



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

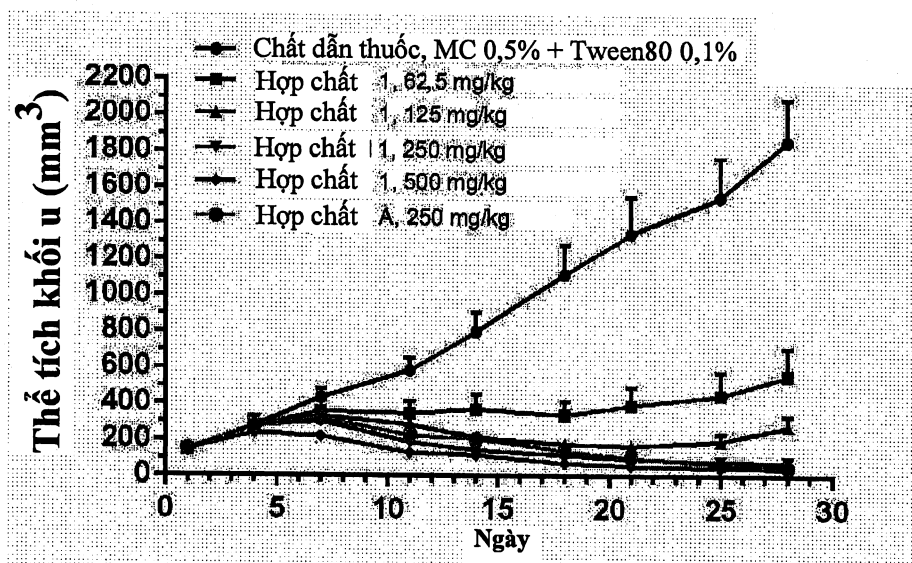
(11) 
1-0020407

(51)⁷ C07D 213/50, A61K 31/4412, 31/444, (13) B
A61P 35/00, C07D 401/12, 405/12,
407/12, 413/12, 413/14

- (21) 1-2015-01716 (22) 15.10.2013
(86) PCT/US2013/065126 15.10.2013 (87) WO2014/062732 24.04.2014
(30) 61/714,145 15.10.2012 US
61/714,140 15.10.2012 US
61/780,703 13.03.2013 US
61/786,277 14.03.2013 US
(45) 25.02.2019 371 (43) 25.09.2015 330
(73) EPIZYME, INC. (US)
400 Technology Square, 4th Floor, Cambridge, MA 02139, United States of America
(72) KUNTZ, Kevin, Wayne (US), CAMPBELL, John, Emmerson (US), SEKI, Masashi (JP)
(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT BENZEN ĐƯỢC THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất benzen được thể. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này. Các hợp chất và dược phẩm này có thể được sử dụng để điều trị rối loạn qua trung gian EZH2 ở đối tượng cần điều trị. Sáng chế còn đề cập đến hợp chất như vậy để sử dụng trong nghiên cứu hoặc các mục đích khác không phải để điều trị bệnh.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất benzen được thể. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

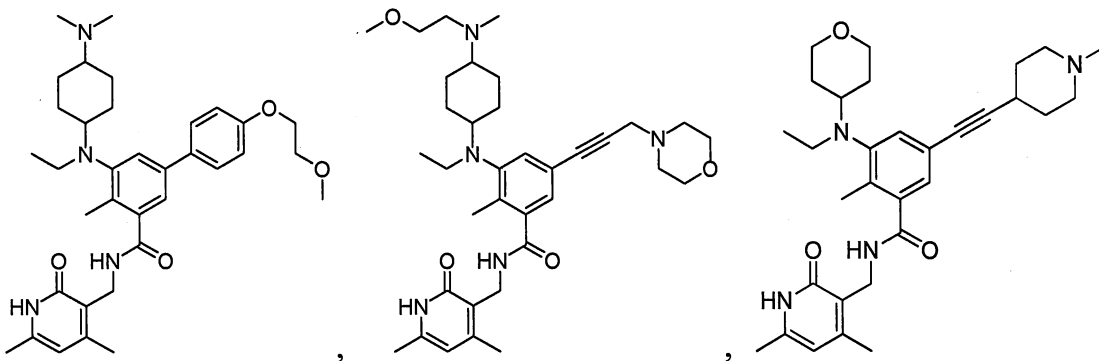
Các công bố đơn yêu cầu cấp patent số US 2012/0071418, WO 2012/142513, WO 2012/142504, và WO 2013/138361 mô tả, ít nhất một phần, các chất ức chế EZH2 và phương pháp điều trị ung thư. Tuy nhiên, cần phải có các tác nhân và các phương pháp điều trị ung thư bổ sung khác.

Luôn có nhu cầu không ngừng về chất mới làm chất ức chế hoạt tính của đoạn gen tăng cường thể tương đồng Zeste 2 (Enhancer of Zeste Homolog 2 - EZH2), mà có thể được sử dụng để điều trị rối loạn qua trung gian EZH2 (ví dụ, bệnh ung thư).

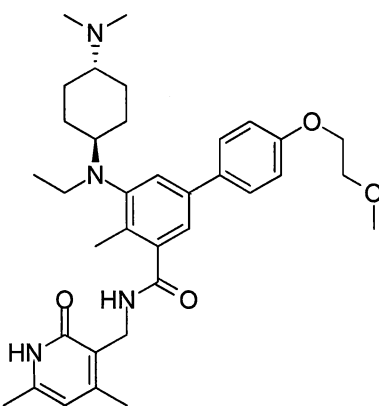
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm giải quyết các vấn đề kỹ thuật còn tồn tại như nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hợp chất benzen được thể được chọn từ:

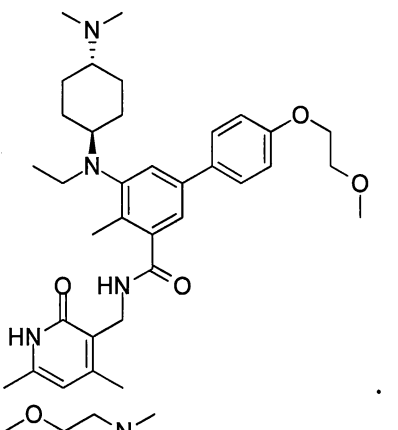


và muối được dụng của nó.

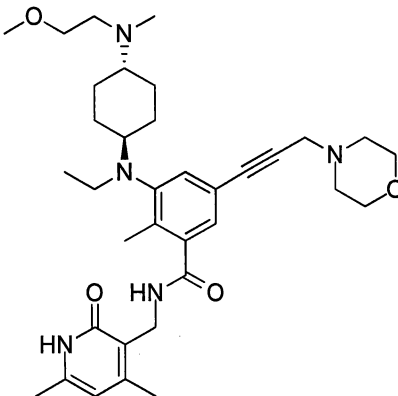


Ví dụ, hợp chất này là

hoặc muối được dụng của nó.

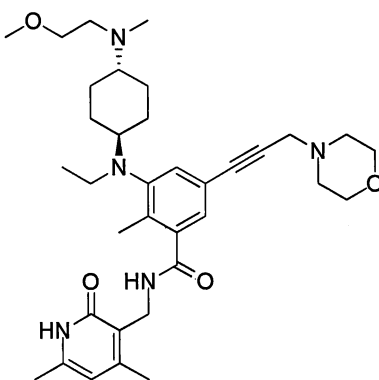


Ví dụ, hợp chất này là

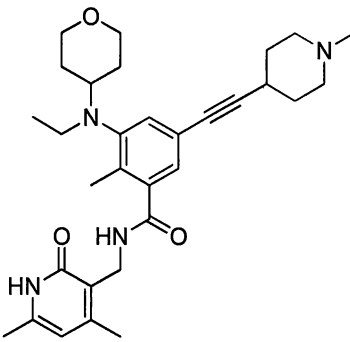


Ví dụ, hợp chất này là

hoặc muối được dụng của nó.

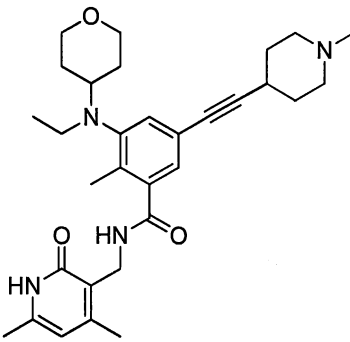


Ví dụ, hợp chất này là



Ví dụ, hợp chất này là

hoặc muối được dụng của nó.



Ví dụ, hợp chất này là

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa một hoặc nhiều chất mang được dụng và một hoặc nhiều hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này.

Một khía cạnh khác của sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn qua trung gian EZH2. Phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng có nhu cầu dùng lượng cho hiệu quả điều trị của một hoặc nhiều hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này. Rối loạn qua trung gian EZH2 là bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh lý mà được điều chỉnh ít nhất là một phần thông qua hoạt tính của EZH2. Theo một phương án, rối loạn qua trung gian EZH2 có liên quan đến hoạt tính EZH2 tăng lên. Theo một phương án, rối loạn qua trung gian EZH2 là bệnh ung thư. Bệnh ung thư qua trung gian EZH2 có thể là u lympho, bệnh bạch cầu hoặc u mêlanin, ví dụ, u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL), u lympho không Hodgkin (NHL), u lympho dạng nang, bệnh bạch cầu tủy xương mãn tính (CML), bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu lympho cấp tính, bệnh bạch cầu dòng hỗn hợp, hoặc hội chứng loạn sản tủy (MDS). Theo một phương án, bệnh ung thư qua trung gian EZH2 có thể là khối u hình gậy ác tính hoặc khối u thiếu hụt INI1. Việc chẩn đoán mô học của khối u hình gậy ác tính phụ thuộc vào việc nhận diện các tế bào hình gậy đặc trưng (các tế bào lớn với nhân nằm lệch tâm và tế bào chất dư, ưa eosin) và hóa mô miễn dịch với các kháng thể đối với vimentin, keratin và kháng nguyên màng biểu mô. Trong hầu hết các khối u hình gậy ác tính, gen SMARCB1/INI1, nằm ở dải nhiễm sắc thể 22q11.2, bị bất hoạt bởi

sự mất đoạn và/hoặc đột biến. Theo một phương án, khối u hình gậy ác tính có thể là khối u thiếu hụt INI1.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, phần mô tả bất kỳ về phương pháp điều trị sẽ bao gồm việc sử dụng các hợp chất theo sáng chế để thực hiện việc điều trị hoặc phòng ngừa này như được mô tả trong bản mô tả này, cũng như việc sử dụng hợp chất để bào chế thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh lý này. Việc điều trị bao gồm việc điều trị cho người hoặc động vật không phải người bao gồm động vật gặm nhấm và các mẫu bệnh khác.

Ngoài ra, các hợp chất hoặc các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để nghiên cứu (ví dụ, nghiên cứu enzym di truyền biểu sinh) và các mục đích khác không phải để điều trị bệnh.

Theo các phương án nhất định, hợp chất được ưu tiên bộc lộ trong bản mô tả này có các tính chất được lý và/hoặc được động học mong muốn, ví dụ, tốc độ thanh thải chậm và/hoặc hạn chế nguy cơ tương tác thuốc-thuốc có hại trong liệu pháp kết hợp được đánh giá, ví dụ, qua sự ức chế thuận nghịch và phụ thuộc thời gian của enzym P-450 xitôcrom.

Trừ khi được định nghĩa khác đi, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc về. Trong bản mô tả này, các dạng số ít cũng bao gồm nghĩa số nhiều trừ khi ngữ cảnh cho thấy rõ ràng ý nghĩa khác. Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm theo sáng chế, các phương pháp và nguyên liệu thích hợp được mô tả dưới đây. Tất cả các tài liệu công bố, đơn sáng chế, bằng sáng chế và các tài liệu tham khảo khác được đề cập đến ở trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích tham khảo. Các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong bản mô tả này không tạo thành tình trạng kỹ thuật của sáng chế được yêu cầu bảo hộ. Trong trường hợp có mâu thuẫn, thì bản mô tả sáng chế này, bao gồm các định nghĩa, sẽ được áp dụng. Ngoài ra, nguyên liệu, các phương pháp và các ví dụ chỉ nhằm mục đích minh họa và không làm giới hạn sáng chế. Trong trường hợp có mâu thuẫn giữa cấu trúc hóa học và tên của hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này, thì cấu trúc hóa học sẽ được áp dụng.

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng nhờ phần mô tả chi tiết sáng chế và các yêu cầu bảo hộ sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là biểu đồ thể hiện tác dụng kháng khối u của Hợp chất 1 hoặc Hợp chất A được dùng qua đường miệng chống lại mảnh ghép ngoại lai KARPAS-422 u lympho ở chuột nhắt. Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SD (n=10).

Fig. 2 là biểu đồ thể hiện tác động của Hợp chất 1 hoặc Hợp chất A lên cân nặng chuột nhắt. Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SD (n=10).

Fig. 3 là biểu đồ thể hiện lượng của hợp chất 1 trong khối u vào ngày 7 hoặc ngày 28 sau khi điều trị hoặc lượng của hợp chất A trong khối u vào ngày 7 sau khi điều trị. Trên hình vẽ này, từ “A” đến “G” biểu thị 7 ngày sau khi sử dụng hợp chất 1 lần lượt ở liều lượng 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3, và 500 mg/kg; “H” và “I” biểu thị 7 ngày sau khi sử dụng hợp chất A lần lượt ở liều lượng 125 và 250 mg/kg; và từ “J” đến “L” biểu thị 28 ngày sau khi sử dụng hợp chất 1 lần lượt ở liều lượng 62,5, 125 và 250 mg/kg.

Fig. 4 là biểu đồ thể hiện nồng độ của Hợp chất 1 hoặc Hợp chất A trong huyết tương vào ngày 7 hoặc ngày 28 sau khi điều trị. Đường nét đứt phía trên cho thấy LCC đã được hiệu chỉnh có tính đến sự liên kết với protein huyết tương (PPB) của hợp chất A và đường nét đứt phía dưới biểu thị LCC đã được hiệu chỉnh có tính đến PPB của hợp chất 1.

Fig. 5 là biểu đồ thể hiện mức độ methyl hóa H3K27me3 toàn bộ trong khối u KARPAS-422 từ chuột nhắt được điều trị bằng Hợp chất 1 hoặc Hợp chất A trong thời gian 7 ngày. Trên hình vẽ này, “A” biểu thị việc điều trị bằng chất dẫn thuốc; từ “B” đến “H” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất 1 lần lượt ở liều lượng 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3, và 500 mg/kg; và “I” và “J” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất A lần lượt ở liều lượng 125 và 250 mg/kg.

Fig. 6 là biểu đồ thể hiện mức độ methyl hóa H3K27me3 toàn bộ trong khối u KARPAS-422 từ chuột nhắt được điều trị bằng Hợp chất 1 trong thời gian 28 ngày.

Fig. 7 là biểu đồ thể hiện mức độ methyl hóa H3K27me3 toàn bộ trong tủy xương từ chuột nhắt mang khối u ghép ngoại lai KARPAS-422 được điều trị bằng Hợp chất 1 hoặc Hợp chất A trong thời gian 7 ngày. Trên hình vẽ này, “A” biểu thị việc điều trị bằng chất dẫn thuốc; từ “B” đến “H” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất 1 lần lượt ở liều lượng 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3, và 500 mg/kg; và “I” và “J” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất A lần lượt ở liều lượng 125 và 250 mg/kg.

Fig. 8 là biểu đồ thể hiện mức độ methyl hóa H3K27me3 toàn bộ trong tủy xương từ chuột nhắt mang khối u ghép ngoại lai KARPAS-422 điều trị bằng Hợp chất 1 trong thời gian 28 ngày. Trên hình vẽ này, “A” biểu thị việc điều trị bằng chất dẫn thuốc; từ “B” đến

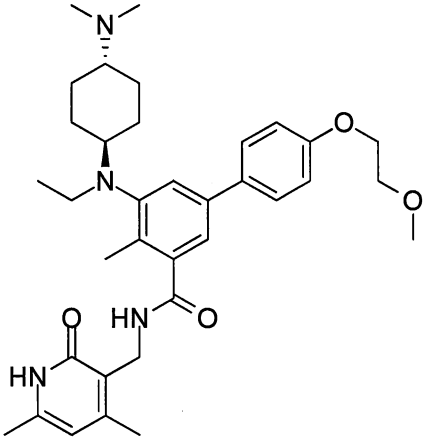
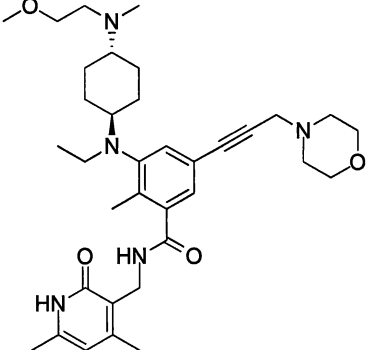
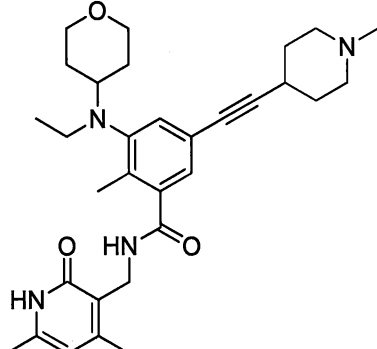
“E” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất 1 lần lượt ở liều lượng 62,5, 125, 250, và 500 mg/kg; và “F” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất A ở liều lượng 250 mg/kg.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất benzen được thể mới, phương pháp tổng hợp để tạo ra hợp chất này, được phẩm chứa chúng và các cách sử dụng khác nhau của hợp chất này.

Các hợp chất đại diện theo sáng chế bao gồm hợp chất được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1

Hợp chất số	Cấu trúc
1	
2	
105	

Trong bản mô tả sáng chế này, công thức cấu tạo của hợp chất thể hiện chất đồng phân nhất định để thuận tiện trong một số trường hợp, nhưng sáng chế có thể bao gồm tất cả các chất đồng phân, chẳng hạn như chất đồng phân dị hình, chất đồng phân quang học dựa trên cacbon không đối xứng, chất đồng phân lập thể, tautome, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân hình học, chất đồng phân không đối quang, chất triệt quang và chất tương tự, cần hiểu rằng không phải tất cả các chất đồng phân đều có thể có cùng mức độ hoạt tính. Ngoài ra, hiện tượng đa hình tinh thể có thể có mặt đối với hợp chất được thể hiện bằng công thức này. Cần lưu ý rằng dạng tinh thể bất kỳ, hỗn hợp các dạng tinh thể, hoặc anhydrit hoặc hydrat của chúng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

“Hiện tượng đồng phân” dùng để chỉ các hợp chất mà có công thức phân tử giống nhau nhưng khác nhau ở trình tự liên kết của các nguyên tử của chúng hoặc ở sự sắp xếp của các nguyên tử của chúng trong không gian. Các chất đồng phân mà khác nhau ở sự sắp xếp của các nguyên tử của chúng trong không gian được gọi là “chất đồng phân lập thể”. Chất đồng phân lập thể mà không phải là ảnh qua gương của nhau được gọi là “chất đồng phân không đối quang,” và chất đồng phân lập thể mà là ảnh qua gương của nhau không chồng khít lên nhau được gọi là “chất đồng phân đối ảnh” hoặc đôi khi được gọi là chất đồng phân quang học. Hỗn hợp chứa lượng bằng nhau của các dạng chất đồng phân đối ảnh riêng rẽ có tính không đối xứng gương ngược được gọi là “hỗn hợp triệt quang”.

“Chất đồng phân dị hình” dùng để chỉ chất đồng phân không đối quang mà sự tồn tại của chúng là do sự quay bị cản trở quanh liên kết đôi hoặc cầu nối xycloalkyl (ví dụ, 1,3-xyclobutyl). Các cấu hình này được phân biệt ở tên của chúng bằng tiền tố cis và trans, hoặc Z và E, mà chỉ ra rằng các nhóm nằm trên cùng một phía hoặc phía đối diện của liên kết đôi trong phân tử theo quy tắc Cahn-Ingold-Prelog.

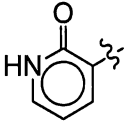
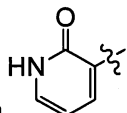
Cần hiểu rằng hợp chất theo sáng chế có thể được mô tả dưới dạng chất đồng phân lập thể. Cũng cần hiểu rằng khi hợp chất có các dạng đồng phân lập thể, thì tất cả các dạng đồng phân lập thể đều được dự định là được bao gồm trong phạm vi của sáng chế, cần hiểu rằng không phải tất cả các chất đồng phân lập thể đều có thể có cùng mức độ hoạt tính.

Hơn nữa, các cấu trúc và hợp chất khác được thảo luận trong sáng chế bao gồm tất cả các chất đồng phân atropic của chúng, cần hiểu rằng không phải tất cả các chất đồng phân atropic đều có thể có cùng mức độ hoạt tính. “Chất đồng phân atropic” là một loại của chất đồng phân lập thể trong đó nguyên tử của hai chất đồng phân được sắp xếp khác nhau trong không gian. Sự tồn tại của chất đồng phân atropic là do sự quay hạn chế gây ra bởi sự cản

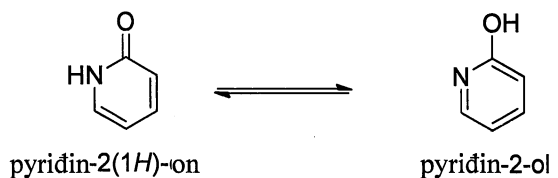
trở quay của nhóm lớn quanh liên kết trung tâm. Chất đồng phân atropic này thường tồn tại dưới dạng hỗn hợp, tuy nhiên nhờ kết quả của các cải tiến gần đây trong kỹ thuật sắc ký, đã có thể tách hỗn hợp của hai chất đồng phân atropic trong một số trường hợp chọn lọc.

“Tautome” là một trong số hai hoặc nhiều chất đồng phân cấu trúc mà tồn tại cân bằng và dễ dàng chuyển đổi từ dạng đồng phân này thành dạng kia. Sự chuyển đổi này dẫn đến sự di chuyển hình thức của nguyên tử hydro kèm theo sự chuyển đổi của liên kết đôi liên hợp liên kề. Tautome tồn tại dưới dạng hỗn hợp của tập hợp tautome trong dung dịch. Trong các dung dịch mà có thể tautome hóa, sự cân bằng hóa học của các tautome sẽ đạt được. Tỷ lệ chính xác của tautome phụ thuộc vào một vài yếu tố, bao gồm nhiệt độ, dung môi và độ pH. Khái niệm về việc tautome có thể chuyển đổi qua lại bởi sự tautome hóa được gọi là hiện tượng tautome.

Trong số các dạng hiện tượng tautome khác nhau có thể có, có hai hiện tượng tautome thường được quan sát thấy. Trong hiện tượng tautome keto-enol, xảy ra sự dịch chuyển đồng thời của điện tử và nguyên tử hydro. Hiện tượng tautome mạch vòng xuất hiện do kết quả của nhóm aldehyt (-CHO) trong phân tử mạch đường phản ứng với một trong số các nhóm hydroxy (-OH) trong cùng phân tử để làm cho nó trở thành dạng vòng (hình vòng) như thể hiện bởi glucoza.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, sự xuất hiện bất kỳ của  cần được hiểu là .

Các cặp tautome thông thường là: hiện tượng tautome keton-enol, amit-nitril, lactam-lactim, amit-axit imidic trong vòng dị vòng (ví dụ, trong nucleobazơ chẳng hạn như guanin, thymin và xytosin), imin-enamin và enamin-enamin. Ví dụ về sự cân bằng keto-enol là giữa pyridin-2(1H)-on và pyridin-2-ol tương ứng, như được thể hiện dưới đây.



Cần hiểu rằng hợp chất theo sáng chế có thể được mô tả dưới dạng các tautome khác nhau. Cũng cần hiểu rằng khi hợp chất có các dạng tautome, thì tất cả các dạng tautome đều

được dự định là được bao gồm trong phạm vi của sáng chế, và việc gọi tên các hợp chất này không loại trừ dạng tautome bất kỳ. Cần hiểu rằng một số tautome nhất định có thể có mức độ hoạt tính cao hơn các tautome khác.

Thuật ngữ “dạng đa hình tinh thể”, “dạng đa hình” hoặc “dạng tinh thể” dùng để chỉ cấu trúc tinh thể trong đó hợp chất (hoặc muối hoặc solvat của nó) có thể kết tinh trong các cấu trúc đóng gói tinh thể khác nhau, tất cả chúng đều có cùng thành phần nguyên tố giống nhau. Các dạng tinh thể khác nhau thường có các mẫu nhiễu xạ tia X, quang phổ hồng ngoại, điểm nóng chảy, tỷ trọng, độ cứng, hình dạng tinh thể, tính chất quang học và điện, độ ổn định và khả năng hòa tan khác nhau. Dung môi tái kết tinh, tốc độ kết tinh, nhiệt độ bảo quản, và các yếu tố khác có thể làm cho một dạng tinh thể trở nên chiếm số lượng lớn. Dạng đa hình tinh thể của hợp chất có thể được điều chế bằng cách kết tinh trong các điều kiện khác nhau.

Hợp chất theo sáng chế bao gồm bản thân hợp chất, chẳng hạn như có công thức bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này. Hợp chất theo sáng chế cũng có thể bao gồm muối của chúng, và solvat của nó, nếu có thể. Muối, ví dụ, có thể được tạo thành giữa anion và nhóm tích điện dương (ví dụ, amino) trên hợp chất benzen được thế. Anion thích hợp bao gồm clorua, bromua, iodua, sulfat, bisulfat, sulfamat, nitrat, phosphat, xitrat, metansulfonat, trifloaxetat, glutamat, glucuronat, glutarat, malat, maleat, succinat, fumarat, tartrat, tosylat, salixylat, lactat, naphthalensulfonat, và axetat (ví dụ, trifloaxetat). Thuật ngữ “anion được dụng” dùng để chỉ anion thích hợp để tạo ra muối được dụng. Tương tự, muối cũng có thể được tạo thành giữa cation và nhóm tích điện âm (ví dụ, carboxylat) trên hợp chất benzen được thế. Cation thích hợp bao gồm ion natri, ion kali, ion magie, ion canxi, và cation amoni chẳng hạn như ion tetrametylamoni. Hợp chất benzen được thế cũng bao gồm các muối chứa nguyên tử nitơ bậc bốn.

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế, ví dụ, muối của hợp chất, có thể tồn tại ở dạng được hydrat hóa hoặc không được hydrat hóa (khan) hoặc dưới dạng solvat với phân tử dung môi khác. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về hydrat bao gồm monohydrat, đihydrat, v.v.. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về solvat bao gồm etanol solvat, axeton solvat, v.v..

“Solvat” dùng để chỉ dạng cộng dung môi mà chứa lượng dung môi theo tỷ lệ hoặc không tỷ lệ. Một số hợp chất có khuynh hướng giữ tỷ lệ mol cố định của phân tử dung môi ở trạng thái rắn kết tinh, do đó tạo ra solvat. Nếu dung môi là nước thì solvat được

tạo thành là hydrat; và nếu dung môi là rượu, thì solvat được tạo thành là alcolat. Hydrat được tạo thành bởi sự kết hợp của một hoặc nhiều phân tử nước với một phân tử của chất trong đó nước giữ được trạng thái phân tử của nó là H_2O .

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất tương tự” dùng để chỉ hợp chất hóa học mà tương tự về mặt cấu trúc với hợp chất khác nhưng khác một chút ở hợp phần (như thay thế một nguyên tử này bằng một nguyên tử của nguyên tố khác hoặc ở sự có mặt của nhóm chức cụ thể, hoặc sự thay thế một nhóm chức này bằng nhóm chức khác). Do đó, chất tương tự là hợp chất mà tương tự hoặc tương đương về mặt chức năng và hình dạng ngoài, chứ không phải ở cấu trúc hoặc nguồn gốc so với hợp chất tham chiếu.

Như được xác định trong bản mô tả này, thuật ngữ “dẫn xuất” dùng để chỉ hợp chất có cấu trúc lõi chung, và được thể bằng các nhóm khác nhau như được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, tất cả các hợp chất trong Bảng 1 là hợp chất benzen được thế, và có lõi chung.

Thuật ngữ “chất đẳng cấu điện tử sinh học” dùng để chỉ hợp chất bắt nguồn từ sự trao đổi nguyên tử hoặc nhóm nguyên tử với nguyên tử hoặc nhóm nguyên tử khác có tính tương tự cao. Mục đích của sự thay thế đẳng cấu điện tử sinh học là để tạo ra hợp chất mới có tính chất sinh học tương tự với hợp chất gốc. Sự thay thế đẳng cấu điện tử sinh học có thể là trên cơ sở hóa lý hoặc topo. Ví dụ về chất đẳng cấu điện tử sinh học axit carboxylic bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axyl sulfonimit, tetrazol, sulfonat và phosphonat. Xem tài liệu, ví dụ, Patani and LaVoie, *Chem. Rev.* 96, 3147-3176, 1996.

Sáng chế đề cập đến tất cả các chất đồng vị của các nguyên tử có mặt trong hợp chất này. Chất đồng vị bao gồm các nguyên tử có cùng số nguyên tử nhưng khác ở số khối. Ví dụ chung và không làm giới hạn sáng chế là, chất đồng vị của hydro bao gồm triti và đơtri, và chất đồng vị của cacbon bao gồm C-13 và C-14.

Sáng chế đề xuất các phương pháp tổng hợp hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tổng hợp chi tiết của các hợp chất khác nhau được bộc lộ theo sáng chế theo các sơ đồ như được thể hiện trong các ví dụ.

Trong toàn bộ bản mô tả này, khi các chế phẩm được mô tả là có, bao gồm, hoặc chứa các thành phần cụ thể, thì nó bao hàm rằng các chế phẩm này cũng chủ yếu bao gồm, hoặc bao gồm, các thành phần đã được chỉ ra. Tương tự, khi các phương pháp hoặc quy trình được mô tả là có, bao gồm, hoặc chứa các bước xử lý cụ thể, thì quy trình này cũng chủ yếu bao gồm, hoặc bao gồm, các bước xử lý đã được chỉ ra. Ngoài ra, cần hiểu rằng thứ tự của các bước hoặc thứ tự để thực hiện các thao tác nhất định là không quan trọng miễn là

sáng chế vẫn có thể thực hiện được. Hơn nữa, hai hoặc nhiều bước hoặc thao tác có thể được thực hiện đồng thời.

Quy trình tổng hợp theo sáng chế có thể áp dụng được cho nhiều nhóm chức khác nhau, do đó nhiều nguyên liệu ban đầu được thể khác nhau có thể được sử dụng. Quy trình thường tạo ra hợp chất cuối cùng mong muốn khi kết thúc hoặc gần kết thúc quy trình chung, mặc dù trong một số trường hợp nhất định có thể mong muốn chuyển đổi tiếp hợp chất thành muối được dụng của nó.

Hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế theo nhiều cách khác nhau bằng cách sử dụng các nguyên liệu ban đầu có sẵn trên thị trường, hợp chất đã biết trong tài liệu, hoặc từ hợp chất trung gian được điều chế dễ dàng, bằng cách áp dụng phương pháp và quy trình tổng hợp tiêu chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, hoặc sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhờ các hướng dẫn trong bản mô tả này. Phương pháp và quy trình tổng hợp tiêu chuẩn để điều chế phân tử hữu cơ và chuyển hóa và xử lý nhóm chức có thể được nêu trong tài liệu khoa học liên quan hoặc trong sách giáo khoa chuẩn trong lĩnh vực. Mặc dù không giới hạn ở một hoặc một vài nguồn bất kỳ, các tài liệu kinh điển chẳng hạn như Smith, M. B., March, J., *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th edition, John Wiley & Sons: New York, 2001; Greene, T.W., Wuts, P.G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons: New York, 1999; R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); và L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), là các sách giáo khoa tham khảo hữu ích và đã được thừa nhận về việc tổng hợp hữu cơ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Phần mô tả sau đây về phương pháp tổng hợp được thiết kế để minh họa, chứ không làm giới hạn, các quy trình chung để điều chế của các hợp chất theo sáng chế.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng các nhóm nhất định có thể cần phải được bảo vệ trong một số điều kiện phản ứng thông qua việc sử dụng nhóm bảo vệ. Nhóm bảo vệ cũng có thể được sử dụng để phân biệt các nhóm chức tương tự nhau trong một phân tử. Danh sách các nhóm bảo vệ và việc làm thế nào để đưa vào và loại bỏ các nhóm này có thể được tìm thấy trong tài liệu Greene, T.W., Wuts, P.G.

M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons: New York, 1999.

Nhóm bảo vệ được ưu tiên bao gồm, nhưng không giới hạn ở:

Đối với gốc hydroxyl: TBS, benzyl, THP, Ac

Đối với axit carboxylic: benzyl este, metyl este, etyl este, allyl este

Đối với amin: Cbz, BOC, DMB

Đối với diol: Ac (x2) TBS (x2), hoặc khi kết hợp với axetonit

Đối với thiol: Ac

Đối với benzimidazol: SEM, benzyl, PMB, DMB

Đối với aldehyt: di-alkyl axetal chẳng hạn như dimetoxyl axetal hoặc diethyl axetyl.

Trong các sơ đồ phản ứng được mô tả trong bản mô tả này, nhiều chất đồng phân lập thể có thể được tạo ra. Khi không chỉ ra chất đồng phân lập thể cụ thể, cần hiểu có nghĩa là tất cả các chất đồng phân lập thể có thể có mà có thể được tạo ra từ phản ứng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng phản ứng có thể được tối ưu hóa để ưu tiên tạo ra một chất đồng phân, hoặc sơ đồ mới có thể được tạo ra để điều chế một chất đồng phân đơn lẻ. Nếu hỗn hợp được tạo ra, thì các kỹ thuật chẳng hạn như sắc ký lớp mỏng điều chế, HPLC điều chế, HPLC bất đối xứng điều chế, hoặc SFC điều chế có thể được sử dụng để tách các chất đồng phân này.

Các chữ viết tắt sau đây được sử dụng trong toàn bộ bản mô tả và được xác định dưới đây:

Ac	axetyl
AcOH	axit axetic
aq.	trong nước
BID hoặc b.i.d.	hai lần mỗi ngày (hai lần một ngày)
BOC	tert-butoxy cacbonyl
Cbz	benzyloxy cacbonyl
CDCl ₃	clorofom được đơteri hóa
CH ₂ Cl ₂	điclometan
DCM	điclometan
DMB	2,4 dimetoxyl benzyl
DMF	N,N-Dimetylformamit
DMSO	Dimetyl sulfoxit

EA hoặc EtOAc	Etyl axetat
EDC hoặc EDCI	N-(3-Đimetylaminopropyl)-N'-etylcarbodiimit
ESI-	Chế độ phun điện tử âm
ESI+	Chế độ phun điện tử dương
EtOH	etanol
h	giờ
H ₂ O	nước
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HCl	hydro clorua hoặc axit clohydric
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
K ₂ CO ₃	kali cacbonat
LC/MS hoặc LC-MS	Sắc ký lỏng khối phổ
M	Mol
MeCN	Axetonitril
min	phút
Na ₂ CO ₃	natri cacbonat
Na ₂ SO ₄	natri sulfat
NaHCO ₃	natri bicacbonat
NaHMDs	Natri hexametyldisilazit
NaOH	natri hydroxit
NaHCO ₃	natri bicacbonat
Na ₂ SO ₄	natri sulfat
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân
Pd(OH) ₂	Paladi dihydroxit
PMB	para metoxybenzyl
p.o.	qua miệng (dùng qua đường miệng)
ppm	phần triệu
prep HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế
PYBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrolidinophosphi hexaflophosphat
Rt hoặc RT	Nhiệt độ trong phòng
TBME	<i>tert</i> -Butyl metyl ete

TFA	axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyran

Hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế thích hợp bằng nhiều phương pháp quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Hợp chất theo sáng chế có công thức bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được điều chế theo quy trình được minh họa trong các ví dụ dưới đây, từ nguyên liệu ban đầu có sẵn trên thị trường hoặc nguyên liệu ban đầu mà có thể được điều chế bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong tài liệu.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng, trong các trình tự phản ứng và sơ đồ tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này, thứ tự của các bước nhất định có thể được thay đổi, chẳng hạn như việc đưa vào và loại bỏ nhóm bảo vệ.

Hợp chất theo sáng chế ức chế hoạt tính histon methyltransferaza của EZH2 hoặc thể đột biến của chúng và, theo đó, theo một khía cạnh theo sáng chế, các hợp chất nhất định được bộc lộ trong bản mô tả này là hợp chất ứng viên có thể dùng để điều trị, hoặc ngăn ngừa các tình trạng bệnh lý và bệnh nhất định trong đó EZH2 có đóng vai trò nào đó. Sáng chế đề xuất các phương pháp để điều trị tình trạng bệnh lý và bệnh mà tiến trình của chúng có thể bị ảnh hưởng bằng cách điều biến tình trạng methyl hóa của histon hoặc các protein khác, trong đó tình trạng methyl hóa này được điều hòa ít nhất một phần bởi hoạt tính của EZH2. Việc điều hòa tình trạng methyl hóa của histon sau đó có thể ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của gen đích được hoạt hóa bởi việc methyl hóa, và/hoặc gen đích bị ức chế bởi việc methyl hóa. Phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị dùng lượng cho hiệu quả điều trị của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối, chất đa hình, solvat, hoặc chất đồng phân lập thể được dụng của nó.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, phần mô tả bất kỳ về phương pháp điều trị sẽ bao gồm việc sử dụng các hợp chất theo sáng chế để thực hiện việc điều trị hoặc phòng ngừa này như được mô tả trong bản mô tả này, cũng như việc sử dụng hợp chất để bào chế thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh lý này. Việc điều trị này bao gồm việc điều trị cho người hoặc động vật không phải người bao gồm động vật gặm nhấm và các mẫu bệnh khác.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều biến hoạt tính của EZH2, tiểu đơn vị xúc tác của phức hợp PRC2 mà xúc tác cho việc methyl hóa một lần đến methyl hóa ba lần của lysin 27 trên histon H3 (H3-K27) ở đối tượng có nhu cầu. Ví dụ, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng mắc bệnh ung thư có biểu hiện EZH2 đột

biến dùng lượng cho hiệu quả điều trị của hợp chất được mô tả trong bản mô tả này, trong đó (các) hợp chất này ức chế hoạt tính histon methyltransferaza của EZH2, bằng cách đó điều trị bệnh ung thư.

Ví dụ, bệnh ung thư qua trung gian EZH2 được chọn từ nhóm bao gồm u lympho dạng nang và u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL) của kiểu phụ giống tế bào B trung tâm mầm (GCB). Ví dụ, bệnh ung thư là u lympho, bệnh bạch cầu hoặc u melanin. Tốt hơn là, u lympho là u lympho không Hodgkin (NHL), u lympho dạng nang hoặc u lympho tế bào B lớn lan tỏa. Theo cách khác, bệnh bạch cầu là bệnh bạch cầu tủy xương mãn tính (CML), bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu lympho cấp tính hoặc bệnh bạch cầu dòng hỗn hợp.

Ví dụ, tình trạng bệnh lý tiền ung thư qua trung gian EZH2 là hội chứng loạn sản tủy (MDS, trước đây gọi là bệnh bạch cầu cấp tính).

Ví dụ, bệnh ung thư qua trung gian EZH2 là bệnh ung thư máu.

(Các) hợp chất theo sáng chế ức chế hoạt tính histon methyltransferaza của EZH2 hoặc thể đột biến của nó và, theo đó, sáng chế còn đề cập đến các phương pháp để điều trị tình trạng bệnh lý và bệnh mà tiến trình của chúng có thể bị ảnh hưởng bằng cách điều biến tình trạng methyl hóa của histon hoặc các protein khác, trong đó tình trạng methyl hóa này được điều hòa ít nhất một phần bởi hoạt tính của EZH2. Theo một khía cạnh theo sáng chế, các hợp chất nhất định được bộc lộ trong bản mô tả này là hợp chất ứng viên có thể dùng để điều trị, hoặc ngăn ngừa các tình trạng bệnh lý và bệnh nhất định. Việc điều hòa tình trạng methyl hóa của histon sau đó có thể ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của gen đích được hoạt hóa bởi việc methyl hóa, và/hoặc gen đích bị ức chế bởi việc methyl hóa. Phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị dùng lượng cho hiệu quả điều trị của hợp chất theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “đối tượng” có thể dùng thay đổi với “đối tượng có nhu cầu”, cả hai thuật ngữ này dùng để chỉ đối tượng có rối loạn trong đó sự methyl hóa protein qua trung gian EZH2 đóng một phần vai trò, hoặc đối tượng có nguy cơ phát triển rối loạn này cao so với số đông trong quần thể. “Đối tượng” bao gồm động vật có vú. Động vật có vú có thể là *ví dụ*, người hoặc động vật có vú thích hợp không phải là người, chẳng hạn như động vật linh trưởng, chuột nhắt, chuột cống, chó, mèo, bò, ngựa, dê, lạc đà, cừu hoặc lợn. Đối tượng cũng có thể là chim hoặc gà. Theo một phương án, động vật có vú là người. Đối tượng có nhu cầu có thể là người đã được chẩn đoán hoặc được xác định từ

trước là mắc bệnh ung thư hoặc tình trạng bệnh lý tiền ung thư. Đối tượng có nhu cầu cũng có thể là người đã mắc (ví dụ, đang mắc phải) bệnh ung thư hoặc tình trạng bệnh lý tiền ung thư. Theo cách khác, đối tượng có nhu cầu có thể là người có nguy cơ phát triển rối loạn này cao so với số đông trong quần thể (*tức là*, đối tượng có khả năng phát triển rối loạn này so với số đông trong quần thể). Đối tượng có nhu cầu có thể có tình trạng bệnh lý tiền ung thư. Đối tượng có nhu cầu có thể mắc bệnh ung thư chống lại hoặc kháng (*tức là*, bệnh ung thư mà không đáp ứng hoặc vẫn chưa đáp ứng đối với việc điều trị). Đối tượng có thể kháng điều trị khi bắt đầu việc điều trị hoặc có thể phát triển tính kháng trong quá trình điều trị. Theo một số phương án, đối tượng có nhu cầu bị tái phát ung thư sau khi có tình trạng thuyên giảm nhờ liệu pháp điều trị gần nhất. Theo một số phương án, đối tượng có nhu cầu đã dùng và đều không cho kết quả khi sử dụng tất cả các liệu pháp hiện có và được biết là để điều trị bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng có nhu cầu đã dùng ít nhất một liệu pháp điều trị trước đó. Theo phương án được ưu tiên, đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc tình trạng bệnh lý ung thư. Ví dụ, bệnh ung thư là u lympho, bệnh bạch cầu, u mêlanin, hoặc sacôm nguyên bào cơ vân. Tốt hơn là, u lympho là u lympho không Hodgkin, u lympho dạng nang hoặc u lympho tế bào B lớn lan tỏa. Theo cách khác, bệnh bạch cầu là bệnh bạch cầu tủy xương mãn tính (CML). Tình trạng bệnh lý tiền ung thư là hội chứng loạn sản tủy (MDS, trước đây gọi là tiền bệnh bạch cầu).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “việc điều trị” hoặc “điều trị” mô tả việc kiểm soát và chăm sóc bệnh nhân nhằm mục đích chiến đấu với bệnh, tình trạng bệnh lý, hoặc rối loạn và bao gồm việc dùng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối, chất đa hình hoặc solvat được dụng của chúng, để làm giảm bớt các triệu chứng hoặc biến chứng của bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn, hoặc để loại trừ bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn. Thuật ngữ “điều trị” cũng có thể bao gồm việc xử lý tế bào *in vitro* hoặc mẫu động vật.

Hợp chất theo sáng chế, hoặc muối, chất đa hình hoặc solvat được dụng của chúng, có thể hoặc cũng có thể được sử dụng để ngăn ngừa bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn liên quan, hoặc được sử dụng để xác định các liệu pháp thích hợp cho mục đích này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “việc ngăn ngừa,” “ngăn ngừa,” hoặc “bảo vệ chống lại” mô tả việc làm giảm hoặc loại trừ sự khởi phát của các triệu chứng hoặc biến chứng của bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn này.

Các đột biến điểm của gen EZH2 ở một gốc axit amin đơn lẻ (ví dụ, Y641, A677, và A687) của EZH2 đã được báo cáo là có mối quan hệ với u lympho. Các ví dụ khác về các

đột biến của EZH2 và các phương pháp phát hiện các đột biến này và các phương pháp điều trị rối loạn có liên quan đến các đột biến đó được mô tả trong tài liệu, ví dụ, công bố đơn sáng chế Mỹ số US 20130040906.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tham khảo các tài liệu tham khảo chung có nội dung mô tả chi tiết các kỹ thuật đã biết mà được thảo luận trong bản mô tả này hoặc các kỹ thuật tương đương. Các tài liệu này bao gồm Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (2005); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2000); Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Enna *et al.*, *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Fingl *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (1975), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition (1990). Tất nhiên, các tài liệu này cũng có thể được đề cập đến khi tạo ra hoặc sử dụng khía cạnh của sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “liệu pháp kết hợp” hoặc “liệu pháp cùng dùng” bao gồm việc dùng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối, chất đa hình hoặc solvat được dùng của chúng, và ít nhất một chất thứ hai dưới dạng một phần của chế độ điều trị cụ thể được dự định để tạo ra tác dụng có lợi từ tác động phối hợp của các chất trị liệu này. Tác dụng có lợi của sự kết hợp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tác động phối hợp được động học hoặc dược lực học bắt nguồn từ việc kết hợp các chất trị liệu.

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này kết hợp với ít nhất một tá dược hoặc chất mang dược dụng.

“Dược phẩm” là chế phẩm chứa hợp chất theo sáng chế ở dạng thích hợp để dùng cho đối tượng. Theo một phương án, dược phẩm là ở dạng khối lớn hoặc ở dạng liều đơn vị. Dạng liều đơn vị là dạng bất kỳ trong số nhiều dạng, bao gồm, ví dụ, viên nang, túi dùng qua đường tĩnh mạch (IV), viên nén, bơm đơn lẻ trên dụng cụ để xông sol khí hoặc lọ. Lượng thành phần hoạt tính (*ví dụ*, chế phẩm chứa hợp chất được bộc lộ hoặc muối, hydrat, solvat hoặc chất đồng phân của chúng) trong liều đơn vị của dược phẩm là lượng hữu hiệu và thay đổi theo chế độ điều trị cụ thể liên quan. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ rằng đôi khi cần phải thay đổi liều lượng nêu trên tùy thuộc vào tuổi và tình trạng bệnh lý của bệnh nhân. Liều lượng cũng sẽ phụ thuộc vào đường dùng. Nhiều đường dùng được dự định, bao gồm đường miệng, phổi, trực tràng, ngoài đường tiêu hóa, qua da, dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, xông, trong khoang má,

dưới lưỡi, trong màng phổi, trong vỏ, trong mũi, và các đường dùng tương tự. Dạng liều lượng để dùng tại chỗ hoặc qua da của hợp chất theo sáng chế bao gồm bột, khí dung, thuốc mỡ, hồ bột, kem, thuốc xức, gel, dung dịch, cao dán và thuốc xông. Theo một phương án, hoạt chất được trộn trong điều kiện vô trùng với chất mang được dụng, và với chất bảo quản, chất đệm, hoặc chất đẩy bất kỳ khi cần thiết.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ “được dụng” dùng để chỉ các hợp chất, anion, cation, nguyên liệu, chế phẩm, chất mang, và/hoặc dạng liều mà, trong phạm vi của đánh giá y tế hợp lý, thích hợp khi tiếp xúc với mô của người và động vật mà không gây độc, kích thích, đáp ứng dị ứng quá mức, hoặc gây ra các vấn đề hoặc biến chứng khác, phù hợp với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ cho phép.

“Tá dược được dụng” dùng để chỉ tá dược hữu ích trong việc bào chế dược phẩm mà nhìn chung là an toàn, không độc và không có tác dụng không mong muốn về mặt sinh học hay mặt khác, và bao gồm tá dược được phép để sử dụng cho thú y cũng như sử dụng trong dược phẩm cho người. “Tá dược được dụng” như được sử dụng trong bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ bao gồm một tá dược và nhiều tá dược như vậy.

Dược phẩm theo sáng chế được bào chế phù hợp với đường dùng dự định. Ví dụ về đường dùng bao gồm dùng ngoài đường tiêu hóa, *ví dụ*, trong tĩnh mạch, trong da, dưới da, qua miệng (*ví dụ*, xông), qua da (tại chỗ), và qua niêm mạc. Dung dịch hoặc huyền phù được sử dụng ngoài đường tiêu hóa, trong da, hoặc dưới da có thể bao gồm các thành phần sau đây: chất pha loãng vô trùng chẳng hạn như nước để tiêm, dung dịch nước muối, dầu không bay hơi, polyetylen glycol, glyxerin, propylen glycol hoặc các dung môi tổng hợp khác; chất kháng khuẩn chẳng hạn như rượu benzylic hoặc metyl paraben; chất chống oxy hóa chẳng hạn như axit ascorbic hoặc natri bisulfit; chất tạo chelat chẳng hạn như axit etylenđiamintetraaxetic; chất đệm chẳng hạn như axetat, xitrat hoặc phosphat, và chất điều chỉnh trương lực chẳng hạn như natri clorua hoặc dextroza. Độ pH có thể được điều chỉnh bằng axit hoặc bazơ, chẳng hạn như axit clohydric hoặc natri hydroxit. Chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được nạp vào trong ampun, xy lanh dùng một lần hoặc lọ đa liều lượng làm bằng thủy tinh hoặc chất dẻo.

Hợp chất hoặc dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng theo nhiều phương pháp đã biết hiện đang được sử dụng cho liệu pháp hóa trị. Ví dụ, để điều trị bệnh ung thư, hợp chất theo sáng chế có thể được tiêm trực tiếp vào khối u, truyền vào dòng máu hoặc các khoang của cơ thể hoặc dùng qua đường miệng hoặc dùng qua da bằng miếng dán.

Liều lượng được chọn phải đủ để tạo ra hiệu quả điều trị nhưng không quá cao để gây ra tác dụng phụ không chấp nhận được. Tình trạng bệnh lý (ví dụ, bệnh ung thư, bệnh tiền ung thư, và bệnh tương tự) và sức khỏe của bệnh nhân tốt hơn là được theo dõi chặt chẽ trong thời gian điều trị và trong một khoảng thời gian hợp lý sau khi điều trị.

Thuật ngữ “lượng cho hiệu quả điều trị”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ lượng được chất dùng để điều trị, cải thiện, hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý đã xác định, hoặc để thể hiện tác dụng trị liệu hoặc ức chế ở mức có thể phát hiện được. Tác dụng này có thể được phát hiện bằng phương pháp kiểm tra bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Lượng hữu hiệu chính xác cho một đối tượng sẽ phụ thuộc vào cân nặng, kích thước, và sức khỏe của đối tượng; bản chất và mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh lý; và liệu pháp hoặc các liệu pháp kết hợp được chọn để dùng. Lượng cho hiệu quả điều trị cho một trường hợp nhất định có thể được xác định bằng các thí nghiệm thông thường mà thuộc kỹ năng và đánh giá của thầy thuốc. Theo khía cạnh được ưu tiên, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cần được điều trị là bệnh ung thư. Theo một khía cạnh khác, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cần được điều trị là rối loạn tăng sinh tế bào.

Đối với hợp chất bất kỳ, lượng cho hiệu quả điều trị có thể được ước lượng ban đầu trong thử nghiệm nuôi cấy tế bào, ví dụ, tế bào khối u, hoặc trong mẫu động vật, thường là chuột, chuột nhắt, thỏ, chó, hoặc lợn. Mẫu động vật cũng có thể được sử dụng để xác định khoảng nồng độ thích hợp và đường dùng. Sau đó, thông tin này có thể được sử dụng để xác định liều lượng và đường dùng thích hợp cho người. Hiệu quả điều trị/phòng ngừa và độc tính có thể được xác định bằng quy trình được tiêu chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc động vật thí nghiệm, ví dụ, ED_{50} (liều cho hiệu quả điều trị ở 50% quần thể) và LD_{50} (liều gây chết cho 50% quần thể). Tỷ lệ liều giữa liều gây độc và liều điều trị là chỉ số điều trị, và nó có thể được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ, LD_{50}/ED_{50} . Dược phẩm có chỉ số điều trị lớn được ưu tiên. Liều lượng có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào dạng liều được sử dụng, độ nhạy của bệnh nhân, và đường dùng.

Liều lượng và việc sử dụng được điều chỉnh để tạo ra hàm lượng đủ của (các) hoạt chất hoặc để duy trì tác dụng mong muốn. Các yếu tố có thể tính đến bao gồm mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh lý, sức khỏe chung của đối tượng, tuổi, cân nặng, và giới tính của đối tượng, chế độ ăn, thời gian và tần suất sử dụng, (các) sự kết hợp thuốc, tính dễ phản ứng, và độ dung nạp/đáp ứng đối với liệu pháp. Dược phẩm tác dụng kéo dài có thể được

dùng 3 đến 4 ngày một lần, tuần một lần, hoặc hai tuần một lần tùy thuộc vào thời gian bán hủy và tốc độ thanh thải của chế phẩm cụ thể.

Dược phẩm chứa hoạt chất theo sáng chế có thể được sản xuất theo phương thức mà nhìn chung đã biết, ví dụ, bằng quy trình trộn, hòa tan, tạo hạt, tạo viên bao đường, nghiền thành bột mịn, nhũ tương hóa, bao gói, sấy, hoặc làm khô lạnh thông thường. Dược phẩm có thể được bào chế theo phương thức thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang dược dụng bao gồm tá dược và/hoặc chất phụ trợ mà hỗ trợ cho việc xử lý hoạt chất thành chế phẩm mà có thể được sử dụng làm thuốc. Tất nhiên, chế phẩm thích hợp phụ thuộc vào đường dùng được chọn.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng để tiêm bao gồm dung dịch nước vô trùng (mà hòa tan trong nước) hoặc thể phân tán và bột vô trùng để pha chế tùy ứng dụng dung dịch hoặc thể phân tán tiêm được vô trùng. Để dùng trong tĩnh mạch, chất mang thích hợp bao gồm nước muối sinh lý, nước hãm khuẩn, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) hoặc nước muối đệm phosphat (PBS). Trong tất cả các trường hợp, dược phẩm phải vô trùng và nên là dịch lỏng ở mức độ mà có khả năng bơm dễ dàng. Nó phải ổn định trong điều kiện sản xuất và bảo quản và phải được bảo quản chống lại hoạt động nhiễm vi sinh vật chẳng hạn như vi khuẩn và nấm. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và chất tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Độ lỏng phù hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng lớp bao chẳng hạn như lexitin, bằng cách duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp của thể phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Việc ngăn ngừa hoạt động của vi sinh vật có thể thu được bằng nhiều chất kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clobutanol, phenol, axit ascorbic, thimerosal, và các chất tương tự. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức chẳng hạn như manitol và sorbitol, và natri clorua trong dược phẩm. Tác động hấp thu kéo dài của các chế phẩm tiêm được có thể thu được bằng cách bao gồm trong dược phẩm chất làm chậm sự hấp thụ, ví dụ, alumin monostearat và gelatin.

Dung dịch tiêm vô trùng có thể được pha chế bằng cách kết hợp hoạt chất với lượng yêu cầu trong dung môi thích hợp với một thành phần hoặc hỗn hợp của các thành phần được liệt kê ở trên, như yêu cầu, sau đó là vô trùng bằng cách lọc. Thông thường, thể phân tán được pha chế bằng cách kết hợp hoạt chất vào chất dẫn thuốc vô trùng chứa môi trường phân tán cơ sở và các thành phần khác được yêu cầu từ các thành phần được liệt kê ở trên.

Trong trường hợp của bột vô trùng để pha chế dung dịch tiêm vô trùng, các phương pháp điều chế là làm khô trong chân không và đông khô mà tạo ra bột của thành phần hoạt tính cộng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch đã được lọc vô trùng trước đó của chúng.

Các chế phẩm dùng qua đường miệng thường bao gồm chất pha loãng trợ hoặc chất mang được dùng ăn được. Chúng có thể được bao trong viên nang gelatin hoặc được dập thành viên nén. Để sử dụng để điều trị qua đường miệng, hoạt chất có thể được kết hợp với tá dược và được sử dụng ở dạng viên nén, viên ngậm dẹp, hoặc viên nang. Các chế phẩm dùng qua đường miệng cũng có thể được bào chế bằng cách sử dụng chất mang lỏng để sử dụng dưới dạng thuốc súc miệng, trong đó hợp chất trong chất mang lỏng này được dùng qua đường miệng và được súc và được nhổ ra hoặc được nuốt vào. Chất liên kết tương thích về mặt dược phẩm, và/hoặc nguyên liệu phụ trợ có thể được bao gồm dưới dạng một phần của dược phẩm. Viên nén, viên tròn, viên nang, viên ngậm dẹp và các dạng viên tương tự có thể chứa thành phần bất kỳ trong số các thành phần sau đây, hoặc hợp chất có bản chất tương tự: chất liên kết chẳng hạn như xenluloza vi tinh thể, gồm tragacan hoặc gelatin; tá dược chẳng hạn như tinh bột hoặc lactoza, chất gây rã chẳng hạn như axit alginic, Primogel, hoặc tinh bột ngô; chất bôi trơn chẳng hạn như magie stearat hoặc Sterotes; chất gây trượt chẳng hạn như silic đioxit dạng keo; chất làm ngọt chẳng hạn như sucroza hoặc sacarin; hoặc chất tạo hương vị chẳng hạn như bạc hà, metyl salixylat, hoặc hương cam.

Để dùng bằng cách xông, hợp chất được phân phối ở dạng phun sol khí từ vật chứa được tạo áp hoặc thiết bị phân phối, mà chứa chất đẩy thích hợp, ví dụ, khí chẳng hạn như cacbon đioxit, hoặc ống phun.

Việc dùng toàn thân cũng có thể là bằng phương thức qua niêm mạc hoặc qua da. Để sử dụng qua niêm mạc hoặc qua da, chất thấm thích hợp đối với hàng rào cần phải thấm qua được sử dụng trong chế phẩm. Chất thấm này thường là đã biết trong lĩnh vực, và bao gồm, ví dụ, để sử dụng qua niêm mạc, chất tẩy rửa, muối mật, và dẫn xuất của axit fusidic. Việc sử dụng qua niêm mạc có thể được thực hiện thông qua việc sử dụng khí dung qua mũi hoặc thuốc đạn. Đối với việc sử dụng qua da, hoạt chất được tạo chế phẩm thành thuốc mỡ, dầu cao, gel, hoặc kem như thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Hoạt chất có thể được pha chế với chất mang được dùng mà sẽ bảo vệ hợp chất chống lại sự loại bỏ nhanh khỏi cơ thể, chẳng hạn như chế phẩm giải phóng có kiểm soát, bao gồm thuốc cấy và hệ phân phối thuốc vi nang. Polyme tương hợp sinh học, có thể phân

hủy sinh học có thể được sử dụng, chẳng hạn như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Các phương pháp bào chế các chế phẩm này sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các nguyên liệu cũng có thể mua được trên thị trường từ hãng Alza Corporation và Nova Pharmaceuticals, Inc. Huyền phù liposom (bao gồm liposom nhắm đích vào tế bào bị nhiễm cùng với các kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên virus) cũng có thể được sử dụng làm chất mang được dụng. Chúng có thể được điều chế theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, ví dụ, như mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 4,522,811.

Đặc biệt có lợi nếu bào chế các chế phẩm dùng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa ở dạng liều đơn vị để dễ sử dụng và tạo ra liều lượng đồng đều. Dạng liều đơn vị như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý được phù hợp dưới dạng liều đơn vị cho đối tượng cần được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hoạt chất được tính để tạo ra tác dụng trị liệu mong muốn kết hợp với chất mang được yêu cầu. Đặc tính kỹ thuật cho dạng liều đơn vị theo sáng chế bị kiểm soát và phụ thuộc trực tiếp vào các tính chất đặc trưng của hoạt chất và tác dụng trị liệu cụ thể cần đạt được.

Trong các ứng dụng trị liệu, liều lượng của dược phẩm được sử dụng theo sáng chế thay đổi tùy thuộc vào chất, tuổi, cân nặng, và tình trạng bệnh lý lâm sàng của bệnh nhân tiếp nhận, và kinh nghiệm và quyết định của bác sĩ hoặc người thực hiện liệu pháp này cho bệnh nhân, trong số các yếu tố khác ảnh hưởng đến liều lượng được chọn. Thông thường, liều lượng phải đủ để làm chậm, và tốt hơn là làm thoái lui, sự phát triển của khối u và cũng tốt hơn là làm thoái lui hoàn toàn bệnh ung thư. Liều lượng có thể nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg mỗi ngày đến khoảng 5000 mg/kg mỗi ngày. Theo các khía cạnh được ưu tiên, liều lượng có thể nằm trong khoảng từ 1 mg/kg mỗi ngày đến khoảng 1000 mg/kg mỗi ngày. Theo một khía cạnh, liều lượng sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 mg/ngày đến khoảng 50 g/ngày; từ khoảng 0,1 mg/ngày đến khoảng 25 g/ngày; từ khoảng 0,1 mg/ngày đến khoảng 10 g/ngày; từ khoảng 0,1 mg đến khoảng 3 g/ngày; hoặc từ khoảng 0,1 mg đến khoảng 1 g/ngày, ở liều đơn lẻ, chia nhỏ, hoặc liên tục (liều lượng này có thể được điều chỉnh theo cân nặng của bệnh nhân tính theo kg, diện tích bề mặt cơ thể tính theo m^2 , và tuổi tính theo năm). Lượng hữu hiệu của dược chất là lượng mà tạo ra sự cải thiện có thể nhận ra được một cách khách quan như được nhận ra bởi thầy thuốc hoặc người theo dõi khác có đủ trình

độ. Ví dụ, sự thoái lui của khối u ở bệnh nhân có thể được đo dựa vào đường kính của khối u. Sự giảm đường kính của khối u cho thấy sự thoái lui. Sự thoái lui cũng được thể hiện bởi việc không tái phát khối u sau khi ngừng điều trị. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “liều cho hiệu quả liều lượng” dùng để chỉ lượng hoạt chất tạo ra tác dụng sinh học mong muốn ở đối tượng hoặc tế bào.

Dược phẩm có thể được đựng trong vật chứa, gói, hoặc thiết bị phân phối cùng với hướng dẫn sử dụng.

Hợp chất theo sáng chế còn có khả năng tạo ra các dạng muối khác. Tất cả các dạng này cũng thuộc phạm vi của sáng chế được yêu cầu bảo hộ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “muối dược dụng” dùng để chỉ dẫn xuất của hợp chất theo sáng chế trong đó hợp chất gốc được cải biến bằng cách tạo ra muối axit hoặc bazơ của chúng. Ví dụ về muối dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối axit vô cơ hoặc hữu cơ của gốc bazơ chẳng hạn như amin, muối kiềm hoặc hữu cơ của gốc axit chẳng hạn như axit carboxylic, và các axit tương tự. Các muối dược dụng bao gồm các muối không độc thông thường hoặc các muối amoni bậc bốn của hợp chất gốc được tạo thành, ví dụ, từ axit vô cơ hoặc hữu cơ không độc. Ví dụ, muối không độc thông thường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối có nguồn gốc từ axit vô cơ và hữu cơ được chọn từ axit 2-axetoxibenzoic, axit 2-hydroxyetan sulfonic, axit axetic, axit ascorbic, axit benzen sulfonic, axit benzoic, axit bicarbonic, axit carbonic, axit citric, axit edetic, axit etan disulfonic, axit 1,2-etan sulfonic, axit fumaric, axit glucoheptonic, axit gluconic, axit glutamic, axit glycolic, axit glycollyarsanilic, axit hexylresorxinic, axit hydrabamic, axit bromhydric, axit clohydric, axit hydroiodic, axit hydroxymaleic, axit hydroxynaphtoic, axit isethionic, axit lactic, axit lactobionic, axit lauryl sulfonic, axit maleic, axit malic, axit mandelic, axit metan sulfonic, axit napsylic, axit nitric, axit oxalic, axit pamoic, axit pantothenic, axit phenylaxetic, axit phosphoric, axit polygalacturonic, axit propionic, axit salixylic, axit stearic, axit subaxetic, axit succinic, axit sulfamic, axit sulfanilic, axit sulfuric, axit tanic, axit tartaric, axit toluen sulfonic, và các axit amin thường xuất hiện, ví dụ, glyxin, alanin, phenylalanin, arginin, v.v..

Ví dụ khác về muối dược dụng bao gồm axit hexanoic, axit xyclopentan propionic, axit pyruvic, axit malonic, axit 3-(4-hydroxybenzoyl)benzoic, axit xinamic, axit 4-clobenzensulfonic, axit 2-naphtalensulfonic, axit 4-toluensulfonic, axit camphorsulfonic, axit 4-metylbixyclo-[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxylic, axit 3-phenylpropionic, axit

trimethylaxetic, axit butylaxetic bậc ba, axit muconic, và các axit tương tự. Sáng chế cũng bao gồm muối được tạo thành khi proton axit có mặt trong hợp chất gốc bị thay thế bằng ion kim loại, ví dụ, ion kim loại kiềm, ion kiềm thổ, hoặc ion nhôm; hoặc phối trí với bazơ hữu cơ chẳng hạn như etanolamin, dietanolamin, trietanolamin, tromethamin, N-metylglucamin, và các amin tương tự. Ở dạng muối, cần hiểu rằng tỷ lệ của hợp chất với cation hoặc anion của muối có thể là 1:1, hoặc tỷ lệ bất kỳ không phải là 1:1, ví dụ, 3:1, 2:1, 1:2, hoặc 1:3.

Cần hiểu rằng tất cả các lần viện dẫn đến muối được dụng bao gồm dạng cộng dung môi (solvat) hoặc dạng tinh thể (dạng đa hình) như được xác định trong bản mô tả này, của cùng muối đó.

Hợp chất, hoặc muối được dụng của nó, được dùng qua đường miệng, qua mũi, qua da, phổi, xông, qua má, dưới lưỡi, trong màng bụng, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, qua trực tràng, trong màng phổi, trong vỏ và ngoài đường tiêu hóa. Theo một phương án, hợp chất được dùng qua đường miệng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra các ưu điểm của đường dùng nhất định.

Chế độ dùng liều sử dụng hợp chất được chọn tùy theo nhiều yếu tố bao gồm loại, loài, tuổi, cân nặng, giới tính và tình trạng sức khỏe của bệnh nhân; mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh lý cần được điều trị; đường dùng; chức năng gan và thận của bệnh nhân; và hợp chất cụ thể hoặc muối của chúng được sử dụng. Bác sĩ hoặc bác sĩ thú y có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định và chỉ định lượng hữu hiệu của thuốc cần để ngăn ngừa, chống lại, hoặc kìm hãm diễn tiến của tình trạng bệnh lý.

Các kỹ thuật để bào chế và sử dụng hợp chất được bộc lộ theo sáng chế có thể được tìm thấy trong tài liệu *Remington: the Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995). Theo một phương án, hợp chất được mô tả trong bản mô tả này, và muối được dụng của nó, được sử dụng trong dược phẩm kết hợp với chất mang hoặc chất pha loãng được dụng. Chất mang được dụng thích hợp bao gồm chất độn rắn trơ hoặc chất pha loãng và dung dịch nước hoặc hữu cơ vô trùng. Hợp chất sẽ có mặt trong dược phẩm này với lượng đủ để tạo ra lượng liều lượng mong muốn trong khoảng được mô tả trong bản mô tả này.

Tất cả các tỷ lệ phần trăm và tỷ lệ được sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi có chỉ dẫn khác, là theo khối lượng. Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ rõ ràng từ các ví dụ khác nhau. Các ví dụ được nêu minh họa các thành phần khác nhau và phương pháp hữu dụng để thực hiện sáng chế. Các ví dụ này không làm giới hạn sáng chế được yêu cầu

bảo hộ. Dựa trên bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định và sử dụng các thành phần và phương pháp khác hữu dụng để thực hiện sáng chế.

Trong các sơ đồ tổng hợp và cấu trúc hóa học được mô tả trong bản mô tả này, hợp chất có thể được thể hiện với một cấu hình cụ thể (ví dụ, có hoặc không có chất đồng phân lập thể cụ thể được biểu thị) để cho đơn giản. Các cấu hình cụ thể này hoặc việc thiếu chúng không được hiểu là làm giới hạn sáng chế ở một chất đồng phân này hay chất đồng phân khác, tautome, chất đồng phân vùng (regioisomer) hoặc chất đồng phân lập thể, cũng như là không loại trừ hỗn hợp của các chất đồng phân, tautome, chất đồng phân vùng (regioisomer) hoặc chất đồng phân lập thể; tuy nhiên, cần hiểu rằng chất đồng phân, tautome, chất đồng phân vùng (regioisomer) hoặc chất đồng phân lập thể nhất định có thể có mức độ hoạt tính cao hơn so với chất đồng phân, tautome, chất đồng phân vùng (regioisomer) hoặc chất đồng phân lập thể khác.

Hợp chất được thiết kế, được chọn và/hoặc được tối ưu hóa bằng các phương pháp được mô tả ở trên, ngay khi được tạo ra, có thể được xác định đặc điểm bằng cách sử dụng nhiều thử nghiệm đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để xác định xem liệu hợp chất này có hoạt tính sinh học hay không. Ví dụ, các phân tử có thể được xác định đặc điểm bằng các thử nghiệm thông thường, bao gồm, nhưng không giới hạn ở các thử nghiệm được mô tả dưới đây, để xác định xem liệu chúng có hoạt tính, hoạt tính liên kết và/hoặc tính đặc hiệu liên kết đã được dự đoán hay không.

Hơn nữa, kỹ thuật sàng lọc số lượng lớn có thể được sử dụng để tăng tốc độ phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm này. Kết quả là, có thể sàng lọc nhanh chóng các phân tử được mô tả trong bản mô tả này về hoạt tính, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp chung để thực hiện sàng lọc số lượng lớn được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Devlin (1998) *High Throughput Screening*, Marcel Dekker; và bằng sáng chế Mỹ số 5,763,263. Thử nghiệm số lượng lớn có thể sử dụng một hoặc nhiều kỹ thuật thử nghiệm khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kỹ thuật được mô tả dưới đây.

Tất cả các tài liệu công bố và tài liệu sáng chế được viện dẫn trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích tham khảo như thể mỗi tài liệu công bố hoặc tài liệu sáng chế này được chỉ ra cụ thể và riêng biệt để tham khảo. Việc viện dẫn đến các tài liệu công bố và tài liệu sáng chế không được dự định là sự công nhận rằng tài liệu bất kỳ là tình trạng kỹ thuật thích

đáng, cũng như rằng tài liệu bất kỳ không tạo thành sự công nhận bất kỳ về nội dung hoặc ngày của nó. Sáng chế sẽ được mô tả bằng cách mô tả bằng văn bản, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng sáng chế có thể được thực hiện theo nhiều phương án và rằng phần mô tả trên đây và các ví dụ dưới đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không làm giới hạn phạm vi của yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 Tổng hợp hợp chất theo sáng chế

Thí nghiệm chung

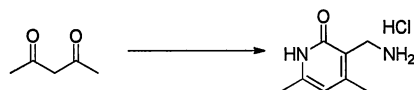
NMR

Thực hiện ghi phổ ^1H -NMR bằng cách sử dụng CDCl_3 trừ khi có chỉ dẫn khác và thu dữ liệu ở 400 hoặc 500 MHz bằng cách sử dụng thiết bị từ (500 MHz) thiết bị Varian hoặc Oxford. Tính đa bội được biểu thị là s=vạch đơn, d = vạch đôi, t = vạch ba, q = vạch tư, quint = vạch năm, sxt = vạch sáu, m = vạch bội, dd =vạch đôi của vạch đôi, dt = vạch đôi của vạch ba; br biểu thị tín hiệu rộng.

LCMS và HPLC

Phổ khối: Waters Acquity Ultra Performance LC. HPLC: Phân tích sản phẩm bằng Shimadzu SPD-20A với cột 150 x 4,5mm YMC ODS-M80 hoặc cột 150 x 4,6mm YMC-Pack Pro C18 ở tốc độ 1,0 ml/phút. Pha động là $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}=3:2$ (chứa SDS 0,3% và H_3PO_4 0,05%). Tinh chế sản phẩm bằng HPLC/MS ($\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ chứa amoni hydroxit 0,1 %) bằng cách sử dụng Waters AutoPurification System với 3100 Mass Detector.

Muối HCl 3-(aminometyl)-4,6-đimetyl-1,2-đihydropyridin-2-on

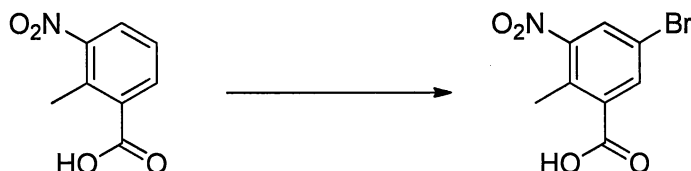


Bổ sung K_2CO_3 (4,00 g, 28,9 mmol) vào dung dịch chứa 2-xyanoaxetamit (8,40 g, 100 mmol) và axetylaxeton (10,0 g, 100 mmol) trong H_2O (200 ml). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 22 giờ. Sau đó, lọc chất rắn kết tủa bằng phễu Buchner, rửa bằng nước đá lạnh, và làm khô dưới áp suất chân không để tạo ra 4,6-đimetyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-carbonitril (13,5 g, hiệu suất 91%).

Bổ sung 10% $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (19 g) vào dung dịch chứa 4,6-đimetyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-carbonitril (10,0 g, 67,5 mmol) trong MeOH (1,50 l) và HCl đặc (30 ml) dưới khí quyển N_2 . Thay thế khí N_2 bằng khí H_2 và khuấy hỗn hợp trong thời gian 26 giờ ở nhiệt độ trong phòng dưới khí quyển hydro. Thay thế khí H_2 bằng khí N_2 . Lọc hỗn hợp qua

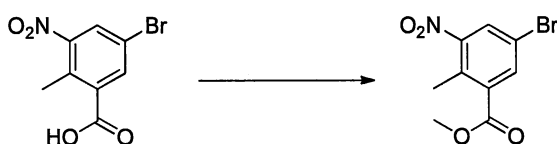
Xelit, rửa bằng MeOH và cô. Nghiền phần cặn thành bột bằng EtOH, thu gom bằng phễu Buchner, và làm khô dưới áp suất chân không để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng (11,5 g, 90%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ phần triệu 11,86 (brs, 1H), 5,98 (s, 1H), 3,78 (m, 2H), 2,20 (s, 3H), 2,16 (s, 3H).

Axit 5-bromo-2-metyl-3-nitrobenzoic



Bổ sung 1,3-đibromo-5,5-đimetylhydantoin (4,34 g, 15,20 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa axit 2-metyl-3-nitrobenzoic (5,00 g, 27,6 mmol) trong H_2SO_4 (20 ml) ở nhiệt độ 0°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 5 giờ. Rót hỗn hợp phản ứng lên nước đá lạnh, thu gom chất rắn kết tủa thu được, rửa bằng nước và làm khô trong chân không để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng (7,28 g, hiệu suất định lượng). ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ phần triệu; 8,31 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 2,43 (s, 3H).

Metyl 5-bromo-2-metyl-3-nitrobenzoat



Bổ sung natri cacbonat (11,9 g, 112 mmol) và metyl iotua (15,9 g, 112 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa axit 5-bromo-2-metyl-3-nitrobenzoic (7,28 g, 28,0 mmol) trong DMF (100 ml). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 8 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, lọc hỗn hợp phản ứng và rửa bằng etyl axetat. Rửa phần lọc kết hợp bằng nước và chiết lại pha nước bằng etyl axetat. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua natri sulfat khan, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn. (7,74 g, hiệu suất định lượng). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (phần triệu); 8,17 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 2,59 (s, 3H).

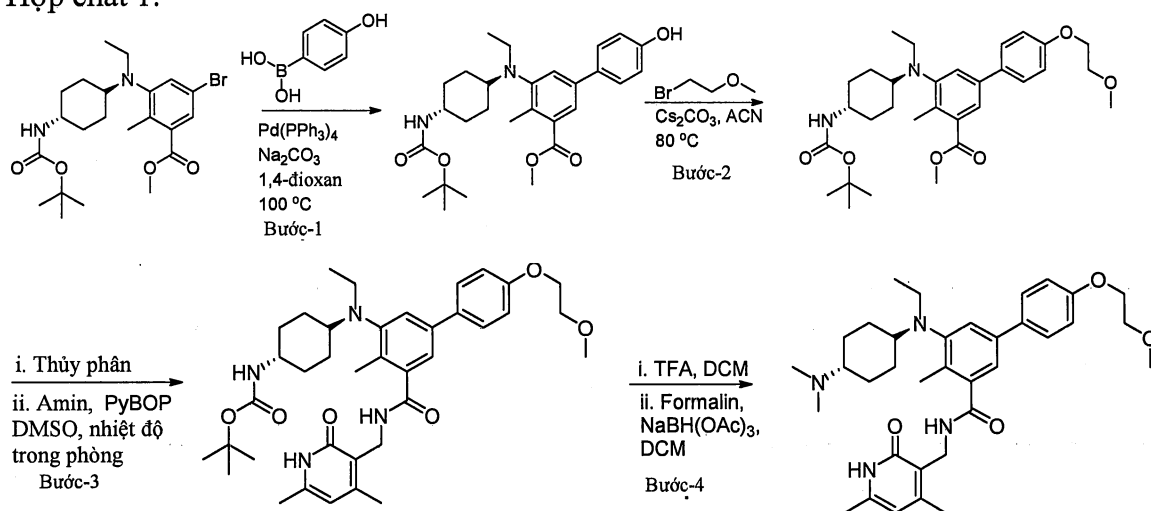
Metyl 3-amino-5-bromo-2-metylbenzoat



Bổ sung amoni clorua (4,45 g, 83,1 mmol) và sắt (4,64 g, 83,1 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa metyl 5-bromo-2-metyl-3-nitrobenzoat (7,60 g, 27,7 mmol) trong EtOH

trong nước (100 ml EtOH và 20 ml H₂O). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 5 giờ. Sau đó, lọc hỗn hợp qua Xelit và rửa tầng Xelit bằng etyl axetat. Cô phần lọc kết hợp trong chân không. Hòa tan phần cặn thu được trong etyl axetat và nước. Chiết lớp nước bằng etyl axetat (hai lần). Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua natri sulfat khan, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu màu nâu (6,67 g, 99%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ phần triệu; 7,37 (s, 1H), 6,92 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,80 (brs, 2H), 2,31 (s, 3H).

Hợp chất 1:



Bước 1: Tổng hợp methyl 5-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)cyclohexyl)(ethyl)amino)-4'-hydroxy-4-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat

Bổ sung Na₂CO₃ (8,01 g, 75,5 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa methyl 5-bromo-3-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)cyclohexyl)(ethyl)amino)-2-methylbenzoat (10g, 21,3 mmol, xem tài liệu, ví dụ, WO2012142504 (Sở Đại diện Số 41478-507001WO)) và axit (4-hydroxyphenyl)boronic (3,5g, 25,3 mmol) trong hỗn hợp của đioxan (225 ml) và nước (75 ml) và sục dung dịch bằng argon trong thời gian 30 phút. Sau đó, bổ sung Pd(PPh₃)₄ (2,4 g, 2,07 mmol) và sục argon lại trong thời gian 15 phút nữa. Gia nhiệt khối phản ứng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 4 giờ. Khi hoàn thành, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng nước và chiết bằng etyl axetat. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua natri sulfat. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm sau đó là tinh chế bằng sắc ký cột tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (8,9 g, hiệu suất 87%).

Bước 2: Tổng hợp methyl 5-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino) cyclohexyl)(ethyl)amino)-4'-(2-methoxyethoxy)-4-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat

Bổ sung Cs_2CO_3 (0,485 g, 1,49 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa methyl 5-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)cyclohexyl)(ethyl)amino)-4'-hydroxy-4-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat (0,6 g, 1,24 mmol) và 1-bromo-2-methoxyetan (0,519 g, 3,73 mmol) trong axetonitril (6 ml) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 12 giờ. Khi hoàn thành, bổ sung nước vào đó và chiết bằng ethyl axetat. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua natri sulfat khan và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế hợp chất thô bằng sắc ký cột để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (0,6 g, hiệu suất 76,5%).

Bước 3: Tổng hợp tert-butyl ((trans)-4-((5-(((4,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl) methyl) carbamoyl)-4'-(2-methoxyethoxy)-4-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(ethyl)-amino)-cyclohexyl) carbamat

Bổ sung NaOH trong nước (0,066 g, 1,66 mmol trong 5 ml H_2O) vào dung dịch chứa methyl 5-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)cyclohexyl)(ethyl)amino)-4'-(2-methoxyethoxy)-4-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat (0,6 g, 1,11 mmol) trong EtOH (10 ml) và khuấy ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, loại bỏ ethanol dưới áp suất giảm và axit hóa phần cặn bằng cách sử dụng axit xitric để điều chỉnh độ pH đến 4. Tiến hành chiết bằng cách sử dụng metanol 10% trong DCM. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp, cô tạo ra axit tương ứng (0,5 g, hiệu suất 85,6%).

Sau đó, hòa tan axit nêu trên (0,5 g, 0,95 mmol) trong DMSO (5 ml) và bổ sung 3-(aminomethyl)-4,6-dimethylpyridin-2(1H)-on (0,288 g, 1,90 mmol) và triethyl amin (0,096g, 0,950 mmol) vào đó. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút trước khi bổ sung PyBop (0,741g, 1,42 mmol) vào đó và tiếp tục khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi hoàn thành phản ứng, rót khối phản ứng vào đá và tiến hành chiết bằng cách sử dụng MeOH/DCM 10 %. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua natri sulfat và cô dưới áp suất giảm để thu được nguyên liệu thô mà sau đó tinh chế bằng sắc ký cột để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (0,45 g, hiệu suất 71,8%).

Bước 4: Tổng hợp N-((4,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)methyl)-5-(((trans)-4-(dimethylamino)-cyclohexyl)(ethyl)-amino)-4'-(2-methoxyethoxy)-4-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamid

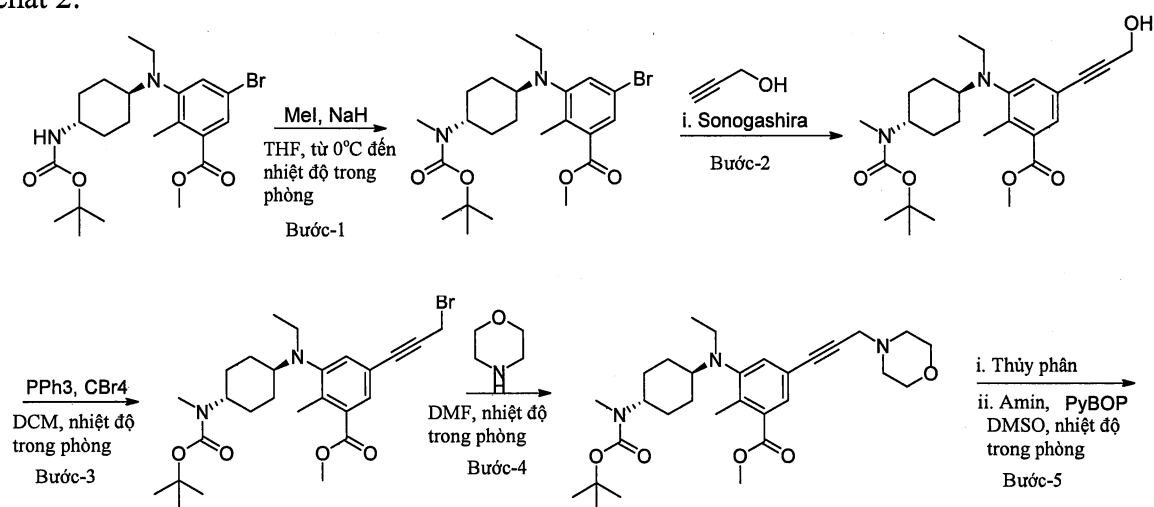
Bổ sung TFA (1 ml) vào dung dịch có khuấy chứa tert-butyl((trans)-4-((5-(((4,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)methyl)carbamoyl)-4'-(2-methoxyethoxy)-4-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(ethyl)amino)cyclohexyl)carbammat (0,45 g, 0,681 mmol) trong DCM (5 ml) ở nhiệt độ 0°C và khuấy phản ứng trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi hoàn

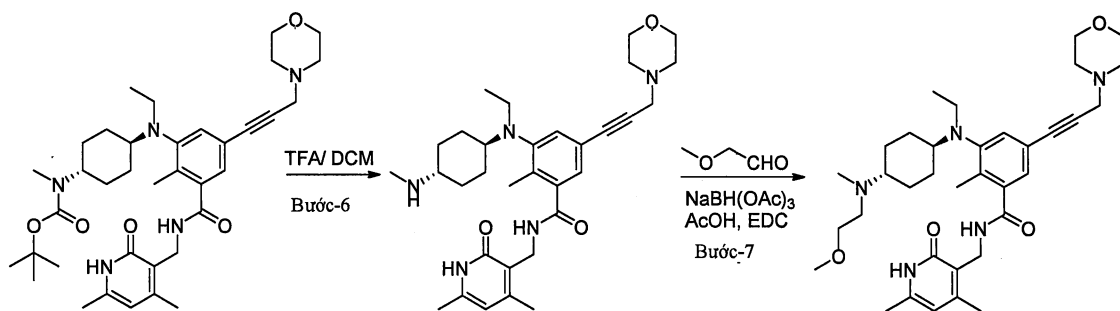
thành, cô phản ứng đến khô. Sau đó, bazơ hóa phần cặn bằng Na_2CO_3 (trong nước) đến độ pH 8 và chiết lớp nước bằng metanol 20% trong DCM. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua Na_2SO_4 và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất đã được khử bảo vệ Boc (0,3 g, hiệu suất 78,7%).

Bổ sung dung dịch formaldehyt (35-41% trong nước) (0,056 g, 1,87 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa hợp chất đã được khử bảo vệ Boc (0,3 g, 0,535 mmol) trong điclorometan (3 ml) ở nhiệt độ 0°C và khuấy trong thời gian 20 phút. Sau đó, bổ sung $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (0,28 g, 1,33 mmol) và khuấy trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 0°C . Khi hoàn thành của phản ứng, bổ sung nước và chiết bằng metanol 20% trong DCM. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua Na_2SO_4 và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm. Tinh chế hợp chất thô bằng HPLC điều chế để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (0,1 g, hiệu suất 31,7%).

LCMS: 589,75 ($\text{M}+1$)⁺; TFA-muối: ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 11,47 (brs, 1H), 9,48 (brs, 1H), 8,21 (brs, 1H), 7,57 (d, 2H, $J=8,0$ Hz), 7,40 (s, 1H), 7,23 (s, 1H), 7,03 (d, 2H, $J=8,8$ Hz), 5,87 (s, 1H), 4,29 (d, 2H, $J=4,4$ Hz), 4,14-4,12 (m, 2H), 3,69-3,66 (m, 2H), 3,32 (s, 3H), 3,13 (m, 4H), 2,69-2,68 (m, 6H), 2,24 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 1,96 (m, 4H), 1,44 (m, 4H), 0,85 (t, 3H, $J=6,8$ Hz).

Hợp chất 2:





Bước 1: Tổng hợp methyl 5-bromo-3-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)-(metyl)-amino)xyclohexyl)(etyl)amino)-2-metylbenzoat

Bổ sung NaH (0,184 g, 7,69 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa methyl 5-bromo-3-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)xyclohexyl)(etyl)amino)-2-metylbenzoat (3 g, 6,41 mmol, xem tài liệu, ví dụ, WO2012142504) trong THF (30 ml) ở nhiệt độ 0°C và khuấy nó ở cùng nhiệt độ trong thời gian 20 phút. Sau đó, bổ sung methyl iodua (9,10 g, 64,10 mmol) ở nhiệt độ 0°C và khuấy phản ứng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Khi hoàn thành, làm dừng phản ứng bằng nước đá và chiết bằng diclometan. Rửa lớp hữu cơ kết hợp bằng nước, làm khô, cô dưới áp suất giảm. Tinh chế hợp chất thô bằng sắc ký cột để tạo ra hợp chất thô nêu ở đề mục, hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế thêm (3 g, hiệu suất 97,4%).

Bước 2: Tổng hợp methyl 3-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)-(metyl)amino)xyclohexyl)(etyl)amino)-5-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)-2-metylbenzoat

Bổ sung CuI (0,015 g, 0,079 mmol), PPh₃ (0,043 g, 0,165 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (0,058 g, 0,082 mmol), N,N-diisopropyl amin (1,08 g, 10,78 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa methyl 5-bromo-3-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)(metyl)amino)xyclohexyl)(etyl)amino)-2-metylbenzoat (2 g, 4,14 mmol) trong toluen khô và sục phản ứng bằng argon trong thời gian 15 phút. Bổ sung prop-2-yn-1-ol (0,46 g, 8,29 mmol) vào đó gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 80°C ở điều kiện bịt kín trong thời gian 5 giờ. Khi hoàn thành, làm dừng phản ứng bằng nước và chiết bằng etyl axetat. Làm khô lớp hữu cơ qua Na₂SO₄. Tinh chế hợp chất thô bằng sắc ký cột để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (1,2 g, hiệu suất 63,2%).

Bước 3: Tổng hợp methyl 5-(3-bromoprop-1-yn-1-yl)-3-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)(metyl)amino)xyclohexyl)(etyl)amino)-2-metylbenzoat:

Bổ sung PPh₃ (1,37 g, 5,22 mmol) và CBr₄ (1,7 g, 5,10 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa methyl 3-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)(metyl)amino)xyclohexyl)(etyl)amino)-5-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)-2-metylbenzoat (1,2 g, 2,62 mmol) trong DCM

(15 ml) ở nhiệt độ 0°C và khuấy phản ứng trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Khi hoàn thành, làm dừng phản ứng bằng nước đá và chiết bằng điclorometan. Rửa lớp hữu cơ kết hợp bằng nước, làm khô, cô dưới áp suất giảm. Tinh chế nguyên liệu thô bằng sắc ký cột để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (0,5 g, hiệu suất 38,5%).

Bước 4: Tổng hợp methyl 3-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino)xyclohexyl)(ethyl)amino)-2-methyl-5-(3-morpholinoprop-1-yn-1-yl)benzoat

Bổ sung morpholin (5 đương lượng) vào dung dịch có khuấy chứa methyl 5-(3-bromoprop-1-yn-1-yl)-3-(((trans)-4-((tert-butoxy carbonyl)-(methyl)amino)xyclohexyl)(ethyl)amino)-2-methylbenzoat (1 đương lượng) trong DMF và khuấy phản ứng trong thời gian 12 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Khi hoàn thành, làm dừng phản ứng bằng nước đá và chiết bằng điclorometan. Rửa lớp hữu cơ kết hợp bằng nước, làm khô, cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất thô mong muốn nêu ở đề mục, hợp chất này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm (hiệu suất 98,7%).

Bước 5: Tổng hợp tert-butyl ((trans)-4-((3-(((4,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydro pyridin-3-yl)methyl)carbamoyl)-2-methyl-5-(3-morpholinoprop-1-yn-1-yl)phenyl)(ethyl)amino)xyclohexyl)(methyl)carbamate

Bổ sung NaOH (1,5 đương lượng) vào dung dịch chứa methyl 3-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino)xyclohexyl)(ethyl)amino)-2-methyl-5-(3-morpholinoprop-1-yn-1-yl)benzoat (1 đương lượng) trong EtOH: H₂O (9:1) và khuấy ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, loại bỏ ethanol dưới áp suất giảm và axit hóa bằng cách sử dụng HCl loãng lên đến độ pH 6 và điều chỉnh về độ pH 4 bằng cách sử dụng axit xitric. Tiến hành chiết bằng cách sử dụng metanol 10% trong DCM. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp cô tạo ra axit tương ứng.

Sau đó, hòa tan axit nêu trên (1 đương lượng) trong DMSO và 3-(aminomethyl)-4,6-dimethylpyridin-2(1H)-on (2 đương lượng) và bổ sung triethyl amin (1 đương lượng) vào đó. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút trước khi bổ sung PyBop (1,5 đương lượng) vào đó và tiếp tục khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi hoàn thành phản ứng, rót khối phản ứng vào đá và tiến hành chiết bằng cách sử dụng MeOH/DCM 10%. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua Na₂SO₄ và cô dưới áp suất giảm để thu được nguyên liệu thô mà sau đó tinh chế lần thứ nhất bằng nước sau đó là rửa bằng axetonitril để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục mong muốn (hiệu suất 69,4%).

Bước 6: Tổng hợp N-((4,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)methyl)-3-(ethyl((trans)-4-(methylamino)cyclohexyl)amino)-2-methyl-5-(3-morpholinoprop-1-yn-1-yl)benzamid

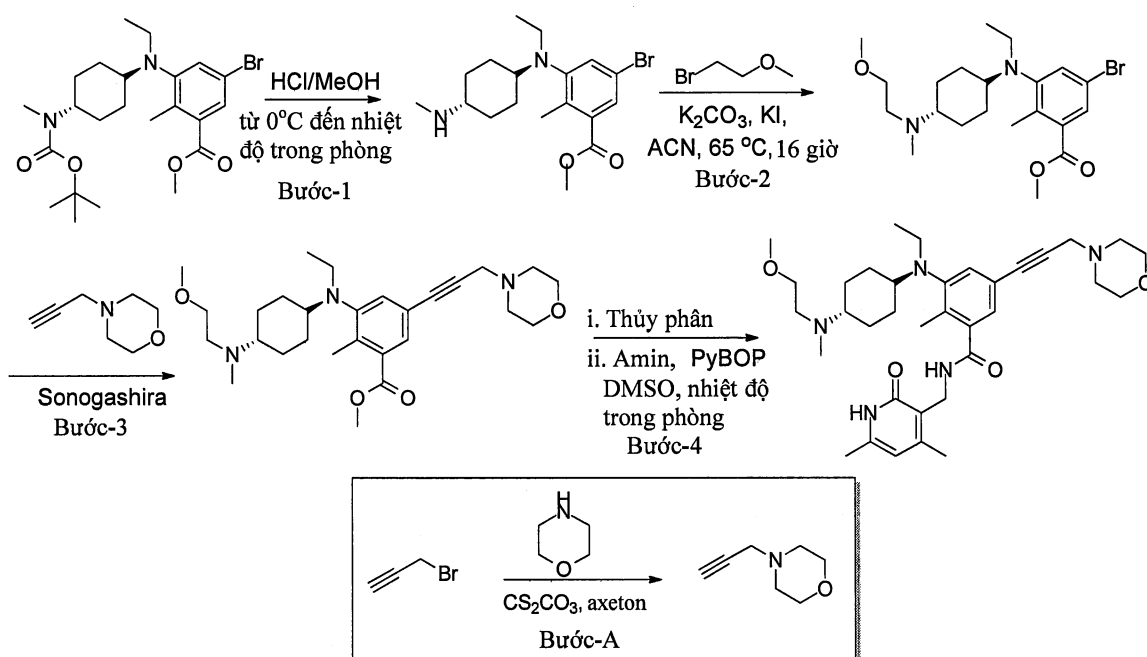
Bổ sung TFA (3 đương lượng) vào dung dịch có khuấy chứa tert-butyl((trans)-4-(((3-((4,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydro pyridin-3-yl)methyl)carbamoyl)-2-methyl-5-(3-morpholinoprop-1-yn-1-yl) phenyl)(ethyl)amino)cyclohexyl)(methyl)carbamate (1 đương lượng) trong DCM ở nhiệt độ 0°C và khuấy phản ứng trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi hoàn thành, cô phản ứng đến khô. Sau đó, bazơ hóa phần cặn bằng Na₂CO₃ (trong nước) đến độ pH 8 và chiết lớp nước bằng metanol 20% trong DCM. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua Na₂SO₄ và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (hiệu suất 99%), hợp chất này được sử dụng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước 7: Tổng hợp N-((4,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)methyl)-3-(ethyl((trans)-4-((2-methoxyethyl)(methyl)amino)cyclohexyl)amino)-2-methyl-5-(3-morpholinoprop-1-yn-1-yl)benzamid

Bổ sung 2-methoxyacetaldehyt (10 đương lượng) và axit axetic (6 đương lượng) vào dung dịch có khuấy chứa N-((4,6-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)methyl)-3-(ethyl((trans)-4-(methylamino)cyclohexyl)amino)-2-methyl-5-(3-morpholinoprop-1-yn-1-yl)benzamid (1 đương lượng) trong dicloetan ở nhiệt độ 0°C và khuấy trong thời gian 20 phút. Sau đó, bổ sung NaBH(OAc)₃ (3 đương lượng) và khuấy trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 0°C. Khi hoàn thành phản ứng, bổ sung nước và chiết bằng metanol 20% trong DCM. Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua Na₂SO₄ và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm. Tinh chế hợp chất thô bằng HPLC điều chế để tạo ra phân tử đích (0,1 g, hiệu suất 33,6%).

LCMS: 606,65 (M+1)⁺; TFA muối: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 11,50 (brs, 1H), 9,22 (brs, 1H), 8,18 (t, 1H), 7,24 (s, 1H), 7,09 (s, 1H), 5,86 (s, 1H), 4,26-4,25 (m, 4H), 3,66-3,59 (m, 4H), 3,48-3,36 (m, 3H), 3,29-3,17 (m, 7H), 3,04-3,01 (m, 3H), 2,69-2,68 (m, 4H), 2,20 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,00-1,92 (m, 2H), 1,82-1,73 (m, 3H), 1,46 (m, 4H), 0,78 (t, 3H, *J*=6,4 Hz).

Sơ đồ tổng hợp thay thế đối với hợp chất 2:



Bước A: Tổng hợp 4-(prop-2-yn-1-yl)morpholin:

Bổ sung Cs_2CO_3 (136,5 g, 420 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa propargyl bromua (50 g, 420 mmol) trong axeton (300 ml) ở nhiệt độ 0°C . Sau đó, bổ sung từng giọt morpholin (36,60 g, 420 mmol) trong axeton (200 ml) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Khi hoàn thành, lọc khối phản ứng và cô phần lọc dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (50 g, thô). Hợp chất đã được tách riêng được sử dụng trực tiếp trong bước liên hợp tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước 1: Tổng hợp methyl 5-bromo-3-(etyl((trans)-4-(methylamino)cyclohexyl)amino)-2-methylbenzoat:

Bổ sung metanolic HCl (500 ml) vào dung dịch có khuấy chứa methyl 5-bromo-3-(((trans)-4-((tert-butoxycarbonyl)(methylamino)cyclohexyl)(etyl)amino)-2-methylbenzoat (30 g, 62,24 mmol) trong metanol (100 ml) ở nhiệt độ 0°C và khuấy phản ứng trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi hoàn thành, cô phản ứng đến khô. Bazo hóa phần cặn bằng Na_2CO_3 (trong nước) đến độ pH 8 và chiết lớp nước bằng metanol 10% trong DCM (200 ml x 3). Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua Na_2SO_4 và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu không màu (25 g, thô). Hợp chất đã được tách riêng được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước 2: Tổng hợp methyl 5-bromo-3-(etyl((trans)-4-((2-methoxyetyl)(methylamino)cyclohexyl)amino)-2-methylbenzoat:

Bổ sung 1-bromo-2-metoxyetan (18,19 g, 130,8 mmol) trong axetonitril (250 ml), K_2CO_3 (18,06 g, 130,8 mmol) và KI (6,51 g, 39,21 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa methyl 5-bromo-3-(etyl((trans)-4-(methylamino) xyclohexyl)amino)-2-methylbenzoat thô (25 g, 65,44 mmol). Khuấy khối phản ứng thu được ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 16 giờ. Khi hoàn thành, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng nước (300 ml) và chiết bằng DCM (500 ml x 3). Rửa lớp hữu cơ kết hợp bằng nước, làm khô qua Na_2SO_4 và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế hợp chất thô bằng sắc ký cột silicagel để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (20 g, hiệu suất 69,3%).

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,55 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,32 (m, 4H), 3,20 (s, 3H), 3,05 (q, 2H), 2,61 (m, 1H), 2,32 (s, 3H), 2,30 (m, 1H), 2,15 (s, 3H), 1,77-1,67 (m, 4H), 1,37-1,31 (m, 2H), 1,24-1,18 (m, 2H), 0,78 (t, 3H, $J=6,8$ Hz).

Bước 3: Tổng hợp methyl 3-(etyl((trans)-4-((2-metoxyetyl)(methylamino)xyclohexyl)amino)-2-methyl-5-(3-morpholinoprop-1-yn-1-yl)benzoat:

Sục argon vào dung dịch chứa methyl 5-bromo-3-(etyl((trans)-4-((2-metoxyetyl)(methylamino)xyclohexyl)amino)-2-methylbenzoat (30 g, 68,02 mmol), 4-(Prop-2-yn-1-yl) morpholin (25,51 g, 204 mmol) và triethylamin (20,61 g, 204 mmol) trong DMF (300 ml) trong thời gian 20 phút. Sau đó, bổ sung CuI (3,87 g, 20,36 mmol) và Pd (PPh_3) $_4$ (7,85 g, 6,79 mmol) và sục argon trong thời gian 20 phút nữa. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 105°C trong thời gian 4 giờ và sau đó làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Làm dừng phản ứng bằng nước (100 ml) và chiết pha nước bằng MeOH/DCM 10 % (400 ml x 3). Làm khô dịch chiết hữu cơ kết hợp qua Na_2SO_4 , lọc và cô. Tinh chế phần cặn bằng sắc ký cột silicagel để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (21 g, hiệu suất 63,7%).

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,46 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,62-3,57 (m, 6H), 3,50 (s, 2H), 3,35-3,32 (m, 2H), 3,21 (s, 3H), 3,17 (m, 1H), 3,05 (q, 2H), 2,61-2,58 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,33 (m, 1H), 2,18 (m, 2H), 1,77-1,70 (m, 4H), 1,36-1,20 (m, 4H), 0,77 (t, 3H, $J=6,8$ Hz), 3H được hợp nhất trong đỉnh dung môi.

Bước 4: Tổng hợp N-((4,6-đimethyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-yl)methyl)-3-(etyl((trans)-4-((2-metoxyetyl)(methylamino)xyclohexyl)amino)-2-methyl-5-(3-morpholinoprop-1-yn-1-yl)benzamit:

Bổ sung NaOH trong nước (2,59 g, 64,91 mmol trong 10 ml H_2O) vào dung dịch chứa methyl 3-(etyl((trans)-4-((2-metoxyetyl)(methylamino)xyclohexyl)amino)-2-methyl-5-(3-

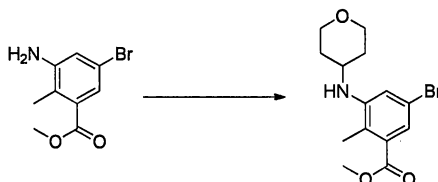
morpholinoprop-1-yn-1-yl)benzoat (21 g, 43,29 mmol) trong EtOH (100 ml) và khuấy ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng, loại bỏ etanol dưới áp suất giảm và axit hóa phần cặn bằng cách sử dụng HCl loãng lên đến độ pH 4 bằng cách sử dụng axit xitric. Tiến hành chiết bằng cách sử dụng MeOH/DCM 10 % (200 ml x 3). Làm khô lớp hữu cơ kết hợp cô tạo ra axit tương ứng (15,5 g, hiệu suất 76%).

Bổ sung 3-(aminometyl)-4,6-đimetylpyridin-2(1H)-on (10 g, 65,80 mmol) và trietyl amin (23 ml, 164,5 mmol) vào dung dịch chứa axit nêu trên (15,5 g, 32,90 mmol) trong DMSO (50 ml). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút trước khi bổ sung PyBop (25,66 g, 49,34 mmol) vào đó ở nhiệt độ 0°C và khuấy thêm qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi hoàn thành, rót khối phản ứng vào nước đá (100 ml) và tiến hành chiết bằng cách sử dụng MeOH/DCM 10 % (200 ml x 3). Làm khô lớp hữu cơ kết hợp qua Na₂SO₄ và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế hợp chất thô bằng sắc ký cột qua alumin bazơ giải hấp bằng MeOH:DCM để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (11 g, hiệu suất 55,3%).

LCMS: 606,50 (M + 1)⁺; ¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7,23 (s, 1H), 7,09 (s, 1H), 6,11 (s, 1H), 4,46 (s, 2H), 3,74-3,72 (m, 4H), 3,51 (s, 2H), 3,47 (t, 2H, J=5,6 Hz), 3,32 (s, 3H), 3,07 (q, 2H, J=7,2 Hz), 2,64-2,63 (m, 7H), 2,38 (m, 1H), 2,37 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,26 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 1,89-1,86 (m, 4H), 1,50-1,30 (m, 4H), 0,83 (t, 3H, J=7,2 Hz).

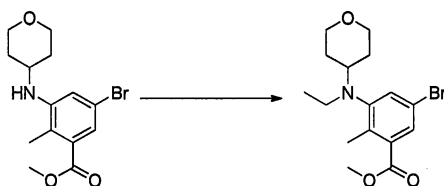
Hợp chất 105:

Metyl 5-bromo-2-metyl-3-[(oxan-4-yl)amino]benzoat



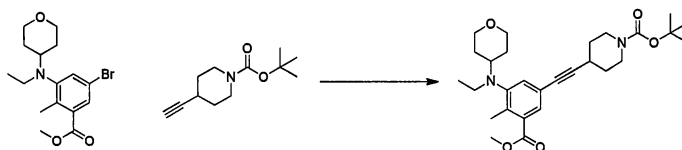
Bổ sung dihydro-2H-pyran-4-on (17,3 g, 173 mmol) và natri triaxetoxylborohydrua (73,6 g, 330 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa metyl 3-amino-5-bromo-2-metylbenzoat (40,2 g, 165 mmol) trong CH₂Cl₂ (500 ml) và AcOH (60 ml). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 giờ. Sau đó, bổ sung NaHCO₃ bão hòa trong nước và tách hỗn hợp. Chiết lớp nước bằng CH₂Cl₂ và cô lớp hữu cơ kết hợp trong chân không. Nghiền phần cặn thành bột với etyl ete, và thu gom chất kết tủa thu được để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng (39,1 g, 72%). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ phần triệu; 7,01 (s, 1H), 6,98 (s, 1H), 5,00 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 3,84-3,87 (m, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,54-3,56 (m, 1H), 3,43 (m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,81-1,84 (m, 2H), 1,47-1,55 (m, 2H).

Metyl 5-bromo-3-[etyl(oxan-4-yl)amino]-2-metylbenzoat



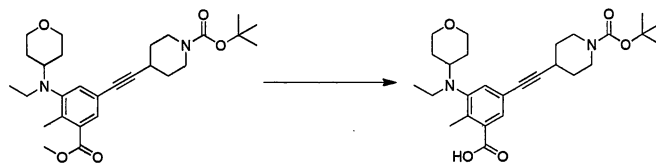
Bổ sung axetaldehyt (24,7 g, 476 mmol) và natri triaxetoxyborohyđrua (79,6 g, 357 mmol) vào dung dịch có khuấy chứa methyl 5-bromo-2-methyl-3-[(oxan-4-yl)amino]benzoat (39,1 g, 119 mmol) trong CH_2Cl_2 (400 ml) và AcOH (40 ml). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 24 giờ. Sau đó, bổ sung NaHCO_3 bão hòa trong nước và tách hỗn hợp. Chiết lớp nước bằng CH_2Cl_2 và cô lớp hữu cơ kết hợp trong chân không. Tinh chế phân cận bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 Heptan/EtOAc = 3/1) để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu nhớt (44,1 g, hiệu suất định lượng). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ phần triệu; 7,62 (s, 1H), 7,52 (s, 1H), 3,80 (m, 5H), 3,31 (m, 2H), 2,97-3,05 (m, 2H), 2,87-2,96 (m, 1H), 2,38 (s, 3H), 1,52-1,61 (m, 2H), 1,37-1,50 (m, 2H), 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H).

tert-Butyl 4-((3-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-5-(metoxycacbonyl)-4-methylphenyl)etynyl)piperidin-1-carboxylat



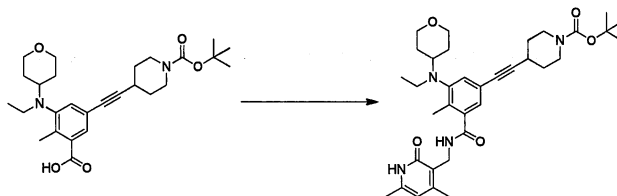
Bổ sung trietylamin (2,82 ml, 20,2 mmol) và đồng(I) iđua (0,096 g, 0,505 mmol) vào dung dịch chứa methyl 5-bromo-3-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-2-methylbenzoat (1,80 g, 5,05 mmol) và *tert*-butyl 4-etylnylpiperidin-1-carboxylat (1,80 g, 8,59 mmol) trong DMF (40 ml). Hỗn hợp phản ứng được khử khí bằng cách sục khí nitơ trong thời gian 15 phút. Sau đó, đưa tetrakis(triphenylphosphin)Paladi(0) (0,292 g, 0,253 mmol) vào và khử khí trong thời gian 10 phút nữa bằng cách sục khí nitơ. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 6 giờ. Làm dừng phản ứng bằng NaHCO_3 bão hòa, chiết bằng TBME (3x40 ml), làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và cô. Tinh chế phân cận bằng sắc ký (AcOEt/Heptan từ 0% đến 40%) để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (2,40 g, hiệu suất 98%). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) δ phần triệu; 7,65 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 3,97 (brd, $J = 11,3$ Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,76 (m, 2H), 3,34 (dt, $J = 2,0, 11,7$ Hz, 2H), 3,24 (ddd, $J = 3,4, 8,8, 12,2$ Hz, 2H), 3,08 (brs, 2H), 2,98 (brs, 1H), 2,80 (dddd, $J = 3,9, 3,9, 3,9, 3,9$ Hz, 1H), 2,52 (s, 3H), 1,87 (m, 2H), 1,60-1,74 (m, 6H), 1,48 (s, 9H), 0,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H); MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 485.4.

Axit 5-((1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidin-4-yl)etynyl)-3-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-2-metylbenzoic



Bổ sung dung dịch chứa natri hydroxit (0,565 g, 14,1 mmol) trong nước (3,0 ml) vào dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(((3-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-5-(metoxycarbonyl)-4-metylphenyl)etynyl)piperidin-1-carboxylat (2,4 g, 4,95 mmol) trong ethanol (20,0 ml) ở nhiệt độ trong phòng. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 6 giờ. Làm dừng phản ứng bằng HCl 1 M (5 ml) và sau đó là dung dịch axit xitric dư để điều chỉnh độ pH về 5. Cô hỗn hợp để loại bỏ EtOH và chiết pha nước còn lại bằng AcOEt (2x40 ml). Kết hợp các lớp hữu cơ, làm khô qua Na₂SO₄, lọc và cô. Tinh chế phân cận bằng sắc ký (AcOEt/Heptan 10%-100%) để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (2,30 g, hiệu suất 99%). ¹H-NMR (500 MHz) δ phần triệu; 7,82 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 3,98 (brd, *J* = 11,3Hz, 2H), 3,77 (m, 2H), 3,35 (dt, *J* = 1,5, 11,3Hz, 2H), 3,25 (ddd, *J* = 3,4, 8,3, 12,2 Hz, 2H), 3,11 (brs, 2H), 3,00 (brs, 1H), 2,81 (dddd, *J* = 3,9, 3,9, 3,9, 3,9 Hz, 1H), 2,60 (s, 3H), 1,88 (m, 2H), 1,60-1,78 (m, 6H), 1,48 (s, 9H), 0,90 (t, *J* = 6,8Hz, 3H); MS (ESI) [M+H]⁺ 471,4.

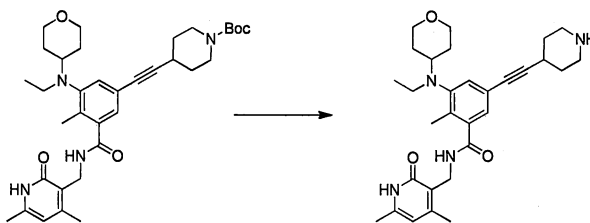
tert-Butyl 4-(((3-(((4,6-đimetyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-yl)metyl)carbamoyl)-5-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-4-metylphenyl)etynyl)piperidin-1-carboxylat



Bổ sung triethylamin (0,90 ml, 6,44 mmol) và (4,6-đimetyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-yl)metanamini clorua (0,405 g, 2,15 mmol) vào dung dịch chứa axit 5-((1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperidin-4-yl)etynyl)-3-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-2-metylbenzoic (1,06 g, 2,25 mmol) trong DMSO (5,8 ml) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch trong trở nên dị tính. Sau đó, bổ sung HOBT (0,493 g, 3,22 mmol) và EDC (0,617 g, 3,22 mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng thu được ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Làm dừng phản ứng bằng nước (80 ml) và khuấy huyền phù đặc này trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Lọc huyền phù đặc và rửa bánh lọc bằng nước (2x20 ml). Làm khô chất rắn đã

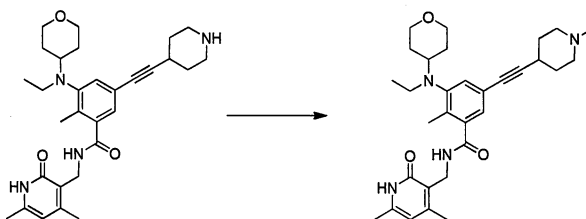
được thu gom lại trong chân không để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (1,27 g, hiệu suất 98%). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ phần triệu; 7,22 (s, 1H), 7,08 (d, $J = 1,0$ Hz 1H), 6,11 (s, 1H), 4,45 (s, 2H), 3,92 (brd, $J = 10,8$ Hz, 2H), 3,78 (dd, $J = 4,4, 5,4$ Hz, 1H), 3,75 (dd, $J = 4,4, 5,4$ Hz, 1H), 3,36 (t, $J = 11,7$ Hz, 2H), 3,21 (br t, $J = 8,3$ Hz, 2H), 3,07 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H), 3,01 (dddd, $J = 3,9, 3,9, 11,3, 11,3$ Hz, 1H), 2,84 (dddd, $J = 3,4, 3,4, 3,9, 3,9$ Hz, 1H), 2,38 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 1,88 (m, 2H), 1,70 ((brd, $J = 12,2$ Hz, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,47 (s, 9H), 0,87 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 605,6.

N-((4,6-Đimetyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-yl)metyl)-3-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-2-metyl-5-(piperidin-4-yletynyl)benzamidit



Bổ sung HCl 4M trong 1,4-đioxan (3 ml, 12,0 mmol) vào dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(((3-((4,6-đimetyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-yl)metyl)carbamoyl)-5-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-4-metylphenyl)etynyl)piperidin-1-carboxylat (250 mg, 0,413 mmol) trong DCM (3 ml) ở nhiệt độ 20°C . Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 1 giờ. LCMS cho thấy rằng phản ứng đã hoàn thành. Cô trực tiếp hỗn hợp phản ứng và hòa tan phần cặn trong DCM và sau đó là làm trung hòa bằng NaHCO_3 bão hòa/nước muối. Làm khô lớp hữu cơ (Na_2SO_4) và lọc. Và cô phần lọc. Phần cặn được sử dụng để alkyl hóa mà không cần tinh chế thêm (209 mg, 100%). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ phần triệu 7,21 (brs, 1H), 7,07 (brs, 1H), 6,11 (s, 1H), 4,46 (s, 2H), 3,95-3,89 (m, 2H), 3,39-3,34 (m, 2H), 3,08 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,06-2,98 (m, 3H), 2,79-2,72 (m, 1H), 2,72-2,65 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 1,94-1,88 (m, 2H), 1,73-1,68 (m, 2H), 1,68-1,56 (m, 4H), 0,85 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H); MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 505,5.

N-((4,6-đimetyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-yl)metyl)-3-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-2-metyl-5-((1-metyl-piperidin-4-yl)etynyl)benzamidit



Bổ sung formaldehyt 35% trong H₂O (0,155 ml, 1,98 mmol) vào dung dịch chứa N-((4,6-đimetyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-yl)metyl)-3-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-2-metyl-5-(piperidin-4-yletynyl)benzamid (100 mg, 0,198 mmol) trong metanol (5 ml) ở nhiệt độ 0°C. Sau khi khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 10 phút, bổ sung natri xyanobororhyđrua (24,9 mg, 0,396 mmol). Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 1 giờ. LCMS cho thấy rằng phản ứng đã hoàn thành. Làm dừng phản ứng bằng NaHCO₃ bão hòa/nước muối và chiết bằng EtAOc/Heptan. Làm khô lớp hữu cơ (Na₂SO₄), lọc và cô. Tinh chế phần cặn bằng sắc ký (cột 10 g, MeOH/DCM=1:9, và sau đó là MeOH/7 M NH₃ trong MeOH/DCM=1:1:8) để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (96,0 mg, 93%). ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ phần triệu 7,22 (brs, 1H), 7,08 (brs, 1H), 6,10 (s, 1H), 4,46 (s, 2H), 3,94-3,87 (m, 2H), 3,35-3,30 (m, 2H), 3,07 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,04-2,97 (m, 1H), 2,79-2,71 (m, 2H), 2,67-2,58 (m, 1H), 2,38 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 2,28-2,21 (m, 2H), 1,97-1,91 (m, 2H), 1,78-1,67 (m, 4H), 1,64-1,54 (m, 2H), 0,85 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); MS (ESI) [M+H]⁺ 519,4.

Ví dụ 2: Quy trình thử nghiệm sinh học và phương pháp tổng quát

Quy trình cho các thử nghiệm enzym PRC2 kiểu đại và PRC2 đột biến

Nguyên liệu chung. *S*-adenosylmethionin (SAM), *S*-adenosylhomoxysteine (SAH), bixin, KCl, Tween20, dimetylsulfoxit (DMSO) và gelatin da bò (BSG) được mua của hãng Sigma-Aldrich ở độ tinh khiết cao nhất có thể. Dithiothreitol (DTT) được mua của hãng EMD. ³H-SAM được mua của hãng American Radiolabeled Chemicals có hoạt tính riêng là 80 Ci/mmol. Đĩa Flash streptavidin 384 giếng được mua của hãng PerkinElmer.

Cơ chất. Các peptit đại diện cho các gốc histon H3 21 – 44 của người chứa lysin 27 không cải biến (H3K27me0) hoặc lysin 27 được dimetyl hóa (H3K27me2) được tổng hợp bằng motif thẻ đánh dấu ái lực-cầu nối G(K-biotin) đầu tận C và mũ amit đầu tận C của hãng 21st Century Biochemicals. Các peptit này được tinh sạch bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đến độ tinh khiết lớn hơn 95% và được xác nhận bằng sắc ký lỏng phổ khối (LC-MS). Các trình tự được liệt kê dưới đây.

H3K27me0: ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGGK(biotin)-amit (SEQ ID NO: 101)

H3K27me2: ATKAARK(me2)SAPATGGVKKPHRYRPGGK(biotin)-amit (SEQ ID NO: 102)

Oligonucleosom hồng cầu ở gà được tinh sạch từ máu gà theo các quy trình đã được thiết lập.

Phức hợp PRC2 tái tổ hợp. Phức hợp PRC2 của người được tinh sạch dưới dạng phức hợp enzym 4 thành phần được đồng biểu hiện trong tế bào *Spodoptera frugiperda* (sf9) bằng cách sử dụng hệ biểu hiện baculovirus. Các tiểu đơn vị được biểu hiện là EZH2 kiểu dại (NM_004456) hoặc các đột biến EZH2 Y641F, N, H, S hoặc C được tạo ra từ cấu trúc EZH2 kiểu dại, EED (NM_003797), Suz12 (NM_015355) và RbAp48 (NM_005610). Tiểu đơn vị EED chứa thẻ đánh dấu FLAG đầu tận N được sử dụng để tinh sạch toàn bộ phức hợp 4 thành phần từ sản phẩm phân giải tế bào sf9. Độ tinh khiết của các phức hợp bằng hoặc lớn hơn 95% được xác định bằng SDS-PAGE và phân tích Agilent Bioanalyzer. Các nồng độ của dung dịch enzym gốc đậm đặc (thông thường 0,3 – 1,0 mg/ml) được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm Bradford so với chuẩn albumin huyết thanh bò (BSA).

Quy trình tổng quát cho thử nghiệm enzym PRC2 đối với cơ chất peptit. Tất cả các thử nghiệm được thực hiện trong đệm chứa bixin 20 mM (pH = 7,6), DTT 0,5 mM, BSG 0,005% và Tween20 0,002%, được điều chế vào ngày sử dụng. Hợp chất trong DMSO 100% (1 µl) được nhỏ thành các vết trên các đĩa polypropylen đáy chữ V 384 giếng (Greiner) bằng cách sử dụng Platemate 2 X 3 được trang bị đầu pipet 384 rãnh (Thermo). Thêm DMSO (1 µl) vào các cột 11, 12, 23, 24, hàng A – H đối với đối chứng tín hiệu cực đại, và thêm SAH, một sản phẩm đã biết và chất ức chế PRC2 (1 µl) vào các cột 11, 12, 23, 24, hàng I – P đối với đối chứng tín hiệu cực tiểu. Dung dịch hỗn hợp (40 µl) chứa enzym PRC2 kiểu dại và peptit H3K27me0 hoặc enzym đột biến Y641 bất kỳ và peptit H3K27me2 được bổ sung bằng Multidrop Combi (Thermo). Hợp chất được ủ với PRC2 trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 25°C, sau đó dung dịch hỗn hợp (10 µl) chứa hỗn hợp của SAM không có hoạt tính phóng xạ và ³H-SAM được bổ sung vào để khơi mào phản ứng (thể tích cuối = 51 µl). Trong tất cả các trường hợp, nồng độ cuối là như sau: enzym PRC2 kiểu dại hoặc đột biến là 4 nM, SAH trong các giếng đối chứng tín hiệu cực tiểu là 1 mM và nồng độ DMSO là 1%. Nồng độ cuối của các thành phần còn lại được chỉ ra trong Bảng 2 dưới đây. Làm dừng thử nghiệm bằng cách bổ sung SAM không có hoạt tính phóng xạ (10 µl) đến nồng độ cuối là 600 µM, mà pha loãng ³H-SAM đến hàm lượng mà không còn phát hiện được sự kết hợp của nó vào cơ chất peptit. 50 µl dung dịch phản ứng trong đĩa polypropylen 384 giếng sau đó được chuyển sang đĩa Flash 384 giếng và peptit đã được biotin hóa được để cho liên kết với bề mặt streptavidin trong ít nhất 1 giờ trước khi được rửa ba lần bằng Tween20 0,1%

trong máy rửa đĩa Biotek ELx405. Sau đó, các đĩa được đọc trên máy đọc đĩa PerkinElmer TopCount để xác định lượng peptit đã được đánh dấu bằng ^3H liên kết với bề mặt đĩa Flash, được xác định dưới dạng số phân rã trong một phút (dpm) hoặc theo cách khác, còn được gọi là số đếm trong một phút (cpm).

Bảng 2: Nồng độ cuối của các thành phần với mỗi phương án thử nghiệm dựa trên danh tính của EZH2 (EZH2 kiểu đại hoặc EZH2 đột biến Y641)

Enzym PRC2 (được biểu thị bởi danh tính của EZH2)	Peptit (nM)	SAM không có hoạt tính phóng xạ (nM)	^3H -SAM (nM)
Kiểu đại	185	1800	150
Y641F	200	850	150
Y641N	200	850	150
Y641H	200	1750	250
Y641S	200	1300	200
Y641C	200	3750	250

Quy trình tổng quát cho thử nghiệm enzym PRC2 kiểu đại trên cơ chất Oligonucleosom. Các thử nghiệm được thực hiện trong đệm phủ gồm bixin 20 mM (pH = 7,6), DTT 0,5 mM, BSG 0,005%, KCl 100 mM và Tween20 0,002%, được điều chế vào ngày sử dụng. Hợp chất trong 100% DMSO (1 μl) được nhỏ thành các vết trên các đĩa polypropylen đáy chữ V 384 giếng (Greiner) bằng cách sử dụng Platemate 2 X 3 được trang bị đầu pipet 384 rãnh (Thermo). Thêm DMSO (1 μl) vào các cột 11, 12, 23, 24, hàng A – H đối với đối chứng tín hiệu cực đại, và thêm SAH, một sản phẩm đã biết và chất ức chế PRC2 (1 μl) vào các cột 11, 12, 23, 24, hàng I – P đối với đối chứng tín hiệu cực tiểu. Dung dịch hỗn hợp (40 μl) chứa enzym PRC2 kiểu đại và oligonucleosom hồng cầu gà được bổ sung bằng Multidrop Combi (Thermo). Hợp chất được cho phép ủ với PRC2 trong 30 phút ở nhiệt độ 25°C, sau đó dung dịch hỗn hợp (10 μl) chứa hỗn hợp của SAM không có hoạt tính phóng xạ và ^3H -SAM được thêm vào để khơi mào phản ứng (thể tích cuối = 51 μl). Các nồng độ cuối là như sau: enzym PRC2 kiểu đại là 4 nM, SAM không có hoạt tính phóng xạ là 430 nM, ^3H -SAM là 120 nM, oligonucleosom hồng cầu gà là 120 nM, SAH trong các giếng đối chứng tín hiệu cực tiểu là 1 mM và nồng độ DMSO là 1%. Làm dừng thử nghiệm bằng cách bổ sung SAM không có hoạt tính phóng xạ (10 μl) đến nồng độ cuối là 600 μM , mà pha loãng ^3H -SAM đến hàm lượng mà không còn phát hiện được sự kết hợp của nó vào cơ chất oligonucleosom hồng cầu gà. 50 μl dung dịch phản ứng trong đĩa polypropylen 384

giếng sau đó được chuyển sang đĩa Flash 384 giếng và nucleosom hồng cầu gà được cố định với bề mặt của đĩa, sau đó được rửa ba lần bằng Tween20 0,1% trong máy rửa đĩa Biotek ELx405. Sau đó, các đĩa được đọc trong máy đọc đĩa PerkinElmer TopCount để xác định lượng oligonucleosom hồng cầu gà đã được đánh dấu bằng ^3H liên kết với bề mặt đĩa Flash, được xác định dưới dạng số phân rã trong một phút (dpm) hoặc theo cách khác, còn được gọi là số đếm trong một phút (cpm).

Phép tính mức ức chế theo %:

$$\% \text{ inh} = 100 - \left(\frac{\text{dpm}_{\text{cmpd}} - \text{dpm}_{\text{min}}}{\text{dpm}_{\text{max}} - \text{dpm}_{\text{min}}} \right) \times 100$$

Trong đó dpm = số phân rã trong một phút, cmpd = tín hiệu trong giếng thử nghiệm, và min và max lần lượt là các đối chứng tín hiệu cực tiểu và tối đa.

Phương pháp làm khớp trị số IC_{50} sử dụng bốn thông số:

$$Y = \text{Đáy} + \frac{(\text{Đỉnh} - \text{Đáy})}{1 + \left(\frac{X}{\text{IC}_{50}} \right)^{\text{Hệ số Hill}}}$$

Trong đó đỉnh và đáy thường thay đổi, nhưng có thể lần lượt được cố định bằng 100 hoặc 0 trong phương pháp làm khớp sử dụng 3 thông số. Hệ số Hill thường thay đổi nhưng cũng có thể được cố định bằng 1 trong phương pháp làm khớp sử dụng 3 thông số. Y là % ức chế và X là nồng độ hợp chất.

Các trị số IC_{50} cho các thử nghiệm enzym PRC2 trên cơ chất Peptit (ví dụ, EZH2 kiểu đại và Y641F) được trình bày trong Bảng 3 dưới đây.

Thử nghiệm metyl hóa WSU-DLCL2

Các tế bào ở dạng huyền phù WSU-DLCL2 được mua của hãng DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cultures, Braunschweig, Đức). Môi trường RPMI/Glutamax, Penicillin-Streptomycin, huyết thanh thai bò được vô hoạt bằng nhiệt, và D-PBS được mua của hãng Life Technologies, Grand Island, NY, Mỹ. Đệm tách chiết và đệm trung hòa (5X) được mua của hãng Active Motif, Carlsbad, CA, Mỹ. Kháng thể kháng Histon H3 ở thỏ được mua của hãng Abcam, Cambridge, MA, Mỹ. Kháng thể kháng H3K27me3 ở thỏ và kháng thể kháng IgG ở thỏ liên hợp HRP được mua của hãng Cell Signaling Technology, Danvers, MA, Mỹ. Cơ chất TMB “siêu nhạy” được lấy từ nguồn BioFX Laboratories, Owings Mills, MD, Mỹ. Albumin huyết thanh bò không chứa IgG

được mua của hãng Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Mỹ. PBS với Tween (10X PBST) được mua của hãng KPL, Gaithersburg, MD, Mỹ. Axit sulfuric được mua của hãng Ricca Chemical, Arlington, TX, Mỹ. Các đĩa Immulon ELISA được mua của hãng Thermo, Rochester, NY, Mỹ. Đĩa nuôi cấy tế bào đáy chữ V được mua của hãng Corning Inc., Corning, NY, Mỹ. Đĩa polypropylen đáy chữ V được mua của hãng Greiner Bio-one, Monroe, NC, Mỹ.

Các tế bào ở dạng huyền phù WSU-DLCL2 được giữ trong môi trường sinh trưởng (RPMI 1640 được cung cấp 10% thể tích/thể tích huyết thanh thai bò được vô hoạt bằng nhiệt và 100 đơn vị/ml penixilin-streptomycin) và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường 5% CO₂. Trong điều kiện thử nghiệm này, các tế bào được ủ trong môi trường thử nghiệm (RPMI 1640 được cung cấp 20% thể tích/thể tích huyết thanh thai bò được vô hoạt bằng nhiệt và 100 đơn vị/ml penixilin-streptomycin) ở nhiệt độ 37°C trong môi trường 5% CO₂ trên máy lắc đĩa.

Các tế bào WSU-DLCL2 được gieo mầm trong môi trường thử nghiệm ở nồng độ 50.000 tế bào mỗi ml vào đĩa nuôi cấy tế bào đáy chữ V 96 giếng với 200 µl mỗi giếng. Hợp chất (1µl) từ các đĩa nguồn 96 giếng được bổ sung trực tiếp vào đĩa nuôi cấy tế bào đáy chữ V. Các đĩa này được ủ trên máy lắc đĩa chuẩn độ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ trong 96 giờ. Sau bốn ngày ủ, các đĩa được quay ở tốc độ 241 x g trong năm phút và môi trường được hút từ từ ra khỏi mỗi giếng của đĩa tế bào mà không làm vỡ các viên lắng tế bào. Các viên lắng tế bào này được tái tạo huyền phù trong 200 µl DPBS và các đĩa được quay lần nữa ở tốc độ 241 x g trong năm phút. Phần nổi lên trên bề mặt được hút ra và đệm tách chiết (100 µl) lạnh (4°C) được thêm vào mỗi giếng. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 4°C trên máy lắc obitan trong hai giờ. Các đĩa được quay ở tốc độ 3427 x g trong 10 phút. Phần nổi bề mặt (80 µl mỗi giếng) được chuyển sang giếng tương ứng của nó trong đĩa polypropylen đáy chữ V 96 giếng. Thêm đệm trung hòa 5X (20 µl mỗi giếng) vào đĩa polypropylen đáy chữ V chứa phần nổi bề mặt. Các đĩa polypropylen đáy chữ V chứa chế phẩm histon thô (CHP) được ủ trên máy lắc obitan trong năm phút. Các chế phẩm histon thô (2µl mỗi giếng) được thêm vào mỗi giếng tương ứng vào các đĩa ELISA 96 giếng với hai bản sao chứa 100 µl đệm phủ (1X PBS + BSA 0,05% khối lượng/thể tích). Các đĩa được bịt kín và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Ngày tiếp theo, các đĩa được rửa ba lần bằng 300 µl mỗi giếng 1X PBST. Các giếng được phong bế trong hai giờ bằng 300 µl chất pha loãng ELISA mỗi giếng ((PBS (1X) BSA (2% khối lượng/thể tích) và Tween20 (0,05% thể tích/thể tích)). Các đĩa được rửa

ba lần bằng 1X PBST. Đối với đĩa phát hiện Histon H3, 100 µl kháng thể kháng Histon-H3 (Abcam, ab1791) được pha loãng 1:10.000 trong chất pha loãng ELISA được bổ sung vào mỗi giếng. Đối với đĩa phát hiện sự trimetyl hóa H3K27, 100 µl kháng thể kháng H3K27me3 được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong chất pha loãng ELISA được bổ sung vào mỗi giếng. Các đĩa được ủ trong 90 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa ba lần bằng 300 µl 1X PBST mỗi giếng. Để phát hiện Histon H3, 100 µl kháng thể kháng IgG thỏ được liên hợp HRP được pha loãng đến tỷ lệ 1:6000 trong chất pha loãng ELISA được bổ sung vào mỗi giếng. Để phát hiện H3K27me3, 100 µl kháng thể kháng IgG thỏ được liên hợp HRP được pha loãng đến tỷ lệ 1:4000 trong chất pha loãng ELISA được thêm vào mỗi giếng. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 90 phút. Các đĩa được rửa bốn lần bằng 1X PBST 300 µl mỗi giếng. Thêm 100 µl cơ chất TMB vào mỗi giếng. Các đĩa Histon H3 được ủ trong năm phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa H3K27me3 được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng được dừng bằng axit sulfuric 1N (100 µl mỗi giếng). Độ hấp thụ với mỗi đĩa được đọc ở bước sóng 450 nm.

Đầu tiên, tỷ lệ đối với mỗi giếng được xác định bằng: $\left(\frac{\text{Giá trị OD}_{450} \text{ H3K27me3}}{\text{Giá trị OD}_{450} \text{ Histon H3}} \right)$

Mỗi đĩa bao gồm tám giếng đối chứng chỉ xử lý bằng DMSO (ức chế tối thiểu) cũng như là tám giếng đối chứng cho sự ức chế tối đa (giếng cơ sở).

Giá trị trung bình của các giá trị tỷ lệ với mỗi loại đối chứng được tính toán và được sử dụng để xác định phần trăm ức chế với mỗi giếng thử nghiệm trong đĩa. Hợp chất thử nghiệm được pha loãng liên tiếp ba lần trong DMSO cho tổng số mười nồng độ thử nghiệm, bắt đầu ở 25 µM. Phần trăm ức chế được xác định và đường cong IC₅₀ được tạo ra bằng cách sử dụng hai giếng giống nhau cho mỗi nồng độ của hợp chất. Các trị số IC₅₀ cho thử nghiệm này được trình bày trong Bảng 3 dưới đây.

$$\text{Phần trăm ức chế} = 100 - \left(\left(\frac{(\text{Tỷ lệ mẫu thử nghiệm riêng rẽ}) - (\text{Tỷ lệ trung bình cơ sở})}{(\text{Tỷ lệ ức chế tối thiểu}) - (\text{Tỷ lệ trung bình cơ sở})} \right) * 100 \right)$$

Phân tích mức tăng sinh tế bào

Tế bào ở dạng huyền phù WSU-DLCL2 được mua của hãng DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Đức). Môi trường RPMI/Glutamax, Penixilin-Streptomycin, huyết thanh thai bò được vô hoạt bằng nhiệt được mua của hãng Life Technologies, Grand Island, NY, Mỹ. Đĩa polypropylen đáy chữ V 384 giếng được mua của hãng Greiner Bio-on, Monroe, NC, Mỹ. Đĩa nuôi cấy tế bào màu trắng

đục 384 giếng được mua của hãng Perkin Elmer, Waltham, MA, Mỹ. Cell-Titer Glo® được mua của hãng Promega Corporation, Madison, WI, Mỹ. Máy đọc đĩa SpectraMax M5 đĩa được mua của hãng Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, Mỹ.

Tế bào ở dạng huyền phù WSU-DLCL2 được giữ trong môi trường sinh trưởng (RPMI 1640 được cung cấp 10% thể tích/thể tích huyết thanh thai bò được vô hoạt bằng nhiệt và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường 5% CO₂. Trong điều kiện thử nghiệm này, các tế bào được ủ trong môi trường thử nghiệm (RPMI 1640 được cung cấp 20% thể tích/thể tích huyết thanh thai bò được vô hoạt bằng nhiệt và 100 đơn vị/ml penixilin-streptomycin) ở nhiệt độ 37°C trong môi trường 5% CO₂.

Để đánh giá ảnh hưởng của các hợp chất đến sự tăng sinh của dòng tế bào WSU-DLCL2, các tế bào phát triển theo hàm mũ được đặt vào đĩa trong các đĩa màu trắng đục 384 giếng ở mật độ 1250 tế bào/ml trong thể tích cuối là 50 µl môi trường thử nghiệm. Đĩa chứa dung dịch gốc của hợp chất được chuẩn bị bằng cách thực hiện pha loãng liên tiếp 3 lần 9 điểm với ba bản sao trong DMSO, bắt đầu từ 10 mM (nồng độ đỉnh cuối của hợp chất trong thử nghiệm là 20 µM và DMSO là 0,2%). Phần phân ước 100 nl từ đĩa chứa dung dịch gốc của hợp chất được bổ sung vào giếng tương ứng của nó trong đĩa tế bào. Đối chứng ức chế 100% gồm các tế bào được xử lý bằng staurosporin có nồng độ cuối 200 nM và đối chứng ức chế 0% gồm các tế bào được xử lý bằng DMSO. Sau khi bổ sung các hợp chất, các đĩa thử nghiệm được ủ trong 6 ngày ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, độ ẩm tương đối > 90% trong 6 ngày. Tỷ lệ tế bào sống sót được xác định bằng cách định lượng ATP có mặt trong môi trường nuôi cấy tế bào, thêm 35 µl chất phản ứng Cell Titer Glo® vào các đĩa tế bào. Độ phát quang được đọc trong SpectraMax M5. Nồng độ ức chế 50% khả năng sống của tế bào được xác định bằng cách sử dụng phép làm khớp 4 thông số của đường cong đáp ứng liều đã chuẩn hóa. Các trị số IC₅₀ cho thử nghiệm này cũng được trình bày trong Bảng 3 dưới đây. Dữ liệu phổ khối cho các hợp chất này cũng được liệt kê trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Hợp chất số	IC ₅₀ H3K27me3 ELISA (uM)	IC ₅₀ trong thử nghiệm tăng sinh tế bào WSU (uM)	IC ₅₀ EZH2 WT (uM)	IC ₅₀ EZH2 peptit v2 (µM)	MS (dạng tự do)
1	0,077	0,0230		<0,005	588,37
2	0,11043	0,38533		0,01498	605,81

Hợp chất số	IC50 H3K27me3 ELISA (uM)	IC50 trong thử nghiệm tăng sinh tế bào WSU (uM)	IC50 EZH2 WT (uM)	IC ₅₀ EZH2 peptit v2 (μM)	MS (đang tự do)
105	0,058-0,150	0,325	<0,01	0,0084	518,3257

Ví dụ 3: Đạo hàm nồng độ gây độc tế bào nhỏ nhất (Lowest Cytotoxic Concentration - LCC)

Đã chứng minh được rằng sự tăng sinh tế bào xuất phát từ sự phân chia tế bào mà dẫn đến sự nhân đôi số lượng các tế bào sau phân chia, so với số lượng các tế bào trước khi phân chia. Trong điều kiện mà một bộ thông số của môi trường cố định (ví dụ, độ pH, nồng độ ion, nhiệt độ, mật độ tế bào, hàm lượng protein môi trường và các yếu tố tăng trưởng, và các thông số tương tự), các tế bào sẽ tăng sinh bằng cách nhân đôi liên tục (tức là, phân chia) theo phương trình sau đây, với điều kiện là các chất dinh dưỡng đầy đủ và các yếu tố cần thiết khác có sẵn.

$$N_t = N_0 \times 2^{\frac{t}{t_D}} \quad (\text{A.1})$$

trong đó N_t là số lượng tế bào tại thời điểm (t) sau khi bắt đầu giai đoạn quan sát, N_0 là số lượng tế bào khi bắt đầu giai đoạn quan sát, t là thời gian sau khi bắt đầu giai đoạn quan sát và t_D là khoảng thời gian cần để nhân đôi tế bào, còn được gọi là thời gian nhân đôi. Phương trình A.1 có thể được biến đổi thành dạng thích hợp hơn của phương trình mũ của cơ số e, sử dụng đẳng thức, $0,693 = \ln(2)$.

$$N_t = N_0 e^{\frac{0,693t}{t_D}} \quad (\text{A.2})$$

Hằng số tốc độ cho quá trình tăng sinh tế bào (k_p) tỷ lệ nghịch với thời gian nhân đôi như sau.

$$k_p = \frac{0,693}{t_D} \quad (\text{A.3})$$

Kết hợp phương trình A.2 và A.3 tạo ra,

$$N_t = N_0 e^{k_p t} \quad (\text{A.4})$$

Do đó, theo phương trình A.4, số lượng tế bào được mong đợi là tăng theo hàm mũ theo thời gian trong giai đoạn phát triển sớm của tế bào, được gọi là giai đoạn phát triển pha log. Các phương trình mũ như phương trình A.4 có thể được chuyển sang dạng tuyến tính bằng cách lấy logarit tự nhiên mỗi bên.

$$\ln(N_t) = \ln(N_0) + k_p t \quad (\text{A.5})$$

Do đó, đồ thị $\ln(N_t)$ dưới dạng hàm của thời gian được mong đợi để tạo ra đường thẳng đi lên với độ dốc bằng k_p và đoạn chắn y bằng $\ln(N_0)$.

Việc thay đổi điều kiện môi trường có thể dẫn đến sự thay đổi tốc độ tăng sinh tế bào mà có thể định lượng được dưới dạng mức thay đổi của hằng số tốc độ tăng sinh k_p . Một trong số các điều kiện có thể dẫn đến sự thay đổi tốc độ tăng sinh là việc đưa vào hệ thống hợp chất chống tăng sinh tại lúc bắt đầu giai đoạn quan sát (tức là, tại $t = 0$). Khi hợp chất chống tăng sinh có tác động ngay lập tức đến sự tăng sinh tế bào, thì đồ thị $\ln(N_t)$ dưới dạng hàm thời gian được mong đợi là sẽ tiếp tục tuyến tính ở tất cả các nồng độ hợp chất, với các giá trị k_p giảm dần khi nồng độ hợp chất tăng dần.

Tùy thuộc vào cơ chế của tác dụng chống tăng sinh, một số hợp chất có thể không tác dụng ngay lập tức đến tốc độ tăng sinh. Thay vào đó, có thể có giai đoạn tiềm ẩn trước khi xuất hiện tác động của hợp chất. Trong trường hợp đó, đồ thị $\ln(N_t)$ dưới dạng hàm thời gian sẽ xuất hiện hai pha, và thời điểm tại đó hợp chất bắt đầu tác động có thể được xác định là điểm là điểm chuyển tiếp giữa các pha. Không tính đến sự tác động của hợp chất đến sự tăng sinh là ngay lập tức hay bắt đầu sau giai đoạn tiềm ẩn, hằng số tốc độ tăng sinh ở mỗi nồng độ hợp chất được xác định tốt nhất bằng độ dốc của đường cong $\ln(N_t)$ theo thời gian từ thời điểm tại đó hợp chất bắt đầu tác động đến lúc kết thúc giai đoạn quan sát của thử nghiệm.

Hợp chất được dùng cho các tế bào đang sinh trưởng có thể tác động đến sự tăng sinh đã quan sát được theo một trong hai con đường tổng quát: bằng cách ức chế sự phân chia thêm tế bào (kìm tế bào) hoặc bằng cách tiêu diệt tế bào (tính gây độc tế bào). Nếu hợp chất có tính kìm tế bào, thì việc làm tăng nồng độ của hợp chất sẽ làm giảm giá trị k_p cho đến khi không có thêm sự phân chia tế bào. Lúc này, tốc độ phát triển của tế bào, và do đó giá trị k_p , sẽ bằng 0. Mặt khác, nếu hợp chất có tính gây độc tế bào, thì giá trị k_p sẽ được hợp thành từ hai hằng số tốc độ: hằng số tốc độ tiếp tục phát triển của tế bào khi có mặt hợp chất (k_g) và hằng số tốc độ tiêu diệt tế bào bằng hợp chất (k_d). Hằng số tốc độ chung cho sự tăng sinh ở

nồng độ cố định của hợp chất do đó sẽ là mức chênh lệch giữa các giá trị tuyệt đối của các hằng số tốc độ đối kháng này.

$$k_p = |k_g| - |k_d| \quad (\text{A.6})$$

Ở các nồng độ hợp chất mà tốc độ phát triển tế bào lớn hơn tốc độ tiêu diệt tế bào, giá trị k_p sẽ mang giá trị dương (tức là, $k_p > 0$). Ở các nồng độ hợp chất mà tốc độ phát triển tế bào là nhỏ hơn so với tốc độ tiêu diệt tế bào, giá trị k_p sẽ mang giá trị âm (tức là, $k_p < 0$) và số lượng tế bào sẽ giảm theo thời gian, chỉ ra tính gây độc tế bào rất lớn. Khi k_g bằng k_d thì hằng số tốc độ tăng sinh chung, k_p , sẽ có giá trị bằng 0. Do đó, có thể xác định nồng độ gây độc tế bào nhỏ nhất (LCC) là nồng độ của hợp chất mà dẫn đến giá trị k_p bằng 0, bởi vì bất kỳ nồng độ nào lớn hơn nồng độ này sẽ dẫn đến tính gây độc tế bào quan sát được một cách rõ ràng. *Lưu ý:* ở các nồng độ thấp hơn LCC, có thể xuất hiện hiện tượng tế bào bị chết, nhưng ở tốc độ thấp hơn so với tốc độ tăng sinh của các tế bào còn lại. Việc xử lý ở đây không được dự định để xác định các khía cạnh sinh học chi tiết của tác động của hợp chất. Đúng hơn là, mục tiêu ở đây là đơn thuần xác định thông số thực tiễn để định lượng một cách khách quan nồng độ của hợp chất mà tại đó tốc độ tiêu diệt tế bào lớn hơn tốc độ phát triển tế bào mới. Thực vậy, LCC là nồng độ tại điểm chuyển tiếp hoặc nồng độ tới hạn mà lớn hơn nồng độ đó thì sẽ quan sát thấy tính gây độc tế bào rõ ràng mà thực chất không phải là nồng độ gây độc tế bào. Về mặt này, LCC có thể được xem là tương tự với các giá trị lượng hóa điểm chuyển tiếp vật lý khác, chẳng hạn như nồng độ mixen tới hạn (CMC) được sử dụng để xác định nồng độ lipit, chất tẩy rửa hoặc các loại chất hoạt động bề mặt khác mà khi lớn hơn nồng độ này, tất cả các phân tử đều sẽ kết hợp thành cấu trúc mixen.

Thông thường, tác động của hợp chất chống tăng sinh đến sự phát triển tế bào thường được lượng hóa nhiều nhất bằng trị số IC_{50} , mà được định nghĩa là nồng độ của hợp chất làm giảm tốc độ tăng sinh tế bào xuống một nửa giá trị quan sát được khi không có mặt hợp chất (tức là, so với mẫu đối chứng dùng chất dẫn thuốc hoặc mẫu đối chứng dùng dung môi). Tuy nhiên, IC_{50} không cho phép các nhà nghiên cứu phân biệt giữa hợp chất gây kìm tế bào và hợp chất gây độc tế bào. Ngược lại, LCC cho phép các nhà nghiên cứu dễ dàng thực hiện sự phân biệt này và định lượng tiếp nồng độ tại đó sự chuyển đổi sang tập tính gây độc tế bào mạnh xuất hiện.

Nếu giới hạn cửa sổ thời gian quan sát xuống giữa điểm bắt đầu tác động và điểm kết thúc thử nghiệm, thì các dữ liệu thường sẽ khớp với phương trình tuyến tính khi được vẽ đồ

thị $\ln(N_t)$ dưới dạng hàm thời gian (*xem trên*). Từ các phép làm khớp kiểu này, giá trị k_p có thể được xác định ở mỗi nồng độ của hợp chất được thử nghiệm. Khi vẽ lại đồ thị giá trị k_p dưới dạng hàm của nồng độ hợp chất ($[I]$) thì đồ thị này sẽ có dạng đường đẳng nhiệt đi xuống, với giá trị lớn nhất $k_{\max}$ khi $[I] = 0$ (được xác định bởi mẫu đối chứng dùng chất dẫn thuốc hoặc mẫu đối chứng dùng dung môi) và giá trị nhỏ nhất $k_{\min}$ tại nồng độ hợp chất vô hạn.

$$k_p = \frac{(k_{\max} - k_{\min})}{1 + \frac{[I]}{I_{\text{mid}}}} + k_{\min} \quad (\text{A.7})$$

trong đó I_{mid} là nồng độ của hợp chất tạo ra giá trị k_p nằm giữa các giá trị $k_{\max}$ và $k_{\min}$ (lưu ý rằng giá trị I_{mid} không bằng IC_{50} , ngoại trừ trong trường hợp hợp chất kìm tế bào hoàn toàn và thuận túy). Do đó, việc làm khớp dữ liệu khi tái lập đồ thị theo phương trình A.7 đưa ra các giá trị ước lượng của $k_{\max}$, $k_{\min}$ và I_{mid} . Nếu hợp chất có tính kìm tế bào (như được định nghĩa trong bản mô tả này), thì giá trị $k_{\min}$ không thể nhỏ hơn 0. Đối với hợp chất gây độc tế bào, $k_{\min}$ sẽ nhỏ hơn 0 và giá trị tuyệt đối của $k_{\min}$ sẽ liên quan trực tiếp đến hiệu quả của hợp chất trong việc tiêu diệt các tế bào.

Các giá trị đã khớp thu được từ phương trình A.7 cũng có thể được sử dụng để xác định giá trị của LCC. Theo định nghĩa, khi $[I] = LCC$, $k_p = 0$. Do đó, trong các điều kiện này, phương trình A.7 trở thành:

$$0 = \frac{(k_{\max} - k_{\min})}{1 + \frac{LCC}{I_{\text{mid}}}} + k_{\min} \quad (\text{A.8})$$

Biểu diễn đại số phương trình A.8 tạo ra phương trình của LCC.

$$LCC = I_{\text{mid}} \left[\left(\frac{k_{\max} - k_{\min}}{-k_{\min}} \right) - 1 \right] \quad (\text{A.9})$$

Phân tích này được thực hiện đơn giản bằng phần mềm làm khớp đường cong phi tuyến tính và có thể được áp dụng trong các thử nghiệm tế bào về hoạt tính hợp chất trong quá trình phát hiện và phát triển thuốc. Theo cách này, LCC có thể tạo ra giá trị lượng hóa hữu ích để đánh giá SAR (mối quan hệ cấu trúc-hoạt tính) của hợp chất.

Ví dụ 4: Thử nghiệm *in vivo*

Chuột nhắt

Chuột nhắt cái Fox Chase SCID[®] (CB17/Icr-*Prkdc^{scid}*/IcrIcoCrl, Charles River Laboratories) hoặc chuột nhắt trụi lông thiếu tuyến ức (Crl:NU(Ncr)-*Foxn1^{nu}*, Charles River Laboratories) 8 tuần tuổi và có cân nặng (BW) nằm trong khoảng từ 16,0 đến 21,1 g vào ngày 1 của nghiên cứu. Các con chuột này được cho uống nước tùy thích (nước thẩm thấu ngược chứa 1 phần triệu Cl) và Lab Diet[®] được cải biến bằng NIH 31 và chiếu xạ chứa 18,0% protein thô, 5,0% chất béo thô, và 5,0% chất xơ thô. Các con chuột nhắt này được nuôi nhốt trên nền chiếu xạ Enrich-o'cobs[™] trong vi lồng tĩnh cách ly với chu kỳ sáng 12 giờ ở nhiệt độ 20–22°C (68–72°F) và độ ẩm 40–60%. Tất cả các quy trình đều tuân theo khuyến cáo trong tài liệu Hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm cho các quy trình nuôi nhốt, chăm sóc, phẫu thuật, điều chỉnh thức ăn và chất lỏng, và chăm sóc thú y.

Nuôi cấy tế bào khối u

Dòng tế bào u lympho ở người thu được từ các nguồn khác nhau (ATCC, DSMZ), ví dụ, Karpas-422 thu được từ DSMZ. Dòng tế bào này được giữ dưới dạng huyền phù nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 chứa 100 đơn vị/ml muối natri Penixilin G, 100 g/ml Streptomycin, 1% HEPES, và 1% L-Glutamin. Môi trường này được bổ sung với huyết thanh thai bò 20%. Các tế bào được nuôi cấy trong bình nuôi cấy mô trong máy ủ được làm ấm ở nhiệt độ 37°C, trong khí quyển gồm 5% CO₂ và 95% không khí.

Ghép khối u *in vivo*

Dòng tế bào u lympho ở người, ví dụ, tế bào Karpas-422, được thu hoạch trong giai đoạn sinh trưởng giữa pha log, và được tái tạo huyền phù trong môi trường cơ sở RPMI-1640 và Matrigel[™] 50% (BD Biosciences) (RPMI:Matrigel=1:1). Mỗi con chuột nhắt được nhận 1 x 10⁷ tế bào (0,2 ml huyền phù chứa tế bào) dưới da trong sườn phải. Khối u được đo hai kích thước bằng thước kẹp để theo dõi sự phát triển khi thể tích trung bình đạt đến khoảng 80–120 mm³ mong muốn. Kích thước khối u, theo mm³, được tính từ:

$$\text{Thể tích khối u} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

trong đó w = chiều rộng và l = chiều dài, theo mm, của khối u. Khối lượng khối u có thể được ước tính với giả định rằng 1 mg tương đương với 1 mm³ thể tích khối u. Sau 10-30 ngày, con chuột có khối u 145-150 mm³ được chia vào các nhóm điều trị có thể tích khối u trung bình là 147 mm³.

Hợp chất thử nghiệm

Hợp chất thử nghiệm được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng và được bảo vệ khỏi ánh sáng. Vào mỗi ngày điều trị, chế phẩm mới của hợp chất sẽ được điều chế bằng cách tạo

huyền phù bột trong natri carboxymethylxenluloza 0,5% (NaCMC) và Tween® 80 0,1% trong nước khử ion. Chất dẫn thuốc, NaCMC 0,5% và Tween® 80 0,1% trong nước khử ion, được sử dụng để điều trị cho nhóm đối chứng với cùng chế độ. Các chế phẩm được bảo quản trong điều kiện tránh ánh sáng ở nhiệt độ 4°C trước khi sử dụng. Trừ khi có chỉ dẫn khác, nếu không các hợp chất được đề cập đến và được thử nghiệm trong thí nghiệm này ở dạng muối cụ thể của nó được nêu trong đoạn này.

Chế độ điều trị

Các con chuột nhắt được điều trị ở liều lượng hợp chất nằm trong khoảng từ 62,5 đến 500 mg/kg theo chế độ BID (2 lần mỗi ngày, cứ 12 giờ/lần) với số lượng ngày dùng khác nhau bằng cách đưa qua ống thông qua miệng vào dạ dày. Mỗi liều được phân phối ở thể tích 0,2 ml/20 g chuột nhắt (10 ml/kg), và được điều chỉnh theo cân nặng của từng con ghi được lần cuối. Thời gian điều trị tối đa là 28 ngày.

Phân tích thể tích khối u trung bình (MTV) và sự ức chế phát triển khối u (TGI)

Hiệu quả điều trị được xác định vào ngày điều trị cuối cùng. MTV(n), thể tích khối u trung bình đối với số lượng con vật là n, có thể đánh giá vào ngày cuối cùng, được xác định cho từng nhóm. Phần trăm ức chế sự phát triển của khối u (%TGI) có thể được xác định bằng một vài cách. Cách thứ nhất, độ chênh lệch giữa MTV(n) của nhóm đối chứng chỉ định và MTV(n) của nhóm được điều trị bằng thuốc được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm của MTV(n) của nhóm đối chứng:

$$\%TGI = \left(\frac{MTV(n)_{\text{đối chứng}} - MTV(n)_{\text{điều trị}}}{MTV(n)_{\text{đối chứng}}} \right) \times 100$$

Cách khác để tính %TGI là tính sự thay đổi kích thước khối u từ ngày 1 đến ngày n với n là ngày điều trị cuối cùng.

$$\%TGI = \left(\frac{\Delta MTV_{\text{đối chứng}} - \Delta MTV_{\text{điều trị}}}{\Delta MTV_{\text{đối chứng}}} \right) \times 100$$

$$\Delta MTV_{\text{đối chứng}} = MTV(n)_{\text{đối chứng}} - MTV(1)_{\text{đối chứng}}$$

$$\Delta MTV_{\text{điều trị}} = MTV(n)_{\text{điều trị}} - MTV(1)_{\text{điều trị}}$$

Độc tính

Các con vật được cân hàng ngày vào các ngày 1–5, và sau đó là hai lần một tuần cho đến khi hoàn thành nghiên cứu. Các con chuột được kiểm tra thường xuyên các biểu hiện bên ngoài của các tác dụng phụ bất lợi bất kỳ liên quan đến việc điều trị, mà đã được ghi lại. Độc tính cho phép đối với liều tối đa dung nhận được (MTD) được xác định là khi BW trung bình theo nhóm giảm ít hơn 20% trong toàn bộ thử nghiệm, và không nhiều hơn 10% tỷ lệ chết do TR. Chết được phân loại là TR nếu do tác dụng phụ khi điều trị như được minh chứng bằng các dấu hiệu lâm sàng và/hoặc khi mổ tử thi, hoặc do các nguyên nhân chưa biết trong thời gian dùng liều. Chết được phân loại là NTR nếu có bằng chứng cho thấy cái chết này không liên quan đến tác dụng phụ khi điều trị. Chết NTR trong thời gian nghỉ dùng thuốc thường sẽ được phân loại là NTRa (do tai nạn hoặc lỗi của con người) hoặc NTRm (do sự lan tỏa của khối u thông qua việc xâm lấn và/hoặc di căn được xác nhận bằng cách mổ tử thi). Các con vật được điều trị qua đường miệng mà chết do các nguyên nhân chưa biết trong giai đoạn dùng thuốc có thể được phân loại là NTRu khi các dấu hiệu của nhóm này không hỗ trợ cho phân loại chúng vào nhóm TR và việc mổ tử thi, để loại trừ lỗi dùng thuốc, không khả thi.

Lấy mẫu

Vào ngày 7 hoặc 28 của nghiên cứu, các con chuột được lấy mẫu theo cách chỉ định trước để đánh giá mức độ ức chế khối u mong muốn. Khối u được thu hoạch từ các con chuột đã được chỉ định trong điều kiện không có ARNaza và khối u này được cắt đôi. Mô khối u đông lạnh từ mỗi con vật được làm lạnh đông đột ngột trong N₂ lỏng và được tán nhỏ bằng cối giã và chày.

Phân tích thống kê và đồ thị

Tất cả các phân tích thống kê và đồ thị đều được thực hiện bằng phần mềm Prism 3.03 (GraphPad) cho hệ điều hành Windows. Để kiểm định ý nghĩa thống kê giữa nhóm đối chứng và nhóm được điều trị trong toàn bộ khoảng thời gian điều trị có các phép đo lặp lại, kiểm định ANOVA, sau đó là kiểm định so sánh nhiều nhóm kiểu Dunnett hoặc kiểm định ANOVA 2 chiều được sử dụng. Phần mềm Prism sẽ đưa kết quả không có ý nghĩa (ns) tại $P > 0,05$, có ý nghĩa (có ký hiệu là “*”) tại $0,01 < P < 0,05$, rất có ý nghĩa (“**”) tại $0,001 < P < 0,01$ và cực kỳ có ý nghĩa (“****”) tại $P < 0,001$.

Tách chiết Histon

Để tách chiết histon, 60-90 mg mô khối u được đồng hóa trong 1,5 ml đệm tách chiết nhân (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 25 mM, Triton X-100 1%, Sucroza 8,6%, cộng

với chất ức chế proteaza của Roche dạng viên nén 1836145) và được ủ trên đá lạnh trong 5 phút. Nhân được gom lại bằng cách ly tâm ở 600 g trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C và được rửa một lần trong PBS. Phần nổi bề mặt được loại bỏ và histon được chiết trong một giờ, thực hiện tạo xoáy cứ 15 phút/lần, với axit sulfuric lạnh 0,4N. Phần chiết được gạn lọc bằng cách ly tâm ở 10.000 g trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C và được chuyển sang ống vi ly tâm mới chứa 10x thể tích axeton lạnh băng. Histon được kết tủa ở nhiệt độ -20°C trong 2 giờ qua đêm, được tạo viên lắng bằng cách ly tâm ở 10.000 g trong 10 phút, và được tái tạo huyền phù trong nước.

ELISA

Histon được pha chế ở nồng độ tương đương trong chất đệm phủ (PBS+BSA 0,05%) tạo ra 0,5 ng/ul mẫu, và 100 ul mẫu hoặc chuẩn được bổ sung với hai bản sao vào 2 đĩa ELISA 96 giếng (Thermo Labsystems, Immulon 4HBX #3885). Các đĩa này được bịt kín và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Ngày tiếp theo, các đĩa được rửa 3 lần bằng 300 ul/giếng PBST (PBS+Tween 20 0,05%; 10X PBST, KPL #51-14-02) trên máy rửa đĩa Bio Tek. Các đĩa được phong bế bằng 300 ul/giếng chất pha loãng (PBS+BSA 2%+ Tween 20 0,05%), được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ, và được rửa 3 lần bằng PBST. Tất cả các kháng thể đều được pha loãng trong chất pha loãng. 100 ul/giếng kháng thể kháng H3K27me3 (CST #9733, dung dịch gốc glyxerol 50% 1:1.000) hoặc kháng thể kháng H3 tổng số (Abcam ab1791, glyxerol 50% 1:10.000) được bổ sung vào mỗi đĩa. Các đĩa này được ủ trong thời gian 90 phút ở nhiệt độ trong phòng và được rửa 3 lần bằng PBST. 100 ul/giếng kháng thể kháng IgG thỏ liên hợp HRP (Cell Signaling Technology, 7074) được bổ sung theo tỷ lệ 1:2.000 vào đĩa H3K27Me3 và theo tỷ lệ 1:6.000 vào đĩa H3 và được ủ trong thời gian 90 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa 4 lần bằng PBST. Để phát hiện, 100 ul/giếng cơ chất TMB (BioFfx Laboratories, #TMBS) được bổ sung vào và các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút. Phản ứng được làm dừng bằng 100 ul/giếng H₂SO₄ 1N. Độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm được đọc trên máy đọc vi đĩa SpectraMax M5.

Nghiên cứu được lực học (PD) 7 ngày

Để kiểm tra xem hợp chất có thể điều biến chất đánh dấu histon H3K27me3 trong khối u *in vivo* hay không, các con chuột nhắt mang khối u ghép ngoại lai Karpas-422 được điều trị bằng hợp chất ở liều lượng 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3, hoặc 500 mg/kg BID hoặc chất dẫn thuốc (chế độ BID) trong thời gian 7 ngày. Có 5 con ở mỗi nhóm. Con

vật được trợ tử 3 giờ sau khi dùng liều cuối cùng và khối u được bảo quản ở trạng thái đông lạnh như được mô tả ở trên. Sau khi tách chiết histon, các mẫu được cho thử nghiệm ELISA bằng cách sử dụng các kháng thể được định hướng chống lại trạng thái đã được trimetyl hóa của histon H3K27 (H3K27me3) hoặc histon H3 tổng số. Dựa trên dữ liệu này, tỷ lệ của dạng H3K27 được methyl hóa toàn bộ so với H3K27 tổng số được tính. Tỷ lệ methyl hóa toàn bộ trung bình cho tất cả các nhóm khi đo bằng ELISA cho thấy khoảng ức chế mong muốn so với chất dẫn thuốc. Thiết kế thí nghiệm này được thể hiện trong Bảng 4A.

Bảng 4A Chế độ dùng liều

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Thể tích liều	Đường dùng	Chế độ
1	5	Chất dẫn thuốc	--	10 µl/g.	Qua đường miệng	BIDx7
2	5	Hợp chất 1	62,5	10 µl/g	Qua đường miệng	BIDx7
3	5	Hợp chất 1	83,3	10 µl/g	Qua đường miệng	BIDx7
4	5	Hợp chất 1	125	10 µl/g	Qua đường miệng	BIDx7
5	5	Hợp chất 1	166,7	10 µl/g	Qua đường miệng	BIDx7
6	5	Hợp chất 1	250	10 µl/g	Qua đường miệng	BIDx7
7	5	Hợp chất 1	333,3	10 µl/g	Qua đường miệng	BIDx7
8	5	Hợp chất 1	500	10 µl/g	Qua đường miệng	BIDx7
9	5	Hợp chất A*	125	10 µl/g.	Qua đường miệng	BIDx7
10	5	Hợp chất A	250	10 µl/g.	Qua đường miệng	BIDx7

*Hợp chất A là N-((4,6-đimetyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-yl)metyl)-5-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-4-metyl-4'-(morpholinometyl)-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamit.

Ví dụ 5: Nghiên cứu hiệu quả điều trị khi tăng liều trên mô hình ghép ngoại lai Karpas-422

Để kiểm tra xem hợp chất có thể hiện tác dụng kháng khối u *in vivo* hay không, con chuột nhất mang khối u ghép ngoại lai KARPAS-422 được điều trị bằng hợp chất ở, ví dụ, liều 62,5, 125, 250, hoặc 500 mg/kg BID trong thời gian 28 ngày. Có 10 con chuột trong mỗi nhóm cho nhánh thử nghiệm đánh giá hiệu quả điều trị. Tiến hành đo tốc độ phát triển khối u trong khoảng thời gian điều trị 28 ngày đối với nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc và nhóm được điều trị bằng hợp chất thử nghiệm.

Histon được tách chiết ra khỏi khối u thu gom được khi kết thúc nghiên cứu vào ngày 28 đối với nhóm dùng để đánh giá hiệu quả (3 giờ sau khi dùng liều cuối cùng đối với cả hai nhóm). Chất đánh dấu H3K27me3 metyl được đánh giá về khả năng bị điều biến khi điều trị theo cách phụ thuộc liều.

Thiết kế thử nghiệm này được thể hiện trong Bảng 4B.

Bảng 4B Chế độ dùng liều

Nhóm	N	Điều trị	Liều (mg/kg)	Thể tích liều	Đường dùng	Chế độ
1	10	Chất dẫn thuốc	--	10 µl/g.	Qua đường miệng	BIDx28
2	10	Hợp chất 1	62,5	10 µl/g	Qua đường miệng	BIDx28
3	10	Hợp chất 1	125	10 µl/g.	Qua đường miệng	BIDx28
4	10	Hợp chất 1	250	10 µl/g.	Qua đường miệng	BIDx28
5	10	Hợp chất 1	500	10 µl/g.	Qua đường miệng	BIDx28
6	10	Hợp chất A*	250	10 µl/g.	Qua đường miệng	BIDx28

*Hợp chất A là N-((4,6-đimetyl-2-oxo-1,2-đihydropyridin-3-yl)metyl)-5-(etyl(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)amino)-4-metyl-4'-(morpholinometyl)-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamit.

Thể tích khối u (Tumor volume - TV) được tính từ các phép đo kích thước sử dụng thước kẹp bằng công thức tính thể tích của elipsoit dài $(L \times W^2)/2$ trong đó L và W là các số đo chiều dài và chiều rộng trục giao tương ứng (mm).

Số liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD). Mức chênh lệch của TV giữa nhóm điều trị bằng chất dẫn thuốc và nhóm điều trị bằng hợp chất được phân tích bằng phân tích phương sai các số đo lặp lại (ANOVA) sau đó là kiểm định so sánh nhiều nhóm kiểu Dunnett. Giá trị $P < 0,05$ (hai chiều) được coi là có ý nghĩa thống kê. Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng gói phần mềm Prism 5 phiên bản 5.04 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Các nghiên cứu ở trên cho thấy rằng cả Hợp chất 1 và Hợp chất A đều thể hiện tác dụng kìm hãm và đẩy lùi sự phát triển của khối u trong mô hình ghép ngoại lai Karpas-422 và được dung nạp tốt. Xem, ví dụ, các hình vẽ Fig. 1 và Fig.2. Ngoài ra, tính chất được động học và dược lực học của Hợp chất 1 hoặc Hợp chất A từ nghiên cứu ở trên được minh họa trên các hình vẽ từ Fig. 3 đến Fig. 8. Fig. 3 là biểu đồ thể hiện lượng của hợp chất 1 trong khối u vào ngày 7 hoặc ngày 28 sau khi điều trị hoặc lượng của hợp chất A trong khối u vào ngày 7 sau khi điều trị. Trên hình vẽ này, từ “A” đến “G” biểu thị 7 ngày sau khi sử dụng hợp chất 1 lần lượt ở liều lượng 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3, và 500 mg/kg; “H” và “I” biểu thị 7 ngày sau khi sử dụng hợp chất A lần lượt ở liều lượng 125 và 250 mg/kg; và từ “J” đến “L” biểu thị 28 ngày sau khi sử dụng hợp chất 1 lần lượt ở liều lượng 62,5, 125 và 250 mg/kg. Lưu ý: đối với các mẫu vào ngày 28, khối u quá nhỏ để phân tích từ nhóm được điều trị bằng 250 mg/kg Hợp chất A và nhóm được điều trị bằng 500 mg/kg Hợp chất 1; chỉ 1 trong số 10 và 5 trong số 10 khối u đủ lớn để phân tích lần lượt từ nhóm được điều trị bằng 250 mg/kg Hợp chất 1 và 125 mg/kg Hợp chất 1. Fig. 4 là biểu đồ thể hiện lượng của hợp chất 1 hoặc Hợp chất A trong huyết tương vào ngày 7 hoặc ngày 28 sau khi điều trị. Đường nét đứt phía trên cho thấy LCC đã được hiệu chỉnh có tính đến sự liên kết với protein huyết tương (PPB) của hợp chất A và đường nét đứt phía dưới cho thấy LCC đã được hiệu chỉnh có tính đến PPB của hợp chất 1. Fig. 5 là biểu đồ thể hiện mức độ metyl hóa H3K27me3 toàn bộ trong khối u KARPAS-422 từ chuột nhắt được điều trị bằng Hợp chất 1 hoặc Hợp chất A trong thời gian 7 ngày. Trên hình vẽ này, “A” biểu thị việc điều trị

bằng chất dẫn thuốc; từ “B” đến “H” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất 1 lần lượt ở liều lượng 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3, và 500 mg/kg; và “I” và “J” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất A lần lượt ở liều lượng 125 và 250 mg/kg. Fig. 6 là biểu đồ thể hiện mức độ methyl hóa H3K27me3 toàn bộ trong khối u KARPAS-422 từ chuột nhắt được điều trị bằng Hợp chất 1 trong thời gian 28 ngày. Fig. 7 là biểu đồ thể hiện mức độ methyl hóa H3K27me3 toàn bộ trong tủy xương từ chuột nhắt mang khối u ghép ngoại lai KARPAS-422 điều trị bằng Hợp chất 1 hoặc Hợp chất A trong thời gian 7 ngày. Trên hình vẽ này, “A” biểu thị việc điều trị bằng chất dẫn thuốc; từ “B” đến “H” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất 1 lần lượt ở liều lượng 62,5, 83,3, 125, 166,7, 250, 333,3, và 500 mg/kg; và “I” và “J” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất A lần lượt ở liều lượng 125 và 250 mg/kg. Fig. 8 là biểu đồ thể hiện mức độ methyl hóa H3K27me3 toàn bộ trong tủy xương từ chuột nhắt mang khối u ghép ngoại lai KARPAS-422 điều trị bằng Hợp chất 1 trong thời gian 28 ngày. Trên hình vẽ này, “A” biểu thị việc điều trị bằng chất dẫn thuốc; từ “B” đến “E” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất 1 lần lượt ở liều lượng 62,5, 125, 250, và 500 mg/kg; và “F” biểu thị việc điều trị bằng Hợp chất A ở liều lượng 250 mg/kg.

Trong các ví dụ 6-8 dưới đây, các thí nghiệm và phân tích được thực hiện bằng các phương pháp và các kỹ thuật tương tự như các phương pháp và kỹ thuật được mô tả trong tài liệu ví dụ, J. Lin, *Pharmaceutical Research*, 2006, 23(6):1089-1116; L. Di et al., *Comb Chem High Throughput Screen*. 2008, 11(6):469-76; M. Fonsi et al., *Journal of Biomolecular Screening*, 2008, 13:862; E. Sjögren et al., *Drug Metab. Dispos*. 2012, 40:2273-2279; T.D. Bjornsson, et al., *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(7):815-832; J.B. Houston and K.E. Kenworthy, *Drug Metab Dispos*, 2000, 28(3):246-254; và S.W. Grimm et al., *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(7):1355-1370.

Ví dụ 6: Đánh giá độ ổn định chuyển hóa trong tiểu thể gan

Độ ổn định chuyển hóa của các hợp chất 1, 2, và 105, được đánh giá trong tiểu thể gan từ năm loài, bao gồm chuột nhắt, chuột cống, chó, khỉ, và người.

Phương pháp: Tiến hành ủ trong các đĩa 96 giếng chứa tổng thể tích 250 μ l chứa 100 mmol/l đệm kali phosphat (độ pH = 7,4), 1 mg/ml tiểu thể gan, hợp chất thử nghiệm (tức là, Hợp chất 1, 2, hoặc 105) ở 8 nồng độ, và 2 mg/ml NADPH. Các nồng độ của hợp chất được sử dụng để ủ nằm trong khoảng từ 45,7 nM lên đến 100 μ M. Việc bổ sung NADPH được áp dụng để bắt đầu phản ứng, và tiến hành ủ trong bể nước rung ở nhiệt độ 37°C trong thời gian lên đến 60 phút. Phản ứng được làm ngừng bằng cách bổ sung thể tích tương đương của dung dịch làm ngừng chứa chất chuẩn nội (IS). Sau đó, các mẫu được quay trong máy

ly tâm lạnh ở tốc độ 3000 vòng/phút trong thời gian tối thiểu là 5 phút trước khi phân tích. Lượng tiêu hao hợp chất thử nghiệm trong hỗn hợp ủ, như được xác định bằng cách sử dụng LC/TOFMS, được sử dụng để ước tính giá trị thanh thải nội tại đối với tiểu thể gan. Hệ thống LC/TOFMS bao gồm thiết bị lấy mẫu tự động Shimadzu SIL-HTC (Kyoto, Japan), hai bơm LC-20AD; Shimadzu Corp.), và cột sấy (CTO-20AC; Shimadzu Corp.) với máy đo phổ khối theo thời gian bay (AB SCIEX Qstar Elite, AB Sciex, Foster City, CA). Diện tích đỉnh của hợp chất thử nghiệm và IS dùng cho thử nghiệm này được tích phân bằng Analyst QS (version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA). Sự phân ly do va chạm (CAD) nhờ nito được sử dụng để tạo ra sản phẩm là các ion. Điều kiện tại đó thiết bị được tối ưu hóa là ở chế độ ion hóa dương.

Việc định lượng LC/MS/MS dựa trên tỷ lệ của diện tích đỉnh của hợp chất thử nghiệm so với diện tích đỉnh của IS. Việc tính toán và tích phân diện tích đỉnh của các hợp chất 1, 2, hoặc 105 và IS bằng cách sử dụng Analyst QS 2.0 (AB Sciex, Foster City, CA). Tiến hành tính toán bằng cách sử dụng Excel (Office 2010, Microsoft Corp., Redmond, WA) và GraphPad Prism v. 5.02 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Số liệu được phân tích và được thông báo dựa trên SOP thích hợp, chẳng hạn như SOP được mô tả trong tài liệu J. Lin, *Pharmaceutical Research*, 2006, 23(6):1089-1116; và Di L et al., *Comb Chem High Quaput Screen*. 2008 11(6):469-76.

Sự tiêu hao của hợp chất thử nghiệm dùng cho các giá trị K_m và V_{max} với tiểu thể gan được tính bằng cách dựng đồ thị theo thời gian để xác định tốc độ tiêu hao. Sau đó, tốc độ tiêu hao được dựng đồ thị bằng cách sử dụng mẫu động học thích hợp. Số liệu được tính dựa trên các phương trình sau đây:

$$\text{Michaelis-Menten: } Cl_{int} (\mu\text{l/phút/mg của tiểu thể gan}) = V_{max} / K_m$$

$$\text{Hill: } Cl_{int} (\mu\text{l/phút/mg của tiểu thể gan}) = Cl_{max} = V_{max} / K_s \cdot (n - 1) / (n (n - 1)^{1/n})$$

$$Cl_{int} (\mu\text{l/phút/g gan}) = Cl_{int} (\mu\text{l/phút/mg tiểu thể}) \cdot \text{Hệ số tỷ lệ hoặc } Cl_{int} (\mu\text{l/phút}/10^6 \text{ tế bào}) \cdot \text{Hệ số tỷ lệ.}$$

Kết quả được nêu trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

	Độ thanh thải nội tại ước tính (ml/phút/kg)				
	Chuột nhắt	Chuột cống	Chó	Khỉ đầu chó	Người

Hợp chất 1	15,4	14,8	8,1	58,6	10,5
Hợp chất 105	54,7	47,5	64,2	74,8	42,1
Hợp chất 2	17,6	14,8	34,3	32,8	8,8

Tất cả ba hợp chất được thử nghiệm, tức là, Hợp chất 1, 2, và 105 đều thể hiện độ thanh thải thông qua chuyển hóa thấp ở tiểu thể gan người (HLM). Cũng quan sát thấy có sự khác nhau về độ thanh thải thông qua chuyển hóa giữa các loài. Khi đầu chó nhìn chung thể hiện độ thanh thải cao hơn so với các loài khác.

Ví dụ 7: Đánh giá sự cảm ứng CYP

Sự cảm ứng của mỗi Hợp chất 1, 2, và 105 được đánh giá ở tế bào gan người được bảo quản lạnh từ một đối tượng cho đơn lẻ.

Phương pháp: Tế bào gan thu được từ hãng BD Biosciences (Woburn, MA), và môi trường và thuốc nhuộm nhân DAPI thích hợp mua của hãng Life Technologies (Durham, NC). Môi trường Eagle được cải biến Dulbecco (DMEM), nước muối đệm phosphat Dulbecco (DPBS), 100x axit amin không thiết yếu MEM, 100x dung dịch Penixilin/Streptomycin/Glutamin, 2x xanh trypan mua của hãng Mediatech (Manassas, VA). Huyết thanh thai bò (FBS) thu được từ hãng Tissue Culture Biologicals (Tulare, CA). Các đĩa phủ collagen 24 giếng dùng để phân tích mARN mua từ hãng BD Biosciences (San Jose, CA). Mẫu dò và đoạn môi được thiết kế sẵn được sử dụng trong hai thử nghiệm ba bản sao để đánh giá sự thay đổi của mARN. Đối chứng dương là β -naphthoflavon đối với CYP1A (1 và 10 $\mu\text{mol/l}$), phenobarbital đối với CYP2B6 (100 $\mu\text{mol/l}$ và 1 mmol/l), và rifampixin đối với CYP2C9 và CYP3A (1 và 10 $\mu\text{mol/l}$). DMSO được sử dụng làm đối chứng dùng chất dẫn thuốc (đối chứng âm). Thử nghiệm đặc hiệu dạng CYP được thực hiện sau thời gian xử lý, và tế bào được đếm để xác định khả năng sống.

Tế bào gan được bảo quản lạnh được làm tam giá trong bể nước 37°C và cho vào đĩa theo hướng dẫn sử dụng của nhà cung cấp. Một ống tế bào gan được bổ sung vào ống hình nón 50 ml chứa môi trường phục hồi tế bào gan được bảo quản lạnh của Life Technologies (CHRM). Các tế bào này được quay trong máy ly tâm Beckman với rôto GH 3.8 ở tốc độ 800 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Dịch nổi bề mặt được lấy ra và tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường đĩa để đếm. Sau khi đếm, tế bào được tái tạo huyền phù ở mật độ 0,75 triệu tế bào sống/ml. Huyền phù (0,5 ml/giếng) được bổ sung vào đĩa phủ collagen 24 giếng, hoặc, sau khi bổ sung 60 μl DMEM chứa 10% FBS,

Penixilin/Streptomycin/Glutamin, và axit amin không thiết yếu MEM, 80 μ l huyền phù được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa phủ collagen 96 giếng. Sau khi xoáy và rung để tạo ra độ bao phủ đĩa tốt hơn, tế bào được đặt trong máy ủ nuôi cấy mô ở CO₂ 5% và 37°C và để cho gắn kết qua đêm. Sau đó, tế bào được xử lý bằng cách sử dụng môi trường duy trì tế bào gan CellzDirect. Tế bào được cho tiếp xúc với Hợp chất 1, 2, hoặc 105 (1 hoặc 10 μ mol/l) hoặc chất dẫn thuốc trong thời gian 48 giờ. Trong quá trình xử lý, môi trường duy trì và hợp chất thử nghiệm được bổ sung mới mỗi 24 giờ.

Sau khi kết thúc việc ủ, tế bào được rửa bằng DPBS. Sau khi rửa bằng DPBS, tế bào được cố định bằng cách sử dụng *p*-formaldehyt 3,7% trong DPBS trong thời gian một giờ. Formaldehyt được loại bỏ và 0,6 μ mol/l DAPI trong DPBS được bổ sung. Tế bào được nhuộm bằng DAPI trong thời gian 20 phút và sau đó được rửa ba lần bằng DPBS. Tế bào được đếm bằng cách sử dụng ArrayScan II (Cellomics, Pittsburgh, PA) với vật kính 5X. Phần tế bào gan còn lại được tính bằng cách sử dụng số lượng tế bào tìm thấy ở điều kiện xử lý chia cho số lượng tế bào tìm thấy ở đối chứng dùng chất dẫn thuốc.

Sau khi xử lý, tế bào được làm tan bằng cách sử dụng đệm RLT từ bộ kit Qiagen RNeasy. mARN được tách riêng bằng cách sử dụng bộ kit RNeasy với việc xử lý ADNaza bằng cách áp dụng quy trình của nhà sản xuất. Nồng độ mARN được đo thông qua Nanodrop ND-1000 (Wilmington, DE). Nồng độ mARN được chuẩn hóa đối với mọi mẫu trong thể cho. Việc phiên mã ngược được tiến hành với bộ kit tổng hợp cADN Superscript VILO của hãng Life Technologies theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi tổng hợp cADN, PCR định lượng theo thời gian thực được tiến hành bằng cách sử dụng hệ thống PCR nhanh theo thời gian thực 7500 của hãng Applied Biosystems, công ty con sở hữu toàn phần của Life Technologies. Các thành phần phản ứng dùng cho PCR theo thời gian thực bao gồm: 10 μ l hỗn hợp chính cải tiến nhanh Taqman (Life Technologies), 2 μ l cADN, 5 μ l nước không chứa nucleaza (Life Technologies), 1 μ l HS00984230_m1 dùng cho thử nghiệm được đánh dấu FAM hạn chế bằng đoạn mỗi đối với β -2 microglobulin, 1 μ l HS00167927_m1 dùng cho thử nghiệm được đánh dấu VIC hạn chế bằng đoạn mỗi đối với CYP1A2 hoặc HS04183483_g1 đối với CYP2B6, và 1 μ l HS04260376_m1 dùng cho thử nghiệm được đánh dấu NED hạn chế bằng đoạn mỗi đối với CYP2C9 hoặc HS00604506_m1 đối với CYP3A4. Thực hiện tính toán số lần chênh lệch so với đối chứng dùng chất dẫn thuốc bằng phần mềm 7500 phiên bản 2.0.5 (Life Technologies) bằng cách sử

dụng phương pháp $\Delta\Delta C_t$. Thực hiện tính toán E_{max} và EC_{50} bằng cách sử dụng GraphPad Prism.

Bảng 6

Hợp chất	Nồng độ (μM)	CYP1A		CYP2B6		CYP2C9		CYP3A		% tế bào còn lại so với đối chứng
		Mức độ cảm ứng (lần)	% đối chứng dương	Mức độ cảm ứng (lần)	% đối chứng dương	Mức độ cảm ứng (lần)	% đối chứng dương	Mức độ cảm ứng (lần)	% đối chứng dương	
1	1	1,04	2,8	0,98	18,0	1,04	43,5	1,04	13,9	107,44
	10	1,14	3,0	1,43	26,3	1,26	52,6	0,99	13,3	99,00
2	1	0,73	Không có	0,61	Không có	0,57	Không có	0,59	Không có	124,70
	10	0,83	Không có	0,64	Không có	0,73	Không có	0,73	Không có	120,90
105	1	1,14	3,0	1,39	25,5	1,20	50,4	1,35	18,1	103,19
	10	1,65	4,4	2,84	52,2	1,82	76,3	2,52	33,8	97,49

Như được thể hiện trong Bảng 6 ở trên, Hợp chất 1 không thể hiện khả năng gây cảm ứng đáng kể (ngoại trừ có khả năng gây cảm ứng với CYP2C9); Hợp chất 2 không thể hiện khả năng gây cảm ứng (với hoạt tính thấp hơn một chút); và Hợp chất 105 thể hiện khả năng cảm ứng đối với CYP2B6, CYP2C9, và CYP3A. Không quan sát thấy khả năng sống sót tế bào giảm đáng kể.

Ví dụ 8: Đánh giá khả năng ức chế CYP

Khả năng ức chế tiềm ẩn đối với hoạt tính enzym của xitô crom P450 của người (CYP) của hợp chất 1, 2, hoặc 105 được đánh giá bằng cách sử dụng tiểu thể gan người đã thu gom.

Phương pháp: Khả năng ức chế cạnh tranh của các hợp chất 1, 2, và 105 được xác định bằng cách đánh giá ở nhiều nồng độ trên phản ứng CYP mẫu dò gần giá trị K_m tương ứng của chúng để tạo ra đường cong IC_{50} cho tiểu thể gan người (HLM). Khả năng bất hoạt phụ thuộc thời gian (TDI) cũng được đánh giá cho CYP3A4/5 bằng cách ước giá các giá trị K_I và k_{inact} khi thích hợp.

Huyền phù chứa PB, HLM, mẫu dò là cơ chất chọn lọc CYP, và chất ức chế cần được thử nghiệm được bổ sung vào đĩa 96 giếng. Các đĩa này được ủ sẵn trong bể nước $37^\circ C$ trong khoảng 2 phút. Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung NADPH vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng. Nồng độ cuối cùng của PB, HLM, và NADPH lần lượt là 100

mmol/l (độ pH 7,4), 0,1 mg/ml, và 2,3 mmol/l. Mẫu dò là cơ chất CYP và chất ức chế CYP được sử dụng làm đối chứng dương và nồng độ tương ứng của chúng được liệt kê dưới đây. Nồng độ MeOH cuối cùng được sử dụng trong mỗi lần ủ không vượt quá 0,8%.

Sau thời gian ủ thích hợp, một thể tích tương đương của dung dịch làm dừng chứa IS được bổ sung vào các giếng thích hợp. Các mẫu tiêu chuẩn và mẫu kiểm tra chất lượng (QC) được chuẩn bị bằng cách sử dụng các thành phần tương tự như mẫu thử nghiệm. Mẫu trống được chuẩn bị từ dung dịch làm dừng tương tự như các mẫu khác nhưng không chứa IS. Các đĩa được quay trong thời gian 5 phút trong máy ly tâm để bàn ở tốc độ 3000 vòng/phút. Các mẫu được phân tích bằng LC/MS/MS. Điều kiện ủ và đối chứng dương được liệt kê trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

CYP được thử nghiệm	Mẫu dò là cơ chất CYP	Nồng độ cơ chất (μmol/l)	Chất ức chế CYP (Đối chứng dương)	Nồng độ ức chế lớn nhất (μmol/l)	Thời gian ủ (phút)	Chất chuẩn nội (LC/MS/MS)
CYP1A2	Phenaxetin	40	Furafyllin	20	10	¹³ C ₂ , ¹⁵ N-axetaminophen
CYP2B6	Bupropion	140	Ticlopidin	5	10	² H ₆ -hydroxybupropion
CYP2C8	Amodiaquin	10	Montelukast	12	10	² H ₃ -desethylamodiaquin
CYP2C9	Tolbutamit	100	Sulfaphenazol	20	10	² H ₉ -hydroxytolbutamit
CYP2C19	(S)-Mephenytoin	30	(S)-Benzylnirvanol	8	10	² H ₃ -4'-hydroxymephenytoin
CYP2D6	(±)-Bufuralol	20	Quinidin	2	5	² H ₉ -1'-hydroxybufuralol
CYP3A4/5	Midazolam	3	Ketoconazol	1	5	¹³ C ₃ -1'-hydroxymidazolam
	Testosteron	70				(R)-propranolol

Để đánh giá TDI, huyền phù ủ sơ bộ chứa PB, HLM, và dung dịch gốc của chất ức chế được bổ sung vào đĩa 96 giếng. Các đĩa này được ủ trước trong bể nước 37°C trong khoảng 2 phút. Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung NADPH vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng và tiến hành trong thời gian 0, 5, 10, 15, 20, và 30 phút. Đối với đối chứng không có NADPH, dung dịch PB được thay thế cho dung dịch gốc của NADPH. Nồng độ cuối cùng của PB, HLM, và NADPH lần lượt là 100 mmol/l (độ pH 7,4), 0,2 mg/ml, và 2,3 mmol/l. Ở các thời điểm tương ứng, 12,5 μl huyền phù đã ủ sơ bộ và pha loãng 20 lần thành hỗn hợp ủ thứ cấp đã được ủ sơ bộ chứa mẫu dò là cơ chất chọn lọc CYP để đánh giá hoạt tính dư. Mẫu dò là cơ chất được sử dụng là testosteron (250 μmol/l) và đối chứng dương là troleandomyxin.

Hệ thống HPLC được sử dụng là hệ thống Shimadzu HPLC (Kyoto, Nhật Bản) bao gồm thiết bị lấy mẫu tự động SIL-HTC, máy khử khí DGU-14A, ba bơm LC-10ADvp, và

cột sấy CTO-10ACvp. Các mẫu được phân tích trên máy đo phổ khối tứ cực chấp ba API4000QTrap (AB Sciex, Foster City, CA) bằng cách sử dụng phương pháp ion hóa phun xoay chiều ở chế độ ion dương.

Việc tính toán và tích phân diện tích đỉnh của tất cả các chất chuyển hóa đã được theo dõi và IS được thực hiện bằng Analyst 1.6 (AB Sciex, Foster City, CA). Việc định lượng được thực hiện bằng cách sử dụng đường cong định cỡ được tạo ra bằng cách dựng đồ thị tỷ lệ diện tích đỉnh của chất chuyển hóa so với IS theo nồng độ của chuẩn định cỡ, và được tạo ra bằng phép hồi quy bậc hai với trọng số $1/x^2$ ($y = a x^2 + b x + c$). Phần trăm ức chế được tính toán bằng cách sử dụng Excel (Office 2010, Microsoft Corp., Redmond, WA), và được dựng đồ thị bằng cách sử dụng GraphPad Prism (Phiên bản 5.02, GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA) dựa trên giả định rằng có một vị trí liên kết. Nồng độ danh nghĩa của hợp chất thử nghiệm và đối chứng dương được chuyển đổi sang hàm log trong GraphPad Prism. Bằng cách sử dụng đồ thị của hoạt tính CYP3A4/5 còn lại theo thời gian ủ sơ bộ, tốc độ mất hoạt tính CYP (λ) được ước tính bằng phép hồi quy không tuyến tính. Các thông số, k_{inact} và K_I , được ước tính sau đó bằng cách làm khớp theo phương trình dưới đây:

$$\lambda = k_{inact} \times \frac{[I]}{K_I + [I]}$$

trong đó $[I]$ là nồng độ ban đầu của hợp chất 1, 2, hoặc 105.

Bảng 8: Sự ức chế thuận nghịch

Hợp chất	IC ₅₀ (μM)						
	CYP1A	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 Midazolam	CYP3A4/5 Testosteron
1	>100	>100	>100	89,57	22,94	40,46	>100
2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
105	>100	47,43	75,66	33,65	2,95	9,67	>100

Bảng 9: Đánh giá khả năng bất hoạt phụ thuộc thời gian (TDI)

Hợp chất	K _I (μM)	k _{inact} (phút ⁻¹)	k _{inact} / K _I (μM ⁻¹ ·phút ⁻¹)
1	6,4 (3,3**)	0,0277	0,0043
105	10,2	0,0214	0,0021
2	22,3	0,0376	0,0017

Như được thể hiện trong Bảng 8 ở trên, Hợp chất 1 và 2 không thể hiện khả năng ức chế thuận nghịch đáng kể; và Hợp chất 105 thể hiện khả năng ức chế đáng kể đối với

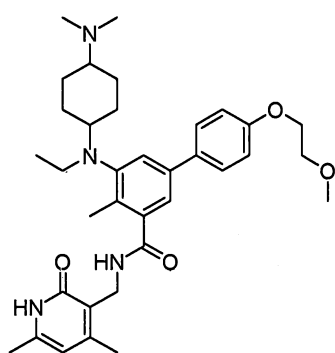
CYP2D6 và CYP3A4 (midazolam). Ngoài ra, như được thể hiện trong Bảng 9 ở trên, tất cả các hợp chất 1, 2, và 105 đều thể hiện khả năng bất hoạt phụ thuộc thời gian, nồng độ, và NADPH của CYP3A4/5 (sử dụng midazolam làm mẫu dò).

Việc bộc lộ toàn bộ nội dung của từng sáng chế và các bài báo khoa học trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích tham khảo.

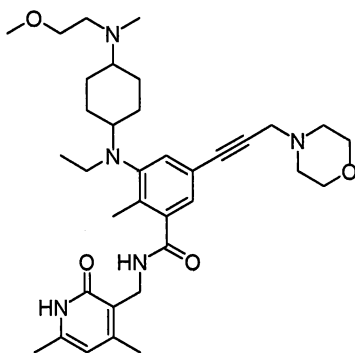
Sáng chế có thể có các phương án ở các dạng cụ thể khác mà không nằm ngoài tinh thần hoặc đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, các phương án trên đây, ở mọi khía cạnh, mang tính minh họa hơn là giới hạn sáng chế được mô tả trong bản mô tả này. Do đó, phạm vi của sáng chế được thể hiện trong các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm hơn là trong phần mô tả trên đây, và tất cả các thay đổi nằm trong định nghĩa và phạm vi tương đương của các điểm yêu cầu bảo hộ đều được dự định bao gồm trong đó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

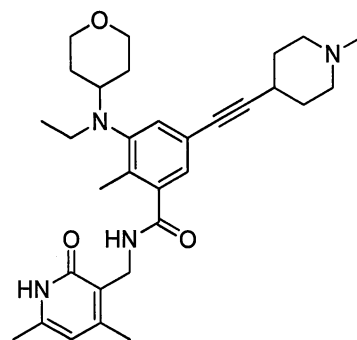
1. Hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:



,

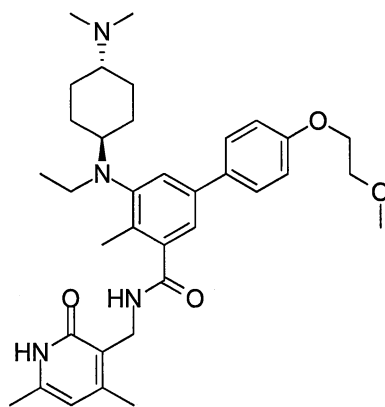


,



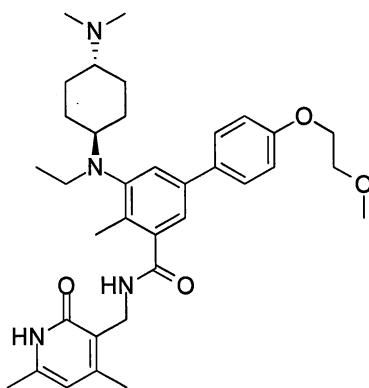
, và

muối được dụng của nó.



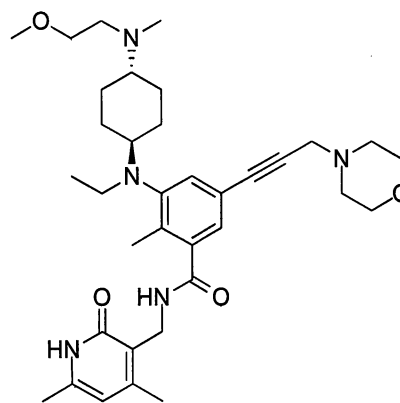
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là
muối được dụng của nó.

hoặc



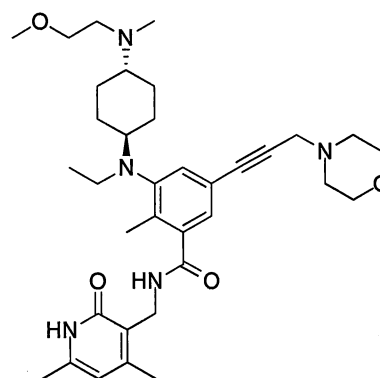
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là

.

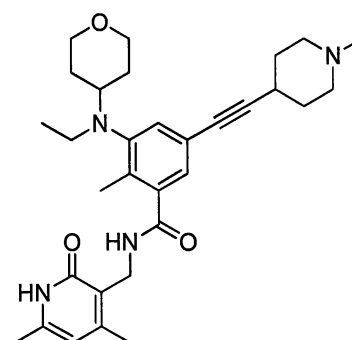


4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là muối được dụng của nó.

hoặc

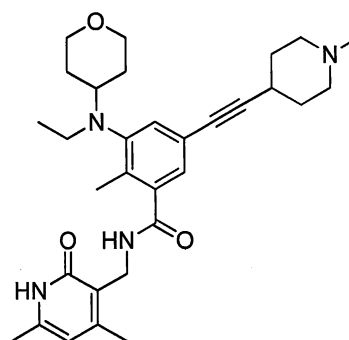


5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là



6. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là muối được dụng của nó.

hoặc



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

8. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 và chất mang dược dụng.
9. Dược phẩm để điều trị rối loạn qua trung gian là đoạn gen tăng cường thể tương đồng Zeste 2 (Enhancer of Zeste Homolog 2 - EZH2) chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 làm thành phần chính.

1/4

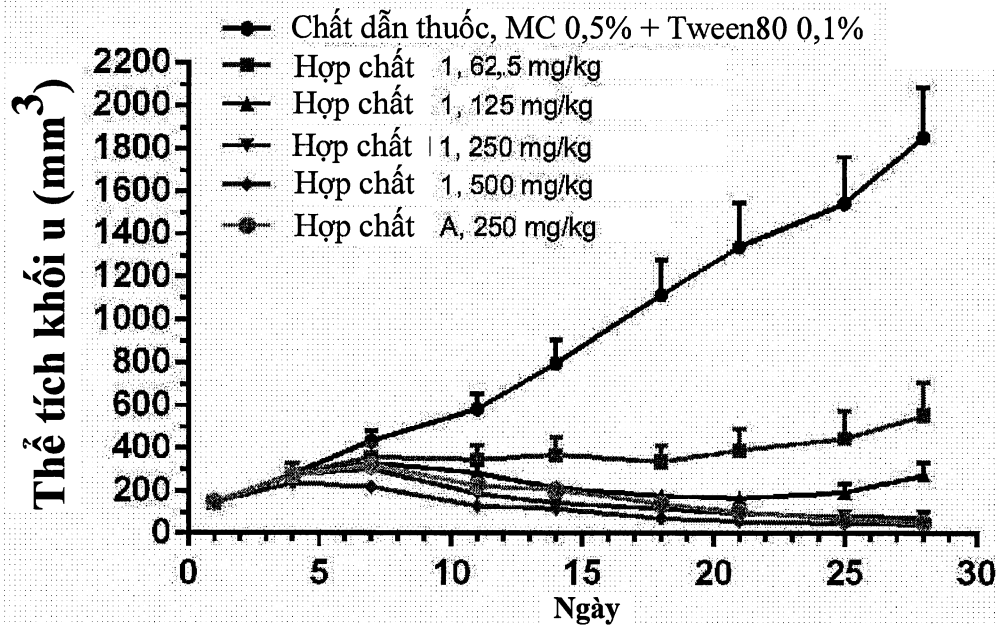


Fig. 1

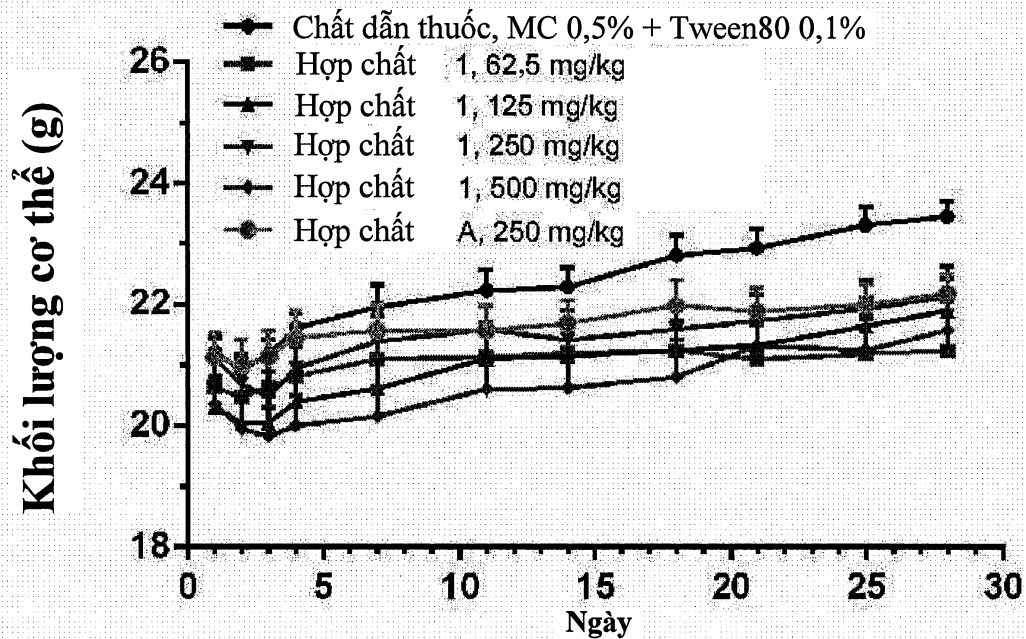


Fig. 2

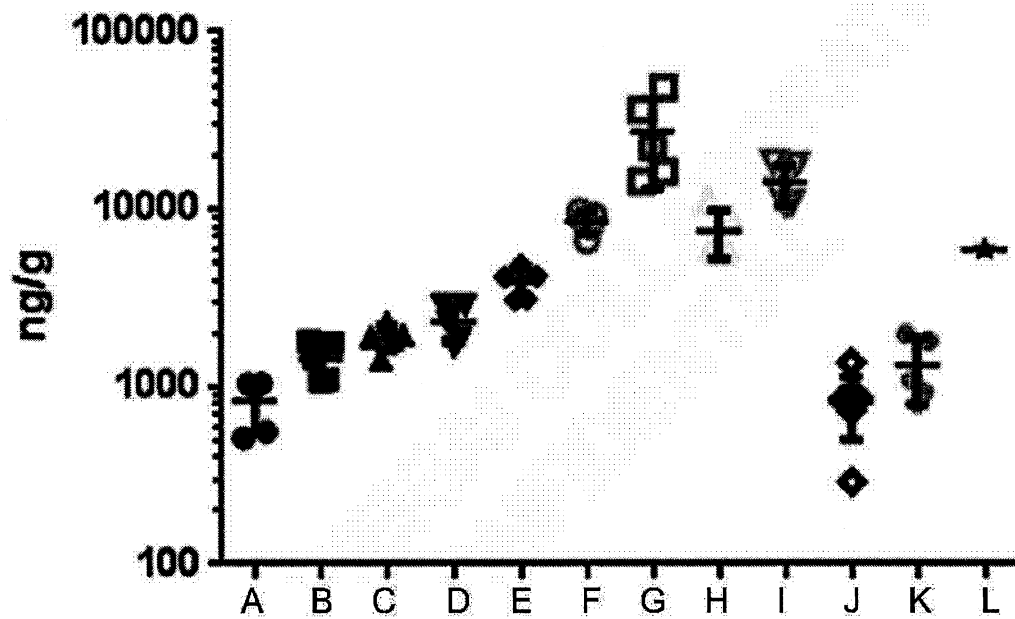


Fig. 3

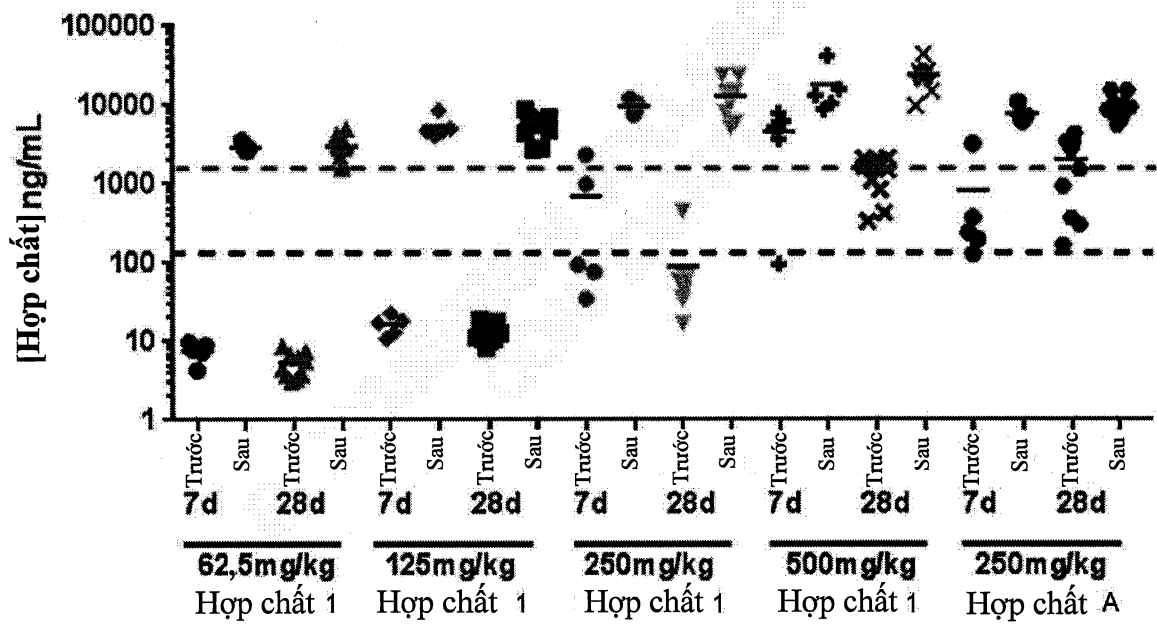


Fig. 4

3/4

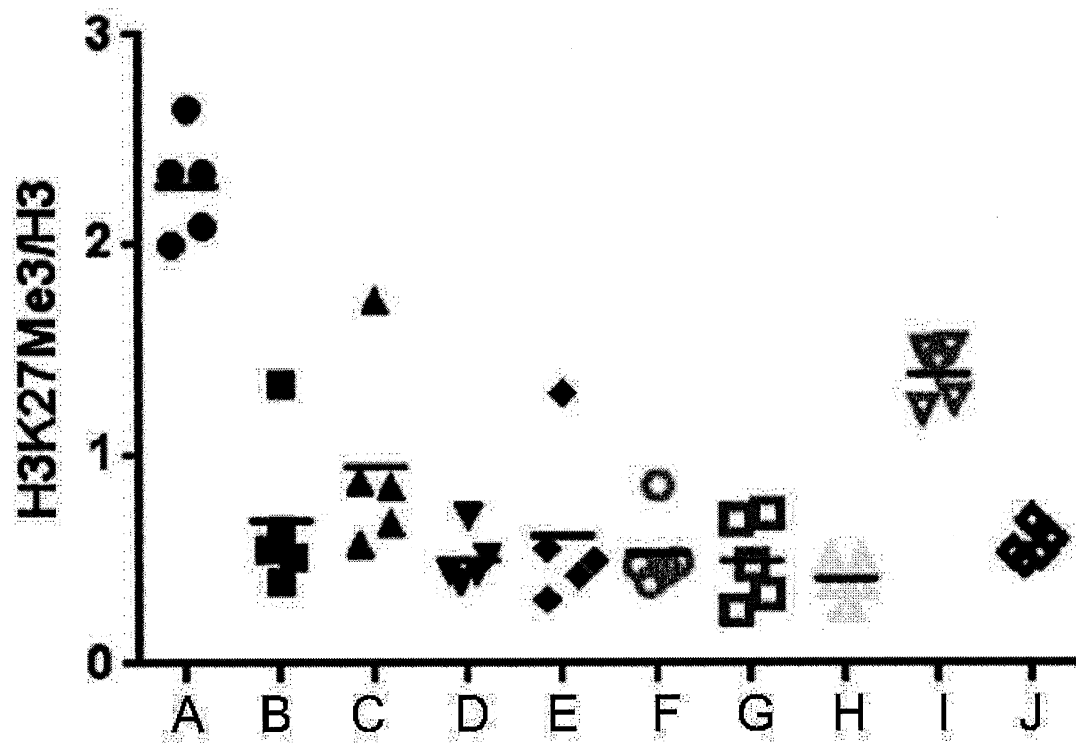


Fig. 5

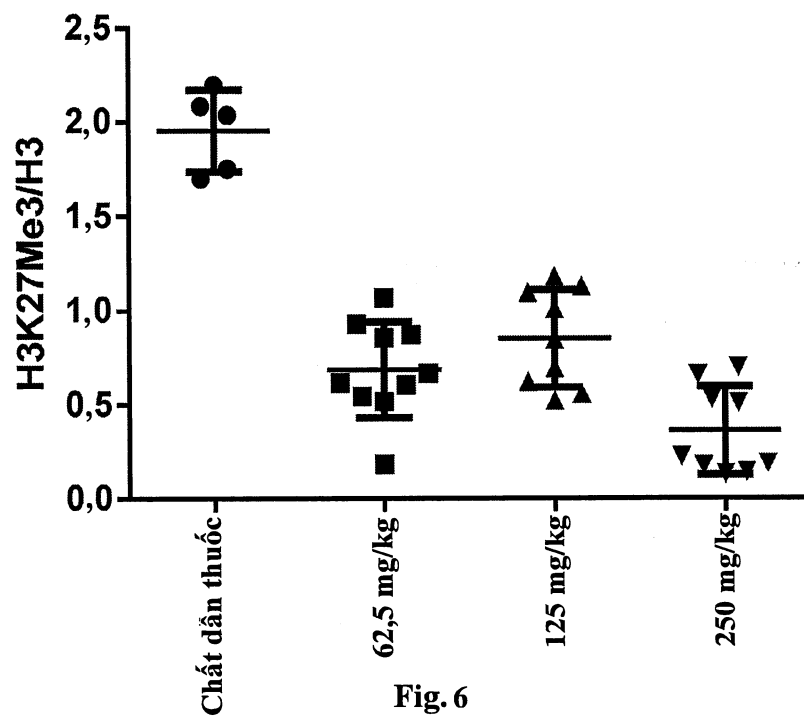


Fig. 6

4/4

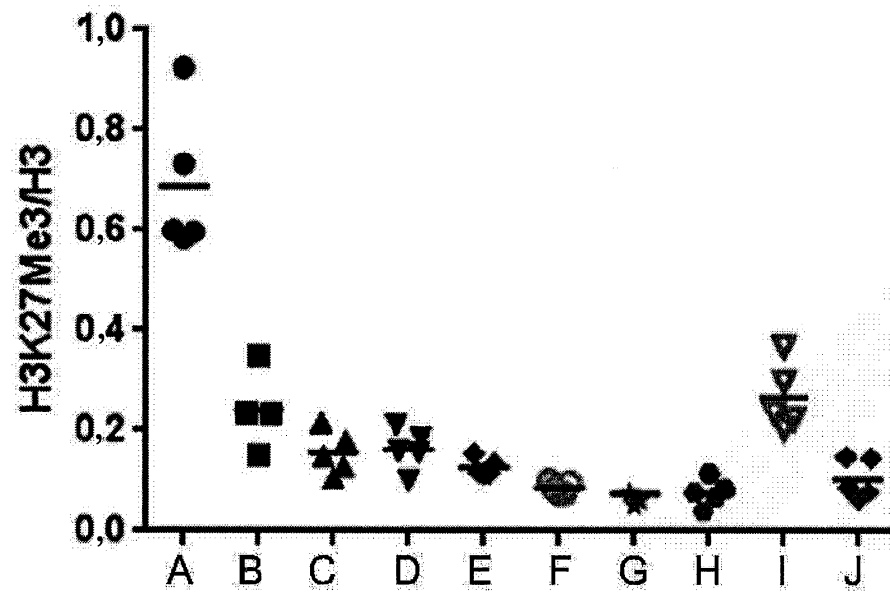


Fig. 7

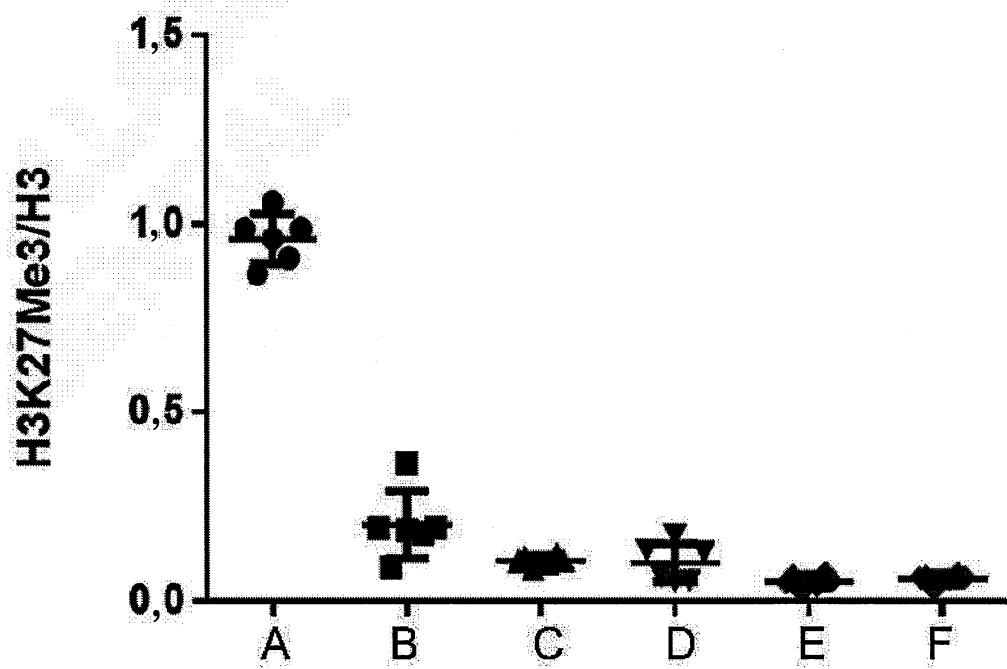


Fig. 8