



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) 
1-0020712

(51)⁷ **C07D 401/14, 403/14, A61K 31/454,**
31/404, A61P 35/00

(13) **B**

(21) 1-2016-03311

(22) 04.02.2015

(86) PCT/CN2015/072230 04.02.2015

(87) WO2015/117551A1 13.08.2015

(30) 201410046278.2 10.02.2014 CN

(45) 25.04.2019 373

(43) 27.03.2017 348

(73) **SHIJIAZHUANG YILING PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)**

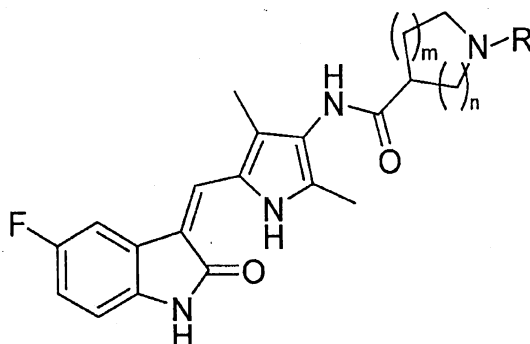
No. 238, Tianshan Street Hi-Tech. Development District Shijiazhuang, Hebei 050035, China

(72) **HU, Lihong (CN), ZHAO, Shaohua (CN), LIU, Peng (CN), LI, Xiangjun (CN), AN, Junyong (CN), ZHOU, Mengxia (CN), ZHANG, Lili (CN), YAO, Zijian (CN)**

(74) **Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ VIPATCO (VIPATCO CO., LTD.)**

(54) **HỢP CHẤT INDOLON ĐƯỢC THỂ PYROL VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất indolon được thể pyrol, phương pháp điều chế và dược phẩm chứa hợp chất này. Hợp chất indolon được thể pyrol có công thức (I) dưới đây. Sáng chế cũng đề cập đến hợp chất indolon được thể pyrol có tác dụng để điều trị bệnh liên quan đến thụ thể tyrosin kinaza và dược phẩm chứa hợp chất này để điều trị các bệnh có liên quan như là các khối u.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất indolon được thế pyrol hoặc các muối được dung của hợp chất này, phương pháp điều chế và dược phẩm chứa hợp chất này. Cụ thể là sáng chế đề cập đến hợp chất indolon được thế pyrol như là chất ức chế tyrosin kinaza đa mục tiêu và dược phẩm chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh ung thư hiện đã trở thành căn bệnh đe dọa nhiều nhất đối với sức khỏe của con người trong xã hội hiện đại. Ngày nay, nhiều loại thuốc chống ung thư đã được đưa ra thị trường mà vẫn còn gây độc cho tế bào đã được nghiên cứu trong thế kỷ trước, chúng tiêu diệt lượng lớn tế bào bình thường trong quá trình điều trị, gây ra các tác dụng phụ không mong muốn đối với bệnh nhân, và vấn đề kháng thuốc nan giải khi thuốc được sử dụng rộng rãi.

Phương pháp ức chế khối u là phương pháp mới được phát triển ở cuối thế kỷ trước trong việc điều trị bệnh ung thư, và các nghiên cứu dựa trên lý thuyết được đề xuất bởi Folkman cho rằng sự tồn tại, phát triển và di căn của khối u dựa vào mạng lưới rộng lớn của các mạch máu mới (Folkman. J. et al., Engl. J. Med., 1971, 285, 1182-1186). Đã tìm thấy trong một lượng lớn các nghiên cứu lâm sàng rằng mô khối u chứa nhiều mạch máu mới, sự phát triển và di căn của các tế bào ung thư yêu cầu một lượng lớn các mạch máu để cung cấp oxy hiệu quả và chất dinh dưỡng. Sự ức chế hình thành mạch máu trong các khối u có thể "bỏ đói" các tế bào ung thư cho đến khi chết, trong khi việc ức chế các mạch máu mới có ít ảnh hưởng đến các tế bào bình thường do có rất ít mạch máu mới ở xung quanh các tế bào bình thường mà ức chế mạch máu dựa trên các loại thuốc chống ung thư có đặc điểm như hiệu quả cao, an toàn và độc tính thấp.

Ức chế mạch máu được phân loại thành ức chế trực tiếp và ức chế gián tiếp. Ức chế trực tiếp là tác động lên các tế bào nội mô mạch máu để ức chế sự hình thành mạch, mở rộng và cung cấp dinh dưỡng cho các tế bào ung thư của mạch máu. Phương pháp chính hiện nay được sử dụng là liệu pháp nhịp (metronomic) cùng với thuốc gây độc tế bào, mà có thể giảm thiểu tác dụng gây độc tế bào nhưng khó khăn trong việc cải thiện các thiệt hại gây ra bởi thuốc đối với cơ thể con người. Ức chế gián tiếp ngăn chặn sự hình thành mạch máu bằng cách ức chế các yếu tố tạo mạch cần thiết cho sự hình thành mạch máu (Cao, Y. et al., *Int. J. Biochem. Cel Biol.*, 2001, 33, 357-369). Quá trình hình thành mạch máu bao gồm việc kích hoạt các tế bào nội mô mạch máu dưới tác động của các chất hoạt hóa; tiết ra các proteaza từ các tế bào nội mạc để hủy hoại màng cơ bản; di chuyển và phát triển các tế bào nội mô; hình thành trong lòng các mao mạch mới; và tập hợp các tế bào ngoại mạch để ổn định cấu trúc hình cầu của các mao mạch mới. Trong điều kiện sinh lý có hai loại yếu tố ảnh hưởng lên thành mạch, cụ thể là các chất ức chế lên sự hình thành mạch máu và các yếu tố ủng hộ hình thành mạch máu. Các chất ức chế hình thành mạch máu có thể được phân thành hai loại chính theo chức năng của chúng: một loại là các chất ức chế hình thành mạch máu chuyên biệt hoạt động trên các tế bào nội mô, bao gồm angiostatin, endostatin và các protein tương tự như vậy; và loại còn lại là các chất ức chế hình thành mạch máu không chuyên biệt hoạt động trên các tế bào màng trong, bao gồm: xytokin, các chất ức chế mô proteinaza kim loại (metalloproteinase), các chất ức chế proteaza serin, các sản phẩm gen ức chế khối u và chất tương tự như vậy. Các yếu tố thúc đẩy hình thành mạch máu bao gồm yếu tố biểu bì sinh trưởng (EGF), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF) và các yếu tố tương tự (Hanks, S. K., et al., *FASEB*, 1995, 9, 576-696). Biểu thị mức độ cao của các yếu tố hỗ trợ tạo mạch máu khác nhau có thể thấy ở các dạng khác nhau của các khối u, như là biểu thị mức độ cao của EGF điển hình

được nhìn thấy trong các khối u tế bào biểu mô và biểu thị mức độ cao của PDGF điển hình được nhìn thấy trong các u thần kinh đệm. Các định hướng hiện tại để phát triển thuốc chống ung thư để chống lại sự hình thành đường mạch máu khối u chủ yếu tập trung vào việc gia tăng các chất ức chế hình thành mạch máu và làm giảm các yếu tố hỗ trợ hình thành mạch máu, trong đó các biểu thị mức độ cao ức chế của các yếu tố hỗ trợ hình thành mạch máu, đặc biệt nhằm vào đường tín hiệu VEGF/VEGFR, trở thành mục tiêu chính trong nghiên cứu hiện nay.

VEGF là glyco protein trong cơ thể con người và đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành mạch máu. Họ VEGF của người bao gồm VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E và PLGF. VEGF có chọn lọc có thể hoạt động trên VEGFR (thụ thể VEGF) mà là một loại protein tyrosin kinaza xuyên màng. Liên kết VEGF để VEGFR thay đổi tổ chức của VEGFR, và kết quả trong nhị trùng hóa của thụ thể và photpharyl hóa các vị trí tyrosin trong tế bào, từ đó kích hoạt các đường tải nạp xuôi dòng (Joukov, V., et al., EMBO J., 1996, 15, 290-298). Một số nghiên cứu cho thấy rằng các đường tải nạp tín hiệu của VEGF/VEGFR là con đường di chuyển và hỗ trợ tạo mạch máu quan trọng nhất trong tế bào. Bằng cách ức chế con đường này, thì sự phát triển và di chuyển của tế bào nội mạc có thể được hạn chế, và dẫn đến hạn chế sự phát triển của các khối u. Hiện nay, một số loại thuốc được như vậy đã được chấp nhận sử dụng và có hơn ba mươi loại khác đang được thử nghiệm lâm sàng. Một loại thuốc quan trọng là một kháng thể đơn dòng VEGF tái tổ hợp được gọi là bevacizumab (tên thương mại là Avastin), đây là loại thuốc đầu tiên được chứng nhận chống lại sự hình thành mạch máu trong các khối u và có khả năng liên kết cụ thể VEGF-A để ngăn chặn con đường của VEGF/VEGFR. Thuốc này đạt được thành công ban đầu rất lớn sau khi được chấp nhận, nhưng vấn đề kháng thuốc lại xuất hiện dần dần sau khi sử dụng một thời gian dài. Hơn nữa các nghiên cứu cho thấy rằng ức chế đặc biệt VEGF-A gây cho các tế bào thải ra một lượng lớn các yếu tố hỗ trợ tạo mạch

máu khác như PLGF và FGF, và hiện tượng như vậy được gọi là phản ứng phục hồi hỗ trợ tạo mạch máu. Để giải quyết vấn đề kháng thuốc, chiến lược đề ra là phát triển các thuốc ức chế đa mục tiêu.

Thuốc Sunitinib là thuốc chống ung thư đa mục tiêu được nghiên cứu bởi công ty Pfizer, là chất ức chế hoạt động trên các tyrosin kinaza và có thể ức chế hiệu quả thụ thể tyrosin kinaza như là VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β và c-Kit, FLT-3. Bằng cách ức chế các protein đó, sunitinib chặn biểu hiện của các yếu tố hỗ trợ tạo mạch máu khác nhau trong các tế bào ung thư, sao cho mục tiêu là ngăn chặn sự hình thành mạch máu và "bỏ đói" các tế bào ung thư đến chết để có thể nhận diện được (Abrams, T. J và cộng sự Mol. Cancer Ther., 2003, 2, 1010-1021). Hơn nữa, thuốc sunitinib cũng chỉ ra ức chế cụ thể trực tiếp đối với các tế bào ung thư có đột biến trong c-Kit và FLT-3. Thuốc Sunitinib được chứng nhận bởi FDA (Cục quản lý thuốc và thực phẩm của Mỹ) vào năm 2006, mục đích chính để điều trị các khối u mô đệm đường tiêu hóa và ung thư biểu mô tế bào thận, là loại thuốc chống ung thư đầu tiên được chứng nhận cho hai loại chỉ số đồng thời. Mặc dù thuốc sunitinib cho thấy hiệu quả chống khối u, nhưng tác dụng phụ như thiếu nội lực, suy yếu tủy xương và sốt vẫn thấy ở các bệnh nhân điều trị lâm sàng bằng thuốc sunitinib. Thuốc sunitinib cho thấy sự tích lũy mạnh mẽ trong các mô và không thể thực hiện liên tục, và trong các tình huống lâm sàng được thực hiện liên tục trong bốn tuần và sau đó dừng lại hai tuần. Tuy nhiên, điều đó cho thấy trong nghiên cứu sự hình thành mạch máu trong các khối u hồi phục lại sau khi dừng thuốc. Do đó, cần phải thay đổi cấu trúc hóa học để làm giảm tác dụng phụ, tối ưu khả năng của thuốc và tìm ra loại thuốc an toàn và hiệu quả hơn.

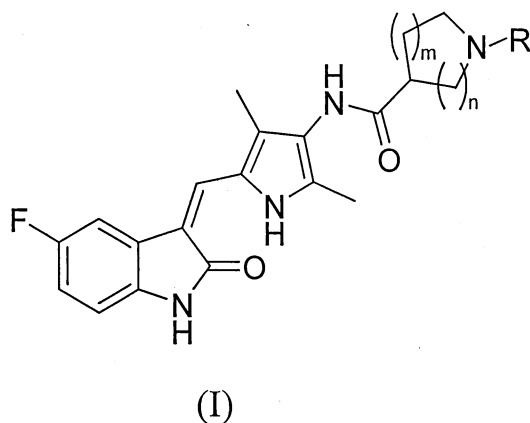
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến thuốc ức chế thụ thể tyrosin kinaza đa mục tiêu có hiệu quả cao và độc tính thấp.

Sáng chế cũng đề cập đến một nhóm các hợp chất indolon được thế pyrol có tác dụng ức chế sự phát triển của khối u.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa các hợp chất indolon được thế pyrol.

Sáng chế cũng đề cập đến hợp chất indolon được thế pyrol có công thức (I) dưới đây, hoặc các muối được dụng của hợp chất này.



trong đó

m được chọn từ 0, 1 và 2;

n được chọn từ 1, 2 và 5; và

R được chọn từ hydro, C₁-C₆ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₃-C₇ xycloalkyl, formyl được thế bằng C₁-C₆ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₃-C₇ xycloalkylformyl, t-butoxycarbonyl, carbamoyl được thế, hoặc carbamoyl vòng có 5 đến 7 cạnh.

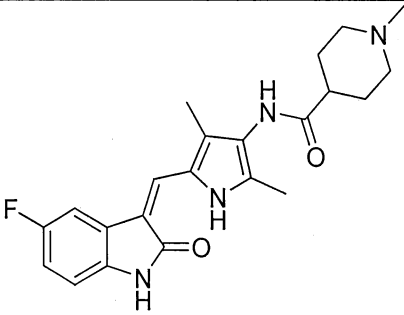
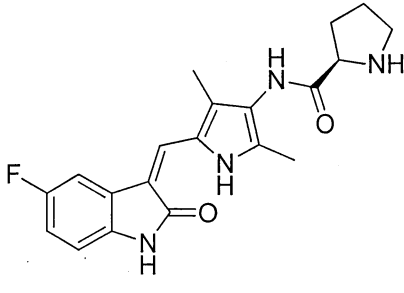
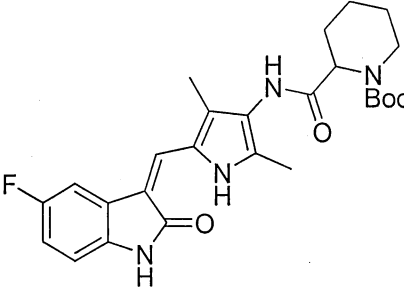
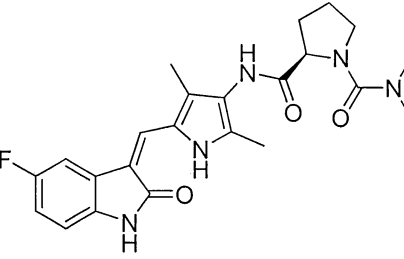
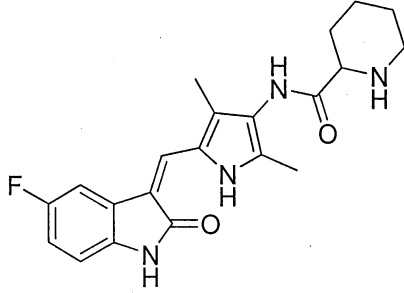
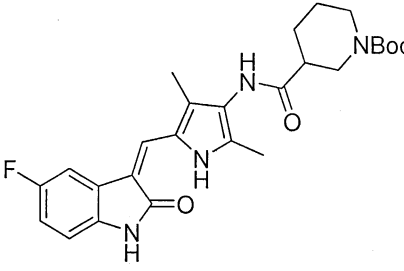
Trong hợp chất indolon được thế pyrol nói trên, R tốt hơn hết được chọn từ nhóm bao gồm hydro, C₁-C₃ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₄-C₇ xycloalkyl, formyl được thế bằng C₁-C₃ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₃-C₆ xycloalkylformyl, t-butoxycarbonyl, N,N-dimetyl carbamoyl, N,N-dietyl carbamoyl, N,N-dipropyl carbamoyl, pyrrolidin-1-ylformyl, hoặc piperidin-1-ylformyl.

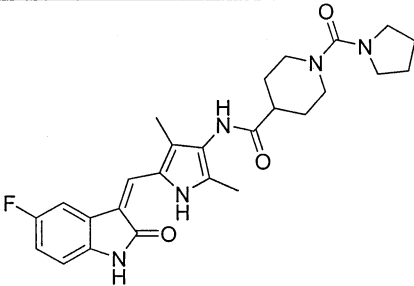
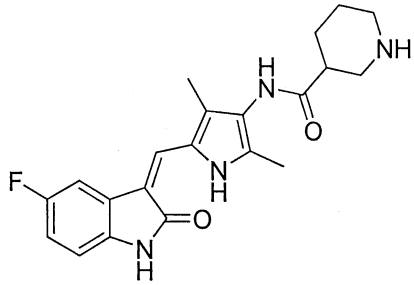
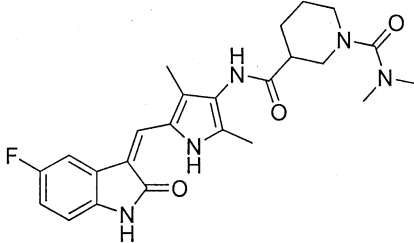
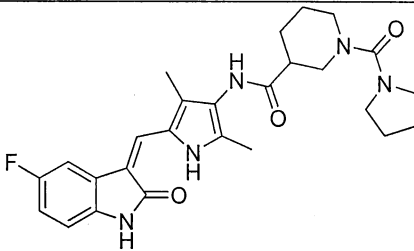
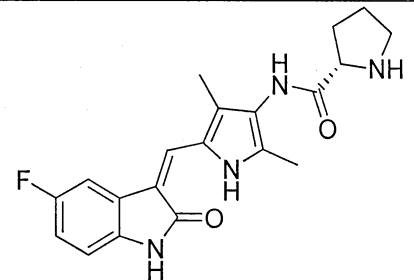
Trong hợp chất indolon được thế pyrol nói trên, R tốt hơn nữa được chọn từ nhóm bao gồm hydro, metyl, t-butoxycarbonyl, N,N-dimetyl carbamoyl hoặc pyrrolidin-1-ylformyl.

Mô tả chi tiết sáng chế

Ở phương án thứ nhất theo sáng chế, hợp chất indolon được thể pyrol có công thức (I) tốt hơn hết được chọn từ các hợp chất 1 đến 15 dưới đây:

Thứ tự hợp chất	Cấu trúc hợp chất
1	
2	
3	
4	

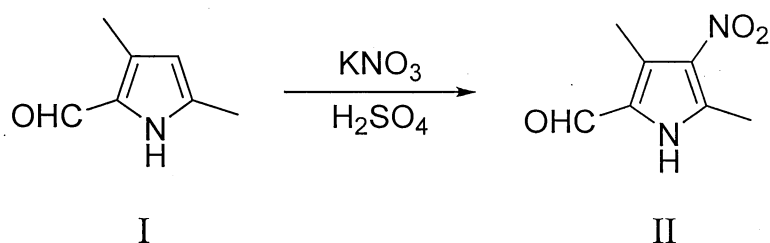
5	
6	
7	
8	
9	
10	

11	
12	
13	
14	
15	

Các muối được dùng của hợp chất indolon được thế pyrrol theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và có thể là hydroclorua, fumarat, maleat, xitrat, phosphat, sulfat, tartrat, metansulfonat, benzensulfonat, v.v.. Sử dụng muối hydroclorua có thể mang lại độ hòa tan và tinh thể cao và cải thiện độ hút ẩm. Do vậy tốt hơn là sử dụng muối hydroclorua.

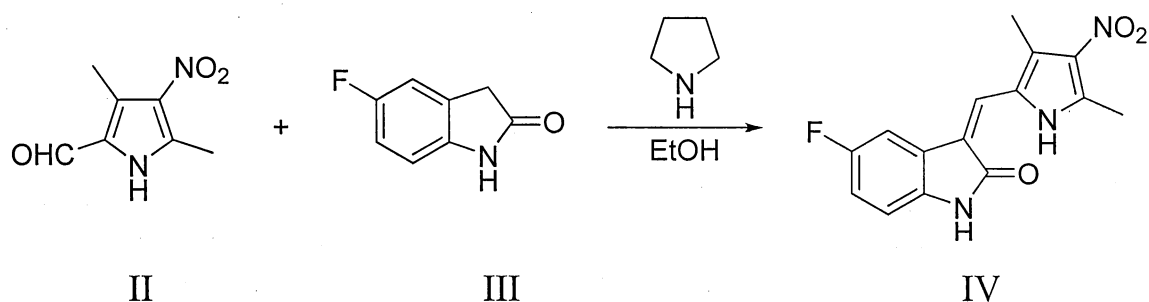
Ở phương án thứ hai theo sáng chế có đề cập đến phương pháp điều chế hợp chất indolon được thể pyrol theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) nitro hóa hợp chất 3,5-dimetyl-2-pyrolaldehyt có công thức I với KNO_3 trong axit sulfuric đặc để tạo ra hợp chất có công thức II:



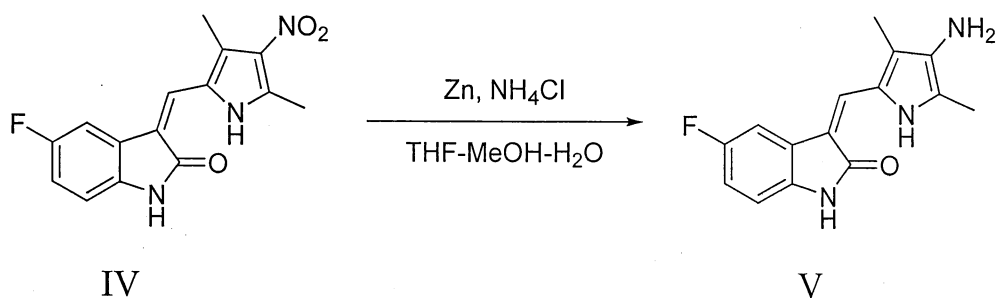
Cụ thể, hòa tan hợp chất 3,5-dimetyl-2-pyrolaldehyt có công thức I trong axit sulfuric đặc, giảm nhiệt độ xuống khoảng -10°C , sau đó bổ sung KNO_3 và cho phép phản ứng xảy ra trong khi duy trì nhiệt độ, sau khi phản ứng hoàn thành, thì bổ sung nước đá vào, tiếp theo khuấy mạnh và lọc, để thu được hợp chất có công thức II, hợp chất này sau đó được tái kết tinh để có được sản phẩm nguyên chất;

(b) ngưng tụ hợp chất 3,5-dimetyl-4-nitro-2-pyrolaldehyt có công thức II với 5-floroindolon có công thức III với xúc tác pyrrolidin để tạo ra hợp chất có công thức IV:



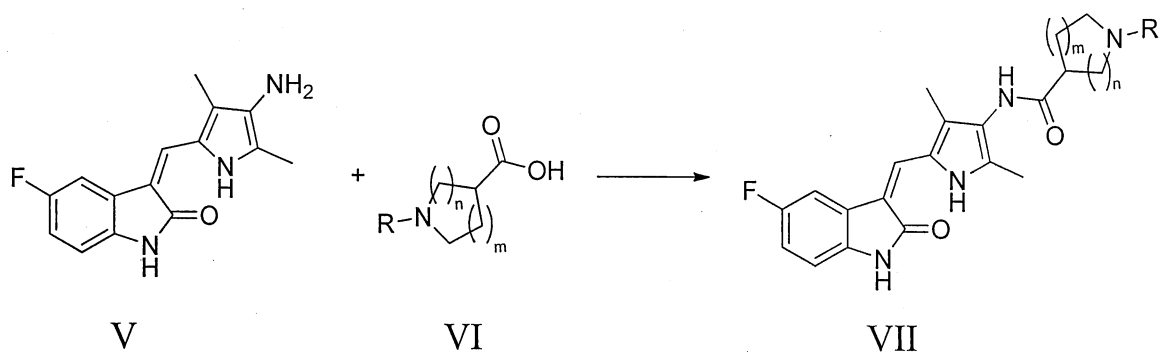
Cụ thể, bổ sung hợp chất 3,5-dimetyl-4-nitro-2-pyrolaldehyt có công thức II vào etanol, nâng nhiệt độ tới 50°C , sau đó bổ sung 5-floroindolon có công thức III, và giữ nguyên nhiệt độ trong khi phản ứng; sau khi phản ứng hoàn thành, lọc để thu được sản phẩm nguyên chất của hợp chất IV;

(c) khử hợp chất có công thức IV bằng bột kẽm để thu được hợp chất có công thức V:



Cụ thể, hòa tan hợp chất có công thức IV trong dung dịch chứa hỗn hợp tetrahydrofuran, nước và metanol, tăng nhiệt độ lên đến 50°C, bổ sung amoni clorua bão hòa và bột kẽm, và cho phép phản ứng xảy ra trong khi giữ nguyên nhiệt độ; sau khi phản ứng hoàn thành, làm bay hơi dung môi, và thực hiện tách etyl axetat để thu được sản phẩm nguyên chất của hợp chất V;

(d) ngưng tụ hợp chất có công thức V với axit tương ứng VI để thu được hợp chất có công thức VII:



Cụ thể, hòa tan hợp chất có công thức V trong tetrahydrofuran, bổ sung chất kiềm (DIPEA, DMAP, pyridin hoặc chất tương tự) và chất ngưng tụ (EDCI, DCC hoặc chất tương tự) ở nhiệt độ trong phòng, và cho phép phản ứng xảy ra trong khi giữ nguyên nhiệt độ; sau khi phản ứng hoàn thành, làm bay hơi dung môi để thu được sản phẩm thô của hợp chất có công thức VII, rửa sạch bằng nước, tiếp theo tráng bằng dung môi (etyl axetat, metanol hoặc chất tương tự), để thu được sản phẩm nguyên chất của hợp chất VII.

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị bệnh của một hoặc nhiều hợp chất indolon được thế pyrol có công thức (I)

hoặc muối được dụng của hợp chất này, và được phẩm có thể chứa thêm các thành phần phụ thông thường như tá dược, chất làm ngọt và các chất tương tự như vậy.

Các hợp chất indolon được thể pyrol hoặc các muối được dụng của hợp chất này theo sáng chế có tác dụng ức chế tyrosin kinaza, và có thể được sử dụng trong việc sản xuất thuốc điều trị các khối u gây ra bởi sự biểu hiện bất thường của tyrosin kinaza. Các hợp chất indolon được thể pyrol hoặc các muối được dụng của hợp chất này theo sáng chế có tác dụng để điều trị các khối u liên quan đến tyrosin kinaza và ức chế sự phát triển tế bào của các khối u, trong đó bao gồm liệu pháp điều trị lượng hiệu quả các hợp chất indolon được thể pyrol hoặc các muối được dụng của hợp chất này đối với bệnh nhân. Các hợp chất indolon được thể pyrol hoặc các muối được dụng của hợp chất này cũng có thể được sử dụng để sản xuất thuốc điều trị các khối u liên quan đến tyrosin kinaza và ức chế sự phát triển tế bào của các khối u.

Hiệu quả đạt được

Các hợp chất indolon được thể pyrol hoặc các muối được dụng của hợp chất này theo sáng chế cho thấy khả năng ức chế nhiều tyrosin kinaza và có thể ức chế sự phát triển khối u như được thử nghiệm trên các thí nghiệm động vật. Cụ thể, các hợp chất indolon được thể pyrol hoặc các muối được dụng của hợp chất này theo sáng chế có mức độ gây độc rất thấp. Các hợp chất này có thể được sử dụng để điều trị nhiều khối u. Các hợp chất theo sáng chế rất đơn giản để tổng hợp, dễ dàng điều chế và có thể tổng hợp được từ nhiều nguồn nguyên liệu có sẵn.

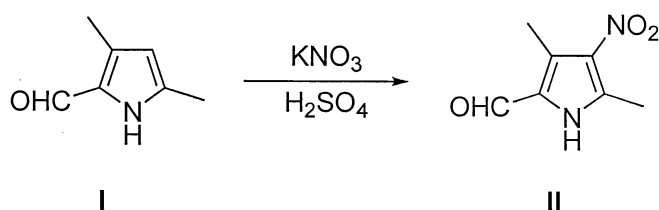
Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết như dưới đây cùng với các ví dụ cụ thể, tuy nhiên sáng chế không bị hạn chế bởi các ví dụ này.

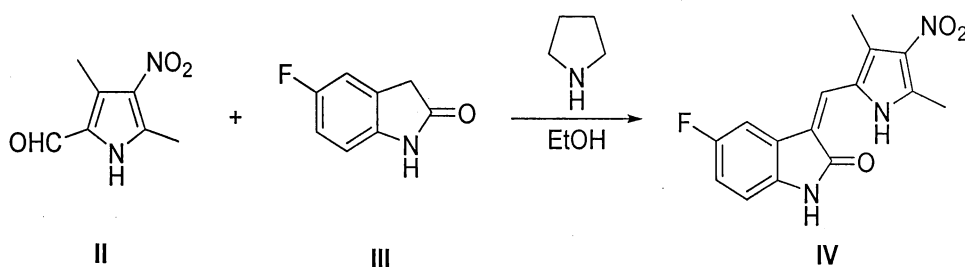
Trong ví dụ điều chế dưới đây, $^1\text{H-NMR}$ được đo bằng thiết bị Varian Mercury AMX300, 400, 500; MS được đo bằng thiết bị VG ZAB-HS hoặc VG-7070 và Esquire 3000 plus-01005; tất cả các dung môi được chưng cất lại

trước khi sử dụng; tất cả các dung môi khan sử dụng được lấy bằng cách sấy khô theo các phương pháp tiêu chuẩn; ngoại trừ trường hợp có chỉ dẫn khác, tất cả các phản ứng được thực hiện dưới điều kiện bảo vệ của Agon và được tạo vết bằng TLC; các cách xử lý tất cả được thực hiện thông qua việc rửa bằng dung dịch NaCl bão hòa và sấy khô bằng MgSO_4 khan; ngoại trừ có chỉ dẫn khác, các sản phẩm được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel, trong đó silica gel là 200- tới 300- mesh GF₂₅₄ được sản xuất bởi công ty Qingdao Haiyang Chemical Co., Ltd. hoặc công ty Yantai Yuanbo Silica Gel.

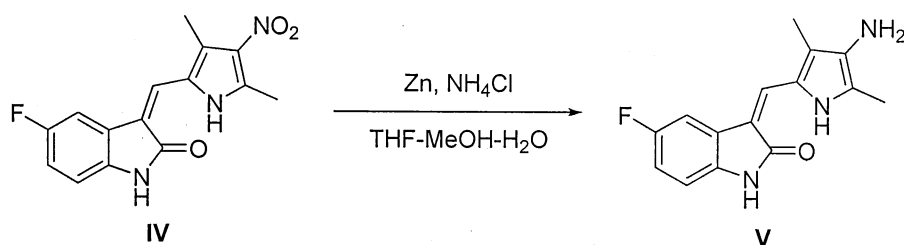
Điều chế thứ nhất: điều chế hợp chất I



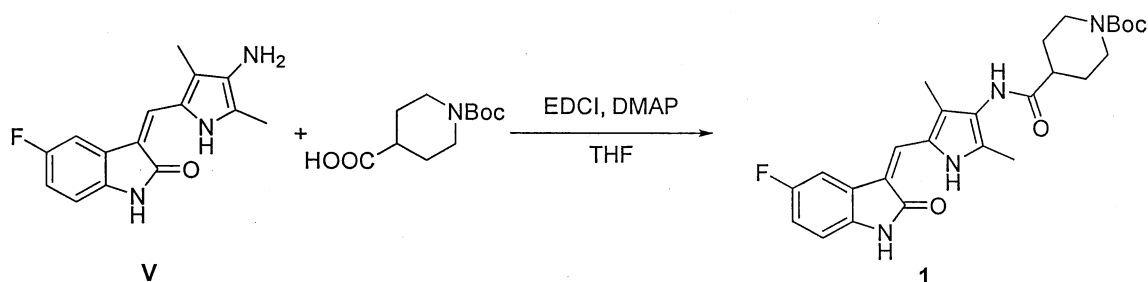
Hợp chất 3,5-dimetyl-2-pyrolaldehyt I là nguyên liệu thô (5 g, 40 mmol) được hòa tan trong 60 mL axit sulfuric đặc, sau đó nhiệt độ hỗn hợp được giảm xuống tới -10°C , ở nhiệt độ đó KNO_3 (4,35 g, 42 mmol) được bổ sung từ từ vào các mẻ trong hơn hai giờ đồng hồ, trong quá trình bổ sung nhiệt độ được duy trì ở -10°C , và dung dịch được khuấy tiếp khoảng hai giờ ở nhiệt độ đó sau khi bổ sung hoàn toàn KNO_3 . Sau khi TLC chỉ ra phản ứng hoàn toàn, dung dịch thu được được cho vào 1 L nước đá, và được chiết hai lần bằng tổng 1 L etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa sạch bằng dung dịch NaCl bão hòa, được sấy khô trên natri sulfat khan và được lọc. Sau đó, các dung môi hữu cơ được bay hơi ở áp suất thấp để thu được 7 g sản phẩm thô, sản phẩm này được cho vào từ 10 đến 20 mL etyl axetat, tiếp theo được khuấy mạnh, để thu được 5 g sản phẩm nguyên chất của hợp chất cần thu II.



Hợp chất II (1,68 g, 10 mmol) và hợp chất III (1,8 g, 12 mmol) được thêm vào 50 mL etanol khan, và tetrahydropyrol (850 mg, 12 mmol) được thêm vào hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp chuyển sang màu vàng sau khi được bổ sung. Nhiệt độ được nâng lên tới 50°C, và phản ứng được thực hiện trong 2 giờ ở nhiệt độ này. Sau khi phản ứng hoàn thành, hỗn hợp được lọc trực tiếp và bánh lọc được rửa bằng một lượng nhỏ etanol và etyl axetat, để thu được 2,7 g sản phẩm nguyên chất của hợp chất cần thu được IV. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,14 (s, 1H), 7,88 (dd, *J* = 9,2, 2,4 Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,05-6,97 (m, 1H), 6,88 (dd, *J* = 8,5, 4,5 Hz, 1H), 2,64 (s, 3H), 2,58 (s, 3H).

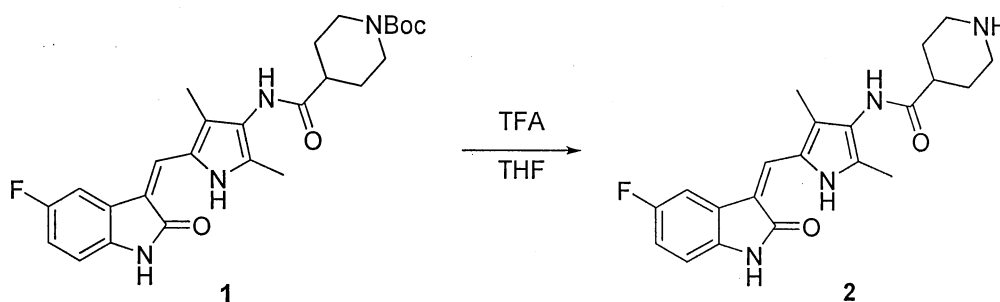


Hợp chất IV (900 mg, 3 mmol) được đặt vào bình hai cổ 500mL, sau đó 200 mL tetrahydrofuran, 100 mL metanol, 60 mL nước và 60 mL dung dịch amoni clorua bão hòa được bổ sung tương ứng vào hỗn hợp này. Sau đó, nhiệt độ được tăng lên 50°C và bột kẽm (1,8 g, 30 mmol) được bổ sung vào trong lúc khuấy, sau hai giờ phản ứng ở điều kiện này, hỗn hợp lúc đầu trong chuyển sang đục. Sau khi hỗn hợp chuyển sang đục, LC-MS sẽ cho biết phản ứng đã xảy ra hoàn toàn. Sau khi hoàn thành phản ứng, dung môi được làm bay hơi. Hỗn hợp được điều chỉnh sang môi trường kiềm bằng dung dịch natri cacbonat bão hòa và được chiết hai lần bằng tổng 2 L etyl axetat. Lớp etyl axetat được rửa sạch bằng dung dịch NaCl bão hòa, được sấy khô trên natri sulfat khan và được lọc. Sau đó các dung môi hữu cơ được làm bay hơi ở áp suất thấp để thu được sản phẩm là hợp chất V (800 mg).



Hợp chất V (270 mg, 1 mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran (20 mL), và axit 4-piperidincacboxylic có nhóm bảo vệ Boc (270 mg, 1,2 mmol), EDCI (220 mg, 1,1 mmol), DIPEA (260 mg, 2 mmol) và lượng xúc tác DMAP được thêm vào hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi được bổ sung, phản ứng được diễn ra ở nhiệt độ trong phòng trong vòng tám giờ và TLC sẽ cho biết phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sau khi phản ứng hoàn thành, dung dịch tetrahydrofuran được làm bay hơi và lượng lớn etyl axetat và nước được thêm vào để phân chia, tiếp theo được lọc để thu được sản phẩm thô của hợp chất cần thu được. Sản phẩm thô được tráng bằng metanol để thu được sản phẩm tinh khiết của Hợp chất 1. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,59 (s, 1H), 10,83 (s, 1H), 9,12 (s, 1H), 7,71 (dd, J = 9,5, 2,6 Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,93-6,86 (m, 1H), 6,86-6,81 (m, 1H), 3,99-3,95 (m, 2H), 3,10-2,94 (m, 1H), 2,79-2,75 (m, 2H), 2,17 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 1,82-1,78 (m, 2H), 1,55-1,45 (m, 2H), 1,41 (s, 9H).

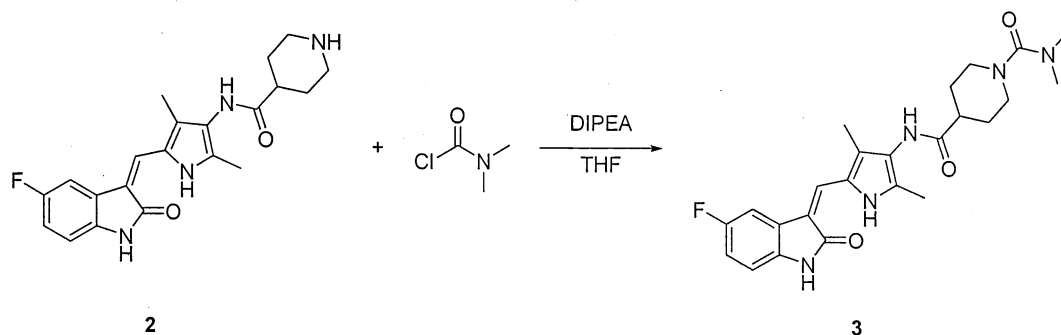
Ví dụ điều chế 2: điều chế hợp chất 2



Hợp chất 1 (480 mg, 1 mmol) được thêm vào 10 mL tetrahydrofuran và 10 mL axit trifloaxetic được bổ sung vào hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó nhiệt độ được tăng lên tới 50°C và phản ứng được phép xảy ra trong khoảng hai giờ, LC-MS sẽ cho biết phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sau khi phản ứng hoàn thành, hầu hết dung dịch được làm bay hơi, phần còn lại được trung

tính hóa bằng dung dịch natri cacbonat bão hòa, tiếp theo được lọc để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được tráng bằng etyl axetat và metanol để thu được sản phẩm nguyên chất của hợp chất 2. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,60 (s, 1H), 10,85 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 7,71 (dd, $J = 9,5, 2,4$ Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 6,94-6,86 (m, 1H), 6,87-6,83 (m, 1H), 3,34 (d, $J = 12,3$ Hz, 2H), 3,06-2,89 (m, 2H), 2,74-2,59 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,05-1,94 (m, 2H), 1,89-1,74 (m, 2H).

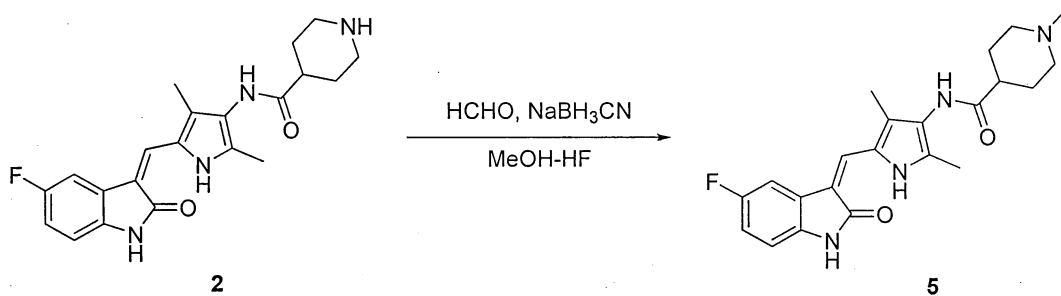
Ví dụ điều chế 3: điều chế hợp chất 3



Hợp chất 2 (383 mg, 1 mmol) được bổ sung vào 20 mL tetrahydrofuran, và DIPEA (260 mg, 2 mmol) và dimethylcarbamoyl clorua (214 mg, 2 mmol) được thêm vào hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi phản ứng diễn ra trong khoảng mười hai giờ, và gần kết thúc như được thấy trên thiết bị TLC. Sau khi phản ứng hoàn thành, các dung môi được làm bay hơi và chất rắn được tráng bằng 20 mL etyl axetat và 10 mL metanol, để thu được sản phẩm nguyên chất của hợp chất 3. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,58 (s, 1H), 10,82 (s, 1H), 9,10 (s, 1H), 7,70 (dd, $J = 9,5, 2,5$ Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,95-6,86 (m, 1H), 6,85-6,77 (m, 1H), 3,87-3,70 (m, 1H), 3,63-3,54 (m, 2H), 2,86-2,58 (m, 8H), 2,18 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 1,85-1,76 (m, 2H), 1,71-1,55 (m, 2H).

Ví dụ điều chế 4: điều chế hợp chất 4

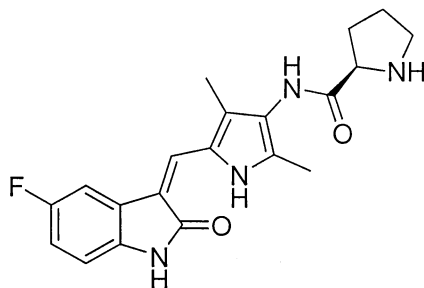
Ví dụ điều chế 5: điều chế hợp chất 5



-17-

6,86 (m, 1H), 6,85-6,80 (m, 1H), 2,87-2,77 (m, 2H), 2,36-2,21 (m, 1H), 2,17 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 1,94-1,59 (m, 6H).

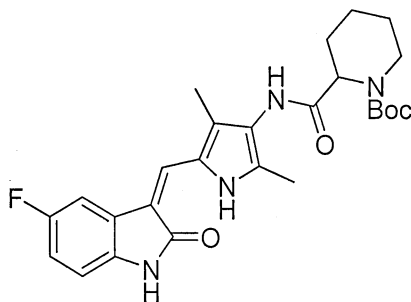
Ví dụ điều chế 6: điều chế hợp chất 6



6

Quá trình tổng hợp hợp chất 6 giống như quá trình điều chế hợp chất 2, ngoại trừ hợp chất 4 được sử dụng thay thế cho hợp chất 1 để thu được hợp chất 6. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,60 (s, 1H), 10,83 (s, 1H), 9,23 (s, 1H), 7,71 (dd, $J = 9,3, 2,4$ Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 6,93-6,87 (m, 1H), 6,83 (dd, $J = 8,4, 4,6$ Hz, 1H), 3,70 (dd, $J = 8,7, 5,5$ Hz, 1H), 2,91 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 2,18 (s, 2H), 2,16 (s, 2H), 2,10-1,98 (m, 1H), 1,85-1,74 (m, 1H), 1,72-1,63 (m, 2H).

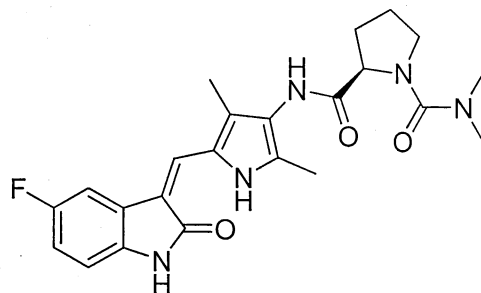
Ví dụ điều chế 7: điều chế hợp chất 7



7

Việc tổng hợp hợp chất 7 cũng giống như hợp chất 1, ngoại trừ việc axit 2-piperidincarboxylic có nhóm bảo vệ Boc được sử dụng thay cho axit 4-piperidincarboxylic có nhóm bảo vệ Boc để thu được hợp chất 7. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,60 (s, 1H), 10,84 (s, 1H), 9,16 (s, 1H), 7,71 (dd, $J = 9,5, 2,5$ Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 6,94-6,87 (m, 1H), 6,85-6,81 (m, 1H), 4,79-4,63 (m, 1H), 3,87-3,75 (m, 1H), 3,30-3,09 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 1,81-1,59 (m, 3H), 1,41 (s, 9H), 1,44-1,22 (m, 3H).

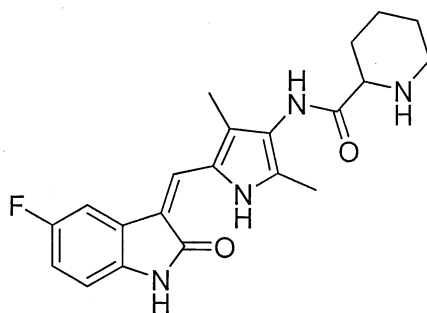
Ví dụ điều chế 8: điều chế hợp chất 8



8

Quá trình tổng hợp hợp chất 8 cũng giống như điều chế hợp chất 3, ngoại trừ việc hợp chất 4 được sử dụng thay thế cho hợp chất 2 để thu được hợp chất 8. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,59 (s, 1H), 10,84 (s, 1H), 8,99 (s, 2H), 7,74-7,68 (m, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,93-6,86 (m, 1H), 6,83 (dd, $J = 8,4, 4,6$ Hz, 1H), 4,39 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 3,60-3,44 (m, 1H), 3,43-3,37 (m, 1H), 2,80 (s, 6H), 2,28-2,20 (m, 1H), 2,16 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 1,97-1,88 (m, 1H), 1,87-1,70 (m, 2H).

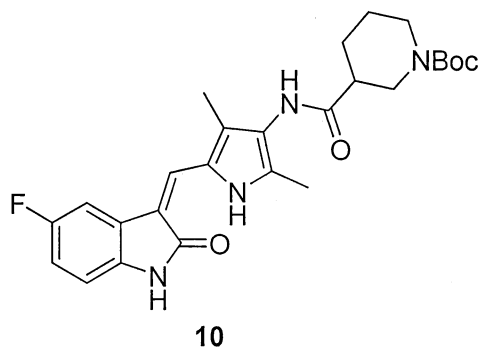
Ví dụ điều chế 9: điều chế hợp chất 9



9

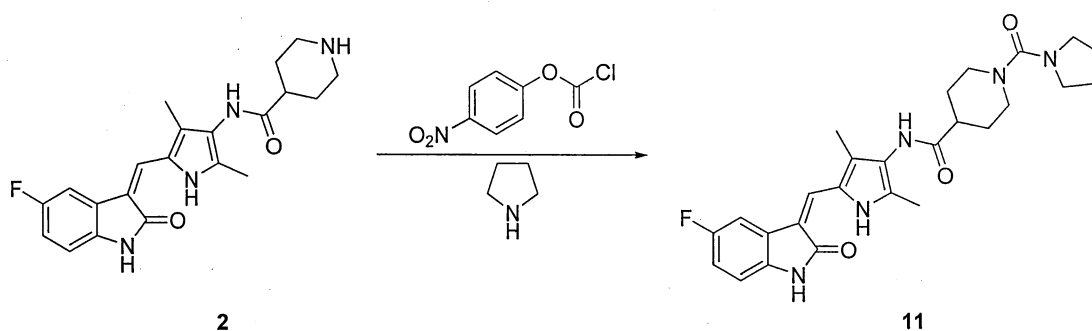
Việc tổng hợp hợp chất 9 được thực hiện giống như điều chế hợp chất 3, ngoại trừ việc sử dụng hợp chất 4 thay thế cho hợp chất 2 để thu được hợp chất 9. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,59 (s, 1H), 10,83 (s, 1H), 8,97 (s, 1H), 7,70 (dd, $J = 9,6, 2,5$ Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,92-6,86 (m, 1H), 6,84-6,81 (m, 1H), 3,30-3,25 (m, 1H), 2,99 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H), 2,60 (t, $J = 11,3$ Hz, 1H), 2,18 (s, 2H), 2,16 (s, 2H), 1,91-1,73 (m, 2H), 1,56-1,33 (m, 4H).

Ví dụ điều chế 10: điều chế hợp chất 10



Việc tổng hợp hợp chất 10 cũng giống như việc điều chế hợp chất 3, ngoại trừ việc hợp chất 4 được sử dụng thay cho hợp chất 2 để thu được hợp chất 10. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,59 (s, 1H), 10,83 (s, 1H), 9,20 (s, 1H), 7,71 (dd, $J = 9,4, 2,5$ Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 6,89 (dd, $J = 13,8, 6,7$ Hz, 1H), 6,86-6,82 (m, 1H), 4,13-4,02 (m, 1H), 3,89 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H), 2,94-2,72 (m, 2H), 2,48-2,41 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,01-1,94 (m, 1H), 1,73-1,57 (m, 2H), 1,42 (s, 9H), 1,39-1,24 (m, 1H).

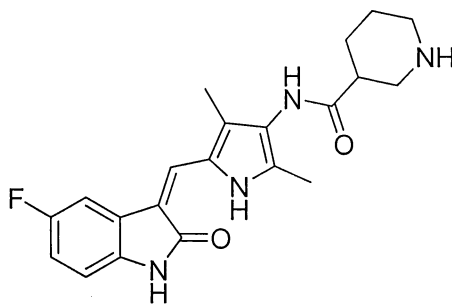
Ví dụ điều chế 11: điều chế hợp chất 11



Hợp chất 2 (383 mg, 1 mmol) được bổ sung vào 20 mL tetrahydrofuran và DIPEA (260 mg, 2 mmol) và *p*-nitrophenyl cloformat (240 mg, 1,2 mmol) được thêm vào hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi thêm vào, phản ứng được diễn ra trong khoảng mười hai giờ và gần như hoàn toàn thấy được trên thiết bị TLC. Sau khi phản ứng hoàn thành, tetrahydropyrol (142 mg, 2 mmol) và lượng DIPEA (260 mg, 2 mmol) còn dư được bổ sung thêm vào, tiếp theo phản ứng tiếp tục trong khoảng thời gian không vượt quá mười hai giờ, quá trình được giám sát bằng thiết bị TLC. Sau khi phản ứng hoàn thành,

các dung môi được làm bay hơi và chất rắn được tráng bằng 20 mL etyl axetat và 10 mL metanol, để thu được sản phẩm nguyên chất của hợp chất 11. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,58 (s, 1H), 10,82 (s, 1H), 9,09 (s, 1H), 7,70 (dd, $J = 9,4, 2,5$ Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,93-6,86 (m, 1H), 6,83 (dd, $J = 8,5, 4,6$ Hz, 1H), 3,70 (d, $J = 13,5$ Hz, 2H), 3,27 (t, $J = 6,4$ Hz, 4H), 2,73 (t, $J = 11,6$ Hz, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 1,86-1,71 (m, 6H), 1,67-1,54 (m, 2H).

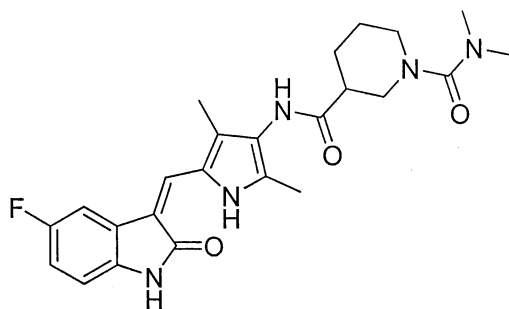
Ví dụ điều chế 12: điều chế hợp chất 12



12

Việc tổng hợp hợp chất 12 giống như việc điều chế hợp chất 2, ngoại trừ việc hợp chất 10 được thay thế cho hợp chất 1 để thu được hợp chất 12. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,59 (s, 1H), 10,90 (s, 1H), 9,17 (s, 0H), 7,69 (dd, $J = 9,4, 2,4$ Hz, 1H), 7,65 (s, 1H), 6,94-6,82 (m, 2H), 3,67-3,52 (m, 2H), 3,15-2,56 (m, 3H), 2,45 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H), 2,17 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 1,89 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 1,61 (d, $J = 10,4$ Hz, 2H), 1,42 (s, 1H).

Ví dụ điều chế 13: điều chế hợp chất 13

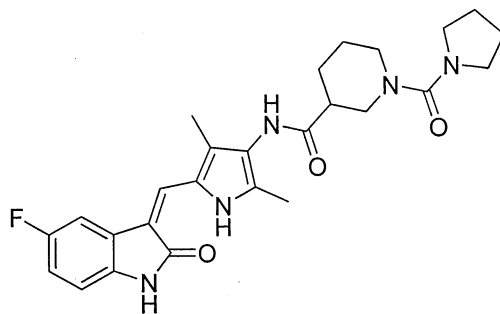


13

Việc tổng hợp hợp chất 13 cũng giống như việc điều chế hợp chất 3, ngoại trừ việc hợp chất 12 được sử dụng thay thế cho hợp chất 2 để thu được hợp chất 13. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,59 (s, 1H), 10,83 (s, 1H),

9,18 (s, 1H), 7,71 (dd, $J = 9,4, 2,4$ Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,89 (dd, $J = 9,2, 2,4$ Hz, 1H), 6,86-6,80 (m, 1H), 3,72-3,59 (m, 1H), 3,51 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H), 2,90-2,81 (m, 1H), 2,78-2,68 (m, 7H), 2,64-2,55 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 1,97 (d, $J = 14,9$ Hz, 1H), 1,73-1,57 (m, 2H), 1,53-1,38 (m, 1H).

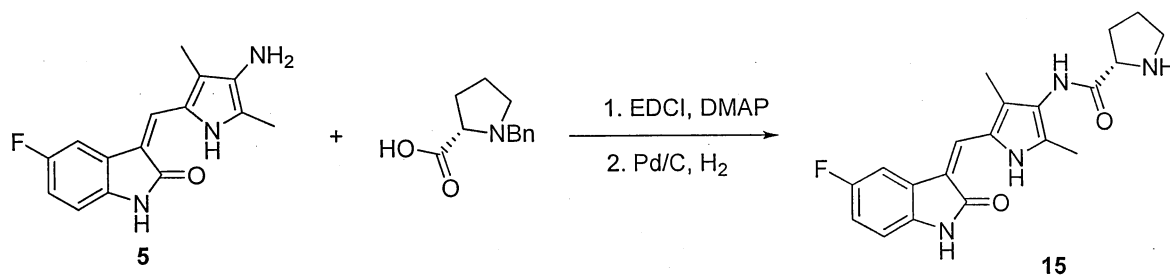
Ví dụ điều chế 14: điều chế hợp chất 14



14

Việc tổng hợp hợp chất 14 cũng giống như việc điều chế hợp chất 11, ngoại trừ việc hợp chất 12 được sử dụng thay cho hợp chất 2, để thu được hợp chất 14. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,59 (s, 1H), 10,83 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 7,71 (dd, $J = 9,4, 2,5$ Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,93-6,86 (m, 1H), 6,83 (dd, $J = 8,4, 4,8$ Hz, 1H), 3,75 (d, $J = 12,7$ Hz, 1H), 3,61 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 3,28 (s, 4H), 2,90-2,81 (m, 1H), 2,73 (t, $J = 11,4$ Hz, 1H), 2,60-2,50 (m, 1H), 2,06-1,91 (m, 1H), 1,76 (s, 4H), 1,74-1,59 (m, 2H), 1,55-1,39 (m, 1H).

Ví dụ điều chế 15: điều chế hợp chất 15



15

Việc tổng hợp hợp chất 15 cũng giống như việc điều chế hợp chất 6, ngoại trừ việc D-N-Bn prolin được sử dụng thay thế cho L-N-Bn prolin để thu được hợp chất 15. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13,60 (s, 1H), 10,83 (s, 1H), 9,23 (s, 1H), 7,71 (dd, $J = 9,3, 2,4$ Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 6,93 – 6,87 (m, 1H), 6,83 (dd, $J = 8,4, 4,6$ Hz, 1H), 3,70 (dd, $J = 8,7, 5,5$ Hz, 1H), 2,91 (t, $J =$

6,6 Hz, 1H), 2,18 (s, 2H), 2,16 (s, 2H), 2,10 – 1,98 (m, 1H), 1,85 – 1,74 (m, 1H), 1,72 – 1,63 (m, 2H).

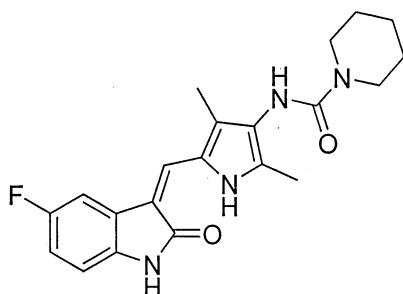
Ví dụ điều chế 16: điều chế muối hydroclorua của hợp chất 6

0,5 mL dung dịch HCl bão hòa trong etanol được pha loãng 10 lần bằng etanol khan và hợp chất 6 (368 mg, 1 mmol) được thêm vào hỗn hợp này, tiếp theo khuấy từ 5 đến 10 phút. Dung dịch phản ứng được cô đặc ở áp suất thấp, được rửa bằng lượng nhỏ metanol, và thu được muối hydroclorua của hợp chất 6.

Muối hydroclorua của tất cả các hợp chất khác có thể được điều chế theo phương pháp nói trên, trong đó hợp chất tương ứng phản ứng với dung dịch HCl pha loãng trong etanol.

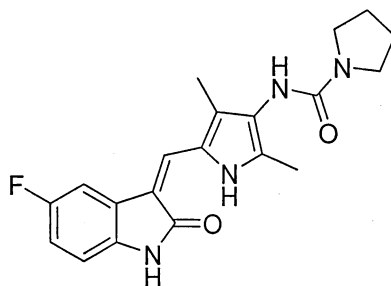
Bằng việc tham khảo các ví dụ điều chế các hợp chất indolon được thể pyrol nói trên, các hợp chất khác cũng được điều chế bằng phương pháp nêu trên.

Người nộp đơn cũng tổng hợp các hợp chất so sánh 1-3 dưới đây bằng các phương pháp tương tự như trên hoặc bằng các phương pháp khác đã biết.



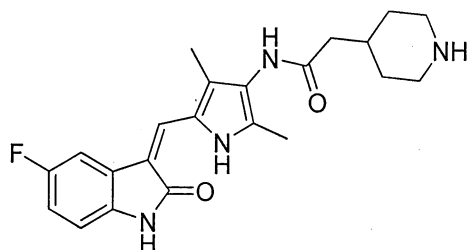
Hợp chất so sánh 1

Hợp chất so sánh 1 giống với hợp chất 2 ngoại trừ piperidinyll ở đầu phải phía xa được gắn với cacbonyl thông qua nguyên tử N của nó.



Hợp chất so sánh 2

Hợp chất so sánh 2 giống với hợp chất 6 ngoại trừ pyrrolidinyl ở đầu phải phía xa được gắn với cacbonyl thông qua nguyên tử N của nó.



Hợp chất so sánh 3

Hợp chất so sánh 3 giống với hợp chất 2 ngoại trừ piperidinyl ở đầu phải phía xa được gắn với cacbonyl thông qua nhóm metylen.

Ví dụ thử nghiệm 1: Thử nghiệm *in vitro* của hoạt động sinh hóa trên tyrosin kinaza KDR

Hoạt động ức chế *in vitro* của các hợp chất trên tyrosin kinaza KDR (thụ thể VEGF) được thử nghiệm bằng phương pháp HTRF (homogeneous time-resolved fluorescence, huỳnh quang phân giải thời gian đồng nhất). Hỗn hợp kinaza đệm, hợp chất thử nghiệm hoặc sunitinib, chất nền và dung dịch ATP được cho vào thể tích cuối cùng 10 μ L trong đĩa 384 giếng mà đã được làm nóng bằng nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian thích hợp. 10 μ L SA-XL665 và kháng thể TK được thêm vào từng giếng đã được sấy đến nhiệt độ trong phòng trong một giờ và được đọc bằng Synergy2.

Kết quả cho thấy rằng tất cả các hợp chất trong các thí nghiệm nói trên có hoạt tính ức chế rõ ràng trên KDR ở nồng độ 0,1 μ M và 1 μ M, và các hợp chất 3, 6, 8, 9, 11 và 13 là tương tự với hoạt tính của sunitinib.

Bảng 1. Hoạt động ức chế *in vitro* của các hợp chất ví dụ trên KDR

	IC ₅₀ (nM)
2	290
3	78
5	141
6	83
8	66
9	89
11	74

12	142
13	77
14	143
15	65
Sunitinib	62
Staurosporin*	8.14

* Staurosporin được sử dụng làm chất đối chứng dương tính

Ví dụ thử nghiệm 2: Xét nghiệm khả năng gây độc cho HUVEC và hoạt động trên VEGF- gây ra tăng sinh tế bào HUVEC *in vitro*

Thử nghiệm hoạt động ức chế trên VEGF- gây ra tăng sinh dòng tế bào tĩnh mạch rốn của người (HUVEC): HUVEC được nuôi trong F-12K chứa 10% FBS, 18 u/mL heparin và 30 µg/mL ECGS, và các HUVEC tại đoạn 4-8 được chọn để xét nghiệm. Các tế bào được phân hủy bằng pancreatin, tái lơ lửng trong môi trường nuôi cấy (1×10^5 /mL), và được cho vào đĩa 96 giếng với 100 µL/giếng, nuôi cấy qua đêm. Việc nuôi cấy được thay thế bằng dung dịch nuôi cấy F-12K chứa 5% FBS và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Dung dịch nuôi cấy F-12K chứa 5% FBS chứa hợp chất cần thử, sunitinib hoặc chất đối chứng được thêm vào và được sấy trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy F-12K chứa 0,1% FBS chứa VEGF165 ở nồng độ cuối cùng 30 ng/ml hoặc chất dẫn thuốc (DMSO) được thêm vào và các tế bào được nuôi cấy trong 72 giờ. Môi trường nuôi cấy được lấy ra bằng ống nhỏ và 120 µL MTS dung dịch xét nghiệm được cho vào từng lỗ, mà đã được sấy ở nhiệt độ 37°C. OD₄₉₀ được đọc. Nhóm được điều trị bằng dung dịch nuôi cấy F-12K chứa 5% FBS như chất đối chứng âm tính. Giá trị tăng trưởng kích thích VEGF có được bằng cách trừ OD của nhóm đối chứng âm tính từ OD của nhóm kích thích VEGF165, và được sử dụng để tính toán sự ức chế. Đồ thị liều lượng-hiệu quả được vẽ bằng phần mềm GraphPad Prism và nồng độ hiệu quả một nửa (EC₅₀) được tính toán.

Xét nghiệm gây độc cho tế bào: các HUVEC nói trên được nuôi trong môi trường nuôi cấy F-12K chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS), 100 U/mL penexilin, 100 µg/mL streptomycin, 30 µg/mL ECGS và 18 u/mL

heparin. Các HUVEC phát triển giai đoạn gắn mũ được phân hủy bằng pancreatin và được điều chỉnh để có mức độ tương ứng với mật độ tế bào bằng việc sử dụng môi trường hoàn chỉnh F-12K chứa 5% FBS, sau đó 150 μ L tế bào được tiêm vào đĩa 96 giếng với 3.000 tế bào/1 giếng. Sau 24 giờ, 50 μ L hợp chất thử nghiệm đã pha loãng đi 4 lần trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh chứa 5% FBS được thêm vào, và lượng tương tự của dung dịch pha loãng DMSO được sử dụng để làm chất đối chứng. Sau khi các tế bào được nuôi tiếp trong 72 giờ, 20 μ L MTS và 1 μ L PMS được thêm vào từng giếng. Sau từ 1 đến 2 giờ, OD₄₉₀ được đo, với OD₆₅₀ là đối chứng. Đồ thị liều lượng-hiệu quả được vẽ bằng phần mềm GraphPad Prism, và nồng độ gây độc tế bào một nửa (CC₅₀) được tính toán. Chỉ số điều trị (TI) của hợp chất thử nghiệm trên các HUVEC được tính toán là $TI = CC_{50}/EC_{50}$.

Kết quả cho thấy rằng tất cả các hợp chất ví dụ có thể ức chế đáng kể sự tăng sinh kích thích VEGF của các HUVEC, với sự hoạt động thấp hơn so với sunitinib. Tuy nhiên, một số hợp chất (hợp chất 2, 3, 5, 6, 8, 11, 13, 14 và 15) cho thấy khả năng gây độc cho HUVEC thấp hơn đáng kể so với sunitinib. Chỉ số điều trị TI của các hợp chất 2, 3, 5, 6, 8, 11, 14 và 15 bằng 2 đến 3 lần so với sunitinib, cho thấy khả năng điều trị tốt hơn.

Đối với các hợp chất so sánh 1 và 2, do dị vòng chứa N ở đầu phải phía xa được gắn cacbonyl thông qua nguyên tử khác loại, nên chỉ số điều trị TI cơ bản giống như sunitinib và thấp hơn rõ ràng so với các hợp chất của sáng chế. Đối với hợp chất so sánh 3, do dị vòng chứa N ở đầu phải phía xa được gắn cacbonyl thông qua nhóm metylen, nên chỉ số điều trị TI cũng cơ bản giống như sunitinib và thấp hơn đáng kể so với các hợp chất của sáng chế.

Bảng 2. Gây độc tế bào với HUVEC, hoạt động phát triển gây nên trên VEGF *in vitro* và chỉ số điều trị TI của một số hợp chất

Hợp chất	EC ₅₀ (nM)	CC ₅₀ (nM)	TI=CC ₅₀ /EC ₅₀
2	16,15	>20000	>1238
3	13,74	>20000	>1456
5	18,43	>20000	>1085
6	13,35	17566,77	1316

8	11,35	>20000	>1762
11	13,93	>20000	>1436
14	13,04	>20000	>1534
15	14,21	17732,12	1247
Sunitinib	7,73	4144,09	536
Hợp chất so sánh 1	13,23	5689,26	430
Hợp chất so sánh 2	12,31	6982,25	567
Hợp chất so sánh 3	14,64	8054,61	550

Ví dụ thử nghiệm 3: Thử nghiệm hoạt động ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào khối u của người có nguồn gốc từ MV-4-11.

Dòng tế bào bạch cầu cấp tính của người MV-4-11 là dòng tế bào có sự biến đổi trong Flt-3. Hoạt động chống tăng sinh *in vitro* của các hợp chất trên MV-4-11 được thử nghiệm bằng phương pháp MTS: các tế bào phát triển trong giai đoạn gần mũ được phân hủy bằng pancreatin và được đếm; số lượng tế bào phù hợp được tái lơ lửng trong dung dịch nuôi cấy, được cho vào đĩa 96 giếng với 150 μL /giếng, và được nuôi qua đêm; dung dịch nuôi cấy 50 μL chứa các hợp chất thử nghiệm được pha loãng 4 lần hoặc chất đối chứng được thêm vào từng giếng, nuôi tiếp trong 72 giờ; dung dịch nuôi cấy được lấy ra bằng ống mẫu và 120 μL MTS dung dịch xét nghiệm (100 μL môi trường mới và 20 μL dung dịch MTS) được thêm vào từng giếng đã được sấy ở nhiệt độ 37°C; OD₄₉₀ được đọc và dữ liệu được phân tích và xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism5, để tính toán IC₅₀.

Kết quả cho thấy rằng tất cả các hợp chất thử nghiệm 1-15 có hoạt động chống lại sự tăng sinh đáng kể trên MV-4-11 và một số hợp chất có hoạt động tương tự hoặc cao hơn sunitinib (xem bảng dưới đây). FLT-3 (FMS tương tự tyrosin kinaza 3) là thụ thể tyrosin kinaza tuýp III, được tìm thấy rộng rãi trong các hệ như hệ miễn dịch và hệ thần kinh. Các đột biến ở gen FLT-3 và quá biểu hiện của FLT-3 có thể gây ra khối u. Hoạt động chống tăng sinh cụ thể của các hợp chất 1-15 trên MV-4-11 cũng cho thấy các hợp chất ví dụ cũng giống với sunitinib có tác dụng làm chất ức chế FLT-3.

Bảng 3. Sự ức chế của một số hợp chất đối với việc tăng sinh dòng tế bào MV-4-11 có nguồn gốc từ người *in vitro*

Hợp chất	IC ₅₀ (nM)	Ức chế tối đa (%)
2	4,70	92,6
3	10,67	92,1
5	1,68	95,0
6	11,58	92,4
9	5,34	94,3
12	7,87	93,1
13	6,41	90,2
15	12,34	92,5
Sunitinib	3,94	94,4

Ví dụ thử nghiệm 4: Ức chế trên khối u cấy ghép MV-4-11 trên chuột trụ lông *in vitro*.

Các tế bào MV-4-11 được nuôi cấy để tăng sinh *in vitro*, và các tế bào phát triển trong giai đoạn gần mũ được thu lại và tái lơ lửng trong môi trường nuôi cấy EMEM không huyết thanh. Dịch tế bào dạng huyền phù được tiêm dưới da bằng xy lanh vào khoang nách của chân phải trước của chuột đực Balb/c trụ lông. Các con chuột và các khối u cấy ghép được theo dõi thường xuyên. Khi thể tích khối u tăng lên nằm trong khoảng từ 100 đến 300 mm³, các con chuột có các khối u với kích thước phù hợp được chọn ra và chia ngẫu nhiên 6 con thành một nhóm. Mỗi nhóm được theo dõi dạ dày bằng chất dẫn thuốc chuẩn (0,5% CMC) hoặc huyền phù của hợp chất 6 hoặc sunitinib ở liều 80 mg/kg, một lần một ngày và giám sát trong thời gian 3 tuần. Trong thời gian giám sát, đường kính của các khối u và trọng lượng cơ thể (BW) của chuột được đo đạc và tình trạng sống của các con chuột được theo dõi. Thử nghiệm kết thúc sau 3 tuần sau khi theo dõi các con chuột được cho chết ngạt bằng khí CO₂ và được đưa vào khám nghiệm.

Thể tích khối u (TV) được tính toán bằng công thức $TV = 1/2 \times a \times b^2$, trong đó a là đường kính lớn hơn của khối u và b là đường kính nhỏ hơn của khối u.

Kết quả cho thấy rằng vào ngày 21 trong đợt theo dõi trong dạ dày, các khối u trong nhóm đối chứng chất dẫn thuốc đã phát triển bằng gần 6 lần so với thể tích ban đầu, trong khi các khối u ở nhóm điều trị bằng hợp chất 6 đã hoàn toàn biến mất, và hợp chất 6 không có tác động đáng kể nào tới trọng lượng của chuột. Mặc dù chất sunitinib cũng cho thấy khả năng chống lại khối u trong hầu hết các con chuột có khối u biến mất, nhưng trọng lượng cơ thể của chuột lại giảm đi đáng kể và có bằng chứng gây độc.

Bảng 4. Ức chế của hợp chất 6 trên khối u cấy ghép MV-4-11 trên chuột trụi lông

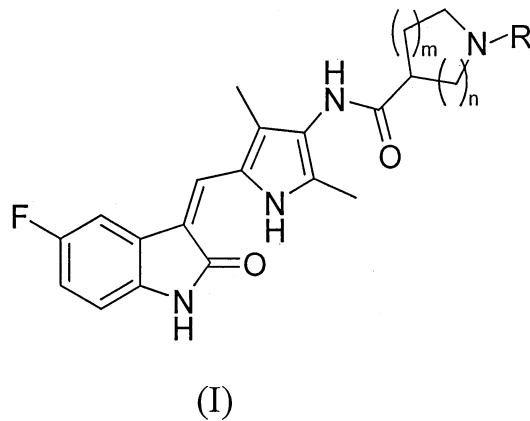
	Số lượng chuột	Liều lượng (mg/kg)	D ₀		D ₂₁	
Nhóm	Khởi đầu/Kết thúc		TV	BW	TV	BW
Đối chứng dẫn thuốc	6/6	—	243,76±20,1	19,42±0,08	1443,81±246,22	22,67±0,48
Sunitinib	6/6	80	242,75±20,58	19,47±0,33	12,97±2,47**	16,02±0,56**
Hợp chất 6	6/6	80	238,25±13,18	20,42±0,20	0,00±0,00**	21,38±0,37

** : P<0,01 như được so sánh với đối chứng dẫn thuốc

Như có thể thấy từ các kết quả thử nghiệm trên khối u cấy ghép MV-4-11 ở chuột trụi lông. Hợp chất 6 của sáng chế có hiệu quả ức chế rất tốt trên các khối u cấy ghép MV-4-11, ở liều lượng 80 mg/kg có thể làm biến mất hoàn toàn các khối u và có rất ít ảnh hưởng lên trọng lượng của chuột. Sunitinib làm giảm đáng kể trọng lượng của chuột và cho thấy rõ ràng có sự nhiễm độc. Các kết quả này chứng minh rằng các hợp chất của sáng chế có khả năng chống lại các khối u so với sunitinib, nhưng lại có mức độ nhiễm độc ít hơn, khoảng điều trị tốt hơn và có giá trị cao trong việc phát triển thuốc.

Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất indolon được thế pyrol có công thức (I) dưới đây, hoặc có công thức của hợp chất 4, hợp chất 6, hợp chất 7, hợp chất 8, hợp chất 9, hoặc hợp chất 15 hoặc các muối được dụng của hợp chất này:

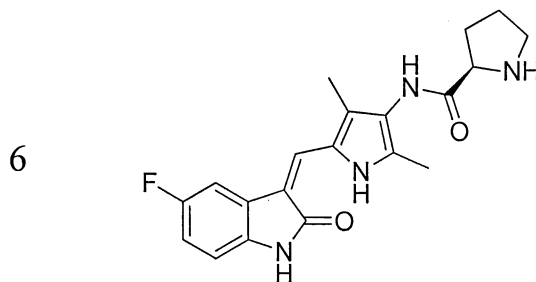
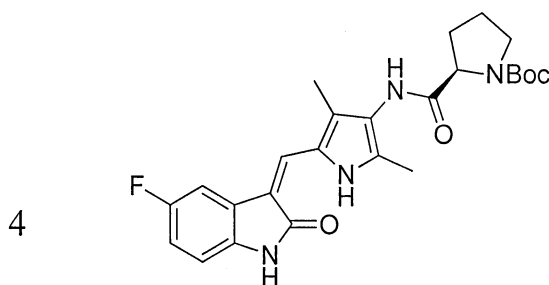


trong đó

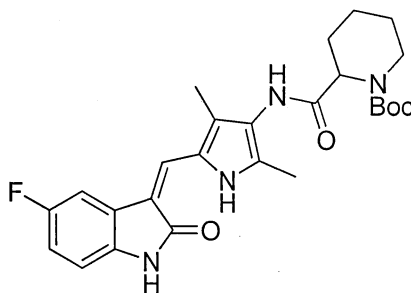
m được chọn từ 0, 1 và 2;

n được chọn từ 1, 2 và 3; và

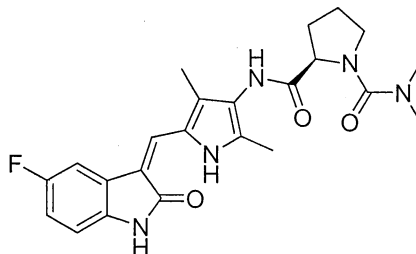
R được chọn từ hydro, C₁-C₆ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₃-C₇ xycloalkyl, formyl được thế bằng C₁-C₆ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₃-C₇ xycloalkylformyl, t-butoxycacbonyl, carbamoyl được thế hoặc carbamoyl vòng có 5 đến 7 cạnh,



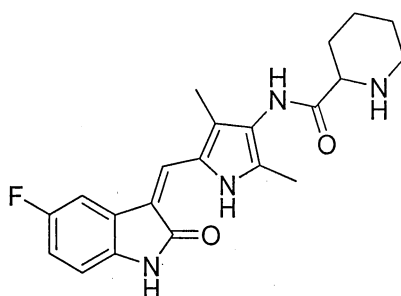
7



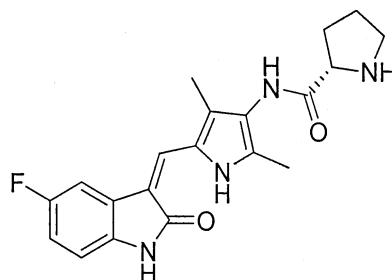
8



9



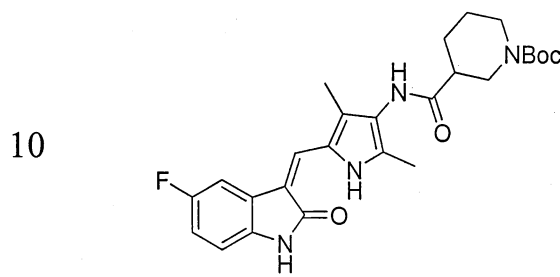
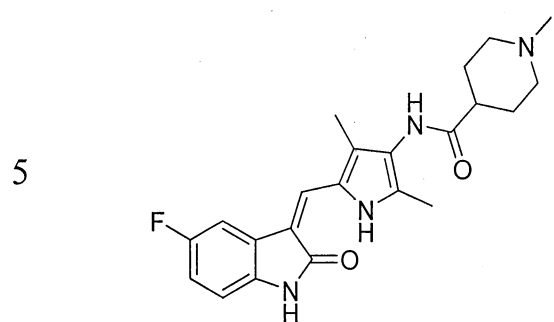
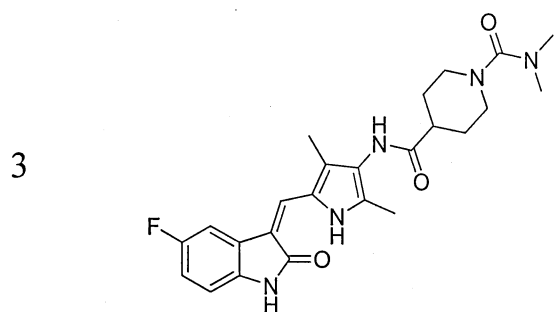
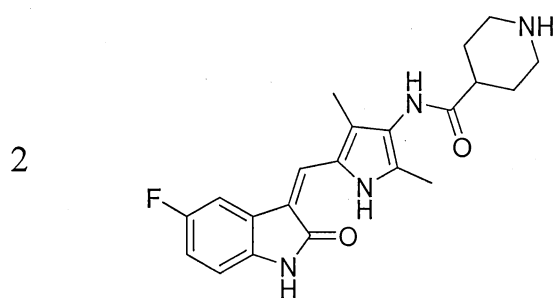
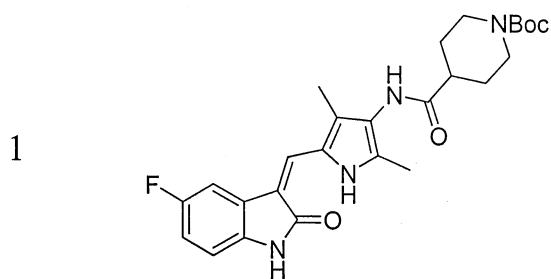
15



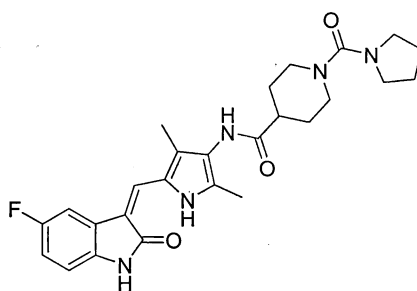
2. Hợp chất indolon được thế pyrol theo điểm 1, trong đó R được chọn từ nhóm bao gồm hydro, C₁-C₃ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₄-C₆ xycloalkyl, formyl được thế bằng C₁-C₃ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₃-C₆ xycloalkylformyl, t-butoxycacbonyl, N,N-dimetyl carbamoyl, N,N-dietyl carbamoyl, N,N-dipropyl carbamoyl, pyrrolidin-1-ylformyl hoặc piperidin-1-ylformyl.

3. Hợp chất indolon được thế pyrol theo điểm 1, trong đó R được chọn từ nhóm bao gồm hydro, metyl, t-butoxycacbonyl, N,N-dimetyl carbamoyl hoặc pyrrolidin-1-ylformyl.

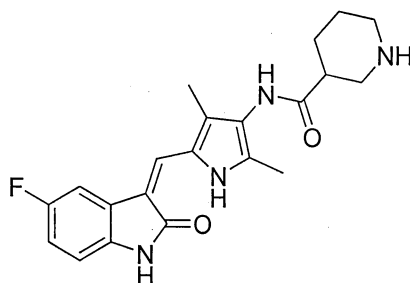
4. Hợp chất indolon được thế pyrol theo điểm 1, trong đó hợp chất indolon được thế pyrol có công thức (I) được chọn từ các hợp chất 1 đến 3, 5, 10 đến 14 dưới đây:



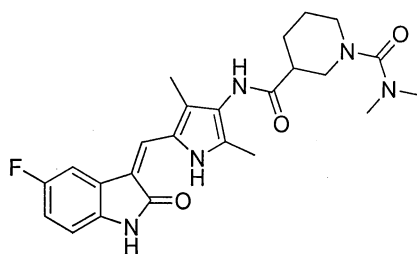
11



12

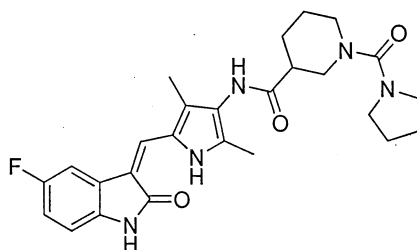


13



hoặc

14



5. Hợp chất indolon được thể pyrol hoặc các muối được dụng của hợp chất này theo điểm 1, trong đó các muối này là các muối hydroclorua.

6. Dược phẩm chứa:

lượng có hiệu quả điều trị bệnh của một hoặc nhiều hợp chất indolon được thể pyrol hoặc các muối được dụng của hợp chất này theo điểm 1, và các thành phần phụ tùy chọn.