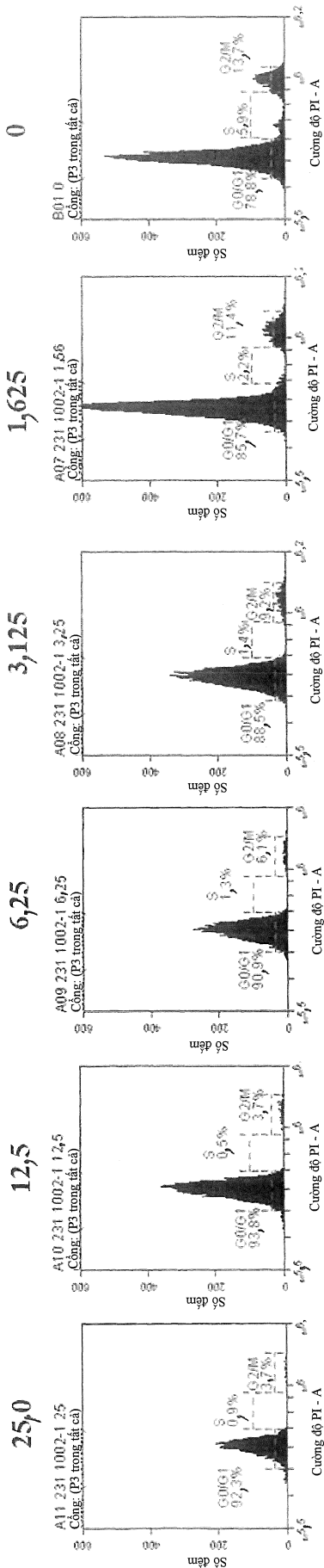


Fig. 4 (a)

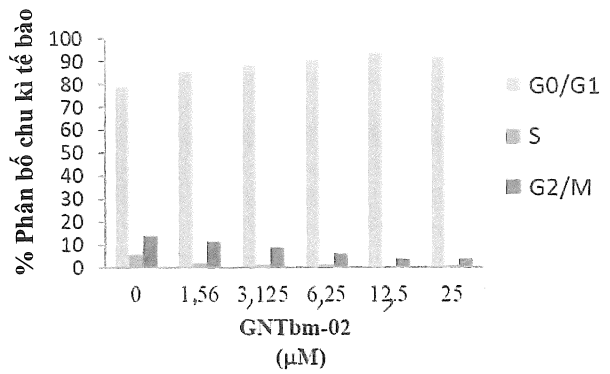
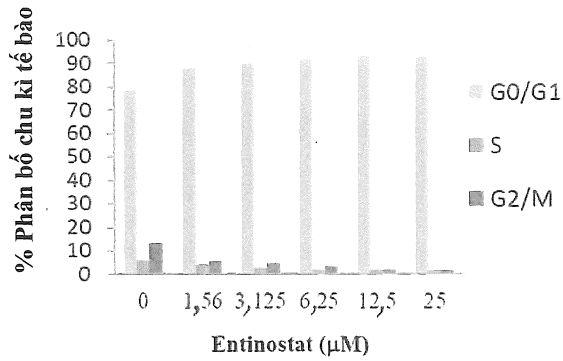


Fig. 4 (b)

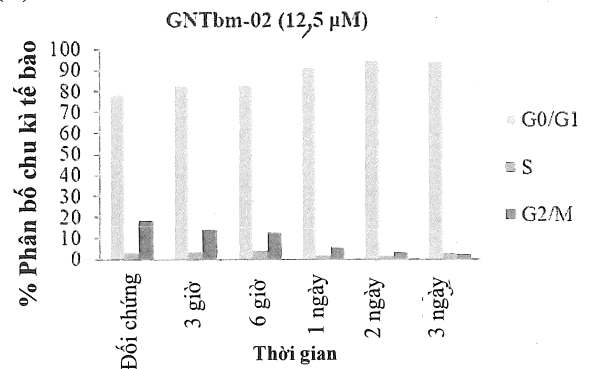
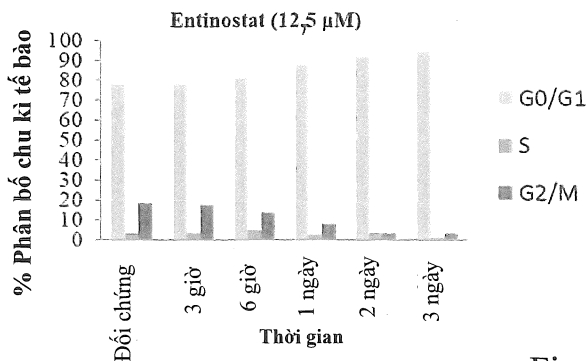


Fig. 4 (d)

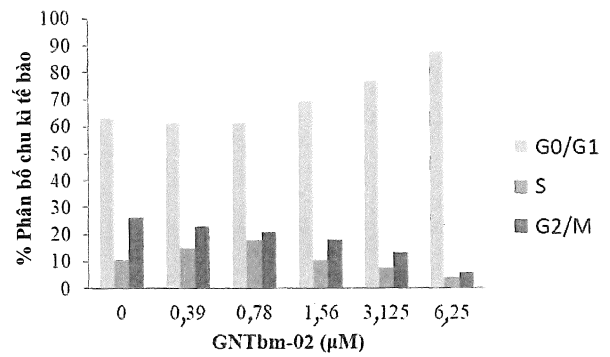
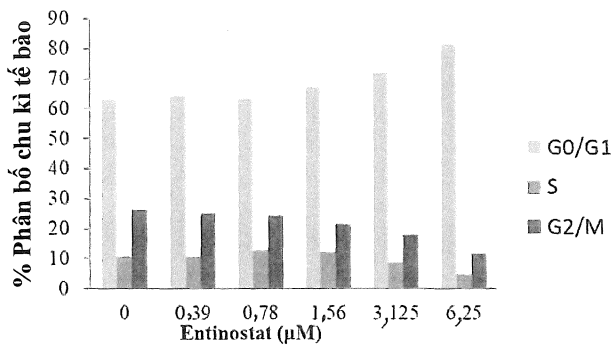


Fig. 5 (b)

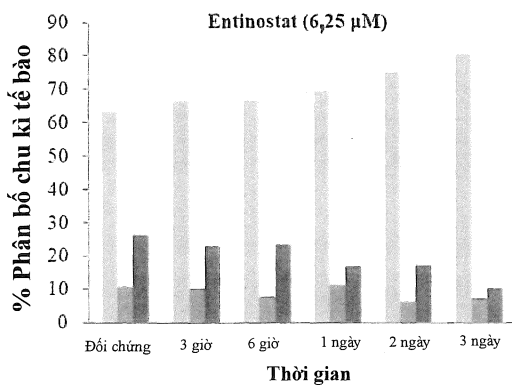
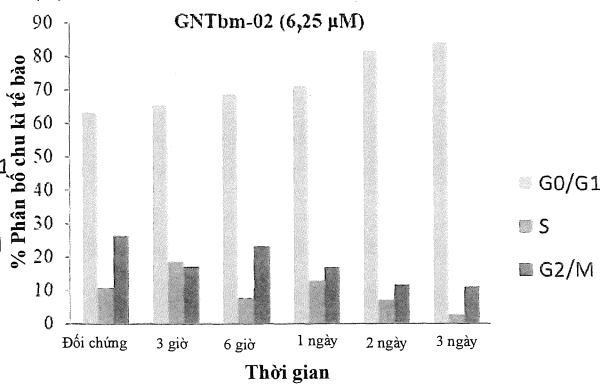


Fig. 5 (d)



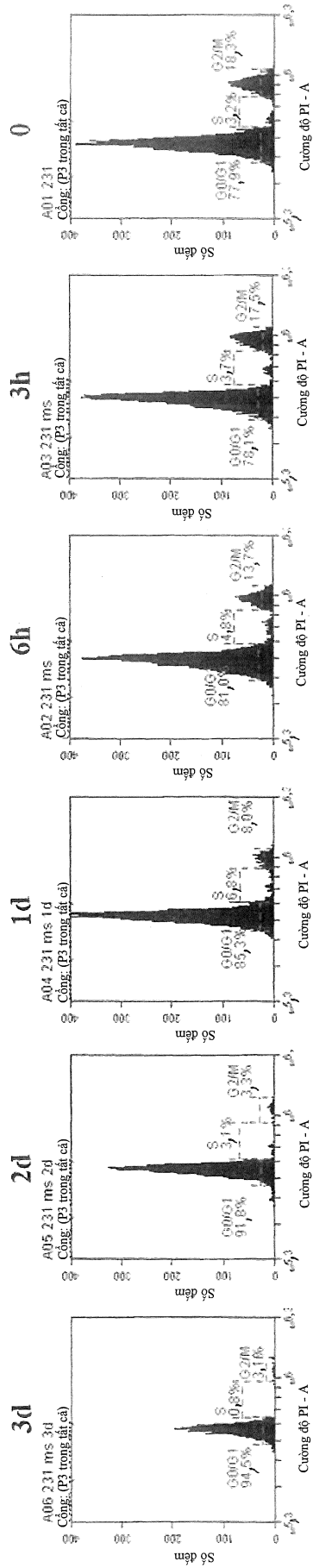
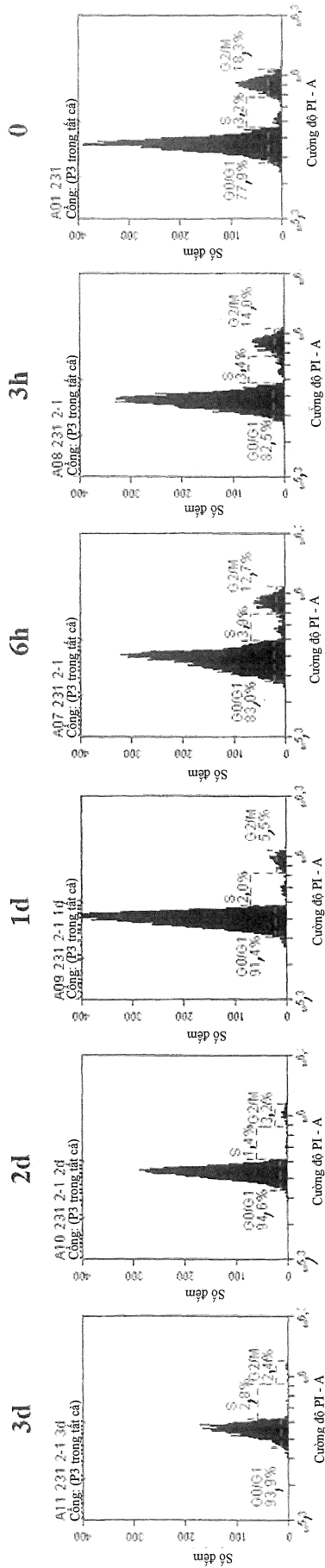
Entinostat (12,5 μ M)GNTbm-02 (12,5 μ M)

Fig. 4 (c)

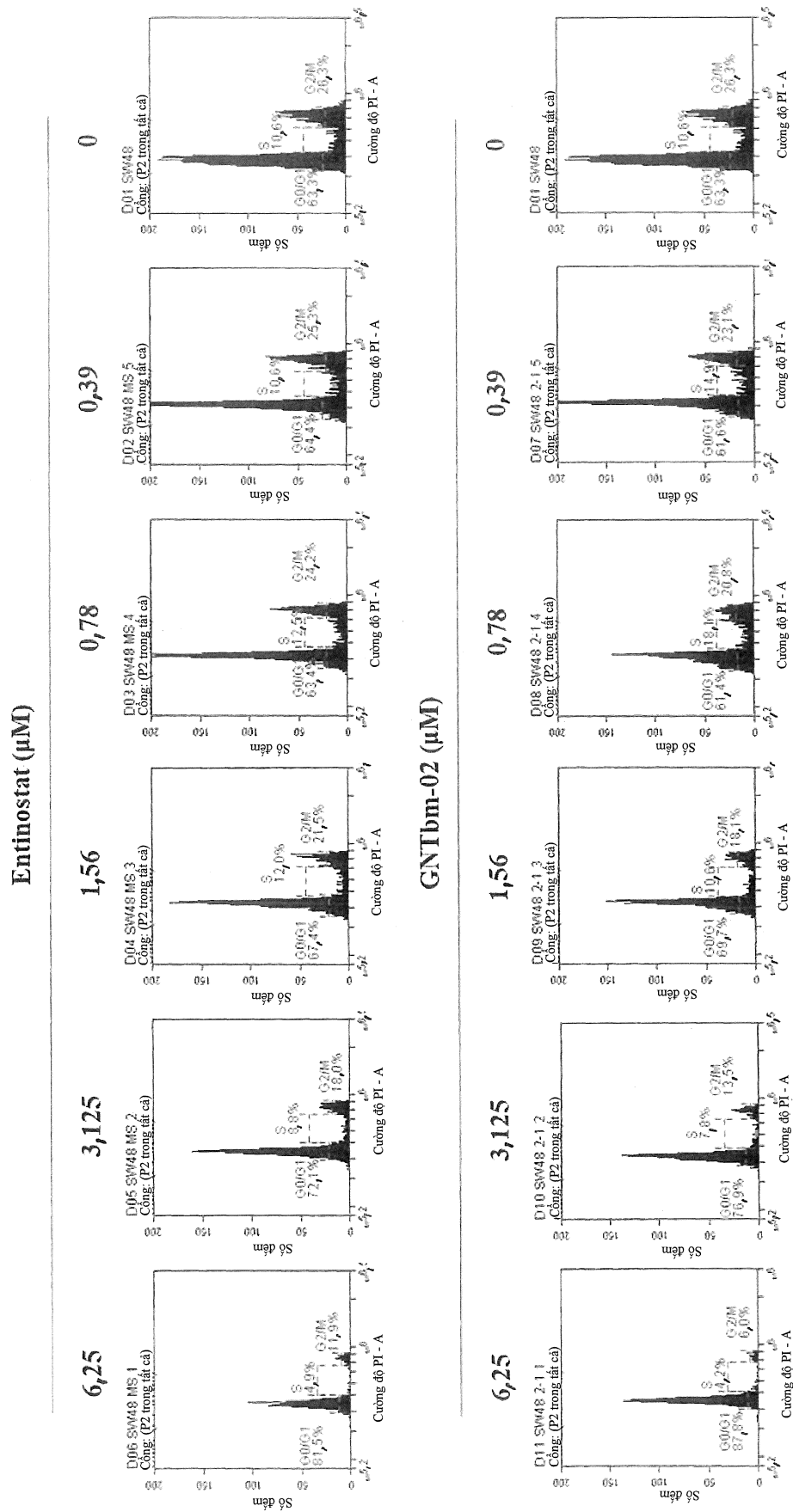
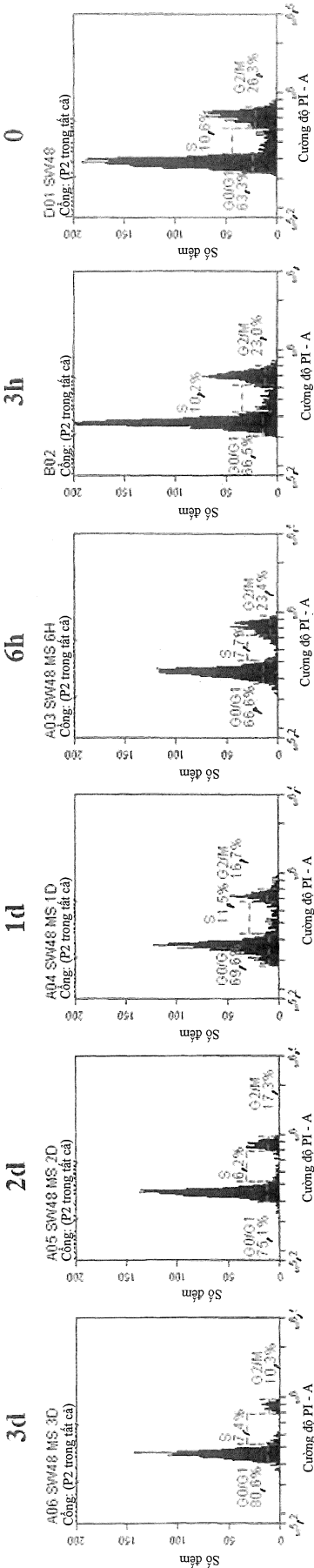


Fig. 5 (a)

Entinostat (6,25 μ M)



GNTbm-02 (6,25 μ M)

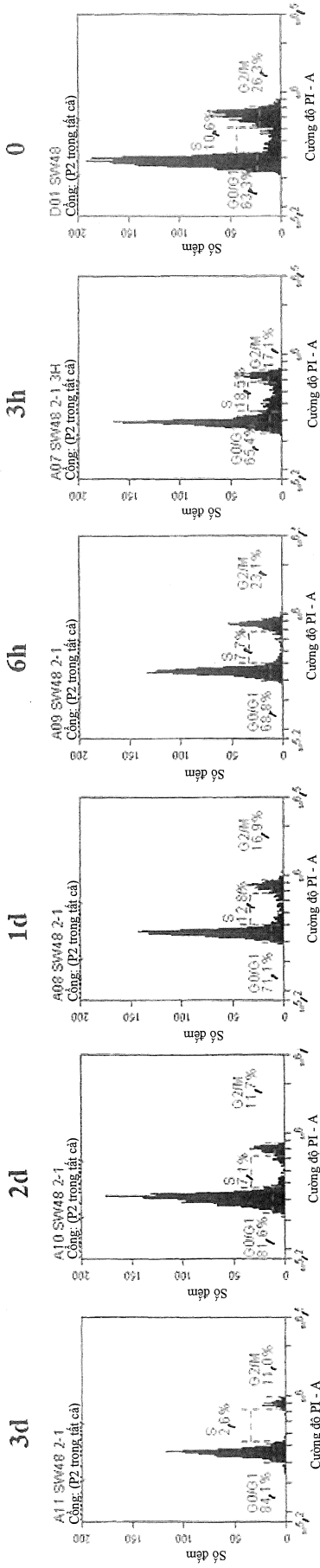
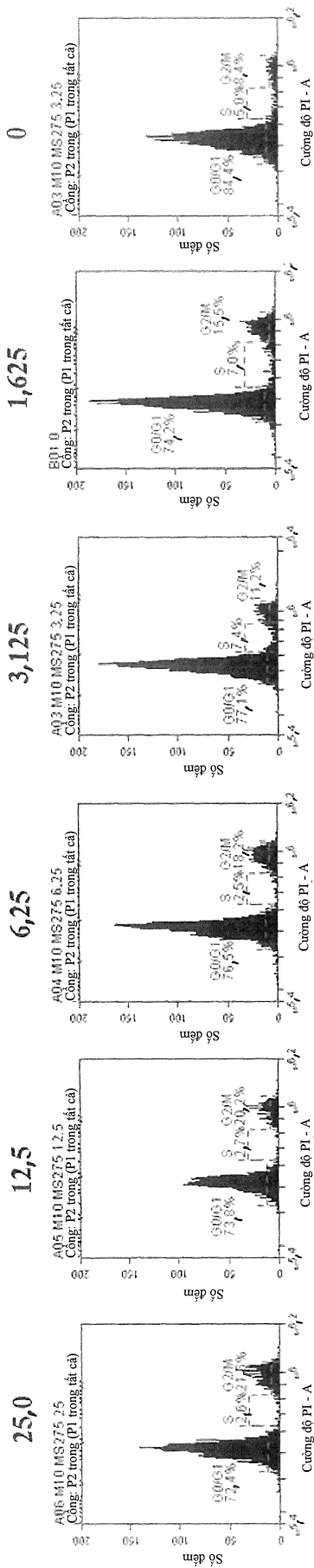


Fig. 5 (c)

Entinostat (μM)



GNTbm-02 (μM)

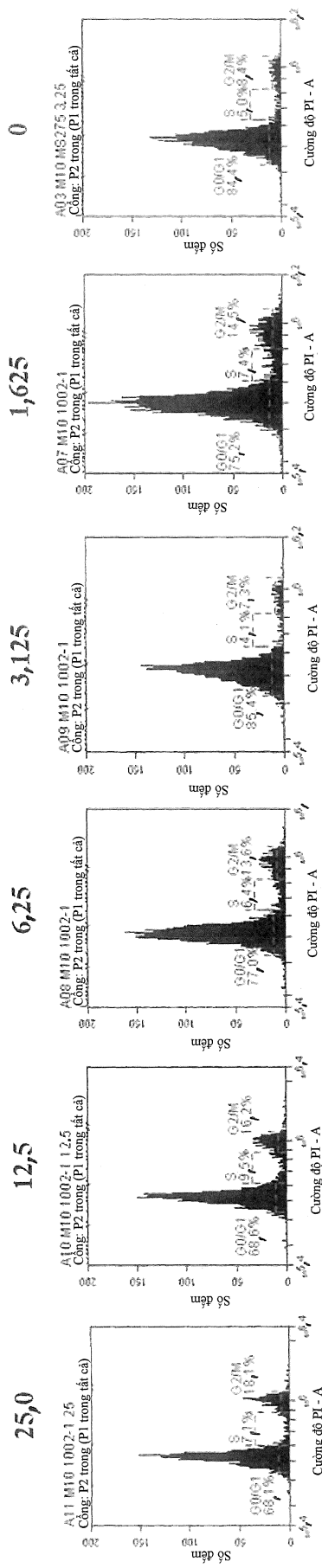


Fig. 6 (a)

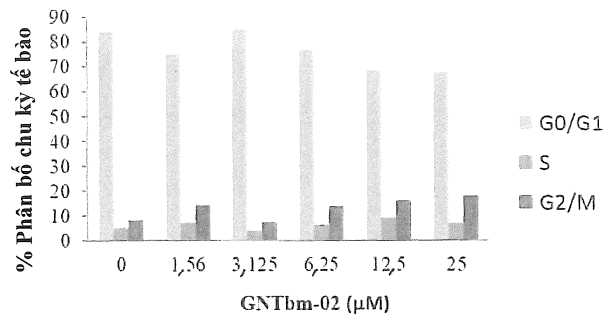
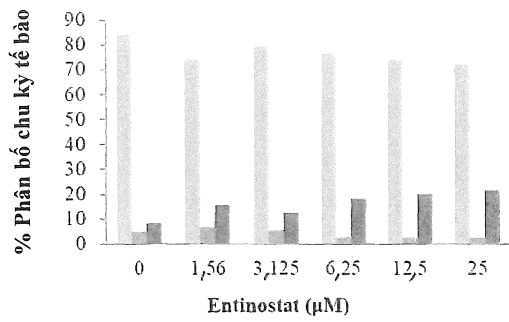


Fig. 6 (b)

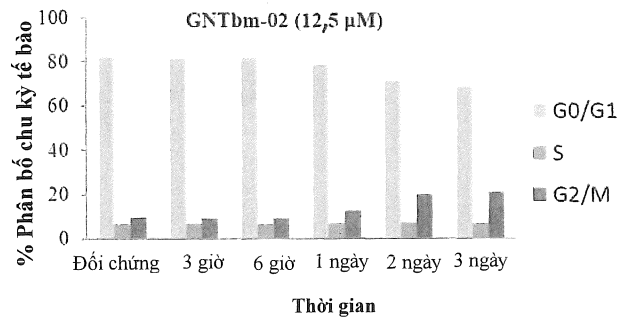
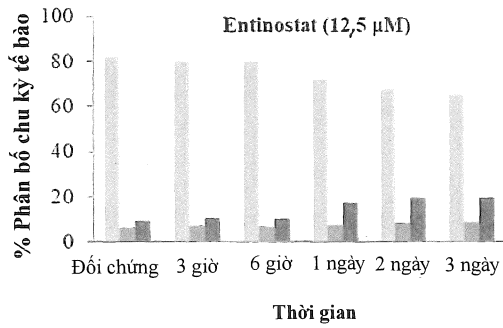


Fig. 6 (d)

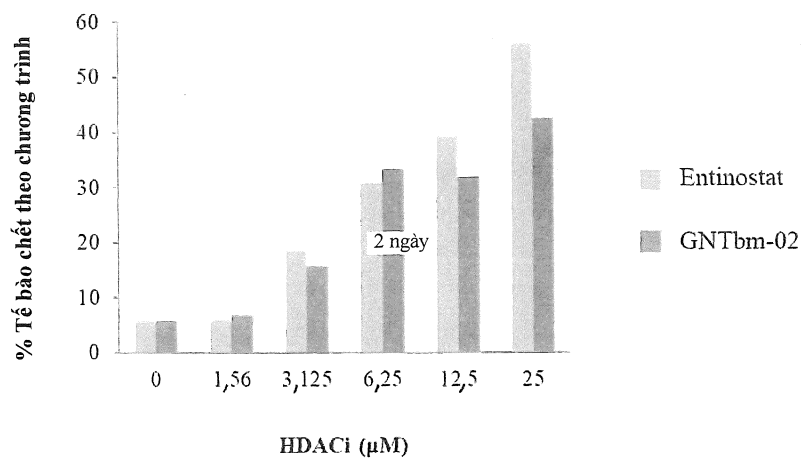


Fig. 7 (b)

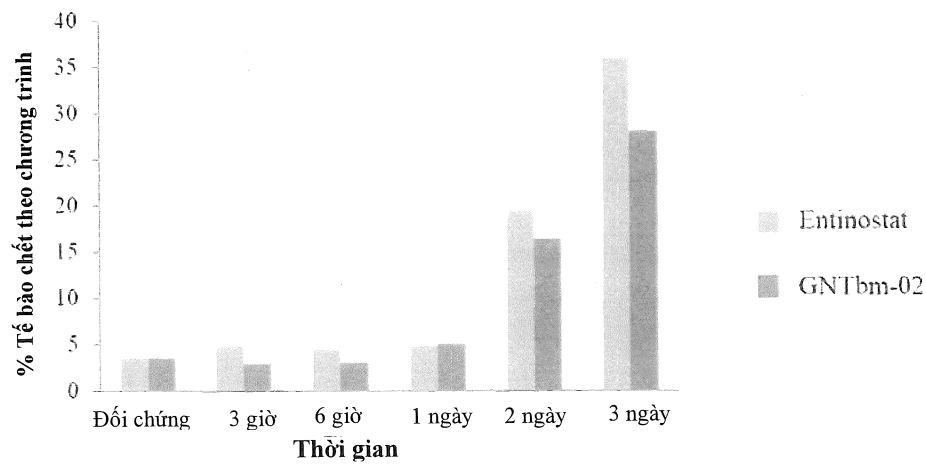


Fig. 7 (d)

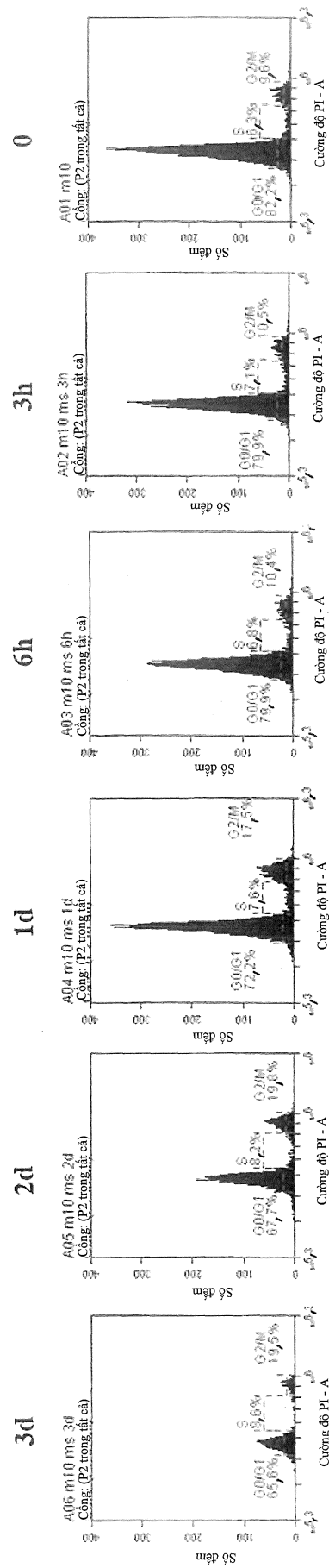
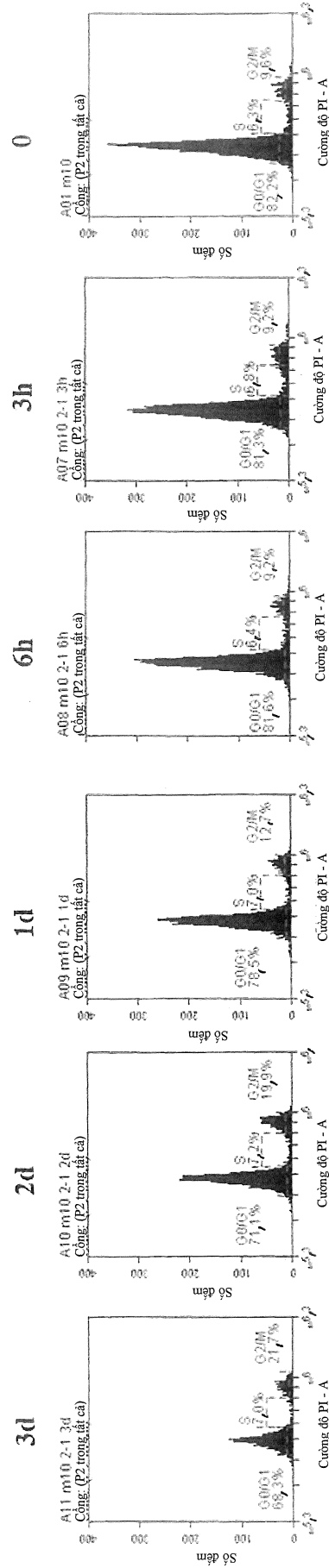
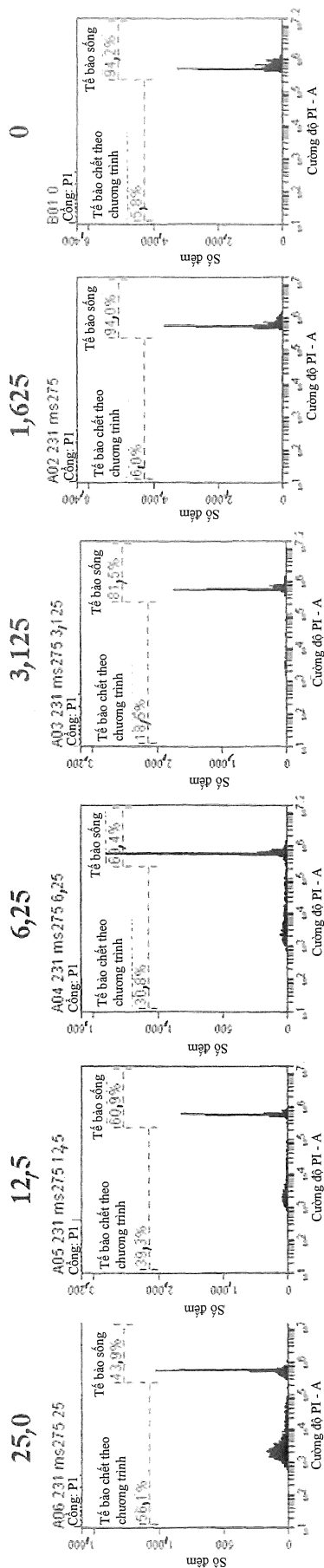
Entinostat (12,5 μ M)GNTbm-02 (12,5 μ M)

Fig. 6 (c)

Entinostat (μM)



GNTbm-02 (μM)

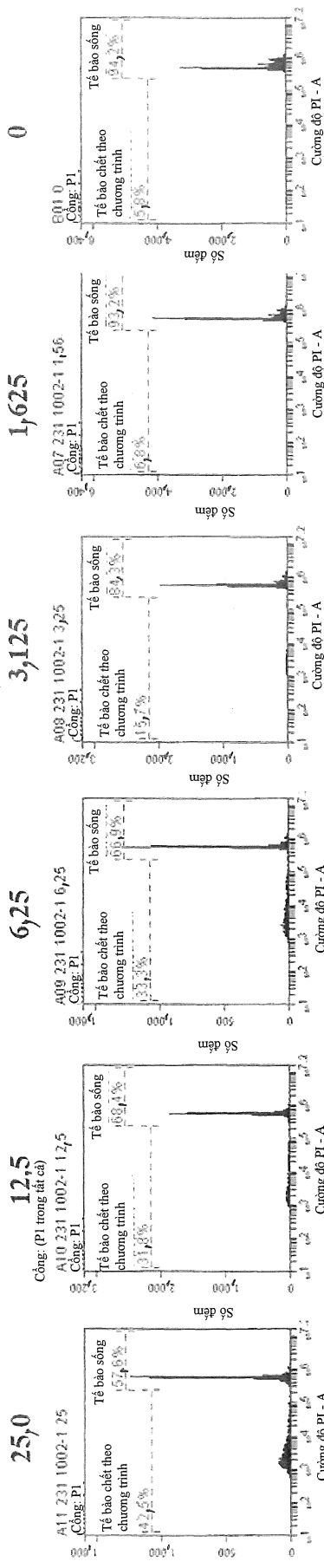
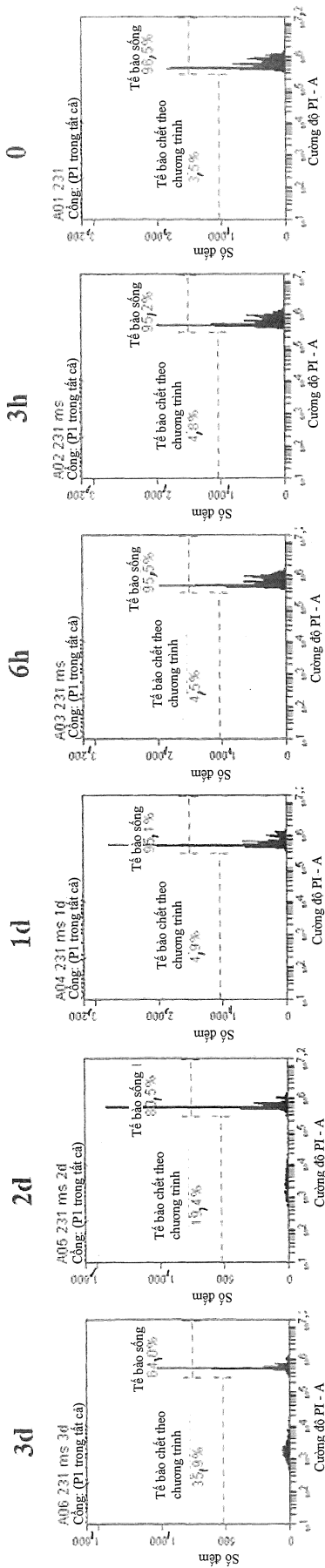


Fig. 7(a)

Entinostat (12,5 μ M)



GNTbm-02(12,5 μ M)

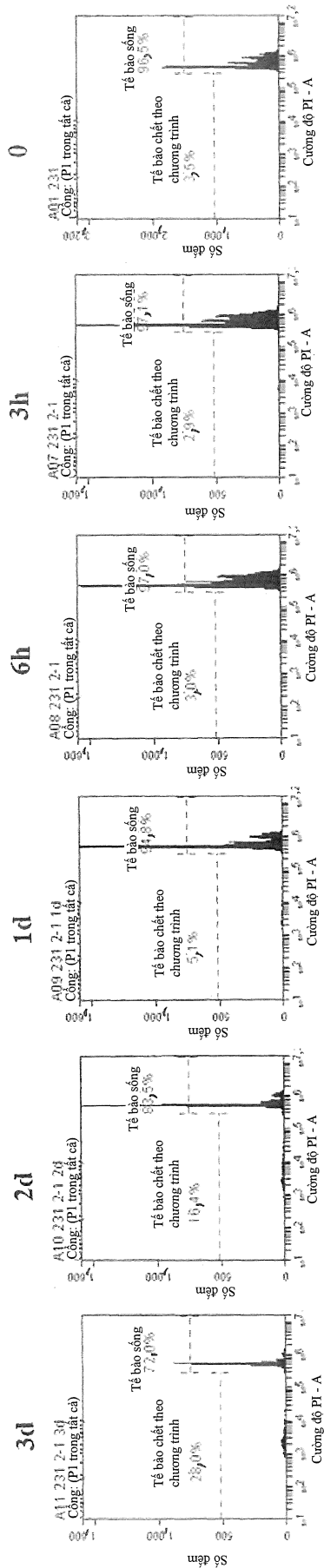


Fig. 7(c)

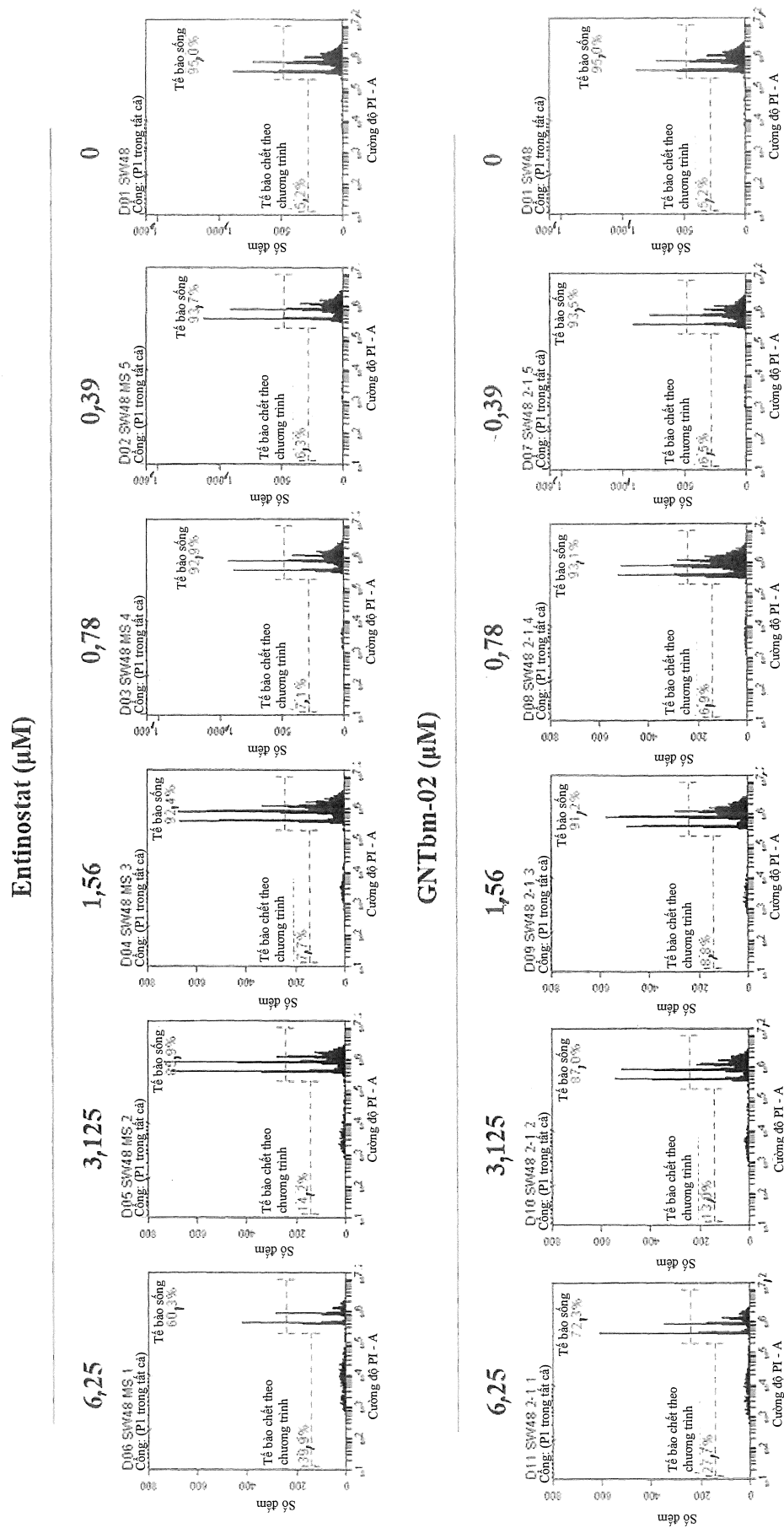


Fig. 8 (a)

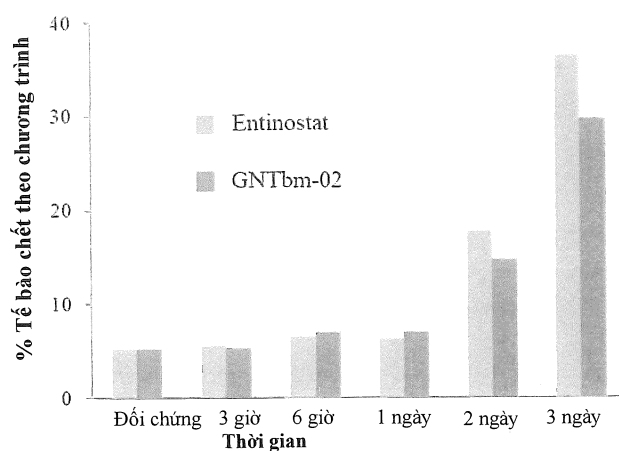


Fig. 8 (b)

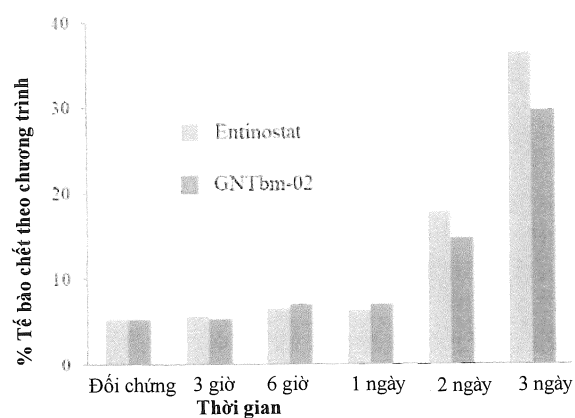


Fig. 8 (d)

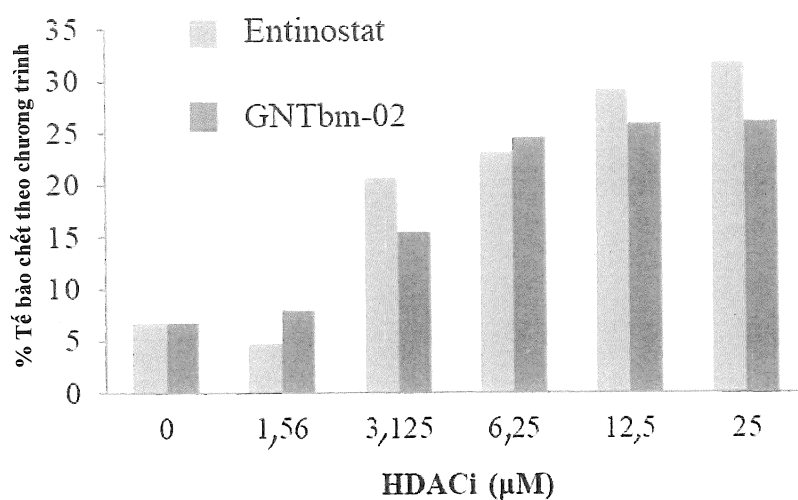


Fig. 9 (b)

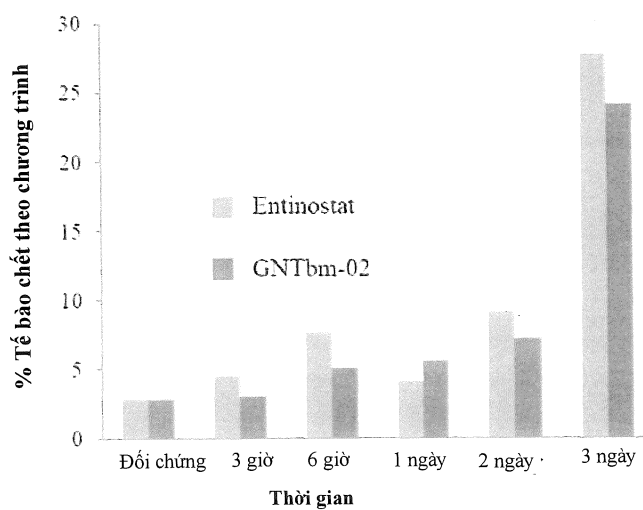
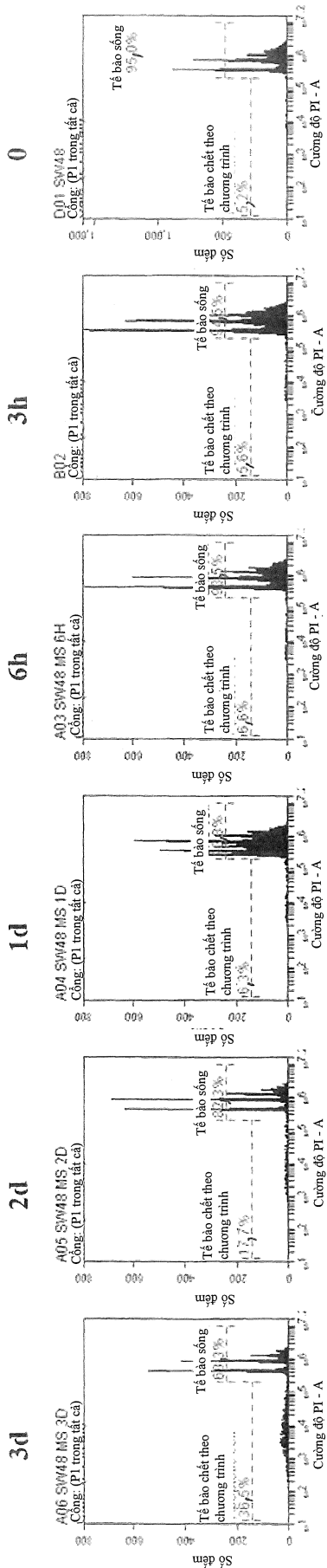


Fig. 9 (d)

Entinostat (6,25 μ M)



GNTbm-02 (6,25 μ M)

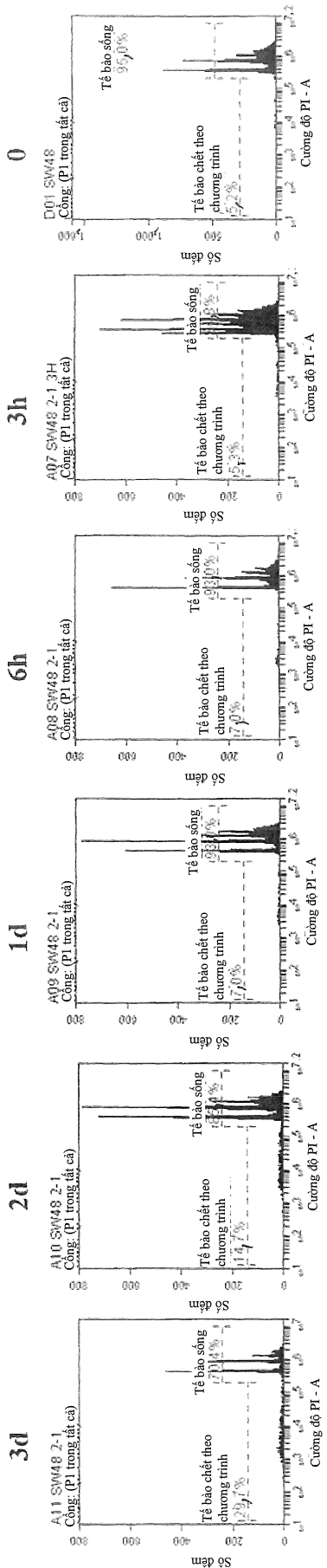


Fig. 8 (c)

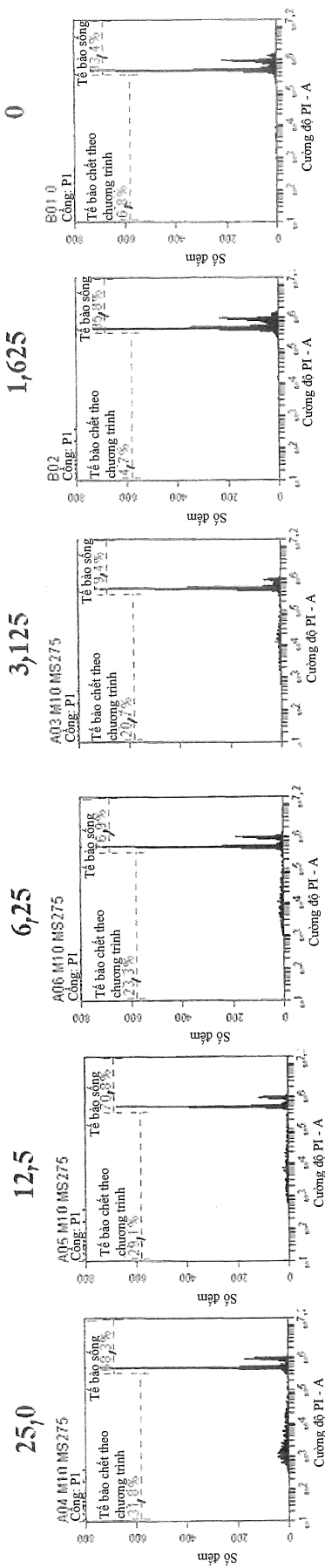
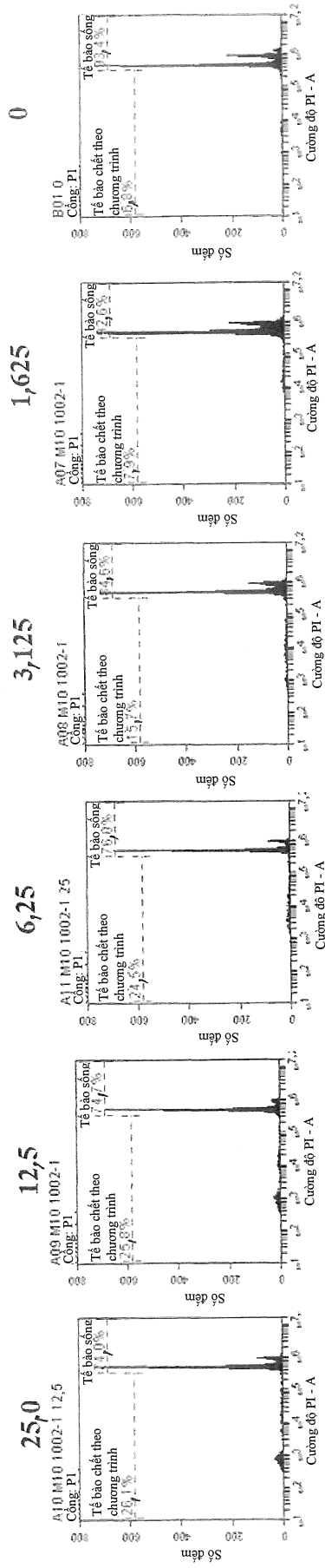
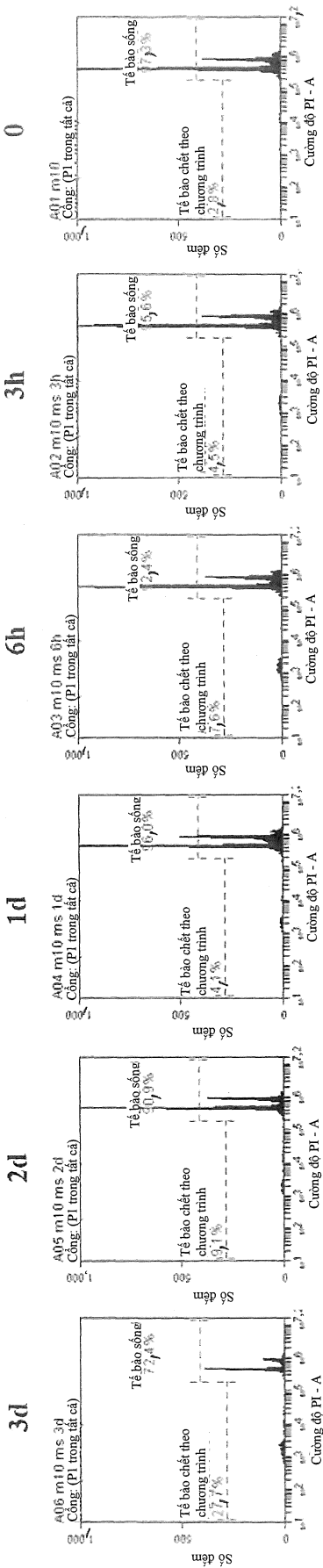
Entinostat (μM)GNTbm-02 (μM)

Fig. 8 (a)

Entinostat (12,5 μ M)



GNTbm-02(12,5 μ M)

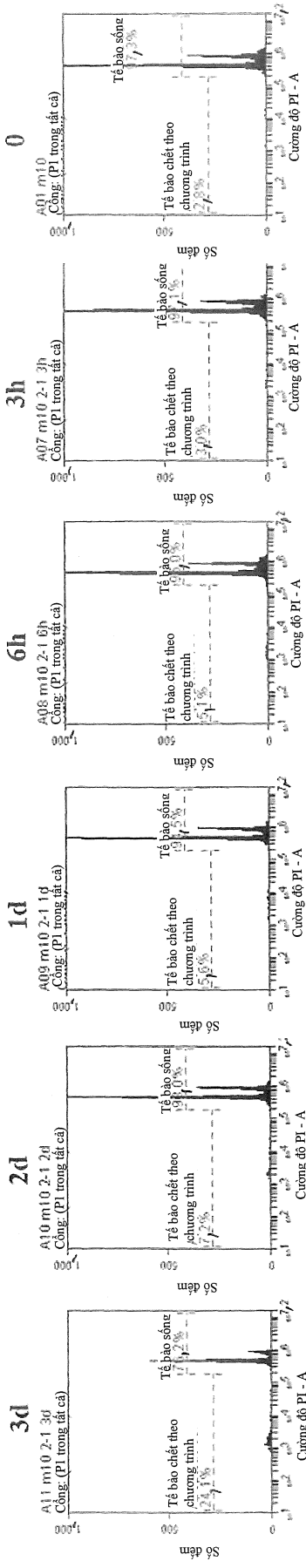


Fig. 9 (c)

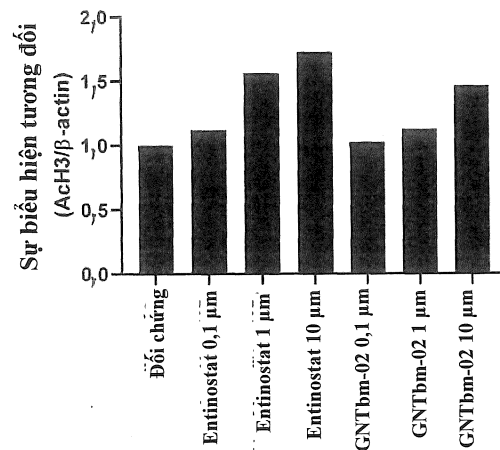
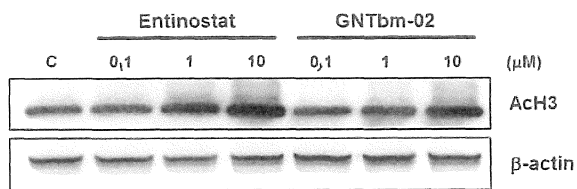


Fig. 10 (a)

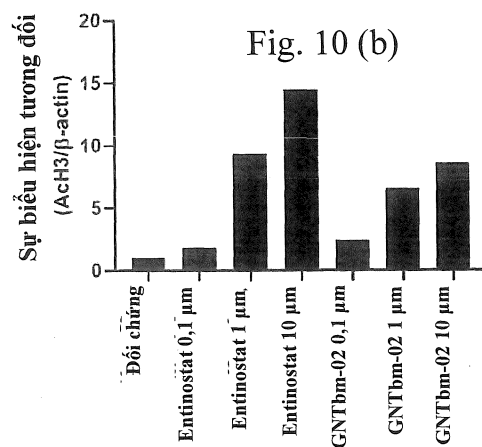
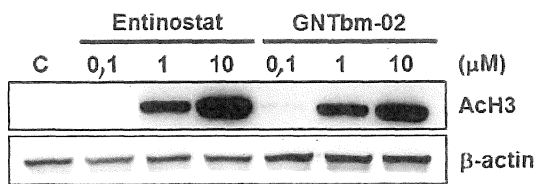


Fig. 10 (b)

Fig. 10 (c)

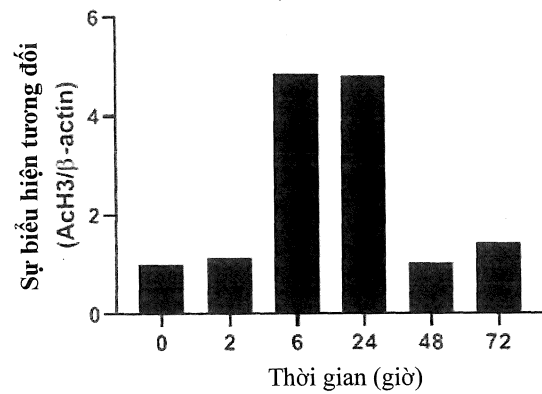
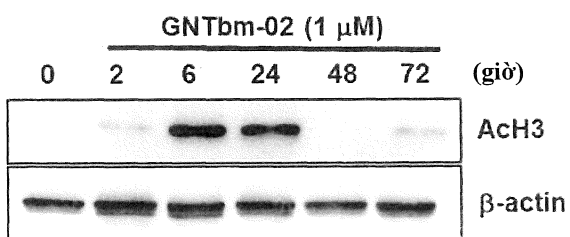


Fig. 11 (a)

Fig. 11 (b)

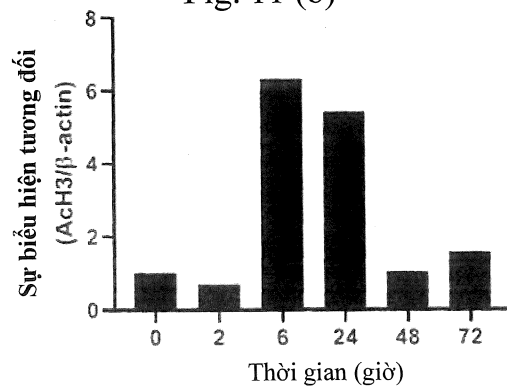
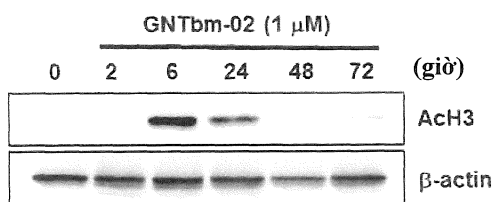


Fig. 11 (c)

Fig. 11 (d)

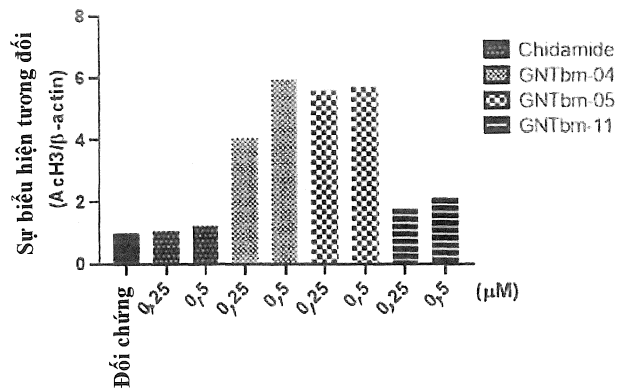
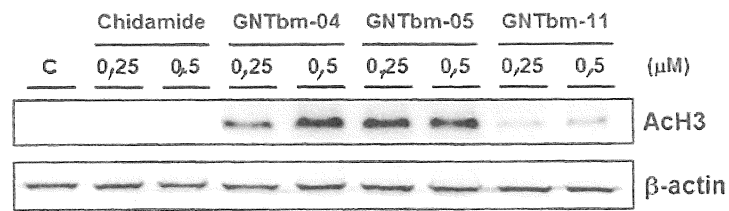


Fig. 12 (a)

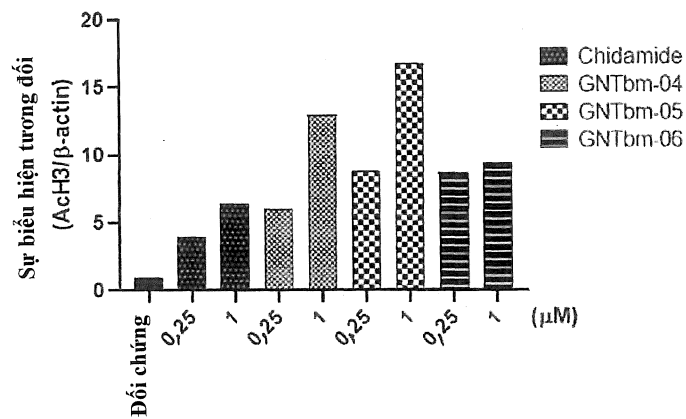
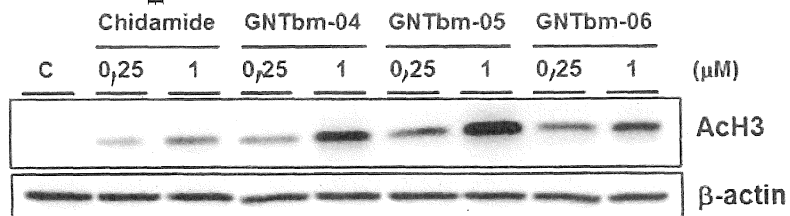


Fig. 12 (b)

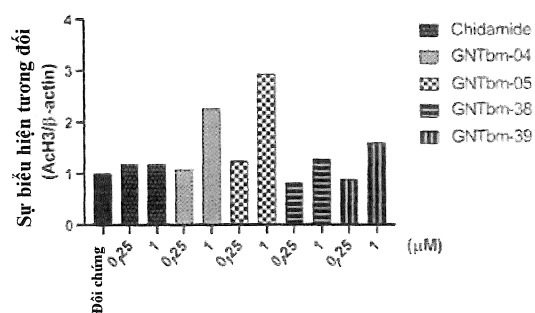
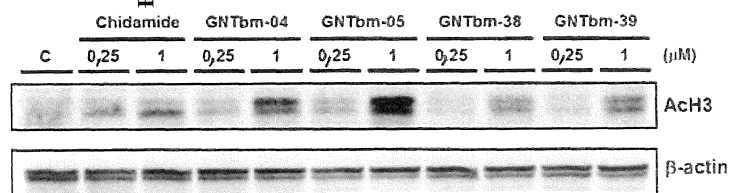


Fig. 12 (c)

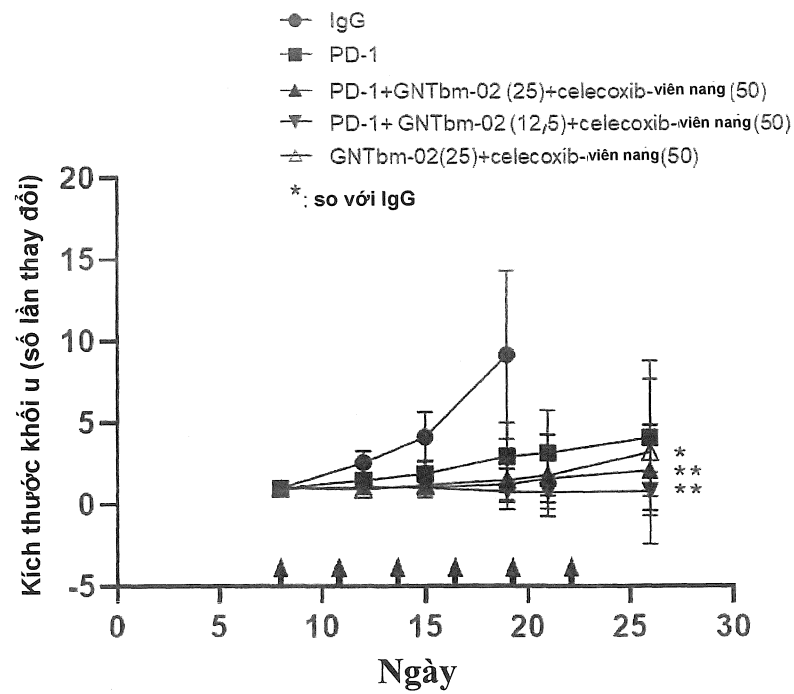


Fig. 13 (a)

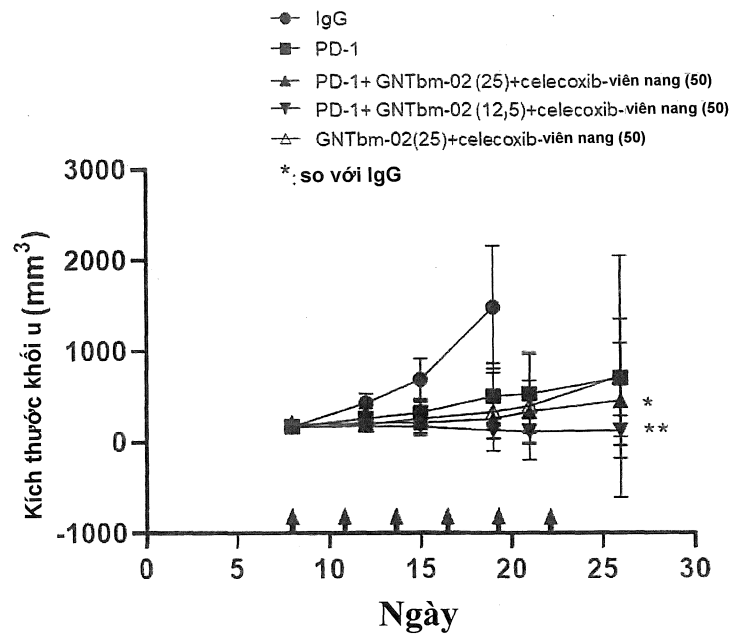
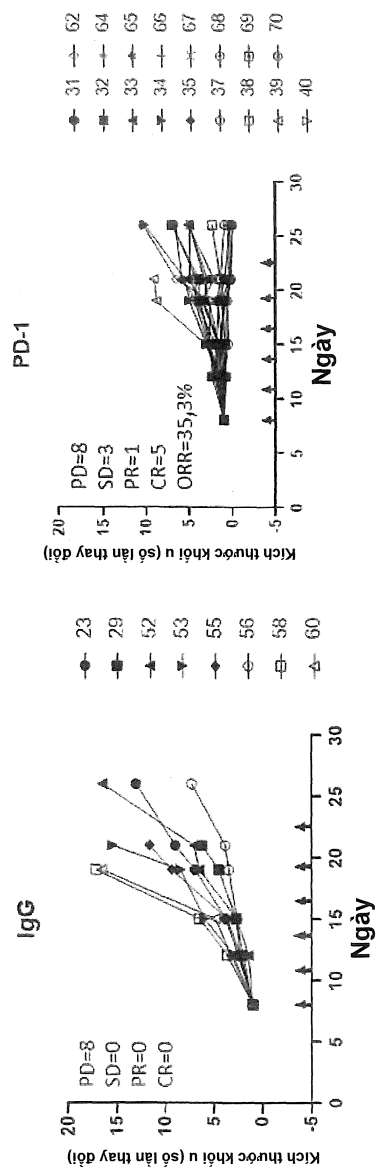
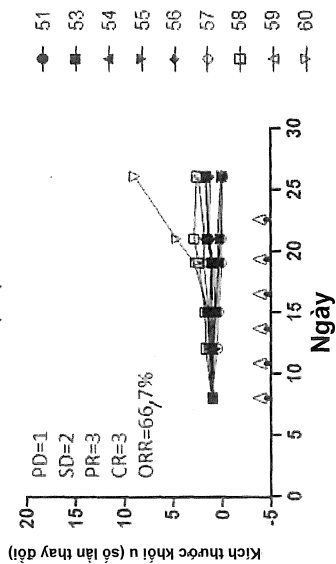


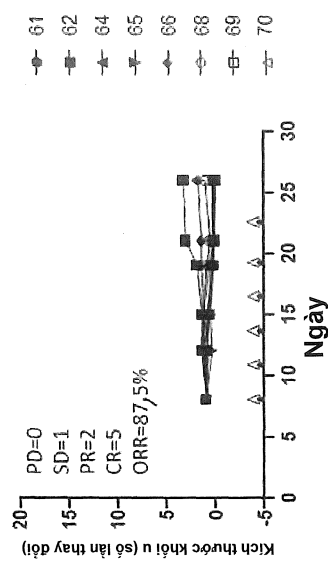
Fig. 13 (b)



PD-1 + GNTbm-02(25)+celecoxib-viên nang (50)



PD-1 + GNTbm-02(12.5)+celecoxib-viên nang (50)



GNTbm-02(25)+celecoxib-viên nang (50)

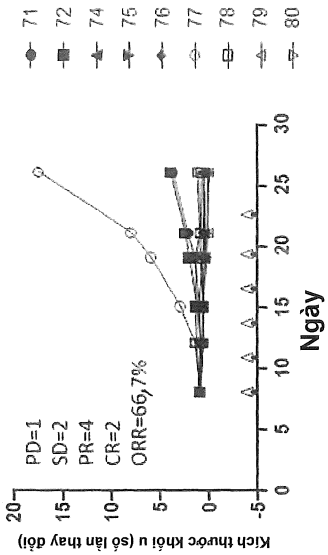


Fig. 13 (c)

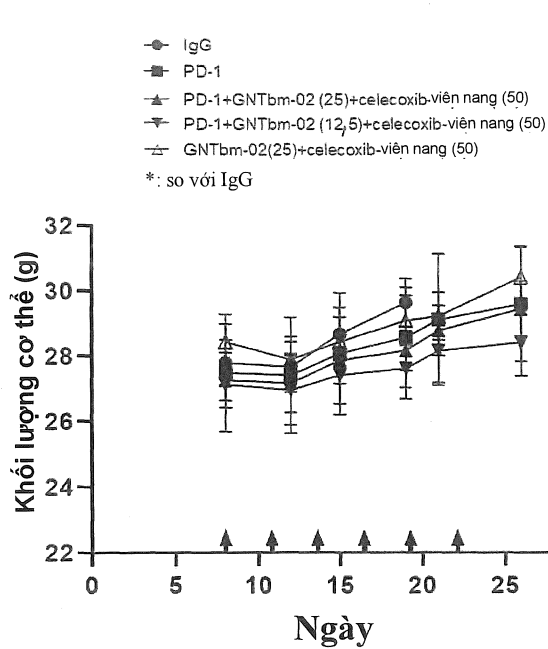


Fig. 13 (d)

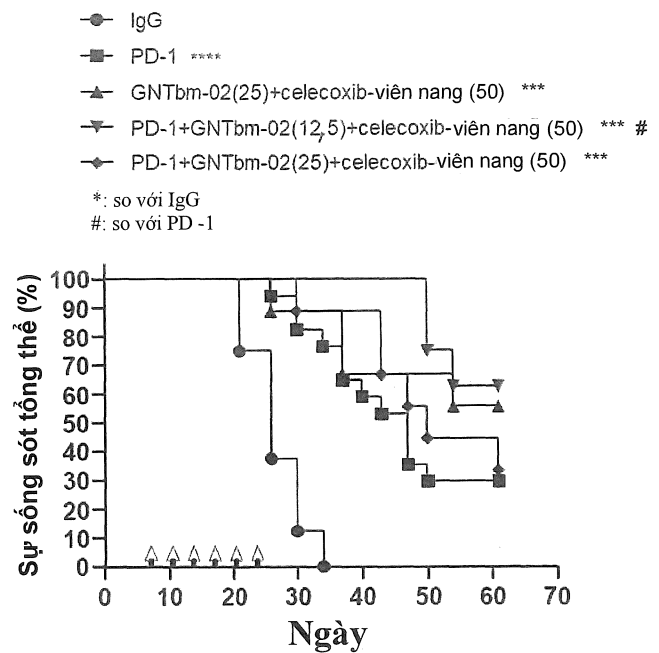


Fig. 13 (e)

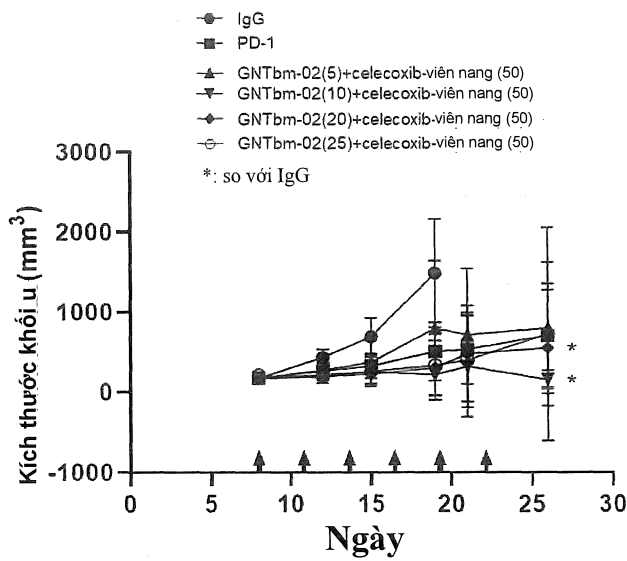


Fig. 14 (a)

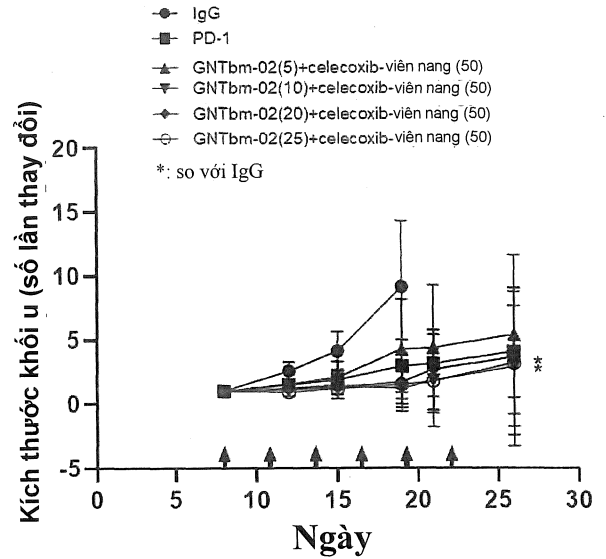


Fig. 14 (b)

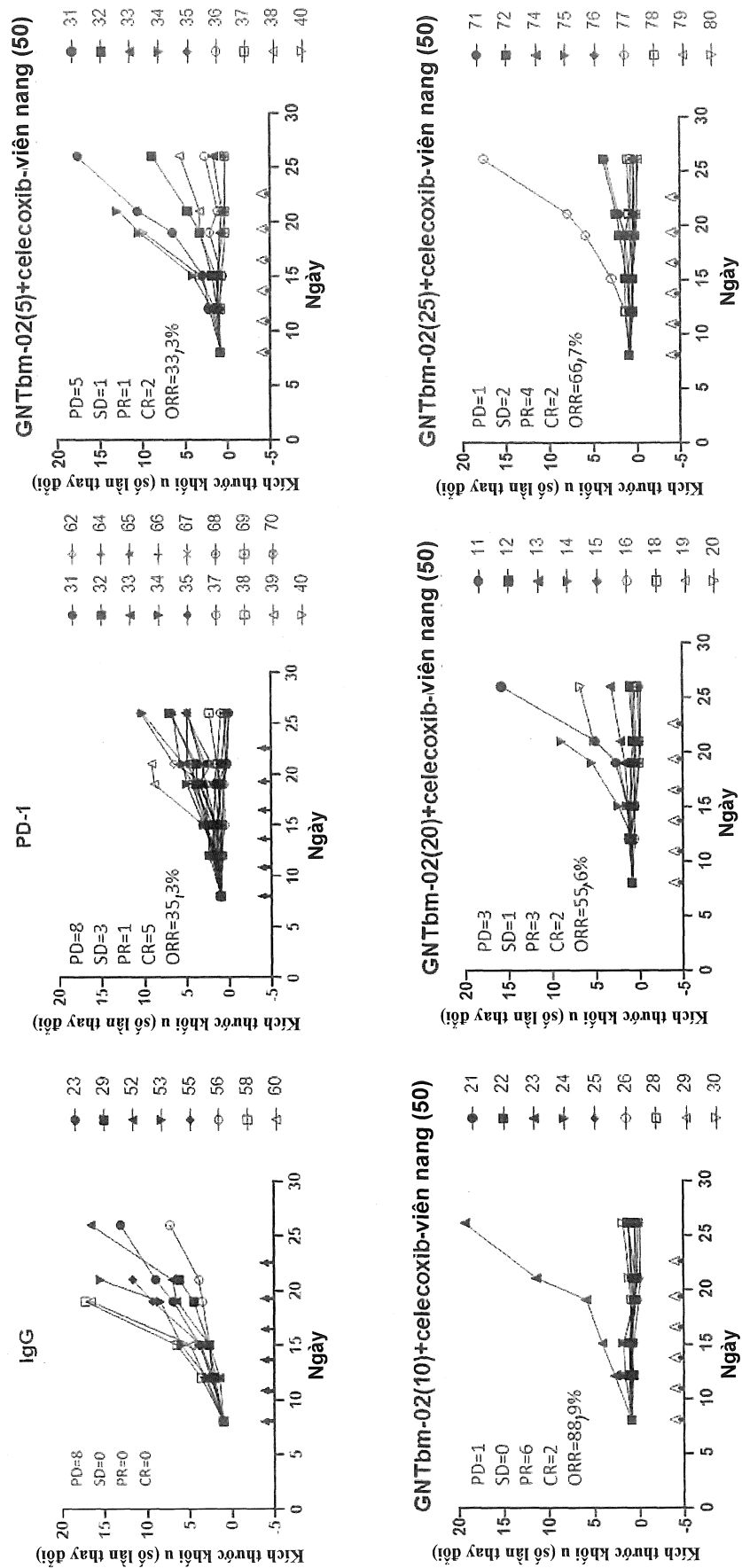


Fig. 14 (c)

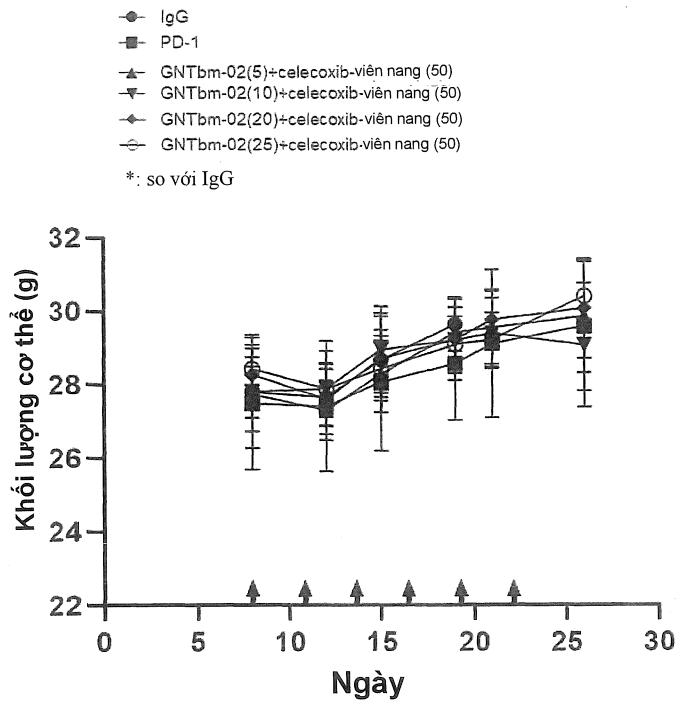


Fig. 14 (d)

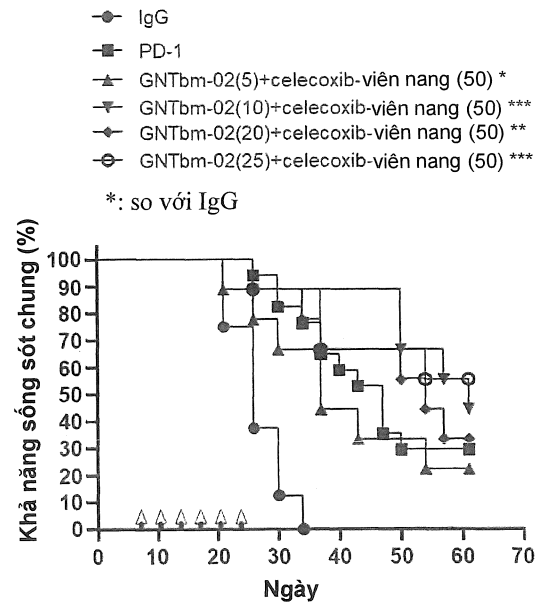


Fig. 14 (e)

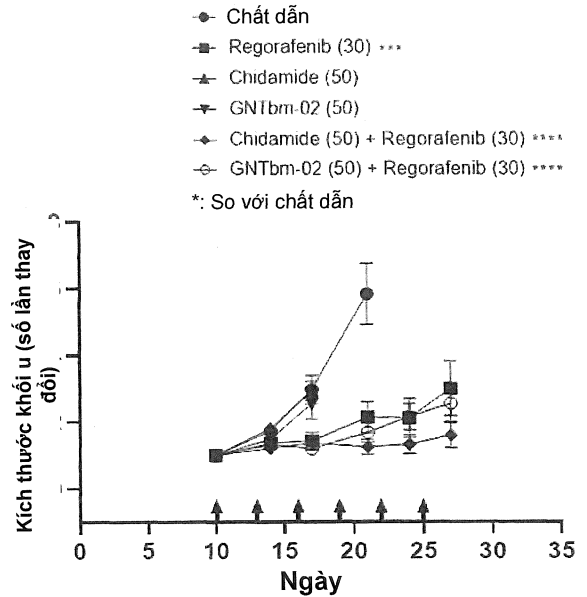
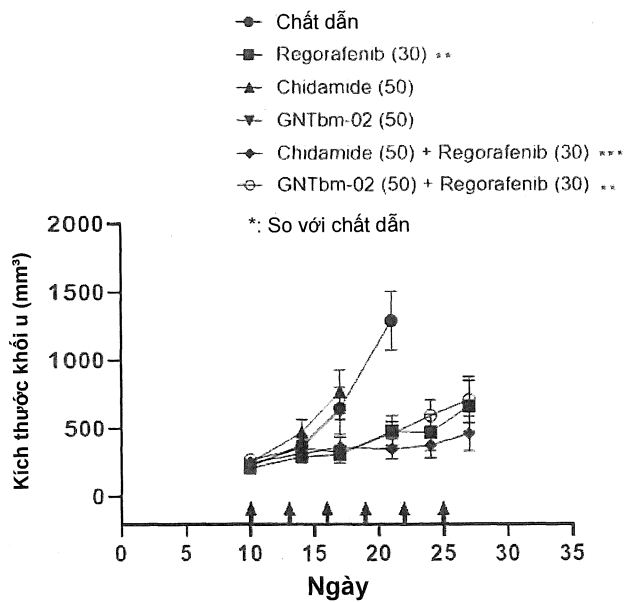


Fig. 14 (f)

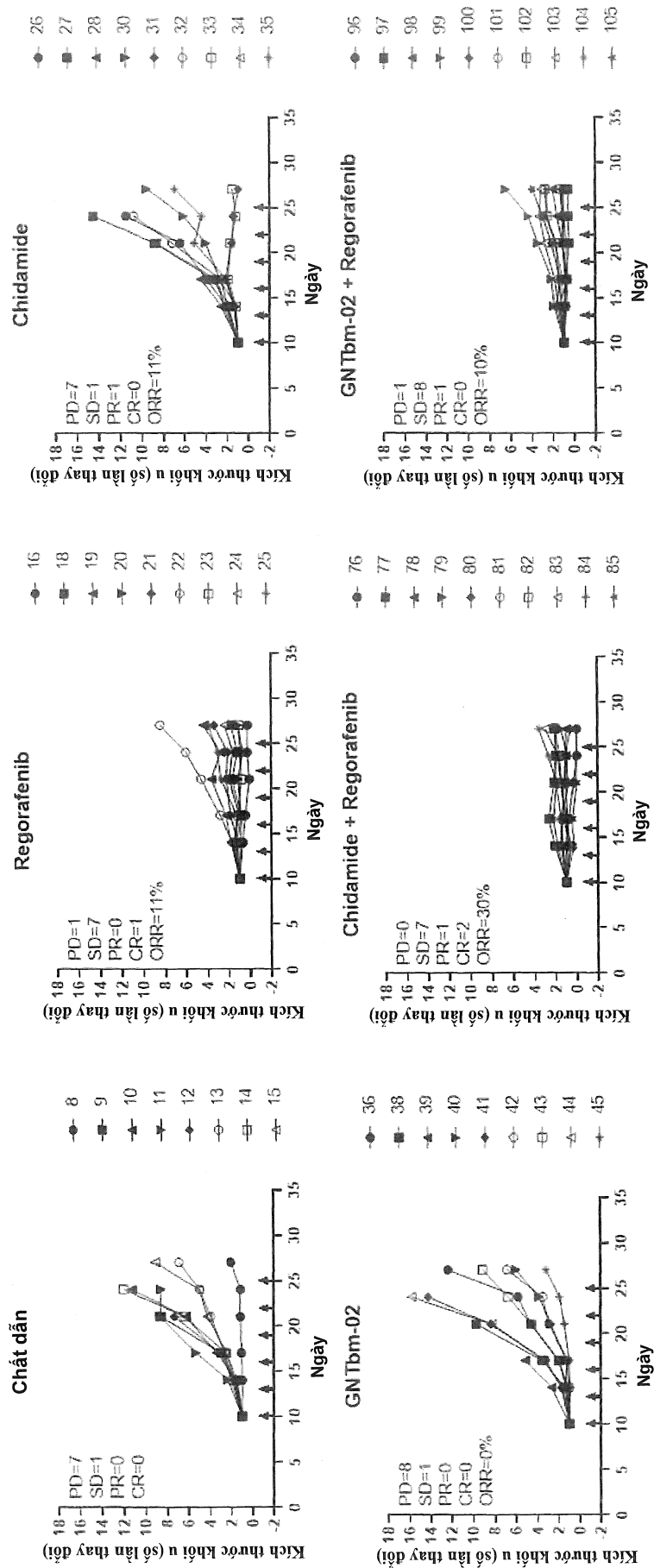


Fig. 14 (g)

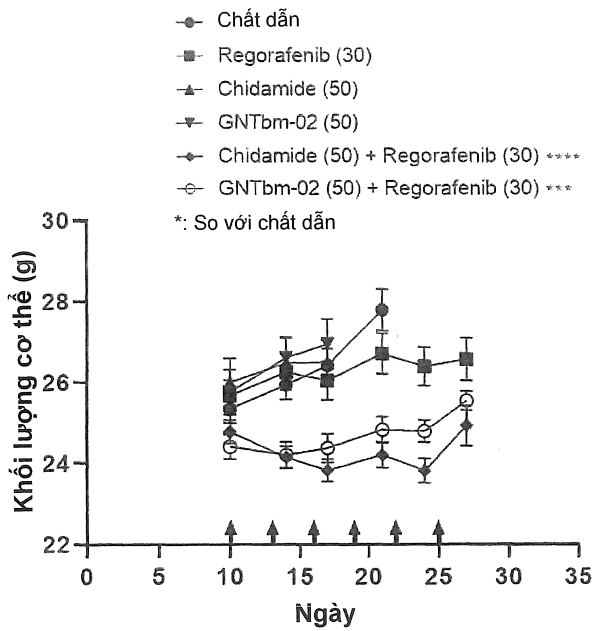


Fig. 14 (h)

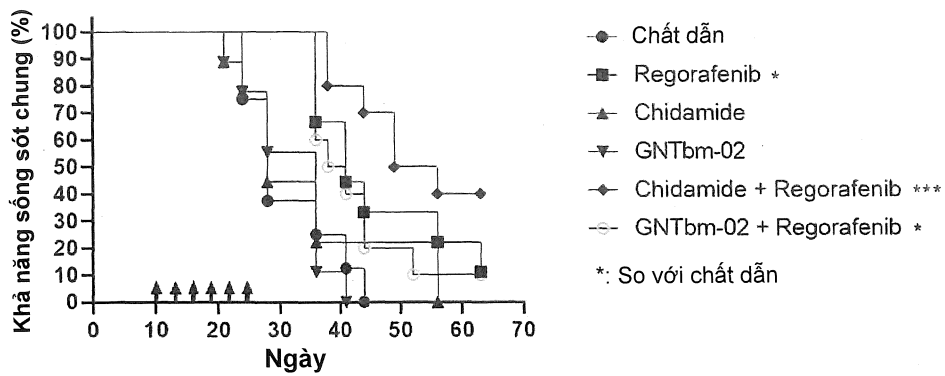


Fig. 14 (i)

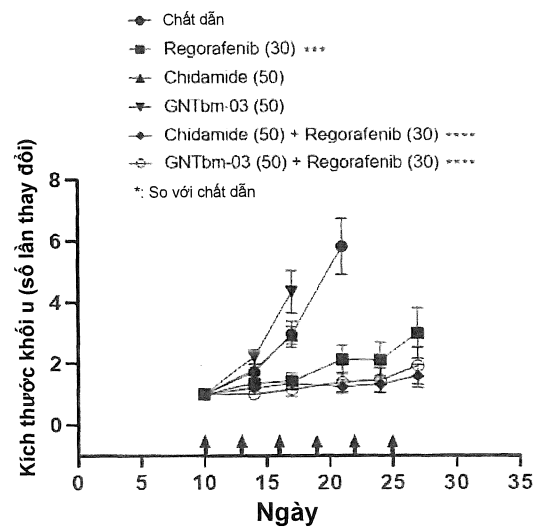
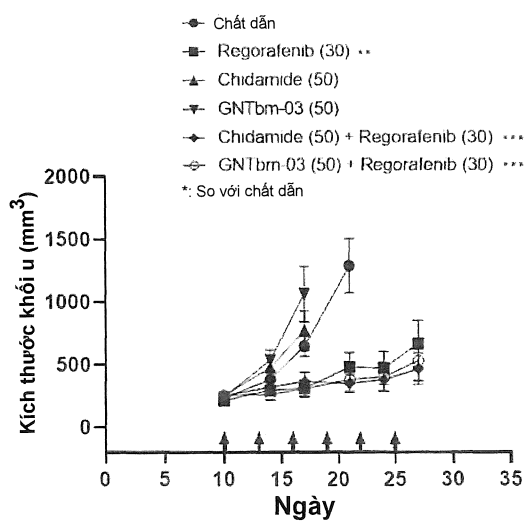


Fig. 14 (j)

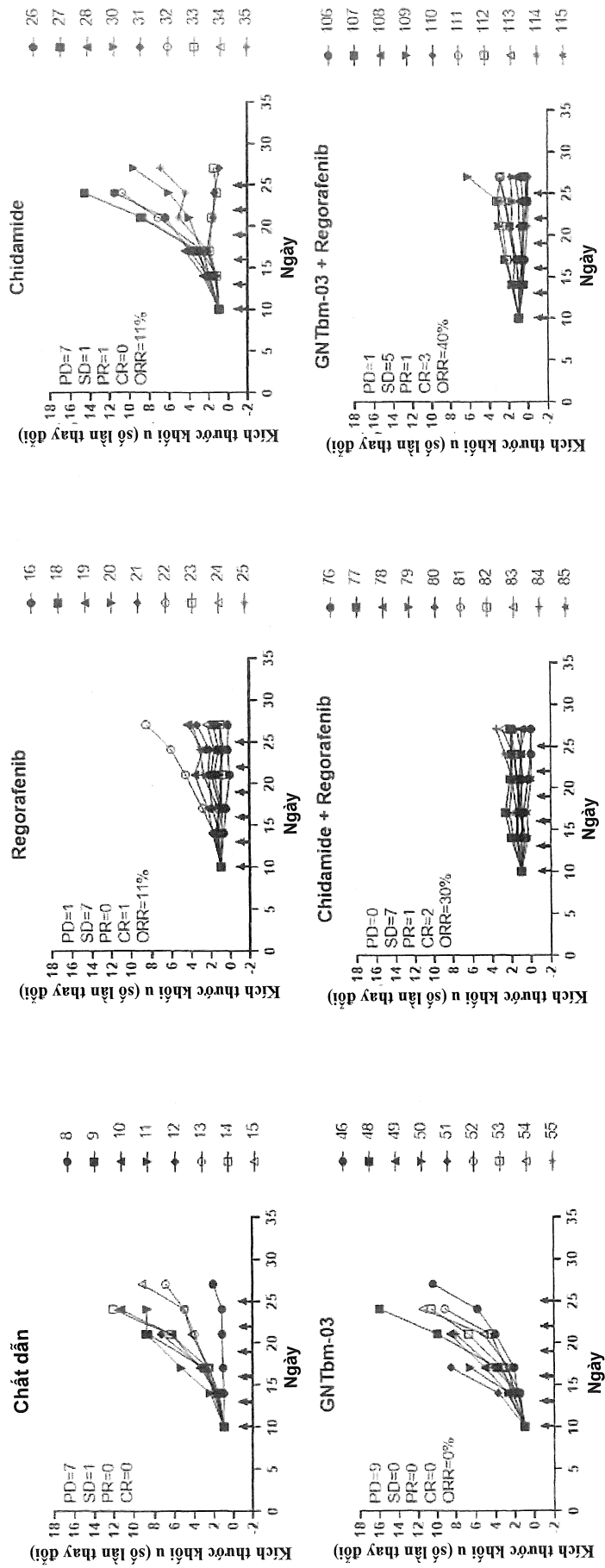


Fig. 14 (k)

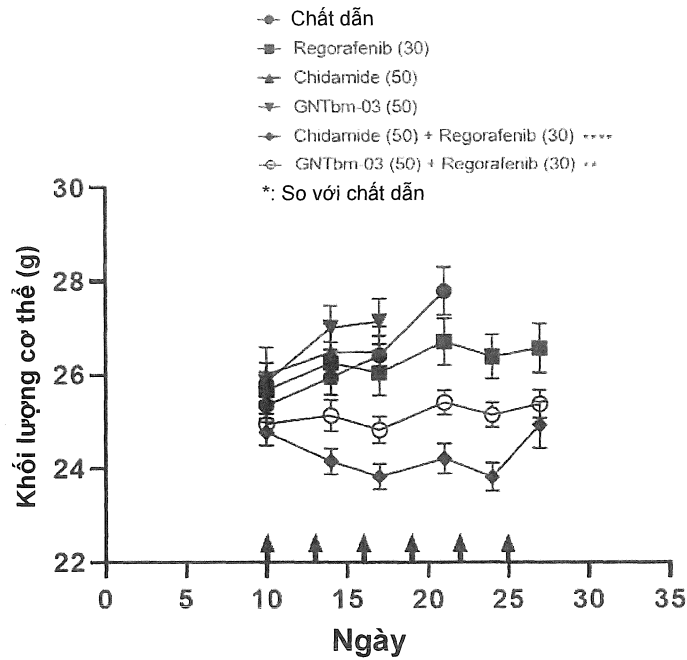


Fig. 14 (l)

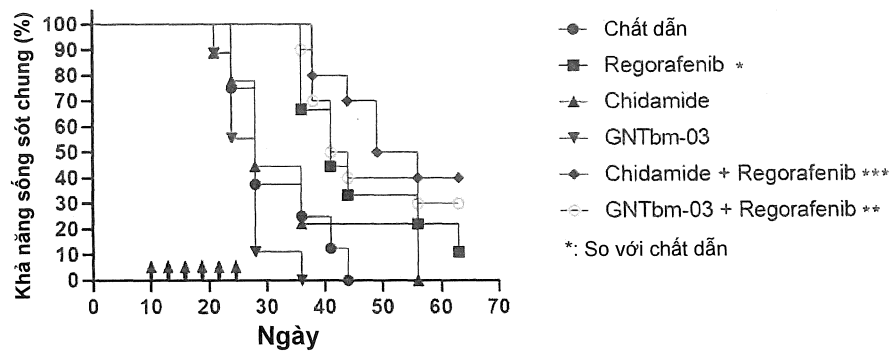


Fig. 14 (m)

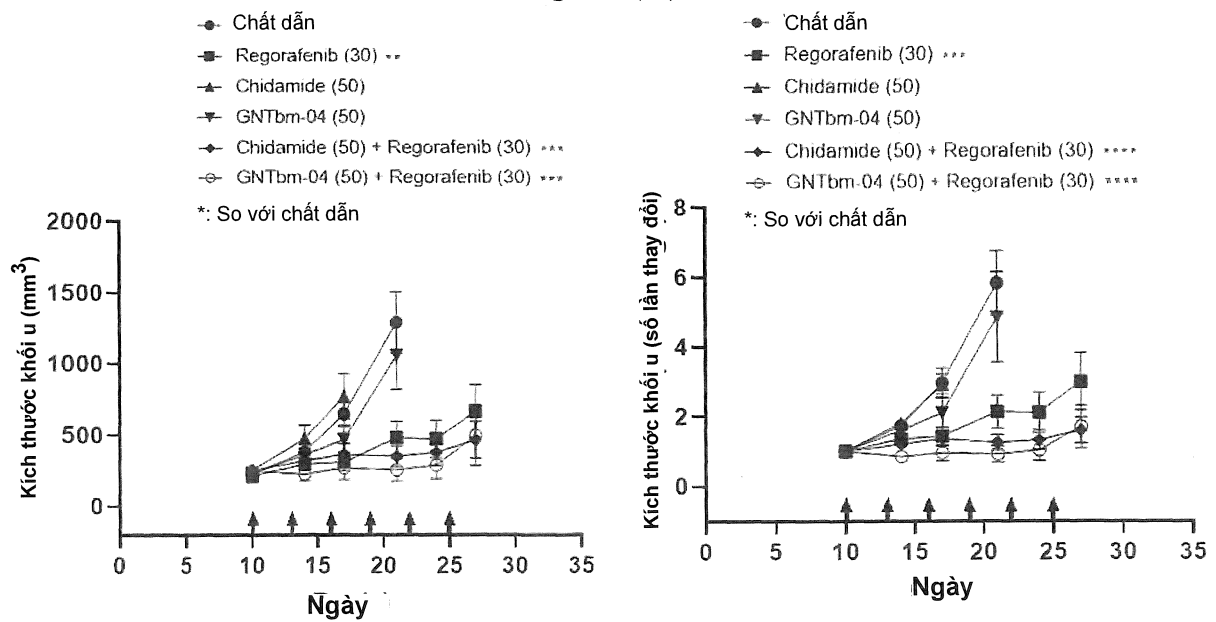


Fig. 14 (n)

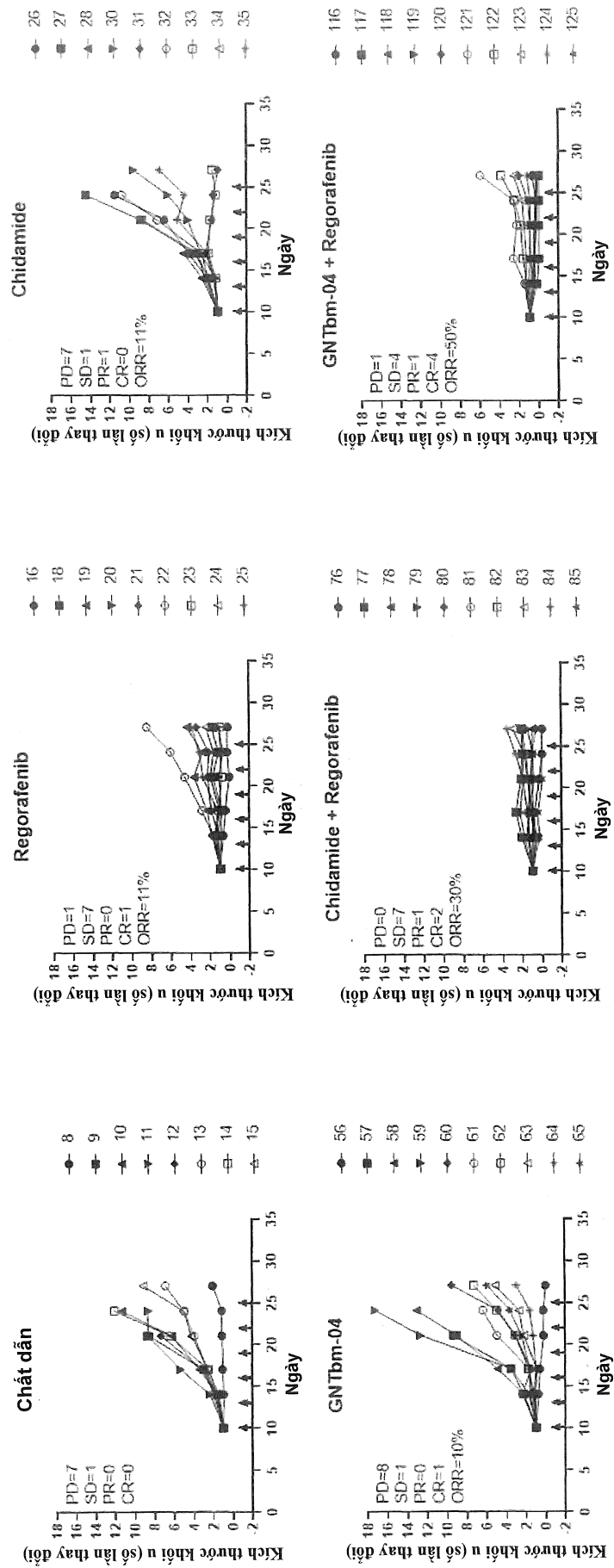


Fig. 14 (o)

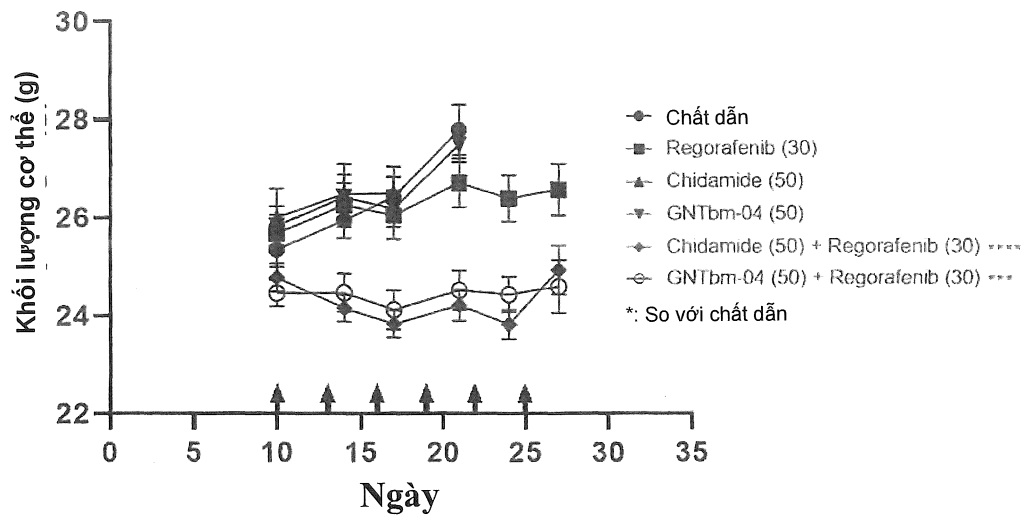


Fig. 14 (p)

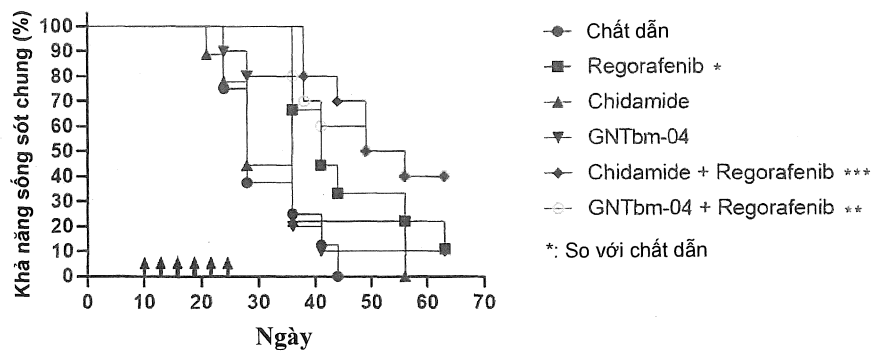


Fig. 14 (q)

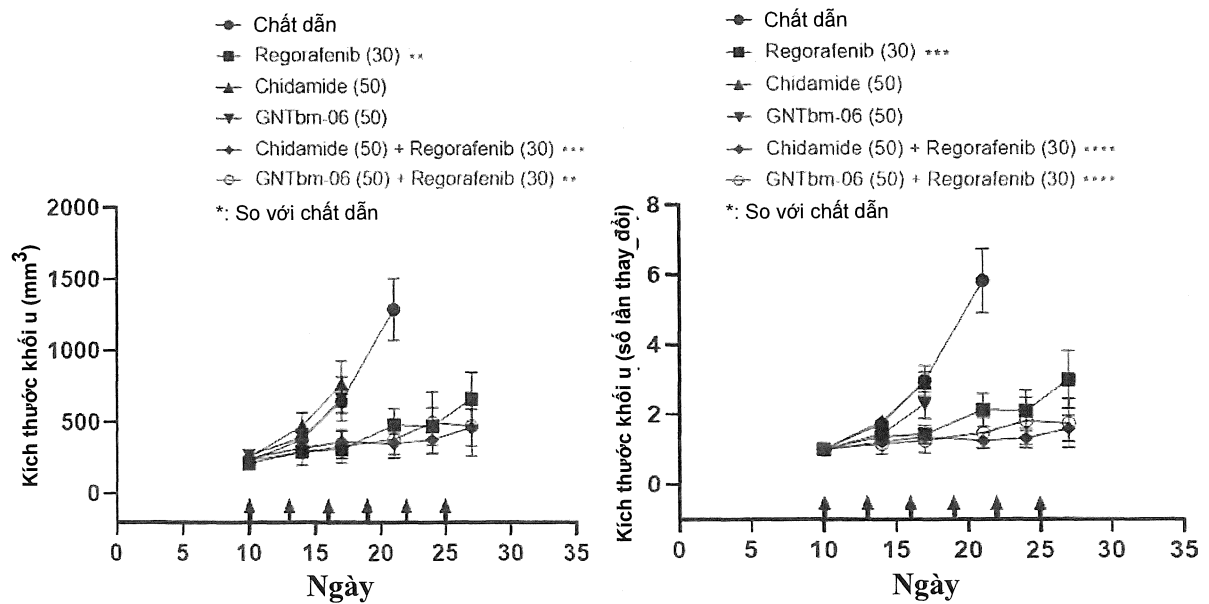


Fig. 14 (r)

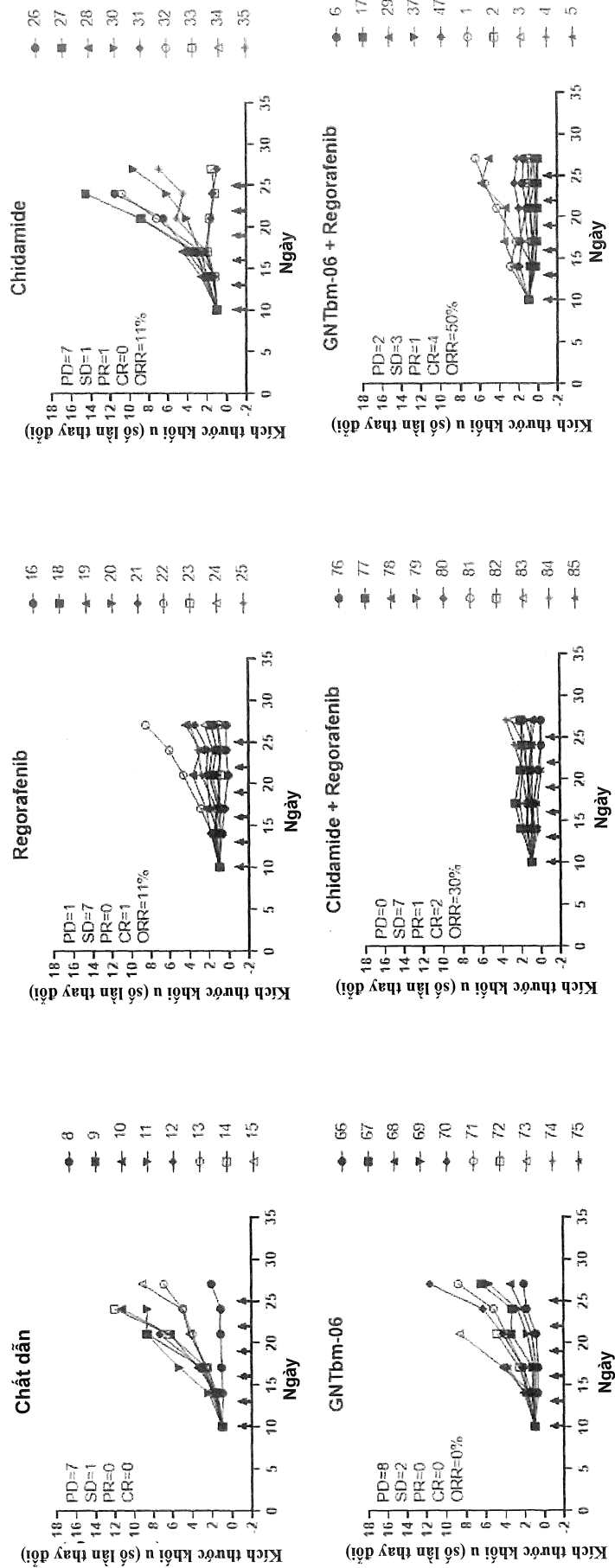


Fig. 14 (s)

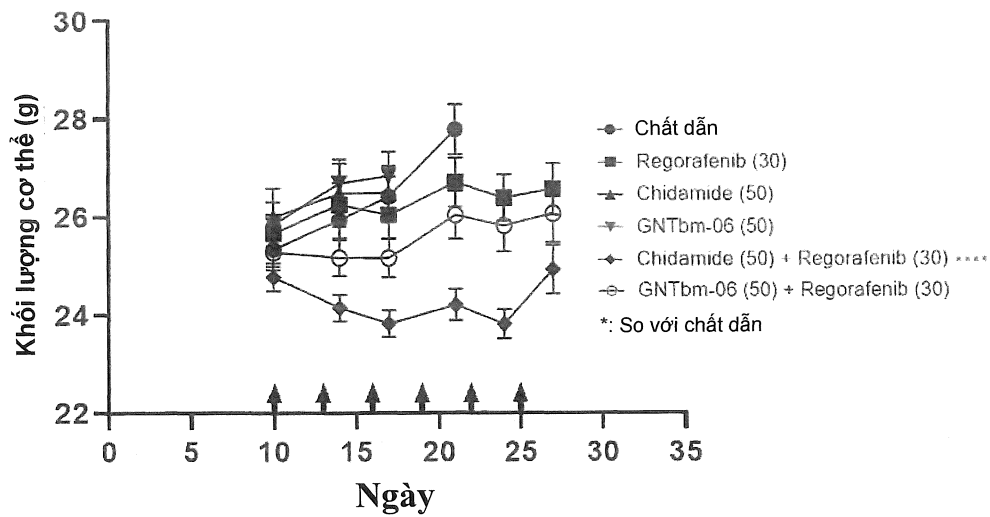


Fig. 14 (t)

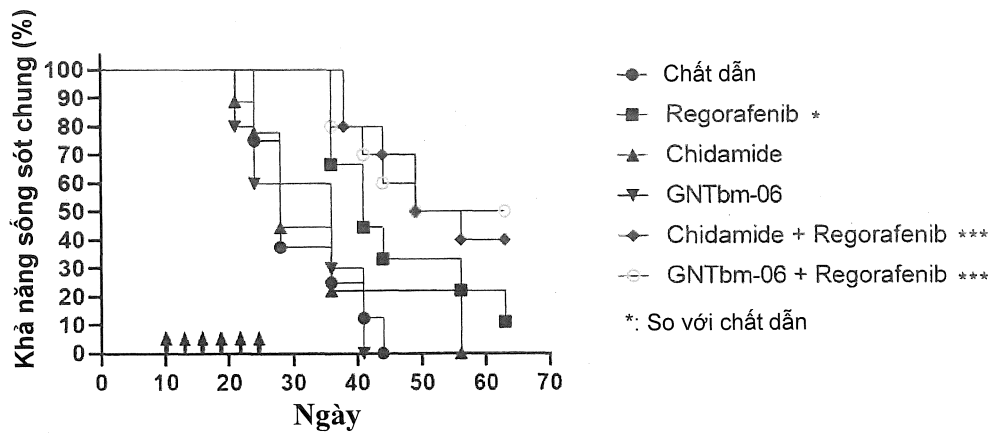


Fig. 14 (u)

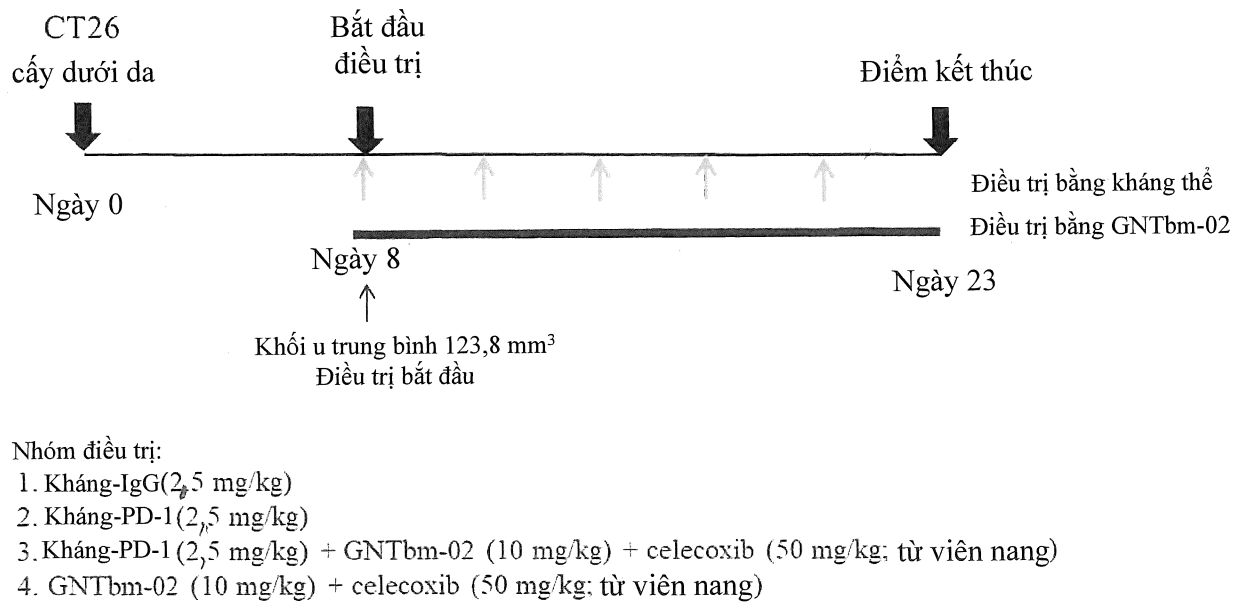


Fig. 15 (a)

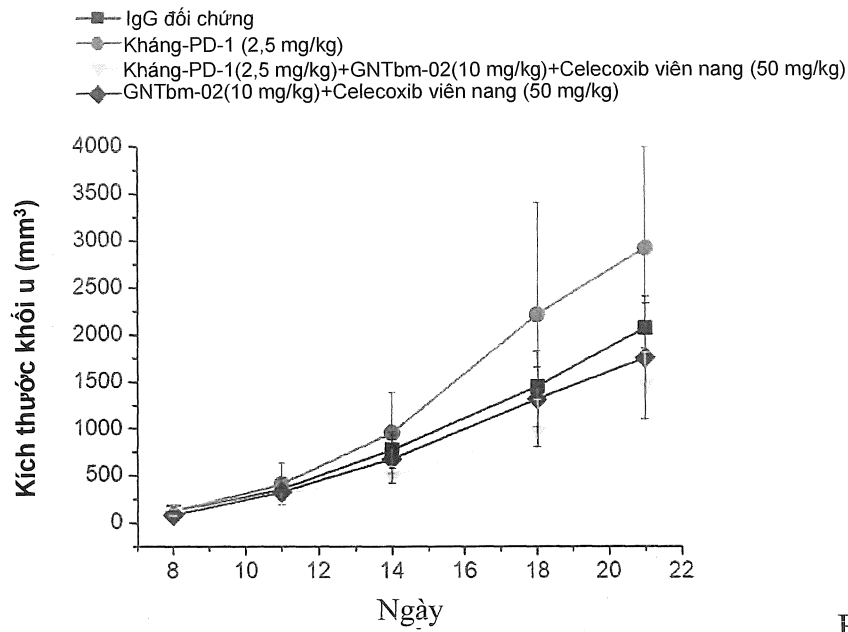


Fig. 15 (b)

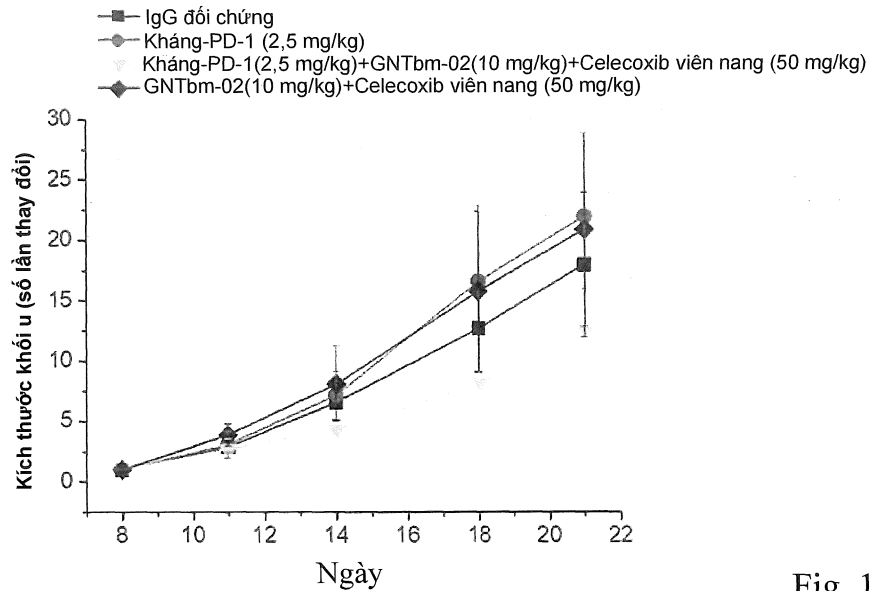


Fig. 15 (c)

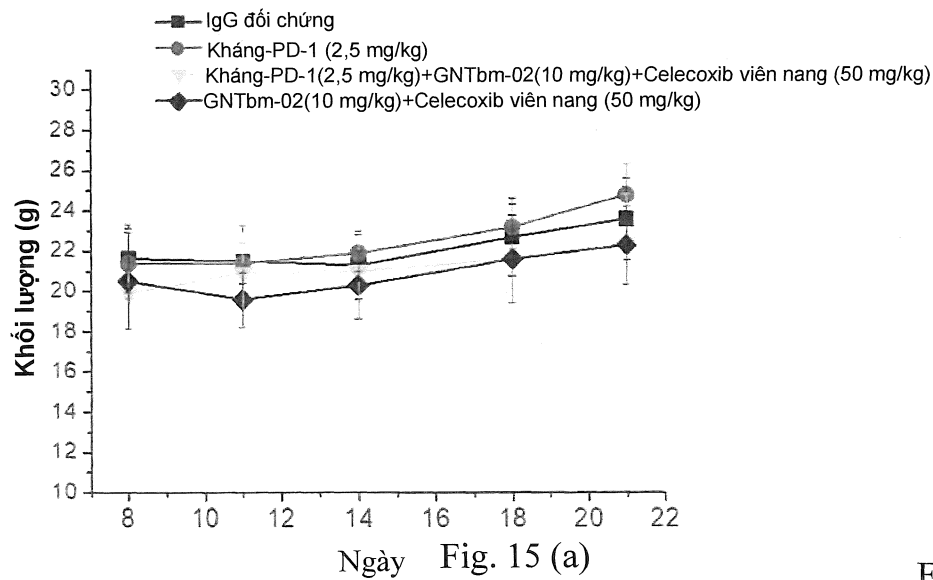
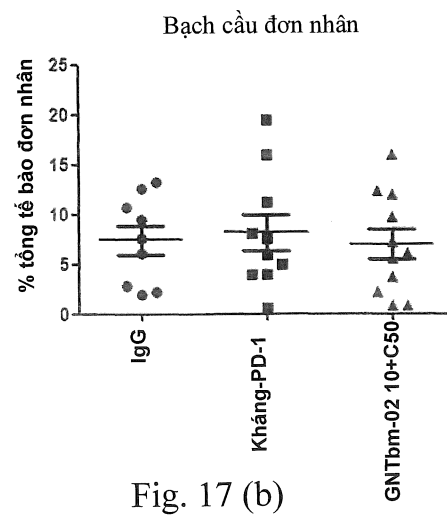
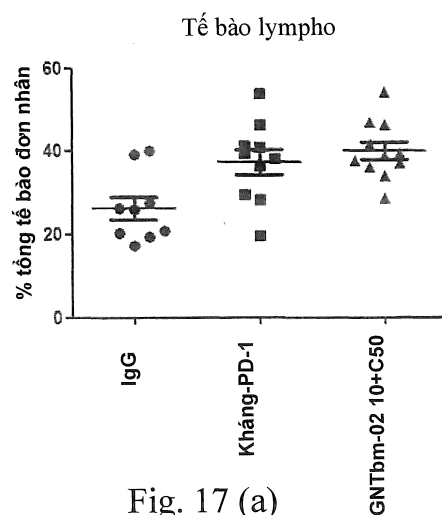
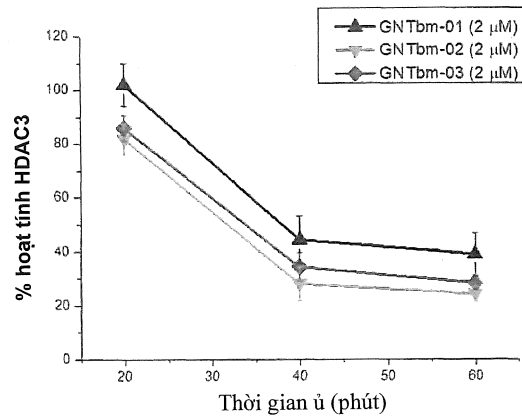
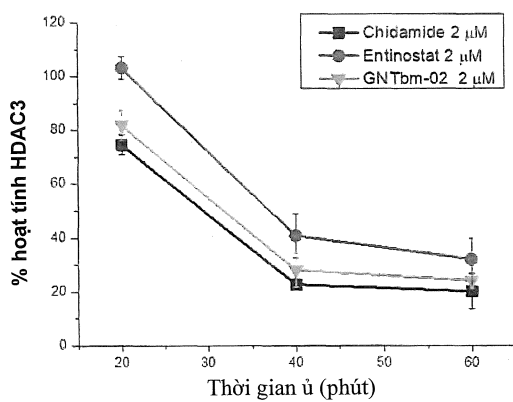
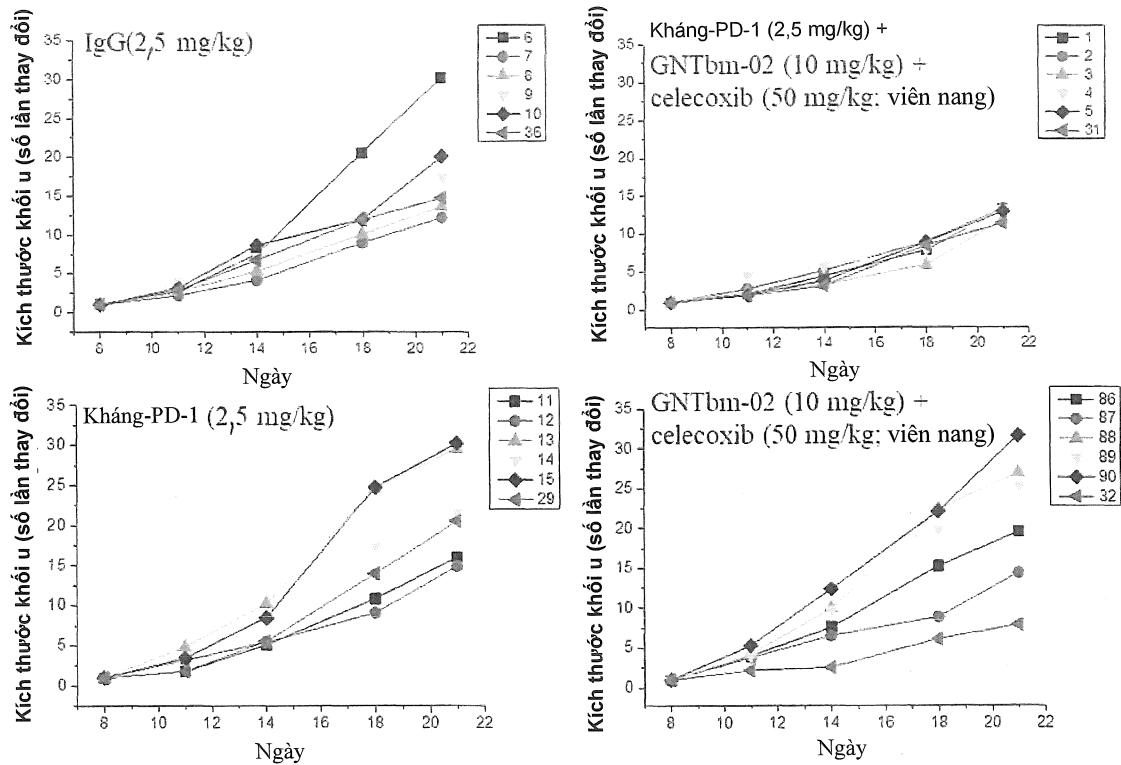


Fig. 15 (d)



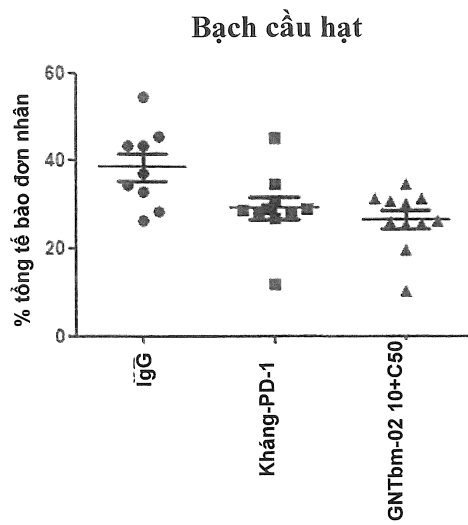


Fig. 17 (c)

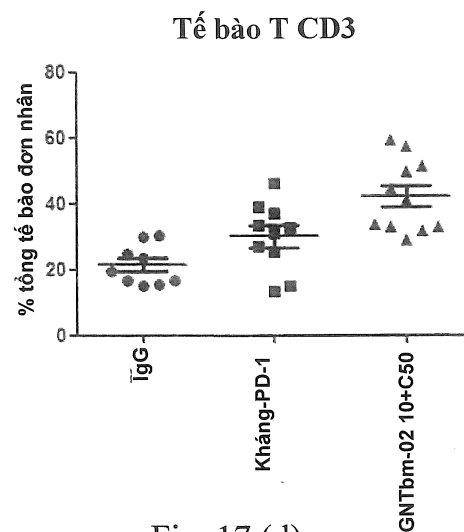


Fig. 17 (d)

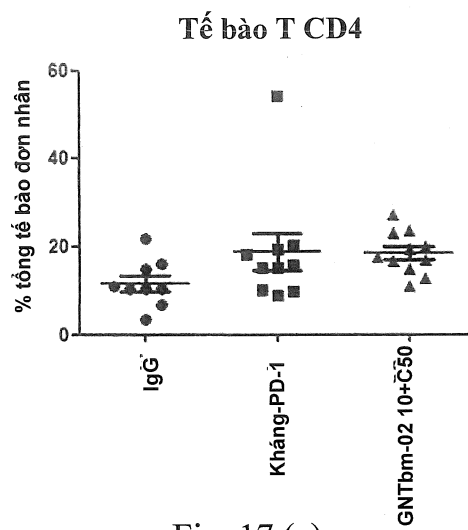


Fig. 17 (e)

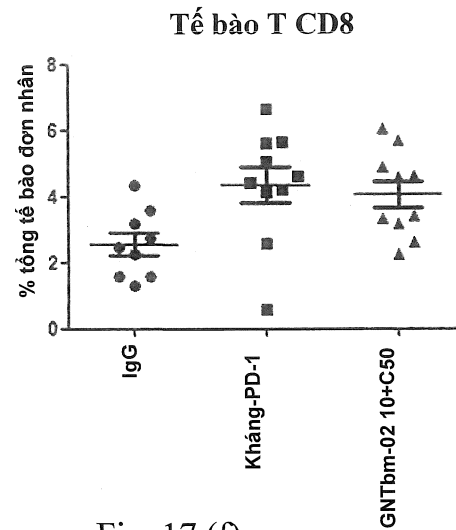


Fig. 17 (f)

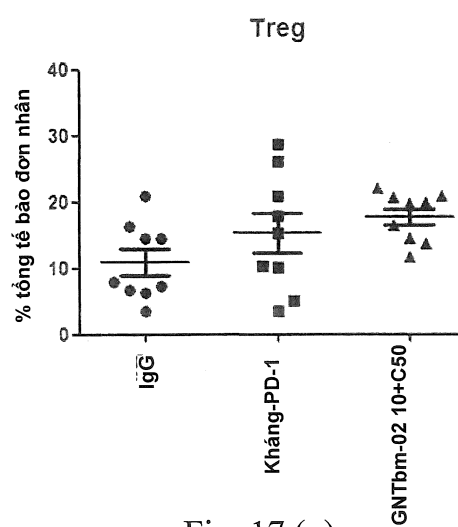


Fig. 17 (g)

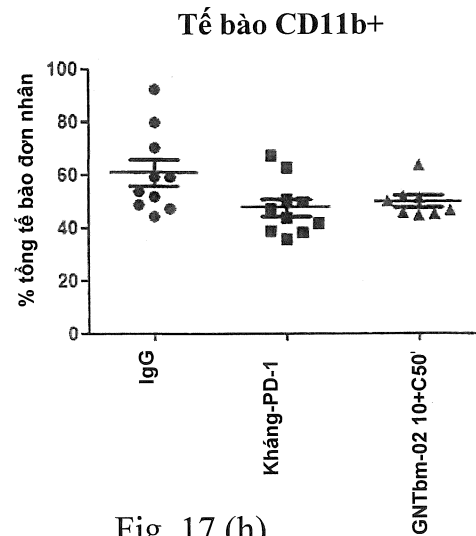


Fig. 17 (h)

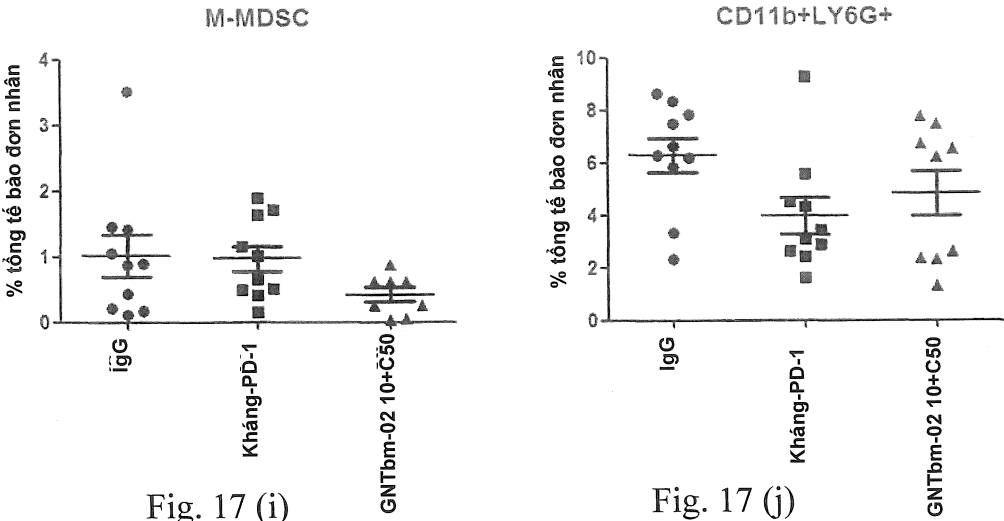


Fig. 17 (i)

Fig. 17 (j)

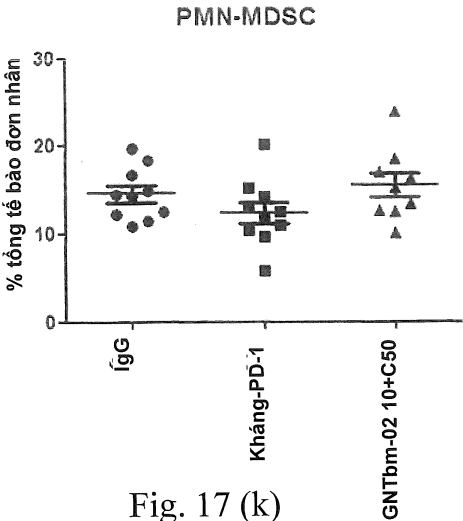


Fig. 17 (k)