



(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) 
1-0021207

(51)⁷ **C07J 63/00, A61K 31/565, A61P 29/00**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2014-03938 | (22) | 24.04.2013 | | |
| (86) | PCT/US2013/038064 | 24.04.2013 | (87) | WO2013/163344 | 31.10.2013 |
| (30) | 61/687,669 | 27.04.2012 | US | | |
| | 61/775,288 | 08.03.2013 | US | | |
| | 61/780,444 | 13.03.2013 | US | | |
| (45) | 25.07.2019 | 376 | (43) | 27.04.2015 | 325 |
| (73) | REATA PHARMACEUTICALS, INC. (US)
2801 Gateway Drive, Suite 150, Irving, TX 75063-2648, United States of America | | | | |
| (72) | ANDERSON, Eric (US), DECKER, Andrea (DE), LIU, Xiaofeng (US) | | | | |
| (74) | Công ty Luật TNHH T&G (TGVN) | | | | |
-

(54) **DẪN XUẤT 2,2-ĐIFLOPROPIONAMIT CỦA BARĐOXOLON METYL, HỢP CHẤT DẠNG ĐA HÌNH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG**

(57) Sáng chế nói chung đề cập đến đến hợp chất N- ((4aS,6aR,6bS,8aR, 12aS, 14aR, 14bS)-11 -xyano-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptametyl-10,14- đioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-octadecahydropixen-4a-yl)-2,2-điflopropanamit, các hợp chất dạng đa hình của chúng, các dược phẩm chứa hợp chất, và các bộ kit và các vật phẩm sản xuất chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này nói chung đề cập đến hợp chất:

N-((4aS,6aR,6bS,8aR,12aS,14aR,14bS)-11-xyano-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptametyl-10,14-đioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-octadecahydropixen-4a-yl)-2,2-diflopropanamit, ở đây cũng được gọi là RTA 408, 63415, hoặc PP415. Sáng chế này cũng đề cập đến các hợp chất dạng đa hình nêu trên, các phương pháp điều chế và các dược phẩm, và các bộ kit và các vật phẩm sản xuất chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hoạt tính chống viêm và chống tăng sinh của axit oleanolic, triterpenoit tự nhiên đã được cải thiện bởi các biến đổi hóa học. Ví dụ như, axit 2-xyano-3,12-điooxoleana-1,9(11)-dien-28-oic (CDDO) và các hợp chất liên quan đã được phát triển. Xem các tài liệu của Honda và đồng tác giả, 1997; Honda và đồng tác giả, 1998; Honda và đồng tác giả, 1999; Honda và đồng tác giả, 2000a; Honda và đồng tác giả, 2000b; Honda và đồng tác giả, 2002; Suh và đồng tác giả, 1998; Suh và đồng tác giả, 1999; Place và đồng tác giả, 2003; Liby và đồng tác giả, 2005; và các Patent Mỹ 8129429, 7915402, 8124799, và 7943778, nội dung của tất cả các tài liệu này được đưa vào đây để tham chiếu. Metyl este, bardoxolon metyl (CDDO-Me) đã được đánh giá trong các thử nghiệm lâm sàng giai đoạn II và III để điều trị và phòng ngừa bệnh thận do đái tháo đường và bệnh thận mãn tính. Xem tài liệu của Pergola và đồng tác giả, 2011 mà nội dung được đưa vào đây để tham chiếu.

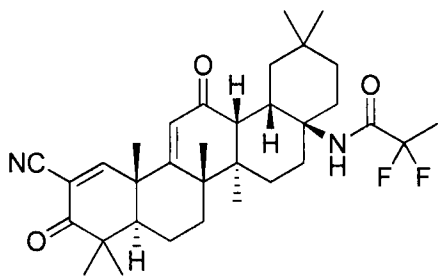
Các dạng tương tự triterpenoit tổng hợp của axit oleanolic cũng đã được thể hiện là các chất ức chế của các quy trình gây viêm tế bào, chẳng hạn như gây ra bởi IFN- γ của men tổng hợp oxyt nitric cảm ứng (iNOS) và của COX-2 trong các đại thực bào ở chuột. Xem các tài liệu của Honda và đồng tác giả, (2000a), Honda và đồng tác giả (2000b), Honda và đồng tác giả (2002), và các Patent Mỹ 8129429, 7915402, 8124799, và 7943778 mà nội dung của tất cả các tài liệu này được đưa vào đây để tham chiếu. Các hợp chất dẫn xuất từ axit oleanolic đã được thể hiện là có ảnh hưởng đến chức năng của nhiều đích protein và do đó điều biến hoạt tính của một số đường

truyền tín hiệu tế bào quan trọng liên quan đến ứng suất oxy hóa, kiểm soát chu kỳ tế bào, và chứng viêm (ví dụ như, Dinkova-Kostova và đồng tác giả, 2005; Ahmad và đồng tác giả, 2006; Ahmad và đồng tác giả, 2008; Liby và đồng tác giả, 2007a, và các Patent Mỹ 8129429, 7915402, 8124799, và 7943778).

Do các đặc trưng hoạt tính sinh học của các dẫn xuất triterpenoit đã biết thay đổi, và do nhiều loại bệnh khác nhau có thể được điều trị hoặc phòng ngừa bằng các hợp chất có các tác dụng chống viêm và chống oxy hóa hiệu nghiệm, và mức độ cao của nhu cầu y tế không đáp ứng được được thể hiện trong các loại bệnh này, cần tổng hợp các hợp chất mới có các đặc trưng hoạt tính sinh học khác nhau để điều trị hoặc phòng ngừa một hoặc nhiều dấu hiệu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một số khía cạnh, mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất có công thức (ở đây cũng được gọi là RTA 408, 63415, hoặc PP415):



hoặc muối được dụng của nó.

Theo một số phương án, hợp chất có dạng muối được dụng. Theo một số phương án, hợp chất không ở dạng muối.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế này đề xuất các hợp chất dạng đa hình nêu trên. Theo một số phương án, hợp chất dạng đa hình có một hình nhiễu xạ bột tia X (CuK α) bao gồm một đỉnh halogen ở khoảng 14 °2 θ . Theo một số phương án, hình nhiễu xạ bột tia X (CuK α) còn bao gồm một đỉnh vai ở khoảng 8 °2 θ . Theo một số phương án, hình nhiễu xạ bột tia X (CuK α) về cơ bản như được thể hiện ở FIG.59. Theo một số phương án, hợp chất dạng đa hình có T_g từ khoảng 150 °C đến khoảng 155 °C, gồm, ví dụ như, T_g là khoảng 153 °C hoặc T_g là khoảng 150 °C. Theo một số phương án, hợp chất dạng đa hình có đường cong đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC) bao gồm một nhóm thu nhiệt được định tâm từ khoảng 150 °C đến khoảng 155 °C. Theo một số phương án, nhóm thu nhiệt được định tâm ở khoảng 153 °C. Theo một số

phương án, nhóm thu nhiệt được định tâm ở khoảng 150 °C. Theo một số phương án, đường cong đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC) về cơ bản như được thể hiện ở FIG.62.

Theo một số phương án, hợp chất dạng đa hình là một solvat có một hình nhiễu xạ bột tia X ($\text{CuK}\alpha$) bao gồm các đỉnh ở khoảng 5,6; 7,0; 10,6; 12,7; và 14,6 °2 θ . Theo một số phương án, hình nhiễu xạ bột tia X ($\text{CuK}\alpha$) về cơ bản như được thể hiện ở FIG.75, mẫu hình đỉnh.

Theo một số phương án, hợp chất dạng đa hình là một solvat có một hình nhiễu xạ bột tia X ($\text{CuK}\alpha$) bao gồm các đỉnh ở khoảng 7,0; 7,8; 8,6; 11,9; 13,9 (đỉnh kép), 14,2; và 16,0 °2 θ . Theo một số phương án, hình nhiễu xạ tia X ($\text{CuK}\alpha$) về cơ bản như được thể hiện ở FIG.75, mẫu hình thứ hai từ đỉnh.

Theo một số phương án, hợp chất dạng đa hình là một hemisolvat axetonitril có một hình nhiễu xạ bột tia X ($\text{CuK}\alpha$) bao gồm các đỉnh ở khoảng 7,5; 11,4; 15,6 và 16,6 °2 θ . Theo một số phương án, hình nhiễu xạ tia X ($\text{CuK}\alpha$) về cơ bản như được thể hiện ở FIG.75, mẫu hình thứ hai từ đáy. Theo một số phương án, hợp chất dạng đa hình có một T_g là khoảng 196 °C. Theo một số phương án, hợp chất dạng đa hình có một đường cong đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC) bao gồm một nhóm thu nhiệt được định tâm ở khoảng 196 °C. Theo một số phương án, đường cong đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC) về cơ bản như được thể hiện ở FIG.116.

Theo một số phương án, hợp chất dạng đa hình là một solvat có một hình nhiễu xạ bột tia X ($\text{CuK}\alpha$) bao gồm các đỉnh ở khoảng 6,8; 9,3; 9,5; 10,5; 13,6; và 15,6 °2 θ . Theo một số phương án, hình nhiễu xạ tia X ($\text{CuK}\alpha$) về cơ bản như được thể hiện ở FIG.75, mẫu hình đáy.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế này đề xuất các dược phẩm chứa hoạt chất gồm có hợp chất nêu trên hoặc hợp chất dạng đa hình của nó (chẳng hạn như, bất kỳ một trong số các hợp chất dạng đa hình được mô tả trên đây và dưới đây), và chất mang dược dụng. Theo một số phương án, dược phẩm được bào chế để dùng: qua đường miệng, trong mô mỡ, trong động mạch, trong khớp, trong sọ, trong da, trong vết thương, trong cơ, trong mũi, trong mắt, trong màng tim, trong bụng, trong màng phổi, trong tuyến tiền liệt, trong trực tràng, trong túi mạc, trong khí quản, trong khối u, trong rốn, trong âm đạo, trong tĩnh mạch, trong bong, trong thủy tinh thể, qua hạt mỡ, khu trú, qua niêm mạc, ngoài ruột, qua trực tràng, dưới kết mạc, dưới da, dưới lưỡi, cục bộ, xuyên miệng, áp da, qua âm đạo, trong kem, trong các chế phẩm lipit, qua ống

thông đường tiêu, qua thụt rửa, qua tiêm truyền liên tục, qua tiêm truyền, qua hít, qua tiêm, qua cấp phối cục bộ, hoặc qua truyền dịch khu trú. Theo một số phương án, dược phẩm được bào chế để dùng qua đường miệng, trong động mạch, trong tĩnh mạch, hoặc sử dụng tại chỗ. Theo một số phương án, dược phẩm được bào chế để dùng qua đường miệng.

Theo một số phương án, dược phẩm được bào chế dưới dạng viên nang cứng hoặc mềm, thuốc viên, sirô, dịch huyền phù, nhũ tương, dung dịch, chất phân tán dạng rắn, viên nhện, hoặc cốm ngọt. Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế còn chứa tác nhân giúp nâng cao độ hòa tan và độ phân tán. (Ví dụ như, các tác nhân nâng cao độ hòa tan và độ phân tán gồm, nhưng không giới hạn ở, các PEG, xyclodextran, và các dẫn xuất xenluloza). Theo một số phương án, hợp chất hoặc dạng đa hình được tạo huyền phù trong dầu vùng.

Theo các phương án khác, dược phẩm được bào chế để dùng cục bộ. Theo các phương án khác, dược phẩm được bào chế dưới dạng nước thơm, kem, chất gel, dầu, thuốc mỡ, sáp, nhũ tương, dung dịch, hoặc dịch huyền phù. Theo một số phương án, dược phẩm được bào chế dưới dạng nước thơm, kem, hoặc chất gel. Theo một số phương án, lượng hoạt chất từ khoảng 0,01% đến khoảng 5% theo trọng lượng, khoảng 0,01% đến khoảng 3% theo trọng lượng, hoặc 0,01%, 0,1%, 1%, hoặc 3% theo trọng lượng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng liên quan đến chứng viêm hoặc ứng suất oxy hóa ở người bệnh cần điều trị, bao gồm cho người bệnh một lượng hiệu quả trị bệnh dược phẩm như được mô tả trên đây hoặc dưới đây. Sáng chế cũng đề cập đến hợp chất N-((4aS,6aR,6bS,8aR,12aS,14aR,14bS)-11-xyano-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptametyl-10,14-dioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-octadecahydropixen-4a-yl)-2,2-diflopropanamit (hay RTA 408) hoặc muối dược dụng của nó, hoặc một hợp chất dạng đa hình đó (chẳng hạn như, ví dụ như, bất kỳ một trong số các hợp chất dạng đa hình được mô tả ở đây trên đây hoặc dưới đây), hoặc dược phẩm bao gồm bất kỳ trong số các thực thể và chất mang dược dụng nêu trên (gồm, ví dụ như, các dược phẩm được mô tả trên đây), để sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng liên quan đến chứng viêm hoặc ứng suất oxy hóa. Sáng chế cũng đề cập đến hợp chất nêu trên, hợp chất dạng đa hình hoặc dược phẩm để điều chế thuốc điều trị hoặc phòng ngừa

tình trạng liên quan đến chứng viêm hoặc ứng suất oxy hóa. Theo một số phương án, tình trạng liên quan đến chứng viêm. Theo các phương án khác, tình trạng liên quan đến ứng suất oxy hóa. Theo một số phương án, tình trạng là một bệnh về da hoặc rối loạn chức năng, nhiễm trùng, chứng viêm da, bệnh viêm khớp xương mãn tính, ung thư, chứng viêm, bệnh tự miễn dịch, bệnh viêm ruột, biến chứng do sự phơi nhiễm bức xạ ion hóa cục bộ hoặc toàn thân, viêm niêm mạc, suy cơ quan cấp tính hoặc mãn tính, bệnh gan, viêm tụy, rối loạn chức năng mắt, bệnh phổi hoặc bệnh đái tháo đường.

Sáng chế này hơn nữa đề cập đến hợp chất N-((4aS,6aR,6bS,8aR,12aS,14aR,14bS)-11-xyano-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptametyl-10,14-dioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-octadecahydropixen-4a-yl)-2,2-diflopropanamit (hay RTA 408) hoặc muối được dụng của nó, hoặc một hợp chất dạng đa hình đó (chẳng hạn như, ví dụ như, bất kỳ một trong số các hợp chất dạng đa hình được mô tả ở đây trên đây hoặc dưới đây), hoặc được phẩm bao gồm bất kỳ trong số các thực thể nêu trên và chất mang được dụng (gồm, ví dụ như, các được phẩm được mô tả trên đây), để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng được lựa chọn từ bệnh về da hoặc rối loạn chức năng, nhiễm trùng, chứng viêm da, bệnh viêm khớp xương mãn tính, ung thư, chứng viêm, bệnh tự miễn dịch, bệnh viêm ruột, biến chứng từ sự phơi nhiễm bức xạ ion hóa toàn thân hoặc cục bộ, viêm niêm mạc, suy cơ quan cấp tính hoặc mãn tính, bệnh gan, viêm tụy, rối loạn chức năng mắt, bệnh phổi, hoặc bệnh đái tháo đường. Theo đó, sáng chế đề cập đến hợp chất nêu trên, hợp chất dạng đa hình hoặc được phẩm để điều chế thuốc điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng được lựa chọn từ bệnh về da hoặc rối loạn chức năng, nhiễm trùng, chứng viêm da, bệnh viêm khớp xương mãn tính, ung thư, chứng viêm, bệnh tự miễn dịch, bệnh viêm ruột, biến chứng từ sự phơi nhiễm bức xạ ion hóa toàn thân hoặc cục bộ, viêm niêm mạc, suy cơ quan cấp tính hoặc mãn tính, bệnh gan, viêm tụy, rối loạn chức năng mắt, bệnh phổi, hoặc bệnh đái tháo đường. Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng được lựa chọn từ bệnh về da hoặc rối loạn chức năng, nhiễm trùng, chứng viêm da, bệnh viêm khớp xương mãn tính, ung thư, chứng viêm, bệnh tự miễn dịch, bệnh viêm ruột, biến chứng từ sự phơi nhiễm bức xạ ion hóa toàn thân hoặc cục bộ, viêm niêm mạc, suy cơ quan cấp tính hoặc mãn tính, bệnh gan, viêm tụy, rối loạn chức năng mắt, bệnh phổi, hoặc bệnh đái tháo đường ở người bệnh cần điều trị, phương pháp bao gồm cho người bệnh một lượng hiệu quả trị bệnh hợp chất nêu trên,

hợp chất dạng đa hình hoặc dược phẩm. Theo một số phương án, tình trạng là bệnh về da hoặc rối loạn chức năng chẳng hạn như chứng viêm da, bỏng nhiệt hoặc hóa học, vết thương mãn tính, mụn trứng cá, tình trạng rụng tóc, các rối loạn chức năng khác về nang lông, bệnh ly thượng bì bóng nước, râm nắng, các biến chứng râm nắng, các rối loạn chức năng hình thành sắc tố da, tình trạng da liên quan đến lão hóa; vết thương hậu phẫu, vết sẹo do da chấn thương hoặc bỏng, bệnh vẩy nến, biểu hiện ngoài da của bệnh tự miễn dịch hoặc bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ, ung thư da, hoặc rối loạn chức năng liên quan đến sự tăng siêu nhanh của các tế bào da. Theo một số phương án, bệnh về da hoặc rối loạn chức năng là chứng viêm da. Theo một số phương án, chứng viêm da là chứng viêm da dị ứng, chứng viêm da lặn chỗ, chứng viêm da do phơi nhiễm hóa học, hoặc chứng viêm da do bức xạ. Theo các phương án khác, bệnh về da hoặc rối loạn chức năng là vết thương mãn tính. Theo một số phương án, vết thương mãn tính là loét đài tháo đường, loét điểm tủy, hoặc loét tĩnh mạch. Theo các phương án khác, bệnh về da hoặc rối loạn chức năng là tình trạng rụng tóc. Theo một số phương án, tình trạng rụng tóc được lựa chọn từ tình trạng hói đầu hoặc tình trạng rụng tóc do thuốc. Theo các phương án khác, bệnh về da hoặc rối loạn chức năng là rối loạn chức năng hình thành sắc tố da. Theo một số phương án, rối loạn chức năng hình thành sắc tố da là bệnh đốm bạch tạng. Theo các phương án khác, bệnh về da hoặc rối loạn chức năng là rối loạn chức năng liên quan đến sự tăng siêu nhanh của các tế bào da. Theo một số phương án, rối loạn chức năng liên quan đến sự tăng siêu nhanh của các tế bào da là sự tăng sừng hóa.

Theo các phương án khác, tình trạng là bệnh tự miễn dịch, chẳng hạn như viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh Crohn, hoặc bệnh vẩy nến. Theo các phương án khác, tình trạng là bệnh gan, chẳng hạn như bệnh gan nhiễm mỡ hoặc bệnh viêm gan.

Theo các phương án khác, tình trạng là rối loạn chức năng mắt, chẳng hạn như viêm màng mạch nhỏ, thoái hóa điểm vàng của võng mạc, bệnh glôcôm, bệnh phù điểm vàng của võng mạc do đài tháo đường, bệnh viêm mí mắt, bệnh võng mạc do đài tháo đường, bệnh hoặc rối loạn chức năng về nội mô giác mạc, chứng viêm hậu phẫu, mắt khô, viêm kết mạc dị ứng hoặc một dạng viêm kết mạc. Theo một số phương án, rối loạn chức năng mắt là thoái hóa điểm vàng của võng mạc. Theo một số phương án, thoái hóa điểm vàng của võng mạc là dạng khô. Theo các phương án khác, thoái hóa

điểm vàng của võng mạc là dạng ướt. Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn chức năng về nội mô giác mạc là loạn dưỡng nội mô giác mạc Fuchs.

Theo các phương án khác, tình trạng là bệnh phổi, chẳng hạn như chứng viêm phổi, xơ hoá phổi, COPD, bệnh hen, xơ nang, hoặc xơ hoá phổi tự phát. Theo một số phương án, COPD bị gây ra bởi khói thuốc.

Theo các phương án khác, tình trạng là nhiễm trùng. Theo các phương án khác, tình trạng là viêm niêm mạc do liệu pháp bức xạ hoặc hóa học trị liệu. Theo một số phương án, viêm niêm mạc xuất hiện ở đường miệng. Theo các phương án khác, tình trạng liên quan đến sự phơi nhiễm bức xạ. Theo một số phương án, nhiễm bức xạ dẫn đến chứng viêm da. Theo một số phương án, nhiễm bức xạ là cấp tính. Theo các phương án khác, nhiễm bức xạ được phân đoạn.

Theo các phương án khác, tình trạng là ung thư. Theo một số phương án, ung thư là ung thư biểu mô, bệnh sacôm, u lym phô, bệnh bạch cầu, u melanin, u trung biểu mô, đau tùy, hoặc u tinh. Theo các phương án khác, ung thư là ung thư bàng quang, máu, xương, não, vú, hệ thần kinh trung ương, cổ tử cung, ruột kết, màng trong dạ con, thực quản, túi mật, cơ quan sinh dục ngoài, ống cơ quan sinh dục liệu, đầu, thận, thanh quản, gan, phổi, mô cơ, cổ, niêm mạc miệng hoặc mũi, buồng trứng, tuyến tụy, tuyến tiền liệt, da, lá lách, ruột non, ruột già, dạ dày, bộ tinh hoàn, hoặc tuyến giáp.

Theo một số phương án, dược phẩm được sử dụng trước hoặc ngay sau khi chủ thể được điều trị bằng liệu pháp bức xạ hoặc hóa học trị liệu trong đó hóa học trị liệu không bao gồm RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó. Theo một số phương án, dược phẩm được sử dụng cả trước và sau khi chủ thể được điều trị bằng liệu pháp bức xạ, hóa học trị liệu hoặc cả hai. Theo một số phương án, việc điều trị làm giảm tác dụng phụ của liệu pháp bức xạ hoặc hóa học trị liệu. Theo một số phương án, tác dụng phụ là viêm niêm mạc và chứng viêm da. Theo một số phương án, việc điều trị nâng cao tính hiệu quả của liệu pháp bức xạ hoặc hóa học trị liệu. Theo một số phương án, hóa học trị liệu bao gồm việc cho người bệnh một lượng hiệu quả trị bệnh 5-floraxil hoặc docetaxel.

Liệu pháp điều trị kết hợp bổ sung cũng được dự liệu bởi sáng chế này. Ví dụ như, theo một số phương án, các phương pháp điều trị ung thư ở một chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể một lượng hiệu quả về mặt dược của hợp chất theo sáng chế này, các

phương pháp có thể bao gồm thêm một hoặc nhiều cách thức điều trị được lựa chọn từ nhóm gồm có việc cho một lượng hiệu quả về mặt dược một loại thuốc thứ hai, phép trị liệu bằng tia X, miễn dịch trị liệu, liệu pháp gen, và phẫu thuật. Theo một số phương án, các phương pháp có thể bao gồm thêm bước (1) cho một tế bào khối u tiếp xúc với hợp chất trước khi cho tế bào khối u tiếp xúc với thuốc thứ hai, (2) cho một tế bào khối u tiếp xúc với thuốc thứ hai trước khi cho tế bào khối u tiếp xúc với hợp chất, hoặc (3) cho tế bào khối u tiếp xúc đồng thời với hợp chất và thuốc thứ hai. Theo các phương án nhất định, thuốc thứ hai có thể là thuốc kháng sinh, thuốc chống viêm, thuốc kháng khối u, thuốc chống tăng sinh, thuốc kháng virus, thuốc điều biến miễn dịch, hoặc ức chế miễn dịch. Theo các phương án khác, thuốc thứ hai có thể là tác nhân alkyl hóa, thuốc điều biến thụ thể androgen, chất phá vỡ bộ xương tế bào, thuốc điều biến thụ thể estrogen, chất ức chế histon-deacetylaza, chất ức chế reductaza HMG-CoA, chất ức chế transferaza prenyl-protein, chất điều biến thụ thể dạng võng mạc, chất ức chế topoisomeraza, hoặc chất ức chế tyrosin kinaza. Theo các phương án nhất định, thuốc thứ hai là 5-azacitidin, 5-floraxil, axit 9-cis-retinoic, actinomycin D, alitretinoin, axit all-trans-retinoic, annamycin, axitinib, belinostat, bevacizumab, bexaroten, bosutinib, busulfan, capecitabin, carboplatin, carmustin, CD437, cediranib, cetuximab, clorambuxil, cisplatin, cyclophosphamid, cytarabin, dacarbazine, dasatinib, daunorubicin, decitabin, docetaxel, dolastatin-10, doxorubicin, doxorubicin, epirubicin, erlotinib, etoposide, gefitinib, gemcitabin, gemtuzumab, ozogamixin, hexametylmelamin, idarubicin, ifosfamid, imatinib, irinotecan, isotretinoin, ixabepilone, lapatinib, LBH589, lomustine, mechlorethamine, melphalan, mercaptopurine, methotrexate, mitomycin, mitoxantron, MS-275, neratinib, nilotinib, nitrosourea, oxaliplatin, paclitaxel, plicamycin, procarbazine, semaxanib, semustine, natri butyrate, natri phenylacetate, streptozotocin, axit suberoylanilic hydroxamic, sunitinib, tamoxifen, teniposide, thiopeta, tioguanin, topotecan, TRAIL, trastuzumab, tretinoin, trichostatin A, axit valproic, valrubicin, vandetanib, vinblastin, vincristin, vindesine, hoặc vinorelbine.

Các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh có thành phần dễ viêm ở một chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể một lượng hiệu quả về mặt dược của hợp chất theo sáng chế này cũng được dự liệu. Theo một số phương án, bệnh có thể là, ví dụ như, bệnh lupus hoặc viêm khớp dạng thấp. Theo các phương án khác, bệnh có thể là bệnh

viêm ruột, chẳng hạn như bệnh Crohn hoặc viêm loét đại tràng. Theo các phương án khác, bệnh có thành phần dễ viêm có thể là bệnh tim mạch. Theo các phương án khác, bệnh có thành phần dễ viêm có thể là bệnh đái tháo đường, chẳng hạn như bệnh đái tháo đường týp 1 hoặc týp 2. Theo các phương án khác, RTA 408, các chất đa hình của nó, và các dược phẩm cũng có thể được sử dụng để điều trị các biến chứng liên quan đến bệnh đái tháo đường. Các biến chứng này được biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật và gồm nhưng không giới hạn ở, ví dụ như, chứng béo phì, chứng tăng huyết áp, chứng xơ vữa động mạch, bệnh tim hình vành, đột quỵ, bệnh mạch máu ngoại biên, chứng tăng huyết áp, bệnh thận, bệnh thần kinh, hoại tử cơ, bệnh võng mạc và hội chứng chuyển hoá (hội chứng X). Theo các phương án khác, bệnh có thành phần dễ viêm có thể là bệnh về da, chẳng hạn như bệnh vẩy nến, mụn trứng cá, hoặc chứng viêm da lạc chỗ. Việc sử dụng RTA 408, các chất đa hình của nó, và các dược phẩm trong các phương pháp điều trị các bệnh về da như thế có thể là nhưng không giới hạn ở, ví dụ như, việc sử dụng cục bộ hoặc qua đường miệng.

Theo các phương án khác, bệnh có thành phần dễ viêm có thể là hội chứng chuyển hoá (hội chứng X). Người bệnh có hội chứng này có đặc điểm là có ba hoặc nhiều hơn các triệu chứng được lựa chọn từ nhóm năm triệu chứng sau: (1) chứng béo phì ở bụng; (2) tăng triglycerit huyết; (3) hàm lượng lipoprotein cholesterol mật độ cao thấp (HDL); (4) bệnh cao huyết áp; và (5) glucoza lúc bụng đói cao, mà có thể là trong phạm vi mang đặc điểm của bệnh đái tháo đường týp 2 nếu người bệnh cũng bị bệnh đái tháo đường. Mỗi trong số các triệu chứng này được định nghĩa trong Báo cáo Thứ ba của Hội đồng Chuyên gia Chương trình Giáo dục về Cholesterol Quy mô Quốc gia liên quan đến việc Phát hiện, Đánh giá và Điều trị Cholesterol Máu Cao ở Người trưởng thành (Hội đồng Điều trị cho Người trưởng thành III, hoặc ATP III), các Viện Y tế Quốc gia, 2001, Công bố NIH số 01-3670, được đưa vào đây để tham chiếu. Người bệnh mắc hội chứng chuyển hoá, bất kể là họ có hoặc phát triển bệnh đái tháo đường chính thức, có rủi ro tăng lên trong việc phát triển các biến chứng mạch máu lớn và mạch máu nhỏ được liệt kê trên đây xảy ra với bệnh đái tháo đường týp 2, chẳng hạn như chứng xơ vữa động mạch và bệnh tim hình vành.

Một phương pháp chung khác được mô tả là phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tim mạch ở một chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể một lượng hiệu quả về mặt dược của hợp chất theo sáng chế này. Theo một số phương án, bệnh tim mạch có

thể là nhưng không giới hạn ở, ví dụ như, chứng xơ vữa động mạch, bệnh cơ tim, bệnh tim bẩm sinh, suy tim xung huyết, viêm cơ tim, bệnh tim thấp khớp, bệnh van tim, bệnh động mạch vành, viêm màng trong tim, hoặc nhồi máu cơ tim. Liệu pháp kết hợp cũng được dự liệu cho các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tim mạch ở một chủ thể. Ví dụ như, các phương pháp này có thể bao gồm việc sử dụng một lượng hiệu quả về mặt dược một hoặc nhiều thuốc tim mạch. Thuốc tim mạch có thể là nhưng không giới hạn ở, ví dụ như, thuốc làm giảm cholesterol, thuốc chống mỡ máu cao, thuốc ngăn chặn kênh canxi, thuốc chống tăng huyết áp, hoặc chất ức chế reductaza HMG-CoA. Theo một số phương án, các ví dụ không giới hạn về thuốc tim mạch gồm amlodipin, aspirin, ezetimibe, felodipin, laxitipin, lercanidipin, nicardipin, nifedipin, nimodipin, nisoldipin hoặc nitrendipin. Theo các phương án khác, các ví dụ không giới hạn khác về thuốc tim mạch gồm atenolol, bucindolol, carvedilol, clonidin, doxazosin, indoramin, labetalol, metyldopa, metoprolol, nadolol, oxprenolol, phenoxybenzamin, phentolamin, pindolol, prazosin, propranolol, terazosin, timolol hoặc tolazoline. Theo các phương án khác, thuốc tim mạch có thể là, ví dụ như, statin, chẳng hạn như atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin hoặc simvastatin.

Các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa thần kinh ở một chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể một lượng hiệu quả về mặt dược của hợp chất theo sáng chế này cũng được dự liệu. Theo một số phương án, bệnh thoái hóa thần kinh có thể được chọn, ví dụ như, từ nhóm gồm có bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, bệnh đa xơ cứng (MS), bệnh Huntington và bệnh xơ cứng cột bên teo cơ. Ở các phương án cụ thể, bệnh thoái hóa thần kinh là bệnh Alzheimer. Ở các phương án cụ thể, bệnh thoái hóa thần kinh là MS, chẳng hạn như MS tiến triển nguyên phát, tiến triển thứ phát tái đi tái lại hoặc tái phát tiến triển. Theo một số phương án, chủ thể có thể là, ví dụ như, động vật linh trưởng. Theo một số phương án, chủ thể có thể là người.

Theo bản mô tả, các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa thần kinh ở một chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể một lượng hiệu quả về mặt dược của hợp chất theo sáng chế này, việc điều trị ngăn chặn sự mất myelin của các neuron tế bào thần kinh ở não hoặc dây cột sống của chủ thể. Theo bản mô tả, việc điều trị ngăn chặn sự mất myelin để viêm. Theo bản mô tả, việc điều trị ngăn chặn mất cắt ngang của các sợi trục neuron tế bào thần kinh ở não hoặc dây cột sống của chủ thể. Theo bản

mô tả, việc điều trị ngăn chặn mặt cắt ngang của các sợi trục ở não hoặc dây cột sống của chủ thể. Theo bản mô tả, việc điều trị ngăn chặn cơ chế gây chết neuron tế bào thần kinh ở não hoặc dây cột sống của chủ thể. Theo bản mô tả, việc điều trị kích thích sự tái myelin hóa các sợi trục neuron tế bào thần kinh ở não hoặc dây cột sống của chủ thể. Theo bản mô tả, việc điều trị thu hồi chức năng bị mất sau cơn bệnh MS. Theo bản mô tả, việc điều trị phòng ngừa cơn bệnh MS mới. Theo bản mô tả, việc điều trị phòng ngừa sự ốm yếu tàn tật do cơn bệnh MS.

Bản mô tả bộc lộ phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn chức năng đặc trưng bởi sự biểu hiện quá mức các gen iNOS ở một chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể một lượng hiệu quả về mặt dược RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, hoặc được phẩm theo sáng chế này.

Bản mô tả bộc lộ phương pháp ức chế việc tạo ra oxit nitric bởi IFN- γ trong các tế bào của chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể này một lượng hiệu quả về mặt dược của RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, hoặc được phẩm theo sáng chế này.

Tuy nhiên, bản mô tả bộc lộ phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn chức năng đặc trưng bởi sự biểu hiện quá mức các gen COX-2 ở một chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể một lượng hiệu quả về mặt dược của RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, hoặc được phẩm theo sáng chế này.

Các phương pháp điều trị bệnh thận/cật (RKD) ở một chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể một lượng hiệu quả về mặt dược hợp chất theo sáng chế này cũng được dự liệu. Xem Patent Mỹ 8,129,429 được đưa vào đây để tham chiếu. RKD có thể là bất nguồn từ, ví dụ như, thương tổn nhiễm độc. Thương tổn nhiễm độc có thể là do, nhưng không giới hạn ở, ví dụ như, tác nhân tạo ảnh hoặc thuốc. Thuốc này có thể là hóa học trị liệu, ví dụ như. RKD có thể là do chứng thiếu máu cục bộ/thương tổn tái thông máu, theo các phương án nhất định. Theo các phương án nhất định, RKD các kết quả từ bệnh đái tháo đường hoặc chứng tăng huyết áp. Theo một số phương án, RKD có thể là do bệnh tự miễn dịch. RKD còn có thể được định nghĩa là RKD mãn tính hoặc RKD cấp tính.

Trong các phương pháp cụ thể điều trị bệnh thận/cật (RKD) ở một chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể một lượng hiệu quả về mặt dược hợp chất theo sáng chế này, chủ thể đã hoặc đang trải qua sự thâm tách. Theo các phương án nhất định, chủ thể đã trải qua hoặc là ứng viên trải qua ghép thận. Chủ thể có thể là động vật linh trưởng. Động

vật linh trưởng có thể là người. Chủ thể trong phương pháp này hoặc bất kỳ phương pháp nào khác có thể là, ví dụ như, bò, ngựa, chó, mèo, lợn, chuột nhắt, chuột cống hoặc chuột lang.

Bản mô tả bộc lộ phương pháp cải thiện tốc độ lọc tiểu cầu hoặc thanh thải creatinin ở một chủ thể, bao gồm việc cho chủ thể một lượng hiệu quả về mặt dược RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, hoặc dược phẩm theo sáng chế này.

Theo một số phương án, dược phẩm được sử dụng dưới dạng một liều đơn lẻ mỗi ngày. Theo các phương án khác, dược phẩm được sử dụng dưới dạng nhiều hơn một liều mỗi ngày. Theo một số phương án, dược phẩm được sử dụng với một lượng hiệu quả về mặt dược.

Theo một số phương án, liều lượng là từ khoảng 1 mg/kg đến khoảng 2000 mg/kg. Theo các phương án khác, liều lượng là từ khoảng 3 mg/kg đến khoảng 100 mg/kg. Theo các phương án khác, liều lượng là khoảng 3, 10, 30, hoặc 100 mg/kg.

Theo các phương án khác, dược phẩm được sử dụng tại chỗ. Theo một số phương án, việc sử dụng tại chỗ được sử dụng cho da. Theo các phương án khác, việc sử dụng tại chỗ được sử dụng cho mắt.

Theo các phương án khác, dược phẩm được sử dụng qua đường miệng. Theo các phương án khác, dược phẩm được sử dụng cho mắt.

Các mục đích, đặc tính và ưu điểm khác của sáng chế này sẽ trở nên rõ ràng hơn thông qua phần mô tả chi tiết dưới đây. Tuy nhiên, nên hiểu rằng phần mô tả chi tiết và các ví dụ cụ thể, trong khi biểu thị các phương án cụ thể của sáng chế, được đưa ra chỉ để minh họa, do những thay đổi và cải biến khác nhau trong phạm vi và tinh thần của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật thông qua phần mô tả chi tiết này. Lưu ý rằng việc chỉ vì một hợp chất cụ thể được gán cho một công thức chung cụ thể không có nghĩa là nó cũng không thể thuộc về một công thức chung khác.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ dưới đây tạo thành một phần của bản mô tả này và được đưa vào để thể hiện rõ thêm các khía cạnh nhất định của sáng chế này. Có thể thấy trong các hình vẽ một hoặc nhiều từ tiếng Đức gồm “Masseänderung” và “temperatur”, tương ứng có nghĩa là “thay đổi về khối lượng” và “nhiệt độ”. Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn nhờ

một trong số các hình vẽ này kết hợp với phần mô tả chi tiết các phương án cụ thể được trình bày ở đây.

FIG.1 thể hiện tác động của RTA 408 đến việc tạo thành nitơ oxit gây cảm ứng bởi IFN γ -và khả năng sống được của tế bào trong các tế bào RAW264.7.

FIG.2a & b thể hiện tác động của RTA 408 đến sự hoạt hóa của yếu tố phản ứng chống oxy hóa (ARE): (a) hoạt tính luciferaza NQO1-ARE; (b) hoạt tính luciferaza GSTA2-ARE.

FIG.3a-f thể hiện mức độ tăng Nrf2 GST ARE tương đối sau khi điều trị tế bào bằng (a) RTA 402; (b) 63415 (RTA 408); (c) 63170; (d) 63171; (e) 63179; và (f) 63189. Các biểu đồ cũng thể hiện khả năng sống được của các tế bào như được phân tích sử dụng thuốc thử làm gia tăng tế bào WST1 và đo khả năng hút sau 1 giờ. Tất cả các thuốc được dùng trong DMSO và các tế bào phát triển ở mức 10,000 tế bào/giếng trong các đĩa 384 giếng trong glucoza ít DMEM được bổ sung 10% FBS, 1% Penixilin Streptomycin, và 0,8 mg/mL Genetixin.

FIG.4a–d thể hiện tác động của RTA 408 đến biểu hiện gen đích Nrf2 trong các nguyên bào sợi phổi HFL1. (a) NQO1; (b) HMOX1; (c) GCLM; (d) TXNRD1.

FIG.5a–d thể hiện tác động của RTA 408 đến biểu hiện gen đích Nrf2 trong các tế bào biểu mô cuống phổi BEAS-2B. (a) NQO1; (b) HMOX1; (c) GCLM; (d) TXNRD1.

FIG.6a & b thể hiện tác động của RTA 408 đến các mức protein đích Nrf2. (a) các tế bào SH-SY5Y; (b) các tế bào BV2.

FIG.7 thể hiện tác động của RTA 408 đến hoạt tính enzym NQO1 trong các tế bào RAW264.7.

FIG.8 thể hiện tác động của RTA 408 đến tổng các mức glutathion trong dòng tế bào gan AML-12.

FIG.9 thể hiện tác động của RTA 408 đến khả năng hút WST-1 với vai trò là chất đánh dấu của NADPH.

FIG.10a–d thể hiện tác động của RTA 408 đến biểu hiện của các gen liên quan đến tổng hợp NADPH. (a) H6PD; (b) PGD; (c) TKT; (d) ME1.

FIG.11a &b thể hiện (a) tác động của RTA 408 đến hoạt hóa do TNF- α của chất chỉ thị enzym luciferaza NF- κ B trong dòng tế bào NIH3T3 ở chuột nhắt với khả năng sống được của WST1 và khả năng sống được của WST1/2 xếp chồng. (b) hoạt hóa do TNF- α của một chất chỉ thị enzym luciferaza NF- κ B trong dòng tế bào NIH3T3 ở chuột nhắt. Đồ thị thể hiện sự thay đổi mức độ tăng tương đối dưới dạng hàm số của thay đổi logarit về hàm lượng của RTA 408.

FIG.12 thể hiện tác động của RTA 408 đối với sự hoạt hóa do TNF- α của một cấu trúc chất chỉ thị enzym luciferaza NF- κ B.

FIG.13a &b thể hiện (a) tác động của RTA 408 đối với sự hoạt hóa do TNF- α của một chất chỉ thị enzym luciferaza NF- κ B ở dòng tế bào A549 của người với khả năng sống được của WST1 và khả năng sống được của WST1/2 xếp chồng; (b) sự hoạt hóa do TNF- α của một chất chỉ thị enzym luciferaza NF- κ B ở dòng tế bào A549 của người. Đồ thị thể hiện sự thay đổi mức độ tăng tương đối dưới dạng hàm số của thay đổi logarit về hàm lượng của RTA 408.

FIG.14 thể hiện tác động của RTA 408 đến sự phosphoryl hóa I κ B α do TNF- α .

FIG.15a-d thể hiện tác động của RTA 408 đến biểu hiện gen transaminaza: (a) ALT1 (GPT1); (b) ALT2 (GPT2); (c) AST1 (GOT1); (d) AST1 (GOT2). Các dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với nhóm đối chứng (*P < 0,05; **P < 0,01).

FIG.16 thể hiện tác động của RTA 408 đến các mức pyruvat trong các tế bào cơ được nuôi cấy (*P < 0,05).

FIG.17 thể hiện tác động của 63415 trong một mẫu chứng viêm gián tiếp thông qua LPS ở phổi (% thay đổi ở các xytokin gây viêm tương ứng với sự điều trị LPS). Hợp chất 63415 được sử dụng QD $\times$ 3 tại thời gian 0, 24, và 48 giờ, sau đó là LPS một giờ sau liều 63415 cuối cùng ở chuột nhắt BALB/c cái. Các con vật bị giết 20 giờ sau khi sử dụng LPS. BALF được kiểm tra để xem biểu hiện xytokin gây viêm. Hợp chất

63415 làm giảm các xytokin gây viêm theo cách phụ thuộc vào liều lượng, với mức giảm tối đa là từ 50%-80% ở TNF- α , IL-6, và IL-12.

FIG.18a & b thể hiện tác động của RTA 408 đến chứng viêm phổi do LPS ở chuột nhắt. (a) các xytokin viêm; (b) các đích Nrf2. RTA 408 được sử dụng cho chuột nhắt BALB/c cái (n = 10) QD $\times$ 6 ở thời gian 0, 24, 48, 72, 96, và 120 giờ, sau đó là LPS ở thời gian 121 giờ với các con vật bị giết ở thời gian 141 giờ. Biểu hiện protein xytokin gây viêm được phân tích ở BALF. Các chất đánh dấu sinh học Nrf2 được phân tích ở phổi. Các dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với nhóm đối chứng nước muối (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

FIG.19a & b thể hiện tác động của 63415 đến sự thâm nhiễm BALF ở chứng viêm phổi do bleomycin: (a) tế bào lỏng BAL đếm được; (b) trọng lượng cơ thể. Hợp chất 63415 được sử dụng QD $\times$ 39 vào các ngày -10 đến 28 ở chuột nhắt C57BL/6. Bleomycin được đưa vào ngày 0. Trọng lượng hàng ngày được đo. Số tế bào BALF đếm được khi giết chuột nhắt. Sự giảm thâm nhiễm dễ gây viêm đáng kể được quan sát thấy. Không có sự cải thiện đáng kể nào ở điểm chứng viêm mãn tính, xơ hóa mô kẽ, hoặc số lượng ổ bệnh xơ hóa được quan sát thấy.

FIG.20a & b thể hiện tác động của RTA 408 đến xơ hoá phổi do bleomycin ở chuột cống: (a) PMN; (b) Hydroxyprolin. Các dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với nhóm đối chứng bleomycin (*P < 0,05).

FIG.21 thể hiện tác động của RTA 408 đến các enzym đích Nrf2 ở phổi từ chuột cống bị xơ hoá phổi do bleomycin. Các dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với nhóm đối chứng nước muối (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

FIG.22a–e thể hiện tác động của RTA 408 đến COPD do khói thuốc lá ở chuột nhắt. (a) KC; (b) IL-6; (c) TNF- α ; (d) IFN- γ ; (e) RANTES. RTA 408 (63415) được thử nghiệm với các mức liều lượng là 3 mg/kg (thấp), 10 mg/kg (trung bình), và 30 mg/kg (cao). Một dạng tương tự AIM (63355) được thử nghiệm trong cùng nghiên cứu để so sánh. Các dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với nhóm đối chứng CS.

FIG.23 thể hiện tác động của RTA 408 đến các enzym đích Nrf2 ở phổi từ chuột nhắt bị COPD do khói thuốc lá. Các dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với nhóm đối chứng nước muối (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001). Các dấu chữ thập thể hiện sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với chuột nhắt phơi nhiễm khói thuốc và được sử dụng chất dẫn thuốc (*P < 0,05).

FIG.24a–d thể hiện các tác động của 63415 (RTA 408) đến trọng lượng cơ thể ở mẫu chuột nhắt BALB/c bị nhiễm trùng. LPS được sử dụng cho tất cả các con vật vào ngày 0. (a) Trọng lượng cơ thể: 63415 (RTA 408); (b) Trọng lượng cơ thể: RTA 405; (c) LPS toàn thân: % Sống sót: 63415 (RTA 408); (d) LPS toàn thân: % Sống sót: RTA 405. Cả RTA 405 và 63415 (RTA 408) được sử dụng QD×5 vào các ngày -2 đến 2. Hợp chất 63415 (RTA 408) cải thiện sự sống sót. Trọng lượng cơ thể dưới dạng hàm thời gian ở chuột nhắt BALB/c được điều trị bằng 63415 đóng vai trò là mẫu nhiễm trùng.

FIG.25 thể hiện tác động của 63415 trong một mẫu viêm niêm mạc miệng do bức xạ. RTA 405 hoặc 63415 (RTA 408) được sử dụng BID×20 vào các ngày -5 đến -1 và ngày 1 đến 15 cho Chuột Vàng Xy-ri đực. Chiếu bức xạ diễn ra vào ngày 0. Các điểm viêm niêm mạc là từ 0 đến 5 dựa trên các biểu hiện lâm sàng (0: hoàn toàn khỏe mạnh; 1-2: nhẹ cho đến ban đỏ nghiêm trọng; 3-5: các mức độ loét khác nhau). 63415 đã cải thiện viêm niêm mạc ở mức 30 mg/kg và 100 mg/kg với sự giảm loét lên đến 36%.

FIG.26 thể hiện tác động của 63415 đến cảm ứng gen đích Nrf2 trong nghiên cứu độc tính ở chuột nhắt trong 14 ngày ở chuột nhắt C57BL/6. Các mRNA của các gen đích Nrf2 được đánh giá ở gan ở chuột nhắt được điều trị PO QD×14. Sự tăng đáng kể trong biểu hiện mRNA cho nhiều gen đích Nrf2 được quan sát thấy và phù hợp với phơi nhiễm mô.

FIG.27a & b thể hiện tác động của 63415 đến cảm ứng gen đích Nrf2 ở gan chuột cống: (a) Các gen đích; (b) Các nhân tố điều hòa âm tính. Các mRNA của các gen đích Nrf2 được đánh giá ở gan của chuột cống được điều trị PO QD×14.

FIG.28a & b thể hiện tác động của 63415 đến các gen đích Nrf2 ở mô của khỉ: (a) Gan; (b) Phổi. Các mRNA của các gen đích Nrf2 được đánh giá ở khỉ được điều trị PO QD×14 sử dụng công nghệ Panomics QuantiGene® 2.0 Plex.

FIG.29a & b thể hiện tác động của 63415 đến hoạt tính enzym đích Nrf2 ở gan chuột nhắt: (a) hoạt tính NQO1; (b) hoạt tính GST. Hoạt tính enzym đích Nrf2 được đánh giá ở gan ở chuột nhắt được điều trị PO QD×14. Các hoạt tính enzym NQO1 và GST được cảm ứng theo cách phụ thuộc vào liều lượng.

FIG.30a & b thể hiện tác động của 63415 đến hoạt tính enzym đích Nrf2 ở gan chuột cống: (a) hoạt tính NQO1; (b) hoạt tính GST. Hoạt tính enzym đích Nrf2 được đánh giá ở gan chuột cống được điều trị PO QD×14. Các hoạt tính enzym NQO1 và GST được cảm ứng theo cách phụ thuộc vào liều lượng.

FIG.31a & b thể hiện các tác động của 63415 đến cảm ứng hoạt tính enzym đích Nrf2 ở các mô khác nhau của khỉ cynomolgus: (a) hoạt tính NQO1; (b) hoạt tính GSR.

FIG.32a & b thể hiện nồng độ RTA 408 ở gan, phổi và não chuột nhắt, và hoạt tính NQO1 ở gan chuột nhắt sau 14 ngày sử dụng qua đường miệng hàng ngày. (a) Sự phân phối mô của RTA 408 ở chuột nhắt sau 14 ngày sử dụng qua đường miệng hàng ngày. Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SD của các nồng độ RTA 408 ở mô được thu thập 4 giờ sau liều cuối cùng của cuộc nghiên cứu. Các con số phía trên các cột báo lỗi thể hiện giá trị trung bình. (b) Sự tương quan của hàm lượng RTA 408 trong gan chuột nhắt với hoạt tính enzym NQO1. Hàm lượng RTA 408 trong gan chuột nhắt riêng lẻ được vẽ so với hoạt tính enzym riêng lẻ theo báo cáo này.

FIG.33a & b thể hiện nồng độ RTA 408 trong huyết tương, gan, phổi, và não chuột cống, và hoạt tính NQO1 ở gan chuột cống sau 14 ngày sử dụng qua đường miệng hàng ngày. (a) Sự phân phối mô của RTA 408 ở chuột cống sau 14 ngày sử dụng qua đường miệng hàng ngày. Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SD của các nồng độ RTA 408 ở mô được thu thập 4 giờ sau liều cuối cùng của cuộc nghiên cứu. Các số phía trên các thanh báo lỗi thể hiện giá trị trung bình. *Hai giá trị được loại trừ khỏi số liệu tính toán giá trị trung bình do là các giá trị ngoại lệ, được định nghĩa là các giá trị khiến cho tập hợp dữ liệu làm hỏng thử nghiệm chuẩn tắc Shapiro-

Wilk. (b) Sự tương quan của hàm lượng RTA 408 gan chuột cống với hoạt tính enzym NQO1. Hàm lượng RTA 408 gan chuột cống riêng lẻ được vẽ so với hoạt tính enzym riêng lẻ theo báo cáo này. Các mô từ nhóm liều lượng 100 mg/kg RTA 408 được thu thập vào ngày 6, và các độc tính được quan sát trong nhóm này loại trừ các đánh giá NQO1 enzym hoạt tính của gan.

FIG.34a & b thể hiện tác động của việc xử lý 63415 đến sự hoạt hóa Nrf2 ở PBMC của khi: (a) PBMC NQO1 so với Nồng độ Huyết tương; (b) NQO1 ở phổi so với PBMC NQO1.

FIG.35 thể hiện tóm lược nghiên cứu độc tính ở khi trong nghiên cứu độc tính ở khi kéo dài 14 ngày sử dụng hợp chất 63415. Tất cả các liều lượng uống được tốt mà không có các dấu hiệu lâm sàng bất lợi. Dữ liệu hóa học lâm sàng không cho thấy độc tính rõ ràng nào.

FIG.36 thể hiện tác động của thời gian định liều đến nồng độ huyết tương của RTA 408 sau khi sử dụng cục bộ qua miệng và mắt. Nồng độ huyết tương của RTA 408 cũng được đo sau 5 ngày sử dụng cục bộ qua mắt hàng ngày RTA 408 và được xác định là vẫn khá phù hợp với các giá trị đo có được sau ngày đầu tiên.

FIG.37a & b thể hiện sự tương quan của việc phơi nhiễm RTA 408 ở huyết tương khi với mRNA biểu hiện NQO1 và SRXN1 ở các PBMC: (a) NQO1; (b) SRXN1.

FIG.38 thể hiện nồng độ RTA 408 ở các mô hoặc chất lỏng khác nhau trong mắt dưới dạng hàm thời gian sau 5 ngày định liều cục bộ cho mắt. Nồng độ RTA 408 trong huyết tương cũng được đo sau khi sử dụng cục bộ qua mắt.

FIG.39 thể hiện tác động của RTA 408 đến tỷ lệ mắc chứng viêm da cấp độ 3 gây ra bởi phơi nhiễm bức xạ cấp tính với các nồng độ khác nhau của RTA 408 được sử dụng cục bộ.

FIG.40 thể hiện tác động của RTA 408 đến tỷ lệ mắc chứng viêm da cấp độ 2 gây ra bởi phơi nhiễm bức xạ cấp tính trong thời gian điều trị là 30 ngày với các nồng độ khác nhau của RTA 408 được sử dụng tại chỗ.

FIG.41 thể hiện tác động của RTA 408 đến tỷ lệ mắc mới chứng viêm da cấp độ 2 gây ra bởi phơi nhiễm bức xạ cấp tính trong thời gian điều trị là 28 ngày với các nồng độ khác nhau của RTA 408 được sử dụng qua đường miệng.

FIG.42a & b thể hiện (a) khu vực phía dưới phần phân tích đường cong điểm lâm sàng của chứng viêm da dưới dạng hàm thời gian cho mỗi trong số các nhóm đối chứng khác nhau gồm tất cả các con vật được sử dụng trong cuộc thử nghiệm; (b) khu vực phía dưới phần phân tích đường cong điểm lâm sàng của chứng viêm da dưới dạng hàm thời khoảng của điểm đó cho mỗi trong số các nhóm đối chứng khác nhau chỉ gồm các con vật đã hoàn thành toàn bộ 30 ngày trong thử nghiệm.

FIG.43 thể hiện điểm mù thứ nhất trung bình của chứng viêm da do bức xạ cấp tính dưới dạng hàm thời gian chỉ cho chất dẫn thuốc không được xử lý, không được xử lý mà không phơi nhiễm bức xạ, và ba lượng RTA 408 cho qua đường miệng ở mức 3, 10, và 30 mg/kg. Điểm chứng viêm da dựa trên thang điểm mà 0 là hoàn toàn khỏe mạnh, 1-2 thể hiện dấu hiệu ban đỏ nhẹ cho đến vừa phải với biểu hiện tróc vảy ở mức thấp nhất cho đến nhẹ, 3-4 thể hiện dấu hiệu ban đỏ vừa phải cho đến nghiêm trọng và biểu hiện tróc vảy, và 5 thể hiện sự loét thực sự.

FIG.44 thể hiện điểm trung bình của chứng viêm da do bức xạ cấp tính dưới dạng hàm thời gian chỉ với chất dẫn thuốc không được xử lý, không được xử lý mà không phơi nhiễm bức xạ, và ba lượng RTA 408 cho qua đường miệng ở mức 3, 10, và 30 mg/kg được đo cứ hai ngày một lần từ ngày 4 đến ngày 30. Điểm chứng viêm da dựa trên thang điểm mà 0 là hoàn toàn khỏe mạnh, 1-2 thể hiện dấu hiệu ban đỏ nhẹ cho đến vừa phải với biểu hiện tróc vảy ở mức thấp nhất cho đến nhẹ, 3-4 thể hiện dấu hiệu ban đỏ vừa phải cho đến nghiêm trọng và biểu hiện tróc vảy, và 5 thể hiện sự loét thực sự.

FIG.45 thể hiện điểm trung bình của chứng viêm da do bức xạ cấp tính dưới dạng hàm thời gian chỉ với chất dẫn thuốc không được xử lý, không được xử lý mà không phơi nhiễm bức xạ, và ba lượng RTA 408 sử dụng cục bộ ở mức 0,01%, 0,1%, và 1% được đo cứ hai ngày một lần từ ngày 4 đến ngày 30. Điểm chứng viêm da dựa trên thang điểm mà 0 là hoàn toàn khỏe mạnh, 1-2 thể hiện dấu hiệu ban đỏ nhẹ cho đến vừa phải với biểu hiện tróc vảy ở mức thấp nhất cho đến nhẹ, 3-4 thể hiện dấu

hiệu ban đỏ vừa phải cho đến nghiêm trọng và biểu hiện tróc vảy, và 5 thể hiện sự loét thực sự.

FIG.46 thể hiện các điểm lâm sàng của chứng viêm da do bức xạ phân đoạn được vẽ so với và những thay đổi ở điểm chứng viêm da cho mỗi nhóm thử nghiệm. Điểm chứng viêm da dựa trên thang điểm mà 0 là hoàn toàn khoẻ mạnh, 1-2 thể hiện dấu hiệu ban đỏ nhẹ cho đến vừa phải với biểu hiện tróc vảy ở mức thấp nhất cho đến nhẹ, 3-4 thể hiện dấu hiệu ban đỏ vừa phải cho đến nghiêm trọng và biểu hiện tróc vảy, và 5 thể hiện sự loét thực sự.

FIG.47 là biểu đồ phân tích AUC thể hiện điểm chứng viêm da (sự nghiêm trọng $\times$ ngày) cho mỗi trong số các nhóm thử nghiệm qua toàn bộ thời kỳ quan sát. Các điểm chứng viêm được đánh giá hai ngày một lần từ ngày 4 đến ngày 30 của cuộc nghiên cứu.

FIG.48a & FIG.48b là (a) biểu đồ khả năng hút ở 595 nm cho dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt được điều trị LNCaP thể hiện tác động độc hại tế bào tương đối trên các tế bào được điều trị bằng tác nhân hóa học trị liệu và RTA 408 so với chỉ riêng RTA 408; (b) biểu đồ khả năng hút ở 595 nm cho dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt được điều trị DU-145 thể hiện tác động độc hại tế bào tương đối trên các tế bào được điều trị bằng tác nhân hóa học trị liệu và RTA 408 so với chỉ riêng RTA 408.

FIG.49 là các bản đen trắng của các ảnh màu của chuột nhắt được chiếu chụp thể hiện hoạt tính luciferaza của các khối u cho ba con chuột nhắt: một con vật đối chứng không được điều trị, một con vật chỉ chịu bức xạ ion hóa (liều đơn lẻ, 18 Gy), và một con vật chịu bức xạ ion hóa (liều đơn lẻ, 18 Gy, ngày 0) và RTA 408 (17,5 mg/kg trong màng bụng, một lần hàng ngày vào các ngày -3 đến -1, sau đó là các liều đơn lẻ vào các ngày 1, 3, và 5). Các màu được biểu thị bởi các mũi tên thể hiện cường độ, trong đó các cường độ được thể hiện bằng màu đỏ, vàng, xanh lục, và xanh lơ theo thứ tự từ cường độ cao nhất đến cường độ thấp nhất.

FIG.50 thể hiện sự giảm các nồng độ protein thể dịch nước cho các chế phẩm khác nhau của RTA 408 (các cột sẫm) so với các giá trị theo tài liệu cho MaxiDex® (0.1% dexamethason) và mapracorat (các cột sáng) sau khi tiến hành chọc hút.

FIG.51 thể hiện việc ngăn chặn NO in vivo phụ thuộc vào liều lượng bằng 63415. Chuột nhắt CD-1 ($n = 6$) được cho uống DMSO hoặc AIM theo liều bằng cách nhồi ống qua miệng. LPS (5 mg/kg) được sử dụng 24 giờ sau đó. 24 giờ sau khi cho LPS, toàn bộ máu được thu thập cho phân tích NO. Ức chế NO được xác định bởi Phản ứng Griess từ huyết tương khử protein giảm đi.

FIG.52 thể hiện sự phân phối rộng rãi 63415 (RTA 408) vào các mô chuột nhắt. Chuột nhắt được định liều PO QD $\times$ 3 với 25 mg/kg 63415 (RTA 408) hoặc 25 mg/kg RTA 405. Máu (huyết tương và toàn bộ máu) và các mô (não, gan, phổi, và thận) được thu thập 6 giờ sau liều cuối cùng. Việc phân tích bán định lượng hàm lượng thuốc được thực hiện. Các mức đáng kể được quan sát thấy ở CNS.

FIG.53 thể hiện sự cảm ứng NQO1 ở gan chuột nhắt, phổi, và thận bởi 63415. Chuột nhắt được định liều PO QD $\times$ 3 với 25 mg/kg. Các mô được thu thập 6 giờ sau liều cuối cùng, và sự phân tích hoạt tính NQO1 được thực hiện. Hoạt hóa có ý nghĩa của NQO1 được quan sát thấy trong nhiều mô.

FIG.54 thể hiện vấn đề nghiên cứu độc tính ở chuột nhắt kéo dài 14 ngày sử dụng hợp chất 63415. Chuột nhắt C57BL/6 được định liều PO QD $\times$ 14. Các điểm đầu nút bao gồm sự sống sót, trọng lượng, và hóa học lâm sàng. Tất cả các con vật sống sót đến ngày 14. Không có sự thay đổi đáng kể nào về trọng lượng xảy ra đối với nhóm chất dẫn thuốc, và không có dấu hiệu của độc tính ở bất kỳ liều lượng nào dựa trên hóa học lâm sàng.

FIG.55 thể hiện sự phân phối mô 63415 từ nghiên cứu độc tính ở chuột nhắt trong 14 ngày ở chuột nhắt C57BL/6. Các mẫu não, phổi, và gan được thu thập 4 giờ sau liều cuối cùng và được định lượng cho hàm lượng 63415 sử dụng phương pháp LC/MS/MS nhạy cảm. Các phơi nhiễm ở mức 10 và 100 mg/kg ở phổi vượt quá IC₅₀ in vitro cho cảm ứng NO tương ứng là 55 lần và 1138 lần. Phơi nhiễm ở mức 10 và 100 mg/kg trong não vượt quá IC₅₀ in vitro cho cảm ứng NO tương ứng là 29 lần và 541 lần.

FIG.56 thể hiện sự phân phối mô hợp chất 63415 ở chuột Sprague Dawley. Các mô được thu thập bốn giờ sau khi định liều lần cuối vào ngày 14 hoặc ngày 6 (100 mg/kg), được tách chiết, và được định lượng cho hàm lượng 63415 sử dụng phương

pháp LC/MS/MS nhạy cảm. Hợp chất 63415 phân phối chuẩn vào các mô đích. Các phơi nhiễm ở mức 10 mg/kg ở phổi và não vượt quá IC_{50} in vitro để ức chế NO tương ứng là 294 lần và 240 lần.

FIG.57 thể hiện sự phân phối mô đích hợp chất 63415 ở khỉ cynomolgus. Các mô được thu thập bốn giờ sau khi định liều lần cuối vào ngày 14. Hàm lượng hợp chất 63415 được tách chiết và được định lượng sử dụng phương pháp LC/MS/MS nhạy cảm.

FIG.58 thể hiện phổ FT-Raman ($3400-50\text{ cm}^{-1}$) của mẫu PP415-P1 tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1).

FIG.59 thể hiện mẫu hình PXRD ($1,5-55,5^\circ 2\theta$) của mẫu PP415-P1 tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1).

FIG.60 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR ($25-350^\circ\text{C}$) của mẫu PP415-P1 tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1).

FIG.61 thể hiện phổ $^1\text{H-NMR}$ ở DMSO- d_6 của mẫu PP415-P1 tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1).

FIG.62 thể hiện biểu đồ nhiệt DSC của mẫu PP415-P1 tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1).

FIG.63 thể hiện biểu đồ đẳng nhiệt DVS của mẫu PP415-P1 tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1).

FIG.64 thể hiện phổ FT-Raman của mẫu PP415-P1 tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1), sau khi kết quả đo DVS (trên đỉnh) không bị thay đổi so với nguyên liệu trước khi đo DVS (dưới đáy). Các phổ đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.65 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P1 tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1), sau khi kết quả đo DVS (trên đỉnh) không bị thay đổi so với tài liệu trước khi đo DVS (dưới đáy). Các mẫu hình đã không được chia theo tỷ lệ nhưng được dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.66 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P40 (trên đỉnh) tương ứng với mẫu hình của dạng solvat (Nhóm 2) (dưới đáy, mẫu PP415-P19). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.67 thể hiện các mẫu hình PXRD của các mẫu ổn định PP415-P2a (trên đỉnh), PP415-P3a (thứ 2 từ đỉnh), PP415-P4a (ở giữa), và PP415-P5a (thứ 2 từ dưới đáy) tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1), sau một tuần không cho thấy sự khác biệt nào so với nguyên liệu ban đầu ở điểm thời gian t_0 (dưới đáy, mẫu PP415-P1). Các mẫu hình không được chia tỷ lệ nhưng dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.68 thể hiện các mẫu hình PXRD của các mẫu ổn định PP415-P2b (trên đỉnh), PP415-P3b (thứ 2 từ đỉnh), PP415-P4b (ở giữa), và PP415-P5b (thứ 2 từ dưới đáy) tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1), sau khi hai tuần không cho thấy sự khác biệt nào so với nguyên liệu ban đầu ở điểm thời gian t_0 (dưới đáy, mẫu PP415-P1). Các mẫu hình không được chia tỷ lệ nhưng dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.69 thể hiện các mẫu hình PXRD của các mẫu ổn định PP415-P2c (trên đỉnh), PP415-P3c (thứ 2 từ đỉnh), PP415-P4c (ở giữa), và PP415-P5c (thứ 2 từ dưới đáy) tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1), sau khi bốn tuần không cho thấy sự khác biệt nào so với nguyên liệu ban đầu ở điểm thời gian t_0 (dưới đáy, mẫu PP415-P1). Các mẫu hình không được chia tỷ lệ nhưng dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.70 thể hiện các phổ FT-Raman ($2400-50\text{ cm}^{-1}$) của các mẫu của dạng solvat (Nhóm 2) (PP415-P7: đỉnh; PP415-P8: thứ 2 từ đỉnh; PP415-P9: thứ 3 từ đỉnh; PP415-P10: thứ 4 từ đỉnh; PP415-P11: ở giữa; PP415-P15: thứ 4 từ dưới đáy; PP415-P17: thứ 3 từ dưới đáy; PP415-P21: thứ 2 từ dưới đáy; PP415-P24: dưới đáy). Các phổ đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.71 thể hiện phổ FT-Raman ($1750-1000\text{ cm}^{-1}$) của dạng solvat (Nhóm 2) (PP415-P7: đỉnh) khác biệt một cách rõ ràng so với phổ của dạng vô định hình (Nhóm 1) (PP415-P1: dưới đáy). Các phổ đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.72 thể hiện các phổ FT-Raman ($1750-1000\text{ cm}^{-1}$) của nhóm 2 (mẫu PP415-P19: đỉnh), nhóm 3 (mẫu PP415-P6: thứ 2 từ đỉnh), nhóm 4 (mẫu PP415-P13: thứ 2 từ dưới đáy), và nhóm 5 (mẫu PP415-P14: dưới đáy) khác nhau đáng kể. Các phổ đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.73 thể hiện các mẫu hình PXRD ($2-32^\circ 2\theta$) của các mẫu của dạng solvat (Nhóm 2) (PP415-P7: đỉnh; PP415-P8: thứ 2 từ đỉnh; PP415-P10: thứ 3 từ đỉnh; PP415-P15: thứ 4 từ đỉnh; PP415-P17: ở giữa; PP415-P18: thứ 4 từ dưới đáy; PP415-P19: thứ 3 từ dưới đáy; PP415-P21: thứ 2 từ dưới đáy; PP415-P24: dưới đáy). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.74 thể hiện các mẫu hình PXRD ($11-21^\circ 2\theta$) của một số mẫu của dạng solvat (Nhóm 2) (PP415-P7: đỉnh; PP415-P8: thứ 2 từ đỉnh; PP415-P10: ở giữa; PP415-P21: thứ 2 từ dưới đáy; PP415-P24: dưới đáy). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.75 thể hiện các mẫu hình PXRD ($2-32^\circ 2\theta$) của nhóm 2 (mẫu PP415-P19: đỉnh), nhóm 3 (mẫu PP415-P6: thứ 2 từ đỉnh), nhóm 4 (mẫu PP415-P13: thứ 2 từ dưới đáy), và nhóm 5 (mẫu PP415-P14: dưới đáy) khác nhau rõ ràng. Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.76 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P7 tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.77 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P21 tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.78 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P24 tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.79 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P29 tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.80 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P47 tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.81 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P48 tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.82 thể hiện các phổ FT-Raman ($1800-700\text{ cm}^{-1}$) của dạng solvat (Nhóm 2) (dưới đáy, mẫu PP415-P7) và của dạng solvat khô (Nhóm 2) (đỉnh, mẫu PP415-P30) là tương tự và chỉ thể hiện những khác biệt nhỏ hầu như không phân biệt được trong biểu đồ. Các phổ được chia tỷ lệ vì mục đích so sánh.

FIG.83 thể hiện mẫu hình PXRD của dạng solvat khô (Nhóm 2), mẫu PP415-P30 (trên đỉnh) so với mẫu hình của dạng solvat (Nhóm 2), mẫu PP415-P7 (dưới đáy). Các mẫu hình không được chia tỷ lệ nhưng dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.84 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P30 được sấy khô tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.85 thể hiện phổ FT-Raman của mẫu PP415-P18 khô (hơi xám) giống với phổ của mẫu PP415-P15 gốc (xám sẫm) là tương tự và chỉ thể hiện những khác biệt nhỏ hầu như không phân biệt được trong biểu đồ. Các phổ đã được chia tỷ lệ vì mục đích so sánh.

FIG.86 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P18 khô (trên đỉnh) thể hiện những khác biệt nhỏ so với mẫu hình của mẫu PP415-P15 gốc (dưới đáy), cho dù có cả hai dạng solvat (Nhóm 2). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.87 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P18 tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.88 thể hiện phổ FT-Raman của mẫu PP415-P17 (trên đỉnh) gần giống với các phổ các mẫu PP415-P19 khô (ở giữa) và PP415-P32 (dưới đáy) và chỉ thể hiện những khác biệt nhỏ hầu như không phân biệt được trong biểu đồ. Các phổ đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.89 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P19 khô (ở giữa) khác với mẫu hình của mẫu PP415-P17 gốc (trên đỉnh) nhưng vẫn tương ứng với dạng nhóm 2.

Mẫu hình của mẫu được sấy khô thêm PP415-P32 (dưới đáy) thể hiện rộng hơn các đỉnh với tỷ lệ S/N thấp hơn. Nguyên liệu ít kết tinh hơn, nhưng vẫn tương ứng với dạng nhóm 2. Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.90 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu PP415-P19 tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.91 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu PP415-P32A tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.92 thể hiện phổ FT-Raman của mẫu PP415-P21 (trên đỉnh) giống với các phổ của các mẫu khô PP415-P28 (ở giữa) và PP415-P34 (dưới đáy). Các phổ đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.93 thể hiện các mẫu hình PXRD của các mẫu khô PP415-P28 (ở giữa) và PP415-P34 (dưới đáy) thể hiện các đỉnh rộng hơn với tỷ lệ S/N thấp hơn, biểu thị độ kết tinh thấp hơn của các mẫu so với mẫu hình của mẫu gốc PP415-P21 (trên đỉnh). Các mẫu hình hơi khác nhau nhưng vẫn tương ứng với dạng nhóm 2. Chúng đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.94 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu khô PP415-P28 tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.95 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu khô PP415-P34 tương ứng với một dạng solvat (Nhóm 2).

FIG.96 thể hiện các phổ FT-Raman ($2400-50\text{ cm}^{-1}$) của các mẫu của dạng solvat (Nhóm 3) (PP415-P6: đỉnh; PP415-P12: ở giữa; PP415-P20: dưới đáy). Các phổ đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.97 thể hiện các phổ FT-Raman ($1750-1000\text{ cm}^{-1}$) của các mẫu của dạng solvat (Nhóm 3) (PP415-P6: đỉnh; PP415-P12: thứ 2 từ đỉnh; PP415-P20: thứ 2 từ dưới đáy) rất tương tự nhau chỉ có những khác biệt nhỏ, ví dụ như, ở $\sim 1690\text{ cm}^{-1}$, nhưng khác nhau rõ ràng so với nhóm 1 (PP415-P1: dưới đáy). Các phổ đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.98 thể hiện các mẫu hình PXRD ($2-32^\circ 2\theta$) của các mẫu của dạng solvat (Nhóm 3) (PP415-P6: đỉnh; PP415-P12: ở giữa; PP415-P20: dưới đáy). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.99 thể hiện các mẫu hình PXRD ($13,5-18,5^\circ 2\theta$) của các mẫu của dạng solvat (Nhóm 3) (PP415-P6: đỉnh; PP415-P12: ở giữa; PP415-P20: dưới đáy) thể hiện những khác biệt nhỏ. Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.100 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu PP415-P6 tương ứng với dạng solvat (Nhóm 3).

FIG.101 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu PP415-P12 tương ứng với dạng solvat (Nhóm 3).

FIG.102 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của dạng solvat khô (Nhóm 3), mẫu PP415-P25.

FIG.103 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của dạng solvat được sấy khô thêm (Nhóm 3), mẫu PP415-P33.

FIG.104 thể hiện các phổ FT-Raman ($1800-700\text{ cm}^{-1}$) của dạng solvat (Nhóm 3) (đỉnh, mẫu PP415-P6), của dạng solvat khô (Nhóm 3) (giữa, mẫu PP415-P25), và của dạng solvat được sấy khô thêm (Nhóm 3) (dưới đáy, mẫu PP415-P33) giống nhau. Các phổ đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.105 thể hiện các mẫu hình PXRD ($4-24^\circ 2\theta$) của dạng solvat (Nhóm 3) (đỉnh, mẫu PP415-P6), của dạng solvat khô (Nhóm 3) (giữa, mẫu PP415-P25), và của dạng solvat được sấy khô thêm (Nhóm 3) (dưới đáy, mẫu PP415-P33). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.106 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu PP415-P13 tương ứng với một dạng solvat axetonitril (Nhóm 4).

FIG.107 thể hiện các phổ FT-Raman ($1800-700\text{ cm}^{-1}$) của dạng solvat axetonitril (Nhóm 4) (xám sẫm, mẫu PP415-P13) và của nguyên liệu được sấy khô của

một dạng solvat axetonitril (Nhóm 4) (hơi xám, mẫu PP415-P26) giống nhau và xếp chồng hoàn toàn. Các phổ đã được chia tỷ lệ cho các mục đích so sánh.

FIG.108 thể hiện mẫu hình PXRD của dạng solvat axetonitril khô (Nhóm 4), mẫu PP415-P26 (dưới đáy), so với mẫu tham chiếu của dạng solvat axetonitril (Nhóm 4), mẫu PP415-P13 (trên đỉnh). Các mẫu hình đã không được chia theo tỷ lệ nhưng được dịch chuyển theo hướng y cho các mục đích so sánh.

FIG.109 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của dạng solvat axetonitril khô (Nhóm 4), mẫu PP415-P26.

FIG.110 thể hiện các phổ FT-Raman ($1800-700\text{ cm}^{-1}$) của dạng solvat axetonitril (Nhóm 4) (đỉnh, mẫu PP415-P35), và của dạng solvat axetonitril khô (Nhóm 4) (giữa, mẫu PP415-P36 và dưới đáy, mẫu PP415-P37) tương ứng với nhau. Các phổ đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y cho các mục đích so sánh.

FIG.111 thể hiện các mẫu hình PXRD ($4-24^\circ 2\theta$) của dạng solvat axetonitril (Nhóm 4) (đỉnh, mẫu PP415-P35) và của dạng solvat axetonitril khô (Nhóm 4) (giữa, mẫu PP415-P36 và dưới đáy, mẫu PP415-P37) phù hợp với nhau. Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.112 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của dạng solvat axetonitril khô (Nhóm 4), mẫu PP415-P36.

FIG.113 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của dạng solvat axetonitril khô (Nhóm 4), mẫu PP415-P37.

FIG.114 thể hiện biểu đồ đẳng nhiệt DVS của dạng solvat axetonitril loại bỏ solvat (Nhóm 4) mẫu PP415-P37).

FIG.115 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P37, một dạng solvat axetonitril (Nhóm 4) sau khi đo DVS (dưới đáy) không bị thay đổi so với nguyên liệu trước khi đo DVS (trên đỉnh). Các mẫu hình đã không được chia theo tỷ lệ nhưng dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.116 thể hiện biểu đồ nhiệt DSC của dạng solvat axetonitril loại bỏ solvat (Nhóm 4) (mẫu PP415-P37).

FIG.117 thể hiện biểu đồ nhiệt DSC một hỗn hợp theo tỷ lệ ~1:1 của dạng vô định hình (Nhóm 1), mẫu PP415-P1, có dạng solvat axetronitril loại bỏ solvat (Nhóm 4), mẫu PP415-P36.

FIG.118 thể hiện biểu đồ nhiệt DSC một hỗn hợp theo tỷ lệ ~1:1 của dạng vô định hình (Nhóm 1), mẫu PP415-P1, với dạng solvat axetronitril loại bỏ solvat (Nhóm 4), mẫu PP415-P36 (số thí nghiệm: PP415-P39). Việc quét nhiệt (Bước 1) tạm ngừng trong 30 phút ở nhiệt độ 173°C (Bước 2) và sau đó bắt đầu lại (Bước 3).

FIG.119 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu PP415-P14 tương ứng với một dạng solvat THF (Nhóm 5).

FIG.120 thể hiện các phổ FT-Raman ($1800-1100\text{ cm}^{-1}$) của một dạng solvat THF (Nhóm 5) (đường đứt nét, mẫu PP415-P14), nguyên liệu được sấy khô của một dạng solvat THF (Nhóm 5) (đường chấm, mẫu PP415-P27), và của dạng vô định hình (Nhóm 1) (đường nét đậm, mẫu PP415-P1). Các phổ đã được chia tỷ lệ vì mục đích so sánh và cho thấy những thay đổi nhỏ trong độ lớn nhưng ít thay đổi tương ứng trong dạng phổ.

FIG.121 thể hiện mẫu hình PXRD của dạng solvat THF khô (Nhóm 5), mẫu PP415-P27 (trên đỉnh) so với mẫu hình của dạng solvat THF (Nhóm 5), mẫu PP415-P14 (dưới đáy). Các mẫu hình đã không được chia theo tỷ lệ nhưng dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.122 thể hiện nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu PP415-P27 tương ứng với một solvat THF khô (Nhóm 5).

FIG.123 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P41 (trên đỉnh) tương ứng với mẫu hình của dạng solvat THF (Nhóm 5) (giữa, mẫu PP415-P14) và không tương ứng với mẫu hình của dạng solvat heptan, (Nhóm 2) (dưới đáy, mẫu PP415-P19). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y cho các mục đích so sánh.

FIG.124 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P45 (trên đỉnh) tương ứng với mẫu hình của dạng solvat THF (Nhóm 5) (giữa, mẫu PP415-P14) và không tương ứng với mẫu hình của dạng solvat heptan (Nhóm 2) (dưới đáy, mẫu PP415-P19). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.125 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P41 (trên đỉnh) tương ứng với một dạng solvat THF (Nhóm 5). Sau khi sấy khô mẫu PP415-P41 trong 1 ngày (thứ 2 từ đỉnh, mẫu: PP415-P44), nguyên liệu chủ yếu là vô định hình. Vẫn còn một số đỉnh rộng với cường độ thấp. Sau khi tiếp tục sấy khô qua đêm (thứ 2 từ dưới đáy, mẫu PP415-P44a), cường độ của các đỉnh rộng này tiếp tục giảm đi. Dạng vô định hình (Nhóm 1) được thể hiện dưới dạng tham chiếu (dưới đáy, mẫu: PP415-P42). Các mẫu hình đã không được chia theo tỷ lệ nhưng dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.126 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P44a tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1).

FIG.127 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P45 (trên đỉnh) tương ứng với một dạng solvat THF (Nhóm 5). Sau khi sấy khô mẫu PP415-P45 trong 1 ngày (thứ 2 từ đỉnh, mẫu PP415-P46), nguyên liệu chủ yếu là vô định hình. Vẫn còn một số đỉnh rộng với cường độ thấp. Sau khi tổng 4 ngày sấy khô (thứ 2 từ dưới đáy, mẫu PP415-P46a), mẫu hình giữ nguyên không đổi. Dạng vô định hình (Nhóm 1) được thể hiện dưới dạng tham chiếu (dưới đáy, mẫu PP415-P42). Các mẫu hình đã không được chia theo tỷ lệ nhưng dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.128 thể hiện nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P46a tương ứng với dạng vô định hình (Nhóm 1).

FIG.129 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P42 (trên đỉnh) tương ứng với mẫu hình của dạng vô định hình (Nhóm 1) (dưới đáy, mẫu PP415-P1). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.130 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P43 (trên đỉnh) tương ứng với mẫu hình của dạng solvat đẳng cấu (Nhóm 2) (dưới đáy, mẫu PP415-P19) và không tương ứng với mẫu hình của dạng solvat THF (Nhóm 5) (giữa, mẫu PP415-P14). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.131 thể hiện các mẫu hình PXRD của các mẫu PP415-P47 (trên đỉnh) và PP415-P48 (ở giữa) cơ bản tương ứng với mẫu hình của các dạng solvat đẳng cấu

(Nhóm 2) (dưới đáy, mẫu PP415-P19), mặc dù có một số điểm khác biệt. Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

FIG.132 thể hiện mẫu hình PXRD của mẫu PP415-P49 (trên đỉnh) tương ứng với mẫu hình của dạng vô định hình (Nhóm 1) (dưới đáy, mẫu PP415-P1). Các mẫu hình đã được chia tỷ lệ và dịch chuyển theo hướng y vì mục đích so sánh.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế này đề xuất, trong một khía cạnh, hợp chất:

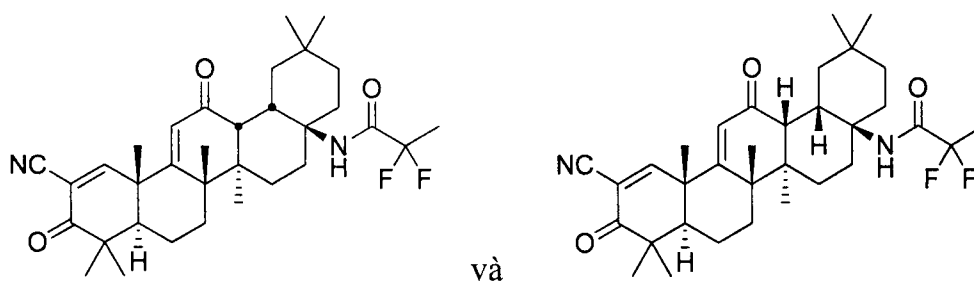
N-((4aS,6aR,6bS,8aR,12aS,14aR,14bS)-11-xyano-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptametyl-10,14-dioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-octadecahydropixen-4a-yl)-2,2-diflopropanamit,

mà ở đây cũng được gọi là RTA 408, 63415, hoặc PP415. Theo các khía cạnh không giới hạn khác, sáng chế này cũng đề xuất các hợp chất dạng đa hình nêu trên, gồm các solvat của chúng. Theo các khía cạnh không giới hạn khác, sáng chế cũng đề xuất các muối dược dụng của chúng. Theo các khía cạnh không giới hạn khác, sáng chế cũng đề xuất các phương pháp điều chế, các dược phẩm, và các bộ kit và các vật phẩm sản xuất bằng các hợp chất này và các hợp chất dạng đa hình của chúng.

I. Các định nghĩa

Khi được sử dụng trong ngữ cảnh của một nhóm hóa học: “hydro” nghĩa là $-H$; “hydroxy” nghĩa là $-OH$; “oxo” nghĩa là $=O$; “cacbonyl” nghĩa là $-C(=O)-$; “cacboxy” nghĩa là $-C(=O)OH$ (cũng được viết là $-COOH$ hoặc $-CO_2H$); “halogen” nghĩa độc lập là $-F$, $-Cl$, $-Br$ hoặc $-I$; “amino” nghĩa là $-NH_2$; “hydroxyamino” nghĩa là $-NHOH$; “nitro” nghĩa là $-NO_2$; “imino” nghĩa là $=NH$; “xyano” nghĩa là $-CN$; “isoxyanat” nghĩa là $-N=C=O$; “azido” nghĩa là $-N_3$; trong trường hợp hóa trị một “phosphat” nghĩa là $-OP(O)(OH)_2$ hoặc một dạng loại bỏ một proton của nó; trong trường hợp hóa trị hai, “phosphat” nghĩa là $-OP(O)(OH)O-$ hoặc một dạng loại bỏ một proton của nó; “mercapto” nghĩa là $-SH$; và “thio” nghĩa là $=S$; “sulfonyl” nghĩa là $-S(O)_2-$; và “sulfinyl” nghĩa là $-S(O)-$. Bất kỳ hóa trị không xác định nào trên một nguyên tử của một cấu trúc được thể hiện trong bản mô tả này ngầm thể hiện một nguyên tử hydro được liên kết với nguyên tử.

Trong ngữ cảnh của sáng chế này, các công thức:



thể hiện các cấu trúc giống nhau. Khi một dấu chấm được vẽ trên một nguyên tử cacbon, dấu chấm biểu thị rằng nguyên tử hydro được gắn vào nguyên tử cacbon đó đang đi ra khỏi mặt phẳng của trang giấy.

Việc sử dụng từ “một” khi được sử dụng kết hợp với thuật ngữ “chứa” trong yêu cầu bảo hộ và/hoặc phân mô tả có thể có nghĩa là “một” nhưng cũng có nghĩa là “một hoặc nhiều,” “ít nhất một” và “một hoặc nhiều hơn một”.

Trong suốt bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” được sử dụng để biểu thị rằng một giá trị gồm biến đổi sai số vốn có cho thiết bị, phương pháp được sử dụng để xác định giá trị, hoặc biến đổi tồn tại giữa các chủ thể nghiên cứu. Khi được sử dụng trong ngữ cảnh của nhiễu xạ bột tia X, thuật ngữ “khoảng” được sử dụng để biểu thị một giá trị $\pm 0.2^\circ 2\theta$ so với giá trị được đưa ra, tốt hơn là một giá trị $\pm 0,1^\circ 2\theta$ so với giá trị được đưa ra. Khi được sử dụng trong ngữ cảnh của phép đo nhiệt lượng quét vi sai hoặc nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh, thuật ngữ “khoảng” được sử dụng để biểu thị một giá trị $\pm 10^\circ\text{C}$ tương ứng với mức tối đa của đỉnh, tốt hơn là một giá trị $\pm 2^\circ\text{C}$ tương ứng với mức tối đa của đỉnh. Khi được sử dụng trong các ngữ cảnh khác, thuật ngữ “khoảng” được sử dụng để biểu thị một giá trị $\pm 10\%$ so với giá trị được đưa ra, tốt hơn là một giá trị $\pm 5\%$ so với giá trị được đưa ra. Cần hiểu rằng, bất cứ khi nào thuật ngữ “khoảng” được sử dụng, một tham chiếu cụ thể cho giá trị số chính xác được biểu thị cũng được bao gồm.

Các thuật ngữ “chứa”, “có” và “gồm” là các động từ liên kết mở rộng. Bất kỳ dạng hay thời nào của một hoặc nhiều trong số các động từ này, chẳng hạn như “chứa”, “có”, “gồm” cũng là mở rộng. Ví dụ như, bất kỳ phương pháp nào “chứa,” “có” hoặc “gồm” một hoặc nhiều bước không giới hạn ở chỉ có một hoặc nhiều bước đó mà cũng bao hàm các bước không được liệt kê khác.

Thuật ngữ “hiệu quả”, khi thuật ngữ này được sử dụng trong phân mô tả và/hoặc yêu cầu bảo hộ, nghĩa là thích hợp để đạt được kết quả mong muốn, kỳ vọng hoặc dự tính. “Lượng hiệu quả”, “lượng hiệu quả trị bệnh” hoặc “lượng hiệu quả về

mặt được” khi được sử dụng trong ngữ cảnh điều trị người bệnh hoặc chủ thể bằng hợp chất nghĩa là lượng hợp chất, khi được sử dụng cho chủ thể hoặc người bệnh để điều trị bệnh, đủ để có tác dụng cho việc điều trị đó.

Thuật ngữ “đỉnh halogen” trong ngữ cảnh của nhiều xạ bột tia X có nghĩa là đỉnh rộng, thường kéo dài $>10^\circ 2\theta$ trong một nhiễu xạ đồ bột tia X, thường đặc trưng bởi hệ hoặc chất rắn vô định hình.

Thuật ngữ “hydrat” khi được sử dụng làm chất biến đổi cho một hợp chất nghĩa là hợp chất có ít hơn một (ví dụ như, hemihydrat), một (ví dụ như, monohydrat), hoặc nhiều hơn một (ví dụ như, dihydrat) phân tử nước liên quan đến mỗi phân tử hợp chất, chẳng hạn như ở các dạng rắn của hợp chất.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “IC₅₀” đề cập đến liều lượng ức chế là 50% của phản ứng tối đa thu được. Số đo định lượng này biểu thị mức độ thuốc cụ thể hoặc chất khác (chất ức chế) cần dùng để ức chế quy trình sinh học, sinh hóa hoặc hóa học đã định (hoặc thành phần của quy trình, tức là enzym, tế bào, thụ thể tế bào hoặc vi sinh vật) đến một nửa.

“Chất đồng phân” của hợp chất thứ nhất là hợp chất tách biệt trong đó mỗi phân tử chứa các nguyên tử hợp thành giống nhau là hợp chất thứ nhất, nhưng hình dạng của các nguyên tử đó dưới dạng ba chiều là khác nhau.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “người bệnh” hoặc “chủ thể” đề cập đến cơ thể sống có vú, chẳng hạn như người, khỉ, bò, cừu, dê, chó, mèo, chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, hoặc các loài biến đổi gen của chúng. Theo các phương án nhất định, người bệnh hoặc chủ thể là con vật không phải người. Theo các phương án nhất định, người bệnh hoặc chủ thể là động vật linh trưởng. Theo các phương án nhất định, người bệnh hoặc chủ thể là người. Các ví dụ không giới hạn về các chủ thể người là người trưởng thành, thanh thiếu niên, trẻ em và thai nhi.

Như được sử dụng khái quát ở đây “dược dụng” đề cập đến các hợp chất, nguyên liệu, hợp phần, và/hoặc các dạng liều lượng mà, trong phạm vi quan điểm y học hợp lý, thích hợp để sử dụng tiếp xúc với các mô, các cơ quan, và/hoặc các chất lỏng trong cơ thể của con người và các con vật mà không độc hại, kích thích, phản ứng dị ứng quá mức, hoặc các vấn đề hay biến chứng khác xứng với tỷ lệ lợi ích/rủi ro hợp lý.

“Các muối được dụng” nghĩa là các muối của các hợp chất theo sáng chế này là được dụng, như được định nghĩa trên đây, và có hoạt tính dược lý mong muốn. Các muối này gồm các muối cộng axit được tạo ra với các axit vô cơ chẳng hạn như axit hydrocloric, axit hydrobromic, axit sunfuric, axit nitric, axit photphoric, và các axit tương tự; hoặc với các axit hữu cơ chẳng hạn như 1,2-etandisulfonic axit, 2-hydroxyetansulfonic axit, 2-naphthalensulfonic axit, 3-phenylpropionic axit, 4,4'-metylenebis(3-hydroxy-2-ene-1-axit cacboxylic), 4-metylbixyclo[2.2.2]oct-2-ene-1-axit cacboxylic, axit axetic, các axit mono- và đicacboxylic béo, các axit sunfuric béo, axit sunfuric thom, axit benzensulfonic, axit benzoic, axit camphorsulfonic, axit cacbonic, axit xinnamic, axit xitric, axit xyclopentan propionic, axit etansulfonic, axit fumaric, axit glucoheptonic, axit gluconic, axit glutamic, axit glycolic, axit heptanoic, axit hexanoic, axit hydroxynaphthoic, axit lactic, axit laurylsulfuric, axit maleic, axit malic, malonic axit, axit mandelic, axit metansulfonic, muconic axit, o-(4-hydroxybenzoyl)benzoic axit, oxalic axit, p-chlorobenzenesulfonic axit, các axit alkanoic thế phenyl, axit propionic, axit p-toluensulfonic, axit pyruvic, axit salicylic, axit stearic, axit suxinic, axit tactaric, axit butylaxetic bậc ba, axit trimetylaxetic, và các axit tương tự. Các muối được dụng cũng gồm các muối cộng bazơ có thể được tạo ra khi các proton axit có mặt có khả năng phản ứng với các bazơ vô cơ hoặc hữu cơ. Các bazơ vô cơ sử dụng được gồm natri hydroxit, natri cacbonat, kali hydroxit, nhôm hydroxit và canxi hydroxit. Các bazơ hữu cơ sử dụng được gồm etanolamin, dietanolamin, trietanolamin, tromethamin, N-metylglucamin và các bazơ tương tự. Nên hiểu rằng anion hoặc cation cụ thể tạo ra một phần của bất kỳ muối nào theo sáng chế này là không quan trọng, miễn là muối, nói chung, là dược lý dụng. Các ví dụ khác về các muối được dụng và các phương pháp điều chế và việc sử dụng chúng được giới thiệu trong tài liệu “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use” (P. H. Stahl & C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002).

“Phòng ngừa” gồm: (1) ức chế sự tấn công của bệnh ở chủ thể hoặc người bệnh có thể chịu rủi ro và/hoặc có khả năng mắc bệnh nhưng chưa trải qua hoặc biểu hiện bất kỳ hay tất cả bệnh lý học hoặc triệu chứng học của bệnh, và/hoặc (2) làm chậm sự tấn công của bệnh lý học hoặc triệu chứng học của một bệnh ở một chủ thể hoặc người bệnh có thể chịu rủi ro và/hoặc có khả năng mắc bệnh nhưng chưa trải qua hoặc biểu hiện bất kỳ hay tất cả bệnh lý học hoặc triệu chứng học của bệnh.

“Tiền dược chất” nghĩa là hợp chất có thể chuyển hóa in vivo thành chất ức chế theo sáng chế này. Bản thân tiền dược chất có thể hoặc cũng có thể không có hoạt tính liên quan đến protein đích đã định. Ví dụ như, hợp chất bao gồm một nhóm hydroxy có thể được sử dụng làm este được biến đổi bằng thủy phân in vivo thành hợp chất hydroxy. Các este thích hợp có thể được chuyển hóa in vivo thành các hợp chất hydroxy gồm axetat, xitrat, lactat, phosphat, tartrat, malonat, oxalat, salixylat, propionat, suxinat, fumarat, maleat, metylen-bis- β -hydroxynaphthoat, gentisat, isethionat, di-p-toluoyltartrat, metansulfonat, etansulfonat, benzensulfonat, p-toluensulfonat, xyclohexylsulfamat, quinat, este của axit amin, và các dạng tương tự. Tương tự, hợp chất bao gồm nhóm amin có thể được sử dụng làm amit được chuyển hóa bằng thủy phân in vivo thành hợp chất amin.

“Chất đồng phân lập thể” hoặc “chất đồng phân quang học” là chất đồng phân của một hợp chất đã cho trong đó các nguyên tử giống nhau được liên kết với các nguyên tử khác giống nhau, nhưng hình dạng của các nguyên tử đó ở dạng ba chiều là khác nhau. “Các isome quang” là các chất đồng phân lập thể của một hợp chất đã định mà là các hình ảnh phản chiếu của nhau, như tay trái và tay phải. “Các đồng phân phi đối hình” là các chất đồng phân lập thể của một hợp chất đã định mà không phải là các isome quang. Các phân tử không đối xứng chứa một tâm không đối xứng, cũng được gọi là tâm lập thể hoặc tâm tạo kết cấu lập thể, là bất kỳ điểm nào, mặc dù không nhất thiết là nguyên tử, trong các nhóm mang phân tử sao cho sự thay thế lẫn nhau của bất kỳ hai nhóm nào tạo ra một chất đồng phân lập thể. Ở các hợp chất hữu cơ, tâm không đối xứng thường là một nguyên tử cacbon, photpho hoặc lưu huỳnh, mặc dù các nguyên tử khác cũng có thể là các tâm lập thể ở các chất hữu cơ và vô cơ. Một phân tử có thể có nhiều tâm lập thể, mang lại cho nó nhiều chất đồng phân lập thể. Ở các hợp chất mà đồng phân lập thể của chúng là do các tâm tạo kết cấu lập thể tứ diện (ví dụ như, cacbon tứ diện), tổng số các chất đồng phân lập thể có thể có theo giả định sẽ không vượt quá $2n$, trong đó n là số lượng các tâm lập thể tứ diện. Các phân tử có sự đối xứng thường có ít hơn số lượng các chất đồng phân lập thể có thể có tối đa. Hỗn hợp 50:50 các isome quang được gọi là hỗn hợp triệt quang. Theo lựa chọn, một hỗn hợp các isome quang có thể giàu isome quang sao cho một isome quang hiện diện với lượng lớn hơn 50%. Thông thường, các isome quang và/hoặc các đồng phân phi đối hình có thể được phân giải hoặc tách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ

thuật. Điều được dự liệu là đối với bất kỳ tâm lập thể hoặc trục không đối xứng mà hóa học lập thể chưa được xác định cho chúng, tâm lập thể hoặc trục không đối xứng đó có thể hiện diện ở dạng R, dạng S, hoặc dưới dạng hỗn hợp của các dạng R và S, gồm các hỗn hợp triệt quang hoặc phi triệt quang. Như được sử dụng ở đây, cụm từ “về cơ bản không có các chất đồng phân lập thể khác” nghĩa là hợp phần chứa $\leq 15\%$, tốt hơn nữa là $\leq 10\%$, thậm chí tốt hơn nữa là $\leq 5\%$, hoặc tốt nhất là $\leq 1\%$ của một (các) chất đồng phân lập thể khác.

“Điều trị” gồm (1) ức chế bệnh ở chủ thể hoặc người bệnh trải qua hoặc biểu hiện bệnh lý học hoặc triệu chứng học của bệnh (ví dụ như, kìm hãm sự phát triển thêm của bệnh lý học và/hoặc triệu chứng học), (2) cải thiện bệnh ở chủ thể hoặc người bệnh trải qua hoặc biểu hiện bệnh lý học hoặc triệu chứng học của bệnh (ví dụ như, đảo ngược bệnh lý học và/hoặc triệu chứng học), và/hoặc (3) mang lại bất kỳ sự giảm bệnh có thể đo được ở chủ thể hoặc người bệnh trải qua hoặc biểu hiện bệnh lý học hoặc triệu chứng học của bệnh.

Các định nghĩa nêu trên thay thế bất kỳ định nghĩa mâu thuẫn nào trong bất kỳ tài liệu tham chiếu nào được đưa vào đây để tham chiếu. Tuy nhiên, việc các thuật ngữ nào đó được định nghĩa không nên được coi là biểu thị rằng bất kỳ định nghĩa nào không được định nghĩa là không xác định. Đúng hơn, tất cả các thuật ngữ được sử dụng được cho là mô tả sáng chế theo cách diễn đạt sao cho một người có kỹ năng bình thường có thể hiểu được phạm vi và thực hiện sáng chế này.

II. RTA 408 và các phương pháp tổng hợp

RTA 408 có thể được điều chế theo các phương pháp được mô tả trong phần các Ví dụ dưới đây. Các phương pháp này có thể được cải biến hoặc tối ưu hóa thêm sử dụng các nguyên lý và các kỹ thuật của hóa học hữu cơ như được áp dụng bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật. Các nguyên lý và kỹ thuật này được đưa ra, ví dụ như, trong tài liệu March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure (2007), được đưa vào đây để tham chiếu.

Nên hiểu rằng anion hoặc cation cụ thể tạo thành một phần của bất kỳ muối nào theo sáng chế này không quan trọng, miễn là muối, nói chung, được lý dụng. Các ví dụ khác về các muối được dụng và các phương pháp điều chế và sử dụng chúng được trình bày trong tài liệu Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (2002), được đưa vào đây để tham chiếu.

RTA 408 cũng có thể tồn tại dưới dạng tiền dược chất. Do các tiền dược chất được biết đến là nâng cao các đặc tính mong muốn của các dược phẩm, ví dụ như, độ hòa tan, khả dụng sinh học, khả năng sản xuất, v.v..., các hợp chất được sử dụng trong một số phương pháp theo sáng chế có thể, nếu muốn, được phân phối dưới dạng tiền dược chất. Do đó, sáng chế dự liệu các tiền dược chất của các hợp chất theo sáng chế này cũng như các phương pháp phân phối tiền dược chất. Các tiền dược chất của các hợp chất được sử dụng trong sáng chế có thể được điều chế bằng cách điều chỉnh các nhóm chức có trong hợp chất theo cách sao cho các biến thể được tách ra, bằng thao tác thông thường hoặc in vivo, khỏi hợp chất mẹ. Theo đó, các tiền dược chất gồm, ví dụ như, các hợp chất được mô tả ở đây trong đó một hydroxy, amino, hoặc nhóm cacboxy được liên kết với bất kỳ nhóm nào mà, khi tiền dược chất được sử dụng cho người bệnh, tách ra để tương ứng tạo thành một hydroxy, amino, hoặc axit cacboxylic.

RTA 408 có thể chứa một hoặc nhiều cacbon hoặc nguyên tử nitơ được thể không đối xứng, và có thể được tách dưới dạng triệt quang hoặc quang hoạt. Do đó, tất cả các dạng epime, dạng triệt quan, đồng phân phi đối hình, không đối xứng, và tất cả các dạng chất đồng phân hình học của một cấu trúc nhằm, trừ khi dạng chất đồng phân hoặc hóa học lập thể cụ thể được biểu thị cụ thể. RTA 408 có thể ở dạng các raxemat và các hỗn hợp raxemic, các isome quang đơn lẻ, các hỗn hợp đồng phân phi đối hình và các đồng phân phi đối hình riêng lẻ. Theo một số phương án, thu được một đồng phân phi đối hình đơn lẻ. Các tâm không đối xứng của RTA 408 theo sáng chế này có thể có hình dạng S hoặc R.

Ngoài ra, các nguyên tử tạo thành RTA 408 theo sáng chế này được dự tính gồm tất cả các dạng đồng vị của các nguyên tử như thế. Các chất đồng vị, như được sử dụng ở đây, gồm các nguyên tử đó mà có cùng số nguyên tử nhưng khác chỉ số khối lượng. Thông qua ví dụ khái quát và không giới hạn, các chất đồng vị của hydro gồm triti và đơteri, và các chất đồng vị của cacbon gồm ^{13}C và ^{14}C . Tương tự, điều được dự liệu là một hoặc nhiều nguyên tử cacbon của hợp chất theo sáng chế này có thể được thay thế bởi (các) nguyên tử silic. Hơn nữa, điều được dự liệu là một hoặc nhiều nguyên tử oxy của RTA 408 có thể được thay thế bởi (các) nguyên tử lưu huỳnh hoặc selen.

RTA 408 và hợp chất dạng đa hình của chúng cũng có thể có ưu điểm là chúng có thể hiệu quả hơn, in độc hơn, hoạt động lâu hơn, hiệu nghiệm hơn, gây ra ít phản

ứng phụ hơn, dễ hấp thụ hơn, và/hoặc có đặc tính dược động học tốt hơn (ví dụ như, khả dụng sinh học qua đường miệng cao hơn và/hoặc mức thanh thải thấp hơn), và/hoặc các ưu điểm dược lý, vật lý, hoặc hóa hoặc hữu ích khác so với các hợp chất trong các giải pháp kỹ thuật đã biết để sử dụng trong các dấu hiệu nêu ra ở đây.

III. Các hợp chất dạng đa hình của RTA 408

Theo một số phương án, sáng chế này đề xuất các dạng rắn khác nhau của RTA 408, gồm các solvat của chúng. Một nghiên cứu về tiền chế phẩm và hiện tượng đa hình sơ bộ được thực hiện, và RTA 408 được thấy có xu hướng cao trong việc tạo thành solvat. Các dạng tinh thể của các nhóm 2, 3, 4, và 5 phù hợp với các solvat. Liên quan đến việc mô tả các nhóm, xem Bảng 1 dưới đây. Những nỗ lực sấy khô các nhóm 2 và 3 (hai nhóm solvat đẳng cấu) đã không thành công, điều này phù hợp với các phân tử dung môi liên kết chặt. Theo một số phương án, việc sấy khô một chất rắn nhóm 4 (solvat axetonitril) mang lại dạng khử solvat đẳng cấu. Theo một số phương án, việc sấy khô một chất rắn nhóm 5 (solvat THF) mang lại dạng vô định hình nhóm 1. Các dạng phi solvat của RTA 408 gồm dạng vô định hình (nhóm 1) và solvat khử solvat tinh thể của nhóm 4 (đẳng cấu và solvat axetonitril nhóm 4). Theo một số phương án, dạng vô định hình có mức chuyển hóa thủy tinh cao với $T_g \approx 153^\circ\text{C}$ ($\Delta C_p = 0,72 \text{ J/g}^\circ\text{C}$) và chỉ hơi hút ẩm ($\Delta m = +0,4\%$ độ ẩm tương đối $50\% \rightarrow 85\%$). Theo một số phương án, dạng vô định hình thích hợp cho ít nhất bốn tuần ở nhiệt độ cao và các điều kiện ẩm (nghĩa là, mở ở nhiệt độ 40°C /độ ẩm tương đối $\sim 75\%$ hoặc đóng ở 80°C). Theo một số phương án, dạng vô định hình (nhóm 1) được điều chế thành công từ nguyên liệu nhóm 2 trong một quy trình gồm hai bước (biến đổi thành nhóm 5 và sau đó sấy khô nhóm 5 để thu được dạng vô định hình), cũng như trong một phương pháp gồm một bước trực tiếp (kết tủa từ một dung dịch axeton trong bể nước lạnh). Solvat khử solvat tinh thể của nhóm 4 (đẳng cấu với solvat nhóm 4) hơi hút ẩm (khối lượng tăng thêm là $\sim 0,7 \text{ wt.}\%$ từ độ ẩm tương đối 50% đến độ ẩm tương đối 85%) và có thể có điểm nóng chảy ở $196,1^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 29,31 \text{ J/g}$).

Một mẫu dạng vô định hình 63415, nhóm 1, đặc trưng bởi quang phổ học FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, chuẩn độ Karl Fischer, $^1\text{H-NMR}$, DSC, và DVS (xem phần các Ví dụ để biết thêm chi tiết). Mẫu được thấy có chứa $\sim 0,9 \text{ wt.}\%$ EtOH với một chút H_2O (theo TG-FTIR). Hàm lượng nước $0,5 \text{ wt.}\%$ được xác định chuẩn độ Karl Fischer. DSC thể hiện nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh cao với $T_g \approx 153^\circ\text{C}$ ($\Delta C_p =$

0,72 J/g°C). Theo DVS, nguyên liệu hơi hút ẩm ($\Delta m = +0,4\%$ độ ẩm tương đối 50% → 85%). Không thấy kết tinh trong các thí nghiệm DSC hoặc DVS.

Độ ổn định hóa học của dạng vô định hình được kiểm tra ở các dung môi hữu cơ, gồm axeton, EtOAc, MeOH, và MeCN, cũng như các môi trường nước khác (ví dụ như, Tween 80 dạng nước 1%, SDS dạng nước 1%, CTAB dạng nước 1%) với nồng độ 1 mg/mL ở các điểm thời gian 6 giờ, 24 giờ, 2 ngày, và 7 ngày. Chỉ quan sát thấy sự phân giải $\geq 1\%$ đối với các dung dịch ở MeCN sau 7 ngày và đối với các dịch huyền phù ở môi trường Tween 80 dạng nước 1% (ở tất cả các điểm thời gian ở 254 nm và sau 24 giờ, 2 ngày, và 7 ngày ở 242 nm).

Ngoài ra, độ ổn định của dạng vô định hình được kiểm tra ở nhiệt độ cao và các điều kiện ẩm (mở ở 25 °C/độ ẩm tương đối 62% và 40 °C/độ ẩm tương đối 75% và đóng ở 60 °C và 80 °C). Sau một tuần, hai tuần, và bốn tuần, các mẫu được bảo quản được phân tích bằng PXRD. Không mẫu nào khác so với nguyên liệu ban đầu vô định hình.

Hơn 30 thí nghiệm sấy khô và kết tinh được thực hiện, gồm làm cân bằng dịch huyền phù, làm nguội chậm, làm bay hơi, và kết tủa. Thu được bốn dạng tinh thể mới (các nhóm 2, 3, 4, và 5) ngoài dạng vô định hình ra (nhóm 1).

Bốn nhóm mới (các nhóm 2, 3, 4, và 5) đặc trưng bởi quang phổ học FT-Raman, PXRD, và TG-FTIR. Tất cả các dạng tương ứng với các solvat (Bảng 1). Các thí nghiệm sấy khô trong chân không hoặc dòng khí N₂ được thực hiện với mục đích thu được dạng phi solvat, kết tinh của 63415.

Bảng 1. Tóm tắt các nhóm thu được

Nhóm	Các đặc tính	Kết quả các thí nghiệm sấy khô
Nhóm 1	dạng vô định hình	--
Nhóm 2	các solvat đẳng cấu (ví dụ như, heptan)	sấy khô không thành công
Nhóm 3	các solvat đẳng cấu (ví dụ như, ethanol)	sấy khô không thành công
Nhóm 4	Solvat MeCN & solvat được khử solvat	sấy khô thành công, cấu trúc không đổi
Nhóm 5	Solvat THF	sấy khô dẫn đến dạng vô định hình

Nhóm 2: Phần lớn các thí nghiệm kết tinh được thực hiện mang lại nguyên liệu rắn của nhóm 2 (xem phần các Ví dụ dưới đây). Các bộ phận của nó tương ứng với các

solvat (của heptan, xyclohexan, isopropyl ete, 1-butanol, trietylamin, và các dung môi có thể khác, chẳng hạn như hexan, các ete khác, v.v...) đẳng cấu, không hợp thức ($<0,5$ đương lượng) với các phân tử dung môi liên kết chặt. Các phổ Rama và các mẫu hình PXRD trong nhóm này rất tương tự nhau, do đó các cấu trúc có thể giống nhau về cơ bản chỉ có những khác biệt nhỏ do các dung môi khác đã được đưa vào.

Các thí nghiệm sấy khô đối với các mẫu nhóm 2 đã mang lại một dạng phi solvat, kết tinh. Thậm chí nhiệt độ cao ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$) và chân không cao ($<1 \times 10^{-3}$ mbar) không thể loại bỏ hoàn toàn các phân tử dung môi liên kết chặt; hàm lượng dung môi là $>2\text{ wt.-%}$ luôn được duy trì. Độ kết tinh của các mẫu được sấy khô một phần này bị giảm đi, nhưng không thấy biến đổi thành cấu trúc khác cũng không thấy vô định hình hóa đáng kể.

Nhóm 3: Có thể thu được nguyên liệu rắn của nhóm 3 từ một vài phương pháp kết tinh (xem phần các Ví dụ dưới đây). Các mẫu của nhóm 3 có thể là các solvat đẳng cấu của 2PrOH, EtOH, và có thể là axeton với các phân tử dung môi liên kết chặt. Chúng có thể tương ứng với các hemisolvat hợp thức hoặc các solvat không hợp thức với hàm lượng dung môi là $\sim 0,5$ đương lượng đối với nhóm 2, các phổ Rama và các mẫu hình PXRD trong nhóm này rất tương tự nhau, biểu thị các cấu trúc tương tự có đưa vào các dung môi khác nhau.

Tương tự với nhóm 2, các thí nghiệm sấy khô đã không thành công. Chính các phân tử dung môi liên kết chặt chỉ có thể được loại bỏ một phần (nghĩa là, $\sim 5,4\text{ wt.-%}$ đến $\sim 4,8\text{ wt.-%}$ sau khi lên đến 3 ngày ở 1×10^{-3} mbar và $80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Các mẫu hình PXRD giữ nguyên không đổi.

Nhóm 4 có thể thu được từ một hệ dung môi MeCN/H₂O 7:3 (xem phần các ví dụ dưới đây). Nó rất có thể tương ứng với một hemisolvat axetonitril kết tinh. Bằng cách sấy khô (trong chân không hoặc dòng khí N₂ ở nhiệt độ cao) phần lớn các phân tử dung môi có thể được loại bỏ mà không làm thay đổi hay phá hủy cấu trúc tinh thể (PXRD giữ nguyên không đổi). Do đó, thu được một dạng phi solvat, kết tinh (hay đúng hơn là solvat được khử solvat). Nó hơi hút ẩm (khối lượng tăng thêm là $\sim 0,7\text{ wt.-%}$ từ độ ẩm tương đối 50% đến độ ẩm tương đối 85%) và có thể có điểm nóng chảy tại $196,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 29,31\text{ J/g}$).

Nhóm 5 có thể thu được từ một hệ dung môi $\sim 1:1$ THF/H₂O. Nhóm 5 chứa THF được liên kết (và có thể là H₂O). Do hàm lượng của hai thành phần không thể dễ

dàng được định lượng tách biệt, tính chất chính xác của solvat kết tinh này chưa được xác định.

Việc sấy khô của nhóm 5 dẫn đến sự khử solvat hóa và biến đổi đáng theo hướng của dạng vô định hình (nhóm 1). Theo một số phương án, dạng vô định hình của RTA 408 có thể được điều chế bằng cách tạo huyền phù solvat heptan nhóm 2 trong THF/H₂O 1:1 để tạo thành một chất rắn nhóm 5, sau đó sấy khô và vô định hình hóa.

Các thí nghiệm với mục đích điều chế dạng vô định hình (nhóm 1) được thực hiện sử dụng nhóm 2 nguyên liệu ban đầu. Nguyên liệu chủ yếu là vô định hình (nhóm 1) được điều chế bắt đầu từ nguyên liệu nhóm 2 trong một quy trình hai bước qua nhóm 5 trên quy mô 100-mg và 3-g (sấy khô ở 100 mbar, 80 °C, một vài ngày). Việc điều chế nguyên liệu vô định hình hoàn toàn (nhóm 1) được thấy là có thể trong một quy trình một bước tránh dung môi THF bằng cách kết tủa trực tiếp dạng vô định hình (nhóm 1) từ một dung dịch axeton của nguyên liệu nhóm 2 trong bể nước lạnh.

IV. Các bệnh liên quan đến chứng viêm và/hoặc ứng suất oxy hóa

Chứng viêm là một quy trình sinh học mang lại khả năng kháng lại các sinh vật ký sinh hoặc truyền nhiễm và thu hồi mô bị hư hỏng. Chứng viêm thường đặc trưng bởi giãn mạch máu cục bộ, đỏ, sưng tấy, và đau, bổ sung các bạch cầu cho vị trí lây nhiễm hoặc chấn thương, tạo ra các xytokin dễ viêm, chẳng hạn như TNF- α và IL-1, và tạo ra các loại khí nitơ hoặc oxy phản ứng, chẳng hạn như hydro peroxit, superoxit, và peroxynitrit. Ở các giai đoạn sau của chứng viêm, việc tổ chức lại mô, sự hình thành mạch, và sự tạo thành sẹo (chứng xơ hóa) có thể xảy ra là một phần của quy trình hàn gắn vết thương. Trong các điều kiện thông thường, phản ứng dễ viêm được điều chỉnh, tạm thời, và được xử lý theo cách có sắp đặt một khi sự lây nhiễm hoặc chấn thương đã được giải quyết một cách thích hợp. Tuy nhiên, chứng viêm cấp tính có thể trở lên quá thể và đe dọa sự sống nếu các cơ chế điều chỉnh thất bại. Theo lựa chọn, chứng viêm có thể trở nên mãn tính và gây hư hỏng mô tích lũy hoặc các biến chứng toàn thân. Dựa trên ít nhất là dấu hiệu được thể hiện ở đây, RTA 408 có thể được sử dụng trong điều trị và phòng ngừa chứng viêm hoặc các bệnh liên quan đến chứng viêm.

Nhiều bệnh nghiêm trọng và khó trị ở người liên quan đến sự rối loạn các quy trình dễ viêm, gồm các bệnh chẳng hạn như ung thư, chứng xơ vữa động mạch, và

bệnh đái tháo đường, mà thông thường không được coi là các điều kiện dễ viêm. Trong trường hợp ung thư, các quy trình dễ viêm liên quan đến các quy trình gồm sự tạo thành, tiến triển, di căn của khối u, và sự kháng lại liệu pháp. Theo một số phương án, RTA 408 có thể được sử dụng trong điều trị và phòng ngừa các bệnh ung thư gồm ung thư biểu mô, bệnh sacôm, u lympho, bệnh bạch cầu, u melanin, u trung biểu mô, đau tủy, hoặc u tinh, hoặc ung thư bàng quang, máu, xương, não, vú, hệ thần kinh trung ương, cổ tử cung, ruột kết, màng trong dạ con, thực quản, túi mật, cơ quan sinh dục ngoài, ống cơ quan sinh dục nội, đầu, thận, thanh quản, gan, phổi, mô cơ, cổ, niêm mạc miệng hoặc mũi, buồng trứng, tuyến tụy, tuyến tiền liệt, da, lá lách, ruột non, ruột già, dạ dày, bộ tinh hoàn, hoặc tuyến giáp. Chứng xơ vữa động mạch, từ lâu được coi là rối loạn chức năng chuyển hóa lipid, hiện này được hiểu chủ yếu là điều kiện dễ viêm, với các đại thực bào hoạt hóa đóng vai trò quan trọng trong việc tạo thành và sự thoát vị có thể của các mảng xơ vữa. Sự hoạt hóa của các con đường tín hiệu dễ viêm cũng được thể hiện là đóng vai trò trong việc phát triển khả năng kháng insulin, cũng như trong việc làm hư hỏng mô ngoại vi liên quan đến chứng tăng đường huyết do đái tháo đường. Sự tạo ra dư thừa các loại khí oxy phản ứng và các loại khí nitơ phản ứng, chẳng hạn như superoxit, hydro peroxit, oxit nitric, và peroxynitrit, là một dấu hiệu xác nhận các điều kiện dễ viêm. Dấu hiệu của việc tạo ra peroxynitrit rối loạn đã được thể hiện trong nhiều loại bệnh khác nhau (Szabo và đồng tác giả, 2007; Schulz và đồng tác giả, 2008; Forstermann, 2006; Pall, 2007).

Các bệnh tự miễn dịch chẳng hạn như viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh vẩy nến, và bệnh đa xơ cứng liên quan đến sự hoạt hóa không tích hợp và mất tính của các quy trình dễ viêm trong các mô bị ảnh hưởng, phát sinh từ sự loạn chức năng của các cơ chế phản ứng và nhận biết của bản thân so với không phải của bản thân trong hệ miễn dịch. Ở các bệnh thoái hóa thần kinh chẳng hạn như các bệnh Alzheimer và Parkinson, sự hư hỏng thần kinh có tương quan với sự hoạt hóa của tiểu thần kinh đệm và các mức độ cao của các protein gây viêm, chẳng hạn như men tổng hợp oxyt nitric cảm ứng (iNOS). Sự suy cơ quan mất tính, chẳng hạn như suy thận, chứng suy tim, suy gan, và bệnh phổi tắc nghẽn mất tính, có liên quan khăng khít đến sự hiện diện của ứng suất oxy hóa và chứng viêm mất tính, dẫn đến sự phát triển chứng xơ hóa và sự hao hụt có thể của chức năng cơ quan. Ứng suất oxy hóa trong các tế bào màng trong mạch, mà ở đó có các mạch máu lớn và nhỏ xếp thành hàng, có thể dẫn đến sự

loạn chức năng màng trong và được cho là một yếu tố góp phần quan trọng trong việc phát triển bệnh tim mạch toàn thân, các biến chứng của bệnh đái tháo đường, bệnh thận mãn tính và các dạng khác của suy cơ quan, và một số bệnh liên quan đến lão hóa khác, gồm các bệnh thoái hóa hệ thần kinh trung ương và võng mạc.

Nhiều rối loạn chức năng khác liên quan đến ứng suất oxy hóa và chứng viêm ở các mô bị ảnh hưởng, gồm bệnh viêm ruột; dễ viêm da các bệnh; viêm niêm mạc và chứng viêm da liên quan đến liệu pháp bức xạ và hóa học trị liệu; các bệnh về mắt, chẳng hạn như viêm màng mạch nhỏ, bệnh glôcôm, thoái hóa điểm vàng của võng mạc, và các dạng khác nhau của bệnh võng mạc; tình trạng thất bại sau ghép và tình trạng thải ghép; chứng thiếu máu cục bộ-thương tổn tái thông máu; đau mãn tính; các điều kiện thoái hóa xương và khớp, gồm bệnh viêm khớp xương mãn tính và chứng loãng xương; bệnh hen và xơ nang; các rối loạn chức năng co giật; và các điều kiện tâm thần kinh, gồm bệnh tâm thần phân liệt, trầm cảm, rối loạn chức năng lưỡng cực, rối loạn căng thẳng sau chấn thương tâm lý, các rối loạn thiếu hụt chú ý, các rối loạn phổ tự kỷ, và các rối loạn chức năng ăn, chẳng hạn như chán ăn tâm thần. Sự rối loạn các con đường tín hiệu dễ viêm được cho là yếu tố chính trong bệnh lý học của các bệnh lãng phí cơ bắp, gồm bệnh loạn dưỡng cơ và các dạng khác nhau của chứng suy mòn.

Nhiều rối loạn chức năng cấp tính đe dọa sự sống cũng liên quan đến tín hiệu dễ viêm rối loạn, gồm suy cơ quan cấp tính liên quan đến tuyến tụy, thận, gan, hoặc phổi, nhồi máu cơ tim hoặc hội chứng vành cấp tính, đột quy, trạng thái sốc nhiễm khuẩn, chấn thương, các vết bỏng nặng, và phản vệ.

Nhiều biến chứng của các bệnh truyền nhiễm cũng liên quan đến sự rối loạn các phản ứng dễ viêm. Mặc dù phản ứng dễ viêm có thể diệt các tác nhân gây bệnh xâm lấn, phản ứng dễ viêm quá mức cũng có thể hoàn toàn bị phá hủy và trong một số trường hợp có thể là nguồn gây hư hại chính ở các mô bị lây nhiễm. Hơn nữa, phản ứng dễ viêm quá mức cũng có thể dẫn đến các biến chứng toàn thân do tạo ra thừa các xytokin dễ viêm, chẳng hạn như TNF- α và IL-1. Đây được cho là một yếu tố gây tử vong phát sinh từ bệnh cúm nặng, hội chứng hô hấp cấp tính nghiêm trọng, và nhiễm trùng.

Biểu hiện khác thường hoặc quá mức của iNOS hoặc cyclooxygenaza-2 (COX-2) có liên quan đến sự phát sinh bệnh của nhiều quy trình bệnh. Ví dụ như, rõ ràng là

NO là một tác nhân có thể gây đột biến (Tamir và Tannebaum, 1996), và oxit nitric cũng có thể hoạt hóa COX-2 (Salvemini và đồng tác giả, 1994). Hơn nữa, có sự tăng iNOS rõ rệt ở các khối u ruột kết chuột cống gây ra do chất sinh ung thư, azoxymetan (Takahashi và đồng tác giả, 1997). Một loạt các dạng tương tự triterpenoit tổng hợp của axit oleanolic đã được thể hiện là các chất ức chế mạnh các quy trình gây viêm tế bào, chẳng hạn như gây ra bởi IFN- γ của men tổng hợp oxyt nitric cảm ứng (iNOS) và của COX-2 ở các đại thực bào ở chuột. Xem tài liệu của Honda và đồng tác giả (2000a), Honda và đồng tác giả (2000b), và Honda và đồng tác giả (2002), tất cả được đưa vào đây để tham chiếu.

Theo một khía cạnh, RTA 408 được bộc lộ ở đây phần nào đặc trưng bởi khả năng ức chế sự tạo ra oxit nitric ở các tế bào có nguồn gốc từ đại thực bào RAW 264.7 gây ra do phơi nhiễm γ -interferon. RTA 408 còn đặc trưng bởi khả năng gây ra biểu hiện của các protein chống oxy hóa, chẳng hạn như NQO1, và làm giảm biểu hiện của các protein gây viêm, chẳng hạn như COX-2 và men tổng hợp oxyt nitric cảm ứng (iNOS). Các tính chất này liên quan đến việc điều trị nhiều loại bệnh và rối loạn chức năng liên quan đến ứng suất oxy hóa và sự rối loạn các quy trình dễ viêm, gồm bệnh ung thư, các biến chứng do phơi nhiễm cục bộ hoặc toàn thân bức xạ ion hóa, viêm niêm mạc và chứng viêm da do liệu pháp bức xạ hoặc hóa học trị liệu, các bệnh tự miễn dịch, các bệnh tim mạch, gồm chứng xơ vữa động mạch, chứng thiếu máu cục bộ-thương tổn tái thông máu, sự suy cơ quan mãn tính và cấp tính, gồm suy thận và chứng suy tim, các bệnh hô hấp, bệnh đái tháo đường và các biến chứng của bệnh đái tháo đường, các dị ứng nghiêm trọng, thải ghép, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, các bệnh thoái hóa thần kinh, các bệnh về mắt và võng mạc, đau mãn tính và cấp tính, các bệnh thoái hóa xương, gồm bệnh viêm khớp xương mãn tính và chứng loãng xương, các bệnh viêm ruột, chứng viêm da và các bệnh về da khác, nhiễm trùng, bỏng, các rối loạn chức năng co giật, và các rối loạn tâm thần kinh.

Theo một khía cạnh khác, RTA 408 có thể được sử dụng cho điều trị chủ thể có điều kiện chẳng hạn như các bệnh về mắt. Ví dụ như, viêm màng mạch nhỏ, thoái hóa điểm vàng của võng mạc (cả dạng khô và dạng ướt), bệnh glôcôm, bệnh phù điểm vàng của võng mạc do đái tháo đường, bệnh viêm mí mắt, bệnh võng mạc do đái tháo đường, các bệnh và các rối loạn chức năng nội mô giác mạc chẳng hạn như loạn dưỡng nội mô giác mạc Fuchs, chứng viêm hậu phẫu, mắt khô, viêm kết mạc dị ứng và các

dạng khác viêm kết mạc là các ví dụ không giới hạn về các bệnh về mắt mà có thể được điều trị bằng RTA 408.

Theo một khía cạnh khác, RTA 408 có thể được sử dụng cho điều trị chủ thể có điều kiện chẳng hạn như da các bệnh hoặc các rối loạn chức năng. Ví dụ như, chứng viêm da, gồm chứng viêm da dị ứng, chứng viêm da lạc chỗ, chứng viêm da do phơi nhiễm hóa học, và chứng viêm da do bức xạ; bỏng nhiệt hoặc hóa học; các vết thương mãn tính gồm loét đài tháo đường, loét điểm tủy, và loét tĩnh mạch; mụn trứng cá; tình trạng rụng tóc gồm tình trạng hói đầu và tình trạng rụng tóc do thuốc; các rối loạn chức năng khác của nang lông; bệnh ly thượng bì bóng nước; râm nắng và các biến chứng của nó; các rối loạn chức năng hình thành sắc tố da gồm bệnh đốm bạch tạng; các điều kiện da liên quan đến lão hóa; làm lành vết thương hậu phẫu; phòng ngừa hoặc làm giảm sự tạo sẹo do da chấn thương, phẫu thuật, hoặc các vết bỏng; bệnh vẩy nến; các biểu hiện ngoài da của các bệnh tự miễn dịch hoặc bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ; phòng ngừa hoặc điều trị ung thư da; các rối loạn chức năng liên quan đến tăng siêu nhanh của các tế bào da chẳng hạn như tăng sừng hóa là một ví dụ không giới hạn về da các bệnh mà có thể được điều trị bằng RTA 408.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, sự hoạt hóa của con đường Keap1/Nrf2/ARE chống viêm/chống oxy hóa được cho là liên quan đến các tính chất chống viêm và chống sinh ung thư của hợp chất được bộc lộ ở đây.

Theo một khía cạnh khác, RTA 408 có thể được sử dụng cho điều trị một chủ thể có điều kiện gây ra bởi các mức độ cao của ứng suất oxy hóa trong một hoặc nhiều các mô. Ứng suất oxy hóa các kết quả từ các mức độ kéo dài hoặc cao bất thường của các loại khí oxy phản ứng, chẳng hạn như superoxit, hydro peroxit, oxit nitric, và peroxynitrit (được tạo ra bởi phản ứng của oxit nitric và peoxit). Ứng suất oxy hóa có thể kèm theo bởi chứng viêm cấp tính hoặc mãn tính. Ứng suất oxy hóa có thể gây ra bởi sự loạn chức năng ty lạp thể, bởi sự hoạt hóa của miễn dịch các tế bào, chẳng hạn như các đại thực bào và các bạch cầu trung tính, bởi sự phơi nhiễm cấp tính một tác nhân bên ngoài, chẳng hạn như bức xạ ion hóa hoặc tác nhân hóa học trị liệu gây độc tế bào (ví dụ như, doxorubicin), do chấn thương hoặc chấn thương mô cấp tính khác, do chứng thiếu máu cục bộ/tái thông máu, do tuần hoàn kém hoặc thiếu máu, do sự giảm oxy-huyết hoặc tình trạng tăng oxy cục bộ hoặc toàn thân, do các mức độ cao của các xytokin dễ viêm và các protein liên quan đến chứng viêm khác, và/hoặc do các

tình trạng sinh lý học bất bình thường khác, chẳng hạn như chứng tăng đường huyết hoặc giảm đường huyết.

Ở các mẫu con vật có nhiều điều kiện như thế, sự kích thích biểu hiện của heme oxygenaza cảm ứng được (HO-1), gen đích của con đường Nrf2, đã được biểu hiện là có tác động trị liệu đáng kể gồm ở các mẫu nhồi máu cơ tim, suy thận, tình trạng thất bại sau ghép và tình trạng thải ghép, đột quỵ, bệnh tim mạch, và bệnh tự miễn dịch (ví dụ như, Sacerdoti và đồng tác giả, 2005; Abraham & Kappas, 2005; Bach, 2006; Araujo và đồng tác giả, 2003; Liu và đồng tác giả, 2006; Ishikawa và đồng tác giả, 2001; Kruger và đồng tác giả, 2006; Satoh và đồng tác giả, 2006; Zhou và đồng tác giả, 2005; Morse và Choi, 2005; Morse và Choi, 2002). Enzym này phân chia heme tự do thành sắt, cacbon monoxit (CO), và biliverdin (sau đó được chuyển hóa thành sắc tố mật, phân tử có khả năng chống oxy hóa).

Theo một khía cạnh khác, RTA 408 có thể được sử dụng trong phòng ngừa hoặc điều trị hư hỏng mô hoặc suy cơ quan, cấp tính và mãn tính, do ứng suất oxy hóa bị gây trầm trọng bởi chứng viêm. Các ví dụ về các bệnh thuộc loại này gồm chứng suy tim, suy gan, tình trạng thất bại sau ghép và tình trạng thải ghép, suy thận, viêm tụy, các bệnh phổi xơ hóa (xơ nang, COPD, và xơ hoá phổi tự phát, ngoài các bệnh khác ra), bệnh đái tháo đường (gồm các biến chứng), chứng xơ vữa động mạch, chứng thiếu máu cục bộ-thương tổn tái thông máu, bệnh glôcôm, đột quỵ, bệnh tự miễn dịch, chứng tự kỷ, thoái hóa điểm vàng của võng mạc, và bệnh loạn dưỡng cơ. Ví dụ như, trong trường hợp chứng tự kỷ, các nghiên cứu cho thấy rằng việc làm tăng ứng suất oxy hóa trong hệ thần kinh trung ương có thể góp phần phát triển bệnh (Chauhan và Chauhan, 2006).

Dấu hiệu cũng kết nối ứng suất oxy hóa và chứng viêm với sự phát triển và bệnh lý học của nhiều rối loạn chức năng khác của hệ thần kinh trung ương, gồm các rối loạn chức năng tâm thần, chẳng hạn như chứng rối loạn tâm thần, trầm cảm trầm trọng, và rối loạn chức năng lưỡng cực; các rối loạn chức năng co giật, chẳng hạn như chứng động kinh; các hội chứng cảm giác và đau, chẳng hạn như chứng đau nửa đầu, đau do căn nguyên thần kinh, hoặc sự ù tai; và các hội chứng hành vi, chẳng hạn như các rối loạn thiếu hụt chú ý. Xem, ví dụ như, Dickerson và đồng tác giả, 2007; Hanson và đồng tác giả, 2005; Kendall-Tackett, 2007; Lencz và đồng tác giả, 2007; Dudhgaonkar và đồng tác giả, 2006; Lee và đồng tác giả, 2007; Morris và đồng tác

giả, 2002; Ruster và đồng tác giả, 2005; McIver và đồng tác giả, 2005; Sarchielli và đồng tác giả, 2006; Kawakami và đồng tác giả, 2006; Ross và đồng tác giả, 2003, tất cả được đưa vào đây để tham chiếu. Ví dụ như, các mức độ cao của các xytokin dễ viêm, gồm TNF- α , interferon- γ , và IL-6, liên quan đến bệnh tâm thần trầm trọng (Dickerson và đồng tác giả, 2007). Tiểu thần kinh đệm hoạt hóa cũng có liên quan đến bệnh tâm thần trầm trọng. Do vậy, sự điều chỉnh giảm các xytokin dễ viêm và ức chế sự hoạt hóa quá mức của tiểu thần kinh đệm có thể có lợi ở những người bệnh có bệnh tâm thần phân liệt, trầm cảm trầm trọng, rối loạn chức năng lưỡng cực, các rối loạn phổ tự kỷ, và các rối loạn tâm thần kinh khác.

Theo đó, ở các bệnh lý liên quan đến riêng ứng suất oxy hóa hoặc ứng suất oxy hóa bị gây trầm trọng bởi chứng viêm, việc điều trị có thể bao gồm sử dụng cho chủ thể một lượng hiệu quả trị bệnh của hợp chất theo sáng chế này, chẳng hạn như các hợp chất được mô tả trên đây hoặc trong suốt bản mô tả này. Việc điều trị có thể được thực hiện để phòng ngừa, trước sự phát triển của trạng thái có thể dự đoán của ứng suất oxy hóa (ví dụ như, cấy ghép cơ quan hoặc sử dụng liệu pháp bức xạ cho người mắc bệnh ung thư), hoặc nó có thể được sử dụng trong điều trị bệnh trong các ngữ cảnh liên quan đến ứng suất oxy hóa được thiết lập và chứng viêm. Theo một số phương án, khi hợp chất theo sáng chế này được sử dụng để điều trị người bệnh tiếp nhận liệu pháp bức xạ và/hoặc hóa học trị liệu, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng trước, đồng thời, và/hoặc sau khi bức xạ hoặc hóa học trị liệu, hoặc hợp chất có thể được sử dụng kết hợp với các liệu pháp khác. Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế có thể phòng ngừa và/hoặc hạn chế sự nghiêm trọng của các tác dụng phụ liên quan đến liệu pháp bức xạ hoặc hóa học trị liệu (sử dụng một tác nhân khác) mà không làm giảm các tác dụng chống ung thư của liệu pháp bức xạ hoặc hóa học trị liệu. Do các tác dụng phụ này có thể giới hạn liều lượng cho liệu pháp bức xạ và/hoặc hóa học trị liệu, theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế này có thể được sử dụng để cho phép định liều thường xuyên hơn và/hoặc cao hơn liệu pháp bức xạ và/hoặc hóa học trị liệu, ví dụ như, mang lại hiệu quả điều trị lớn hơn. Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế khi được sử dụng kết hợp với liệu pháp bức xạ và/hoặc hóa học trị liệu có thể nâng cao tính hiệu quả của liều bức xạ đã định và/hoặc hóa học trị liệu. Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế khi được sử dụng kết hợp với liệu pháp bức xạ và/hoặc hóa học trị liệu có thể nâng cao tính hiệu quả của

liều bức xạ đã định và/hoặc hóa học trị liệu và hạn chế (hoặc, ở mức tối thiểu, không thêm vào) các tác dụng phụ của bức xạ và/hoặc hóa học trị liệu. Theo một số phương án, và không bị ràng buộc bởi lý thuyết, hiệu quả kết hợp này có thể là do sự ức chế hoạt tính của yếu tố gây viêm phiên mã NF- κ B bởi hợp chất theo sáng chế. NF- κ B thường được hoạt hóa mãn tính trong các tế bào ung thư, và hoạt hóa này liên quan đến sự kháng lại liệu pháp và thúc đẩy sự tiến triển của khối u (ví dụ như, Karin, 2006; Aghajan và đồng tác giả, 2012). Các yếu tố phiên mã khác mà thúc đẩy chứng viêm và ung thư, chẳng hạn như STAT3 (ví dụ như, He và Karin 2011; Grivennikov và Karin, 2010), cũng có thể được ức chế bởi hợp chất theo sáng chế theo một số phương án.

RTA 408 có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa các điều kiện dễ viêm, chẳng hạn như nhiễm trùng, chứng viêm da, bệnh tự miễn dịch, và bệnh viêm khớp xương mãn tính. RTA 408 cũng có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa đau dễ viêm và/hoặc đau do căn nguyên thần kinh, ví dụ như, bằng cách gây cảm ứng Nrf2 và/hoặc ức chế NF- κ B.

RTA 408 cũng có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh, chẳng hạn như ung thư, chứng viêm, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh đa xơ cứng, chứng tự kỷ, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ, bệnh Huntington, các bệnh tự miễn dịch, chẳng hạn như viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh Crohn, và bệnh vẩy nến, bệnh viêm ruột, tất cả các bệnh khác mà sự phát sinh bệnh được cho là liên quan đến tạo ra thừa oxit nitric hoặc các prostaglandin, và các bệnh lý liên quan đến riêng ứng suất oxy hóa hoặc ứng suất oxy hóa bị gây trầm trọng bởi chứng viêm. RTA 408 có thể được sử dụng trong điều trị và phòng ngừa các bệnh ung thư gồm ung thư biểu mô, bệnh sacôm, u lym phô, bệnh bạch cầu, u melanin, u trung biểu mô, đau tủy, hoặc u tinh, hoặc ung thư bàng quang, máu, xương, não, vú, hệ thần kinh trung ương, cổ tử cung, ruột kết, màng trong dạ con, thực quản, túi mật, cơ quan sinh dục ngoài, ống cơ quan sinh dục nội, đầu, thận, thanh quản, gan, phổi, mô cơ, cổ, niêm mạc miệng hoặc mũi, buồng trứng, tuyến tụy, tuyến tiền liệt, da, lá lách, ruột non, ruột già, dạ dày, bộ tinh hoàn, hoặc tuyến giáp.

Một khía cạnh khác của chứng viêm là việc tạo ra các prostaglandin dễ viêm, chẳng hạn như prostaglandin E. RTA 408 có thể được sử dụng để thúc đẩy sự giãn mạch máu, sự tràn huyết tương, đau cục bộ, nhiệt độ cao, và các triệu chứng khác của chứng viêm. Dạng cảm ứng được của enzym COX-2 liên quan đến việc tạo ra chúng,

và các mức độ cao của COX-2 được tìm thấy trong các mô bị viêm. Do vậy, sự ức chế COX-2 có thể làm dịu nhiều triệu chứng của chứng viêm và một số thuốc chống viêm quan trọng (ví dụ như, ibuprofen và celecoxib) hoạt động bằng cách ức chế hoạt tính COX-2. Điều đã được thấy rõ là một nhóm các prostaglandin xyclopentenon (các cyPG) (ví dụ như, 15-deoxy prostaglandin J₂, cũng được biết đến là PGJ₂) đóng vai trò trong việc kích thích làm tiêu tan có sắp đặt chứng viêm (ví dụ như, Rajakariar và đồng tác giả, 2007). COX-2 cũng liên quan đến việc tạo ra các prostaglandin xyclopentenon. Do vậy, sự ức chế COX-2 có thể gây trở ngại cho việc làm tiêu tan hoàn toàn chứng viêm, có khả năng thúc đẩy sự dai dẳng của các tế bào miễn dịch hoạt hóa trong các mô và dẫn đến mãn tính, chứng viêm “âm ỉ”. Tác động này có thể chịu trách nhiệm làm tăng tỷ lệ mắc mới của bệnh tim mạch ở người bệnh sử dụng các chất ức chế COX-2 chọn lọc trong các khoảng thời gian dài.

Theo một khía cạnh, RTA 408 có thể được sử dụng để kiểm soát việc tạo ra các xytokin gây viêm trong tế bào bằng cách hoạt hóa có chọn lọc các cận xystein điều chỉnh (các RCR) lên các protein điều chỉnh hoạt tính của các yếu tố phiên mã nhạy oxy hóa khử. Sự hoạt hóa của các RCR bằng các cyPG đã được biểu hiện là khởi đầu một chương trình gây tiêu tan trong đó hoạt tính của yếu tố phiên mã bảo vệ tế bào và chống oxy hóa Nrf2 có khả năng được gây cảm ứng và các hoạt tính của các yếu tố phiên mã gây viêm và gây oxy hóa NF- κ B và các STAT bị ngăn chặn. Theo một số phương án, RTA 408 có thể được sử dụng để tăng sự tạo ra các phân tử khử và chống oxy hóa (NQO1, HO-1, SOD1, γ -GCS) và giảm ứng suất oxy hóa và sự tạo ra các phân tử gây viêm và gây oxy hóa (iNOS, COX-2, TNF- α). Theo một số phương án, RTA 408 có thể được sử dụng để làm cho các tế bào làm chủ biến cố dễ viêm trở lại trạng thái không dễ viêm bằng cách thúc đẩy sự làm tiêu tan chứng viêm và giới sự hư hỏng mô quá mức ở vật chủ.

A. Ung thư

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng gây cảm ứng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình ở các khối u tế bào, gây ra sự biệt hóa tế bào, để ức chế sự phát triển tế bào ung thư, để ức chế phản ứng dễ viêm, và/hoặc thực hiện chức năng trong khả năng phòng ngừa bằng kích thích hóa học. Ví dụ như, sáng chế đề xuất các hợp chất dạng đa

hình mới có một hoặc nhiều tính chất sau: (1) khả năng gây cảm ứng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình và khu biệt cả các tế bào ác tính và không ác tính, (2) hoạt tính ở các mức độ nano mol hoặc dưới nano mol với vai trò là chất ức chế sự phát triển của nhiều tế bào ác tính hoặc tiền ác tính, (3) khả năng ngăn chặn sự tổng hợp mới men tổng hợp oxyt nitric cảm ứng (iNOS) enzyme dễ viêm, (4) khả năng ức chế NF- κ B hoạt hóa, và (5) khả năng gây ra biểu hiện của heme oxygenaza-1 (HO-1).

Các mức độ của iNOS và COX-2 được nâng cao ở các bệnh ung thư nhất định và liên quan đến chất gây ung thư và các chất ức chế COX-2 đã được thể hiện để hạn chế tỷ lệ mắc mới u tuyến đại tràng nguyên phát ở người (Rostom và đồng tác giả, 2007; Brown và DuBois, 2005; Crowel và đồng tác giả, 2003). iNOS được biểu hiện ở các tế bào ngăn chặn có nguồn gốc dạng tủy (các MDSC) (Angulo và đồng tác giả, 2000) và hoạt tính COX-2 trong các tế bào ung thư đã được biểu hiện là dẫn đến sự tạo ra prostaglandin E₂ (PGE₂), đã được thể hiện là gây ra biểu hiện của arginaza ở các MDSC (Sinha và đồng tác giả, 2007). Arginaza và iNOS là các enzym sử dụng L-arginin làm nền và tương ứng tạo ra L-ornithin và urê, và L-xitrulin và NO. Sự làm tiêu arginin từ môi trường nhỏ của khối u bởi các MDSC, kết hợp với việc tạo ra NO và peroxynitrit đã được biểu hiện là ức chế sự phát triển và gây cảm ứng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình của các tế bào T (Bronte và đồng tác giả, 2003). Sự ức chế COX-2 và iNOS đã được biểu hiện là hạn chế sự tích lũy các MDSC, thu hồi hoạt tính gây độc cho tế bào của các tế bào T liên quan đến khối u, và làm chậm sự phát triển khối u (Sinha và đồng tác giả, 2007; Mazzoni và đồng tác giả, 2002; Zhou và đồng tác giả, 2007).

Sự ức chế NF- κ B và các con đường tín hiệu JAK/STAT liên quan đến chiến lược ức chế sự phát triển của các tế bào biểu mô ung thư và gây cảm ứng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình. Sự hoạt hóa của STAT3 và NF- κ B đã được biểu hiện là dẫn đến ngăn chặn cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong các tế bào ung thư, và thúc đẩy sự phát triển, sự xâm lấn, và sự di căn. Nhiều trong số các gien đích liên quan đến các quy trình này đã được thể hiện là được điều chỉnh phiên mã bởi cả NF- κ B và STAT3 (Yu và đồng tác giả, 2007).

Ngoài vai trò trực tiếp của chúng trong các tế bào biểu mô ung thư ra, NF- κ B và STAT3 cũng có các vai trò quan trọng trong các tế bào khác được tìm thấy trong môi trường nhỏ của khối u. Các thí nghiệm ở các mẫu con vật đã chứng tỏ rằng cần có

NF- κ B trong cả các tế bào ung thư và các tế bào tạo máu để truyền các tác động của chúng viêm đến sự khởi đầu và tiến triển của ung thư (Greten và đồng tác giả, 2004). Sự ức chế NF- κ B ở các tế bào tủy và ung thư tương ứng làm giảm số lượng và kích cỡ của các khối u tạo thành. Sự hoạt hóa của STAT3 trong các tế bào ung thư dẫn đến sự tạo ra một vài xytokin (IL-6, IL-10) ngăn chặn sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai liên quan đến khối u (DC). Hơn nữa, STAT3 được hoạt hóa bởi các xytokin này ở chính các tế bào đuôi gai. Sự ức chế STAT3 ở các mẫu chuột nhắt ung thư phụ hồi sự trưởng thành DC, thúc đẩy sự miễn dịch chống khối u, và ức chế sự phát triển khối u (Kortylewski và đồng tác giả, 2005). Theo một số phương án, RTA 408 và các hợp chất dạng đa hình của nó có thể được sử dụng để điều trị ung thư, gồm, ví dụ như, ung thư tuyến tiền liệt. Theo một số phương án, RTA 408 và các hợp chất dạng đa hình của nó có thể được sử dụng trong một liệu pháp kết hợp để điều trị ung thư gồm, ví dụ như, ung thư tuyến tiền liệt. Xem, ví dụ như, Ví dụ H dưới đây.

B. Bệnh đa xơ cứng và các tình trạng thoái hóa thần kinh khác

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng để điều trị người bệnh mắc bệnh đa xơ cứng (MS) hoặc các trạng thái thoái hóa thần kinh khác, chẳng hạn như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, hoặc bệnh xơ cứng cột bên teo cơ. MS được biết đến là một trạng thái dễ viêm của hệ thần kinh trung ương (Williams và đồng tác giả, 1994; Merrill và Benvenist, 1996; Genain và Nauser, 1997). Dựa trên một vài nghiên cứu, dấu hiệu chỉ ra rằng các cơ chế miễn dịch và/hoặc dễ viêm, oxy hóa liên quan đến sự phát sinh bệnh Alzheimer (AD), bệnh Parkinson (PD), bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (ALS), và MS (Bagasra và đồng tác giả, 1995; McGeer và McGeer, 1995; Simonian và Coyle, 1996; Kaltschmidt và đồng tác giả, 1997). Dữ liệu dịch tễ học biểu thị rằng việc sử dụng mãn tính các NSAID mà ngăn chặn sự tổng hợp các prostaglandin từ arachidonat, một cách rõ rệt làm giảm rủi ro phát triển AD (McGeer và đồng tác giả, 1996; Stewart và đồng tác giả, 1997). Do đó, các tác nhân ngăn chặn sự tạo thành NO và các prostaglandin, có thể được sử dụng trong các phương thức phòng ngừa và điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh. Các ứng viên trị bệnh thành công để điều trị bệnh này thường đòi hỏi khả năng thâm nhập vào vách ngăn máu não. Xem, ví dụ như, Công bố Patent Mỹ 2009/0060873 được đưa vào đây để tham chiếu.

C. Chứng viêm thần kinh

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc chứng viêm thần kinh. Chứng viêm thần kinh tóm lược ý tưởng rằng các phản ứng và hoạt động của tiểu thần kinh đệm và tế bào hình sao trong hệ thần kinh trung ương về cơ bản có đặc điểm như chứng viêm, và các phản ứng này chủ yếu tập trung vào việc phát sinh bệnh và làm tiến triển một loạt các rối loạn chức năng hệ thần kinh. Các ý tưởng này đã được mở rộng từ bệnh Alzheimer đến các bệnh thoái hóa thần kinh khác (Eikelenboom và đồng tác giả, 2002; Ishizawa và Dickson, 2001), đến các bệnh gây độc/thiếu máu cục bộ (Gehrmann và đồng tác giả, 1995; Touzani và đồng tác giả, 1999), đến sinh học khối u (Graeber và đồng tác giả, 2002) và thậm chí đến sự phát triển não thông thường. Chứng viêm thần kinh kết hợp một loại các phản ứng tế bào phức tạp gồm sự hoạt hóa của tiểu thần kinh đệm và các tế bào hình sao và gây cảm ứng các xytokin, chemokin, protein bổ sung, protein pha cấp tính protein, chấn thương gây oxy hóa, và các quy trình phân tử có liên quan, và các biến cố có thể có các tác động có hại đến chức năng neuron tế bào thần kinh, dẫn đến chấn thương neuron tế bào thần kinh, tiếp tục hoạt hóa thần kinh đệm, và cuối cùng là thoái hóa thần kinh.

D. Bệnh thận

Theo một số phương án, RTA 408, cũng như các hợp chất dạng đa hình của chúng, có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc các bệnh thận và các rối loạn chức năng, gồm suy thận và bệnh thận mãn tính (CKD), dựa trên, ví dụ như, các phương pháp được bộc lộ bởi US 8,129,429, được đưa vào đây để tham chiếu. Suy thận, dẫn đến thanh thải không phù hợp các phế phẩm chuyển hóa từ máu và các nồng độ bất thường của các chất điện phân trong máu, là một vấn đề y học quan trọng trên toàn thế giới, đặc biệt là ở các nước phát triển. Bệnh đái tháo đường và chứng tăng huyết áp nằm trong số các nguyên nhân quan trọng gây ra suy thận mãn tính, cũng được biết đến là bệnh thận mãn tính (CKD), nhưng nó cũng liên quan đến các trạng thái khác chẳng hạn như bệnh luput. Suy thận cấp tính có thể phát sinh từ sự phơi nhiễm các thuốc nhất định (ví dụ như, acetaminophen) hoặc các hóa chất độc hại, hoặc từ chứng thiếu máu cục bộ-thương tổn tái thông máu liên quan đến trạng thái sốc hoặc các thủ tục phẫu thuật chẳng hạn như cấy ghép, và có thể dẫn đến suy thận mãn tính. Ở nhiều người bệnh, suy thận tiến triển đến giai đoạn mà người bệnh cần thẩm tách thường

xuyên hoặc ghép thận để tiếp tục sống. Cả hai thủ tục này mang tính xâm lấn cao và liên quan đến các tác dụng phụ đáng kể và chất lượng của các vấn đề sống. Mặc dù có các cách điều trị hiệu quả một số biến chứng suy thận, chẳng hạn như cường cận giáp và tăng phosphat huyết, không có cách điều trị nào đã được biểu hiện là tạm ngừng hoặc đảo ngược sự tiến triển ngầm của suy thận. Do đó, các tác nhân có thể cải thiện chức năng thận bị tổn hại thể hiện sự tiến bộ đáng kể trong việc điều trị suy thận.

Chứng viêm góp phần đáng kể vào bệnh lý học của CKD. Cũng có sự liên kết cơ giới mạnh giữa ứng suất oxy hóa và hoạt động khác thường của thận. Con đường tín hiệu NF- κ B đóng vai trò quan trọng trong sự tiến triển của CKD do NF- κ B điều chỉnh phiên mã của MCP-1, một chemokin chịu trách nhiệm bổ sung các bạch cầu đơn nhân/các đại thực bào dẫn đến phản ứng dễ viêm mà cuối cùng là làm tổn thương thận (Wardle, 2001). Con đường Keap1/Nrf2/ARE kiểm soát phiên mã của một vài gen mã hóa các enzym chống oxy hóa, gồm heme oxygenaza-1 (HO-1). Sự cắt bỏ gen Nrf2 ở chuột nhất cái dẫn đến sự phát triển của viêm cầu thận giống như bệnh luput (Yoh và đồng tác giả, 2001). Hơn nữa, một vài nghiên cứu đã chứng tỏ rằng biểu hiện HO-1 được gây ra phản ứng lại sự hủy hoại thận và chứng viêm và enzym này và các sản phẩm của nó – sắc tố mật và cacbon monoxit – đóng vai trò bảo vệ trong thận (Nath và đồng tác giả, 2006).

Tổn thương thận cấp tính (AKI) có thể xảy ra theo sau chứng thiếu máu cục bộ-tái thông máu, việc điều trị bằng các dược lý nhất định, chẳng hạn như xisplatin và rapamycin, và trong tĩnh mạch tiêm thuốc cản quang tiêm tĩnh mạch được sử dụng trong chiếu chụp y học. Như ở CKD, chứng viêm và ứng suất oxy hóa góp phần vào bệnh lý học AKI. Các cơ chế phân tử nằm dưới bệnh thận gây cảm ứng bởi thuốc cản quang (RCN) không được hiểu rõ; tuy nhiên, có thể là sự kết hợp các biến cố gồm sự co mạch kéo dài, sự tự điều chỉnh thận hư, và độc tính trực tiếp của thuốc cản quang tất cả góp phần vào việc gây ra suy thận (Tumlin và đồng tác giả, 2006). Sự co mạch dẫn đến sự giảm lưu lượng dòng máu thận và gây ra chứng thiếu máu cục bộ-tái thông máu và tạo ra các loại khí oxy phản ứng. HO-1 bị gây cảm ứng mạnh trong các trạng thái này và đã được chứng tỏ là ngăn ngừa chứng thiếu máu cục bộ-thương tổn tái thông máu ở một vài cơ qua khác nhau, gồm thận (Nath và đồng tác giả, 2006). Cụ thể, việc gây cảm ứng HO-1 đã được biểu hiện là có khả năng bảo vệ ở mẫu chuột cống RCN (Goodman và đồng tác giả, 2007). Sự tái thông máu cũng gây ra phản ứng

đề viêm, phần nào thông qua sự hoạt hóa tín hiệu NF- κ B (Nichols, 2004). Xác định mục tiêu NF- κ B được đề xuất là chiến lược điều trị để phòng ngừa sự hư hỏng cơ quan (Zingarelli và đồng tác giả, 2003).

E. Bệnh tim mạch

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc bệnh tim mạch. Nguyên nhân gây bệnh CV là phức tạp, nhưng phần lớn các nguyên nhân liên quan đến việc cung cấp không đủ hoặc hoàn toàn đứt đoạn máu đến một cơ quan xung yếu hoặc mô. Thông thường, trạng thái này phát sinh từ sự thoát vị của một hoặc nhiều mảng xơ vữa, điều này dẫn đến sự tạo thành cục nghẽn ngăn chặn lưu lượng dòng máu trong một mạch xung yếu.

Ở một số tỷ lệ mắc mới, chứng xơ vữa động mạch cũng có thể mở rộng ở các mạch máu xung yếu mà chứng hẹp (làm hẹp các động mạch) phát triển và lưu lượng dòng máu đến các cơ quan xung yếu (gồm tim) không đủ mãn tính. Chứng thiếu máu cục bộ mãn tính này có thể dẫn đến sự hư hỏng bộ phận cuối dây thần kinh cảm giác thuộc nhiều loại, gồm chứng tim to liên quan đến suy tim xung huyết.

Chứng xơ vữa động mạch, khuyết tật tiềm ẩn dẫn đến nhiều dạng bệnh tim mạch, xảy ra khi một khuyết tật cơ thể hoặc chấn thương đối với lớp lót (màng trong) của động mạch khởi phát một phản ứng đề viêm liên quan đến sự phát triển của tế bào cơ mềm khác nhau của các mạch máu và sự thâm nhiễm của các bạch cầu vào khu vực bị ảnh hưởng. Cuối cùng là, một tổn thương phức tạp được biết đến là một mảng xơ vữa có thể tạo ra, gồm các tế bào nêu trên kết hợp với các chất lắng đọng của các lipoprotein mang cholesterol và các chất khác (ví dụ như, Hansson và đồng tác giả, 2006). Mặc dù các lợi ích đáng kể của các phương pháp điều trị bệnh hiện tại mang lại, tình trạng tử vong do bệnh tim mạch vẫn giữ mức cao và các nhu cầu không được thỏa mãn đáng kể trong điều trị bệnh tim mạch vẫn còn nguyên.

Việc gây cảm ứng HO-1 đã được biểu hiện là có lợi cho một loạt các mẫu của bệnh tim mạch, và các mức độ thấp của Biểu hiện HO-1 tương quan lâm sàng với rủi ro cao của bệnh CV. RTA 408, các hợp chất dạng đa hình và các phương pháp theo sáng chế, do vậy, có thể được sử dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa nhiều rối loạn chức năng tim mạch khác nhau gồm nhưng không giới hạn ở chứng xơ vữa động mạch, chứng tăng huyết áp, nhồi máu cơ tim, chứng suy tim mãn tính, đột quỵ, xuất

huyết dưới màng nhện, và chứng tái phát hẹp. Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình và các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng làm liệu pháp kết hợp với các liệu pháp điều trị bệnh tim mạch đã biết khác chẳng hạn như nhưng không giới hạn ở các chất kháng đông, các thuốc làm tan huyết khối, streptokinaza, các chất hoạt hóa plasminogen mô, phẫu thuật, phẫu thuật bắc cầu động mạch vành, tạo hình động mạch bằng bóng, sử dụng các stent, các thuốc ức chế sự phát triển tế bào, hoặc các thuốc làm giảm mức độ cholesteol.

F. Bệnh đái tháo đường

Theo một số phương án, RTA 408, cũng như các hợp chất dạng đa hình của chúng, có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc bệnh đái tháo đường, dựa trên, ví dụ như, các phương pháp được bộc lộ bởi US 8,129,429, được đưa vào đây để tham chiếu. Bệnh đái tháo đường là loại bệnh phức tạp đặc trưng bởi việc cơ thể không điều chỉnh được các mức độ lưu thông glucoza. Điều này có thể là do thiếu insulin, hoocmon peptit mà điều chỉnh cả sự tạo ra và sự hấp thụ glucoza ở các mô khác nhau. Thiếu hụt insulin gây hại cho khả năng của cơ bắp, mỡ, và các mô khác trong việc hấp thụ thích hợp glucoza, dẫn đến chứng tăng đường huyết (các mức độ cao bất thường của glucoza trong máu). Thông thường nhất là, sự thiếu hụt insulin này là do sự tạo ra không đủ các tế bào đảo của tuyến tụy. Trong đa số trường hợp, điều này phát sinh từ sự phá hủy tự miễn dịch của các tế bào này, một trạng thái được biết đến là tít 1 hoặc bệnh đái tháo đường tấn công thanh thiếu niên, nhưng cũng có thể là do thương tổn thể chất hoặc nguyên nhân khác nào đó.

Bệnh đái tháo đường cũng có thể phát sinh khi cơ bắp và các tế bào mỡ trở nên ít phản ứng hơn với insulin và không hấp thụ glucoza một cách thích hợp, dẫn đến chứng tăng đường huyết. Hiện tượng này được biết đến là kháng insulin, và trạng thái kéo theo được biết đến là tít 2 bệnh đái tháo đường. Bệnh đái tháo đường tít 2, loại thông thường nhất, rất có liên quan đến chứng béo phì và chứng tăng huyết áp. Chứng béo phì liên quan đến tình trạng dễ viêm của mô mỡ mà được cho là đóng vai trò chính trong sự phát triển khả năng kháng insulin (ví dụ như, Hotamisligil, 2006; Guilherme và đồng tác giả, 2008).

Bệnh đái tháo đường liên quan đến sự hư hỏng đối với nhiều mô, phần lớn là do chứng tăng đường huyết (và giảm đường huyết, có thể là do các liều lượng insulin định thời kém hoặc quá mức) là nguồn ứng suất oxy hóa đáng kể. Do chúng có khả năng

bảo vệ chống lại sự ứng suất oxy hóa, cụ thể là bằng cách gây ra biểu hiện HO-1, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng để điều trị nhiều biến chứng của bệnh đái tháo đường. Như lưu ý trên đây (Cai và đồng tác giả, 2005), chứng viêm mãn tính và ứng suất oxy hóa trong gan bị nghi ngờ là các yếu tố góp phần chính trong sự phát triển của bệnh đái tháo đường type 2. Hơn nữa, các cơ chủ vận PPAR γ chẳng hạn như các thiazolidindion có khả năng hạn chế sự kháng insulin và được biết là các cách điều trị hiệu quả cho bệnh đái tháo đường type 2. Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng làm các liệu pháp kết hợp với các cơ chủ vận PPAR γ chẳng hạn như các thiazolidindion.

G. Chứng viêm khớp

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc một dạng chứng viêm khớp. Theo một số phương án, các dạng của chứng viêm khớp mà có thể được điều trị bằng RTA 408 và các hợp chất dạng đa hình theo sáng chế này là viêm khớp dạng thấp (RA), chứng viêm khớp vẩy nến (PsA), các bệnh lý cột sống (SpAs) gồm viêm cứng khớp đốt sống (dưới dạng), chứng viêm khớp phản ứng (ReA), và viêm đường ruột (EA), viêm khớp dạng thấp ở thanh thiếu niên (JRA), và chứng viêm khớp dễ viêm sớm.

Đối với viêm khớp dạng thấp, các dấu hiệu đầu tiên thường xuất hiện ở lớp lót hoạt dịch, với sự phát triển của các nguyên bào sợi màng hoạt dịch và phần gắn vào mặt khớp của chúng ở rìa khớp (Lipsky, 1998). Sau đó, các đại thực bào, các tế bào T và các tế bào dễ viêm khác được bổ sung vào khớp, ở đó chúng tạo ra một số chất môi giới, gồm các cytokine interleukin-1 (IL-1), góp phần vào di chứng mãn tính dẫn đến phá hủy sụn và xương, và yếu tố hoại tử khối u (TNF- α), đóng vai trò trong chứng viêm (Dinarello, 1998; Arend và Dayer, 1995; van den Berg, 2001). Nồng độ của IL-1 trong huyết tương cao hơn đáng kể ở người bệnh mắc RA so với người khỏe mạnh và, đáng lưu ý là, các mức độ huyết tương IL-1 có tương quan với hoạt tính của bệnh RA (Eastgate và đồng tác giả, 1988). Ngoài ra, các mức độ chất lỏng hoạt dịch IL-1 có tương quan với các đặc tính mô học và chụp tia X khác nhau của RA (Kahle và đồng tác giả, 1992; Rooney và đồng tác giả, 1990).

Các dạng khác nhau của chứng viêm khớp gồm chứng viêm khớp vảy nến (PsA), là một bệnh khớp dễ viêm mãn tính đặc trưng bởi sự liên quan của chứng viêm khớp và bệnh vảy nến. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng PsA có chung một số đặc tính lâm sàng, gây bệnh và di truyền với các bệnh lý cột sống (các SpA), một nhóm các bệnh bao gồm viêm cứng khớp đốt sống, chứng viêm khớp phản ứng và viêm đường ruột (Wright, 1979). Quan niệm rằng PsA thuộc về nhóm SpA gần đây đã làm tăng thêm sự ủng hộ từ các nghiên cứu chiếu chụp chứng tỏ viêm chỗ bám gân lan rộng ở PsA nhưng không lan rộng ở RA (McGonagle và đồng tác giả, 1999; McGonagle và đồng tác giả, 1998). Cụ thể hơn, viêm chỗ bám gân được cho là là một trong những biến cố sớm nhất xảy ra trong các SpA, dẫn đến sự tổ chức lại xương và chứng cứng khớp ở xương sống, cũng như gây ra viêm màng hoạt dịch khớp khi các bộ phận giả bị sưng tấy gần với các khớp ngoại biên. Lượng TNF- α tăng lên được thể hiện ở cả da bị vảy nến (Ettehadi và đồng tác giả, 1994) và chất lỏng hoạt dịch (Partsch và đồng tác giả, 1997). Các thử nghiệm gần đây đã cho thấy lợi ích tích cực của việc điều trị kháng TNF ở cả PsA (Mease và đồng tác giả, 2000) và viêm cứng khớp đốt sống (Brandt và đồng tác giả, 2000).

Viêm khớp dạng thấp ở thanh thiếu niên (JRA), một thuật ngữ cho dạng phổ biến nhất của chứng viêm khớp ở trẻ em, được áp dụng cho gia đình có các bệnh đặc trưng bởi chứng viêm mãn tính và sự phình trương của các màng hoạt dịch. Thuật ngữ chồng chéo, nhưng không hoàn toàn đồng nghĩa, với gia đình có các bệnh được gọi là chứng viêm mãn tính khớp ở thanh thiếu niên và/hoặc chứng viêm khớp tự phát ở thanh thiếu niên ở Châu Âu.

JRA viêm đa khớp là một loại lâm sàng phụ khác biệt đặc trưng bởi chứng viêm và sự phát triển hoạt dịch ở nhiều khớp (bốn khớp hoặc nhiều hơn), gồm các khớp nhỏ của các bàn tay (Jarvis, 2002). Loại JRA phụ này có thể là nghiêm trọng, do liên quan đến nhiều khớp và khả năng tiến nhanh của nó qua thời gian. Mặc dù khác biệt về mặt lâm sàng, JRA viêm đa khớp không đồng nhất, và người bệnh thể hiện sự khác nhau trong các biểu hiện bệnh, độ tuổi bị tấn công, tiên lượng bệnh, và phản ứng trị liệu. Những khác biệt này rất có thể phản ánh nhiều thay đổi trong tính chất miễn dịch và tấn công gây viêm có thể xảy ra trong bệnh này (Jarvis, 1998).

Viêm cứng khớp đốt sống (AS) là một tập hợp con của bệnh trong phân loại bệnh rộng hơn của bệnh lý cột sống. Người bệnh bị tác động bởi các tập con khác nhau

của bệnh lý cột sống có các căn bệnh học thường rất khác nhau, từ sự nhiễm khuẩn cho đến sự di truyền. Tuy nhiên, trong tất cả các phân nhóm, kết quả cuối cùng của quy trình bệnh là chứng viêm khớp trục.

AS là một rối loạn chức năng thấp khớp dễ viêm toàn thân mãn tính của bộ xương trục có hoặc không có các biểu hiện ngoài xương. Các khớp cùng chậu và xương sống bị tác động chủ yếu, nhưng các khớp hông và vai, và ít thông thường hơn là các khớp ngoại biên hoặc các cấu trúc ngoài khớp, chẳng hạn như mắt, hệ mạch, hệ thần kinh, và hệ dạ dày ruột non cũng có thể có liên quan. Căn bệnh học của bệnh chưa được hiểu đầy đủ (Wordsworth, 1995; Calin và Taurog, 1998). Căn bệnh học rất liên quan đến nhóm tương hợp mô chính I (MHC I) HLA-B27 alen (Calin và Taurog, 1998). AS tác động đến các cá thể trong thời kỳ đầu tiên trong cuộc đời của họ và đáng sợ bởi vì nó có khả năng gây đau mãn tính và gây hư hại không thể thu hồi gân, dây chằng, khớp, và xương (Brewerton và đồng tác giả, 1973a; Brewerton và đồng tác giả, 1973b; Schlosstein và đồng tác giả, 1973).

H. Viêm loét đại tràng

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc viêm loét đại tràng. Viêm loét đại tràng là bệnh gây ra chứng viêm và đau đớn, được gọi là các vết loét, trong lớp lót của ruột già. Chứng viêm thường diễn ra trong ruột thẳng và phần dưới của ruột kết, nhưng nó có thể ảnh hưởng đến toàn bộ ruột kết. Viêm loét đại tràng cũng có thể được gọi là viêm ruột kết hoặc viêm ruột thẳng. Chứng viêm làm cho ruột kết thường xuyên trống rỗng, gây ra tiêu chảy. Các vết loét tạo thành ở những nơi mà chứng viêm diệt các tế bào lót ruột kết và các vết loét chảy máu và tạo ra mủ.

Viêm loét đại tràng là bệnh viêm ruột (IBD), tên chung cho các bệnh gây ra chứng viêm trong ruột non và ruột kết. Viêm loét đại tràng có thể khó chẩn đoán do các triệu chứng tương tự với các rối loạn chức năng trong ruột khác và với một loại IBD, bệnh Crohn. Bệnh Crohn khác với viêm loét đại tràng bởi vì nó làm cho chứng viêm sâu hơn trong thành ruột. Ngoài ra, bệnh Crohn thường diễn ra trong ruột non, mặc dù bệnh cũng có thể diễn ra trong miệng, thực quản, dạ dày, tá tràng, ruột già, ruột thừa, và hậu môn.

I. Bệnh Crohn

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc Bệnh Crohn. Các triệu chứng của bệnh Crohn gồm chứng viêm ruột và sự phát triển của chứng hẹp ruột và các lỗ rò; bệnh thần kinh thường đi kèm các triệu chứng này. Các thuốc chống viêm, chẳng hạn như 5-aminosalicylat (ví dụ như, mesalaphút) hoặc corticosteroid, thường được kê đơn, nhưng không phải lúc nào cũng hiệu quả (được xem trong Botoman và đồng tác giả, 1998). Ức chế miễn dịch bằng cyclosporin đôi khi có lợi cho người bệnh kháng hoặc không chịu được corticosteroid (Brynskov và đồng tác giả, 1989).

Trong các trường hợp hoạt động của bệnh Crohn, các nồng độ cao của TNF- α và IL-6 được tiết vào đường lưu thông máu, và TNF- α , IL-1, IL-6, và IL-8 được sinh ra dư thừa bởi các tế bào qua niêm mạc (id.; Funakoshi và đồng tác giả, 1998). Các cytokin này có thể có các tác dụng sâu rộng đến các hệ sinh lý gồm sự phát triển xương, sự tạo máu, và gan, tuyến giáp, và chức năng tâm thần kinh. Ngoài ra, sự mất cân bằng tỷ lệ IL-1 β /IL-1ra, dẫn đến IL-1 β gây viêm, đã được quan sát thấy ở người bệnh mắc bệnh Crohn (Rogler và Andus, 1998; Saiki và đồng tác giả, 1998; Dionne và đồng tác giả, 1998; nhưng xem Kuboyama, 1998).

Các phương thức điều trị đã được đề xuất cho bệnh Crohn gồm việc sử dụng các cơ đối vận cytokin khác nhau (ví dụ như, IL-1ra), các chất ức chế (ví dụ như, của enzym chuyển hóa IL-1 β và các chất chống oxy hóa) và các kháng thể kháng cytokin (Rogler và Andus, 1998; van Hogezaand và Verspaget, 1998; Reimund và đồng tác giả, 1998; Lugerling và đồng tác giả, 1998; McAlindon và đồng tác giả, 1998). Cụ thể, các kháng thể đơn bào chống lại TNF- α đã được thử với thành công nhất định trong việc điều trị Crohn (Targan và đồng tác giả, 1997; Stack và đồng tác giả, 1997; van Dullemen và đồng tác giả, 1995). Các hợp chất này có thể được sử dụng trong liệu pháp kết hợp với RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này.

J. Luput Ban đỏ Toàn thân

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc SLE. Luput

Ban đỏ Toàn thân (SLE) là bệnh thấp khớp tự miễn dịch đặc trưng bởi chất lắng đọng trong các mô của các kháng thể tự động và các phức hợp miễn dịch dẫn đến tổn thương mô (Kotzin, 1996). Ngược lại với các bệnh tự miễn dịch, chẳng hạn như MS và bệnh đái tháo týp 1, SLE có khả năng liên quan đến nhiều hệ thống cơ quan một cách trực tiếp, và các biểu hiện lâm sàng của nó là đa dạng và có thể thay đổi (được xem xét bởi Kotzin và O'Dell, 1995). Ví dụ như, một số người bệnh có thể biểu hiện chứng phát ban chủ yếu ở da và đau khớp, thể hiện sự thuyên giảm tự phát, và cần ít thuốc. Ở đầu ngược lại là những người bệnh mà biểu hiện sự liên quan đến bệnh thận nặng và tiến triển cần liệu pháp với các liều lượng steroid cao và các thuốc gây độc cho tế bào chẳng hạn như xyclophosphamit (Kotzin, 1996).

Một trong các kháng thể được tạo ra bởi SLE, IgG anti-dsDNA, đóng vai trò chính trong sự phát triển của bệnh viêm cầu thận luput (GN) (Hahn và Tsao, 1993; Ohnishi và đồng tác giả, 1994). Bệnh viêm cầu thận là trạng thái nghiêm trọng trong đó trong đó các thành mao mạch của cuộn tiểu cầu lọc máu của thận trở nên dày do sự lớn dần lên ở phía biểu mô của các màng đáy cầu thận. Bệnh thường là mãn tính và tiến triển và cuối cùng có thể dẫn đến suy thận.

K. Hội chứng co thắt ruột kết

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc Hội chứng co thắt ruột kết (IBS). IBS là rối loạn chức năng đặc trưng bởi đau bụng và thói quen đi tiêu thay đổi. Hội chứng này có thể bắt đầu ở tuổi trưởng thành còn trẻ và có thể liên quan đáng kể đến sự ốm yếu tàn tật. Hội chứng này không phải là rối loạn chức năng đồng nhất. Đúng hơn, các loại phụ của IBS đã được mô tả dựa trên triệu chứng tiêu chảy, chứng táo bón, hoặc đau dễ nhận thấy nhất. Nếu thiếu các triệu chứng "cảnh báo", chẳng hạn như sốt, sự hao hụt trọng lượng, và chảy máu dạ dày ruột non, cần hạn chế kiểm tra sức khỏe toàn diện.

Càng ngày, dấu hiệu về các nguồn gốc của IBS cho thấy mối quan hệ giữa viêm ruột truyền nhiễm và sự phát triển tiếp theo của IBS. Các xytokin dễ viêm có thể có vai trò trong đó. Trong một cuộc khảo sát người bệnh có tiền sử viêm dạ dày-ruột vi khuẩn được xác nhận (Neal và đồng tác giả, 1997), 25% đã cho thấy sự thay đổi dai dẳng trong thói quen đi tiêu. Sự dai dẳng của các triệu chứng có thể là do căng thẳng tâm lý tại thời điểm nhiễm trùng cấp tính (Gwee và đồng tác giả, 1999).

Dữ liệu gần đây gợi ý rằng sự phát triển quá nhanh của vi khuẩn trong ruột non cũng có thể có vai trò trong các triệu chứng IBS. Trong một nghiên cứu (Pimentel và đồng tác giả, 2000), 157 (78%) trong số 202 người bệnh IBS tham gia kiểm tra thở hydro có các kết quả kiểm tra dương tính do sự phát triển quá nhanh của vi khuẩn. Trong số 47 chủ thể được tiếp tục kiểm tra, 25 (53%) cho thấy sự cải thiện trong các triệu chứng (nghĩa là, đau bụng và tiêu chảy) nhờ điều trị bằng thuốc kháng sinh.

L. Hội chứng Sjögren

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc Hội chứng Sjögren. Hội chứng Sjögren (SS) nguyên phát là mãn tính, tiến triển chậm và là bệnh tự miễn dịch toàn thân ảnh hưởng chủ yếu đến phụ nữ tuổi trung niên (tỷ lệ nữ so với nam là 9:1), mặc dù nó có thể được thấy ở tất cả các lứa tuổi gồm trẻ em (Jonsson và đồng tác giả, 2002). Bệnh đặc trưng bởi sự thâm nhiễm lymphocyte và sự phá hủy các tuyến ngoại tiết, mà bị thâm nhập bởi các tế bào đơn nhân gồm các lymphocyte CD4+, CD8+, và các tế bào B (Jonsson và đồng tác giả, 2002). Ngoài ra, các biểu hiện (toàn thân) ngoại tuyến được thấy trong một phần ba người bệnh (Jonsson và đồng tác giả, 2001).

Ở các bệnh tự miễn dịch toàn thân khác, chẳng hạn như RA, các yếu tố quan trọng cho các trung tâm mầm lệch vị (GCs) đã được nhận dạng. Các mô hoạt dịch dạng thấp có các GC được thể hiện là tạo ra các chemokin CXCL13, CCL21, và lymphotoxin (LT)- β (được tìm ra trên trung tâm nang và các tế bào B vùng vỏ bao). Phân tích hồi quy đa biến các chất phân tích này đã xác định CXCL13 và LT- β là các xytokin đơn lẻ dự báo các GC trong viêm màng hoạt dịch dạng thấp (Weyand và Goronzy, 2003). Gần đây, CXCL13 và CXCR5 trong các tuyến nước bọt đã được biểu hiện là đóng vai trò thiết yếu trong quá trình dễ viêm bằng cách tăng cường các tế bào B và T, do vậy góp phần vào sự thu hồi mô limphô và tạo thành GC lệch vị trong SS (Salomonsson và đồng tác giả, 2002).

M. Bệnh vẩy nến

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể được sử dụng cho điều trị người bệnh mắc bệnh vẩy nến. Bệnh vẩy nến là bệnh tróc vảy da mãn tính và chứng viêm có ảnh hưởng 2 đến

2,6 % dân số Mỹ, hoặc giữa 5,8 và 7,5 triệu người. Bệnh vẩy nến xảy ra khi các tế bào da tăng nhanh từ khởi nguyên của chúng dưới bề mặt da và xếp chồng trên bề mặt trước khi chúng có cơ hội hoàn thiện. Thông thường, hoạt động này (cũng được gọi là sự quay vòng) mất khoảng một tháng, nhưng ở bệnh vẩy nến, sự quay vòng có thể chỉ diễn ra trong vài ngày. Ở dạng điển hình, bệnh vẩy nến gây ra các đốm da (viêm) đỏ, dày được phủ các vảy màu bạc. Các đốm này, đôi khi được gọi là các mảng, thường ngứa hoặc đau nhức. Các đốm thường hay xảy ra trên khuỷu tay, đầu gối, các bộ phận khác của cẳng chân, da đầu, phần lưng dưới, mặt, lòng bàn tay, và lòng bàn chân, nhưng chúng có thể xảy ra trên da ở bất cứ đâu trên cơ thể. Bệnh cũng có thể ảnh hưởng đến các móng tay, móng chân, và các mô mềm của bộ phận sinh dục và trong miệng.

Bệnh vẩy nến là rối loạn chức năng da gây ra bởi hệ miễn dịch, đặc biệt là liên quan đến một loại tế bào máu trắng được gọi là tế bào T. Thông thường, các tế bào T giúp bảo vệ cơ thể chống lại sự nhiễm trùng và bệnh tật. Trong trường hợp bệnh vẩy nến, các tế bào T được đưa vào hoạt động nhầm và trở nên hiệu nghiệm đến mức chúng khởi phát các phản ứng miễn dịch khác, điều này dẫn đến chứng viêm và sự quay vòng nhanh của các tế bào da.

N. Các bệnh truyền nhiễm

Theo một số phương án, RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các phương pháp theo sáng chế này có thể hữu ích trong việc điều trị các bệnh truyền nhiễm, gồm nhiễm khuẩn và virus. Như đã lưu ý trên đây, các lây nhiễm này có thể liên quan đến các phản ứng dễ viêm toàn thân hoặc cục bộ nghiêm trọng. Ví dụ như, bệnh cúm có thể gây ra chứng viêm phổi nặng và nhiễm khuẩn có thể gây ra phản ứng tăng viêm toàn thân, gồm sự tạo ra thừa nhiều xytokin dễ viêm, là dấu hiệu xác nhận của nhiễm trùng. Ngoài ra các hợp chất theo sáng chế có thể hữu ích trong việc ức chế trực tiếp sự thu hồi các virus gây bệnh. Các nghiên cứu trước đây đã chứng tỏ rằng các hợp chất có liên quan, chẳng hạn như CDDO, có thể ức chế sự thu hồi HIV trong các đại thực bào (Vazquez và đồng tác giả, 2005). Các nghiên cứu khác đã biểu thị rằng sự ức chế việc phát tín hiệu NF- κ B có thể ức chế sự thu hồi virus bệnh cúm, và các prostaglandin xyclopentenon có thể ức chế sự thu hồi virus (ví dụ như, Mazur và đồng tác giả, 2007; Pica và đồng tác giả, 2000).

Sáng chế này liên quan đến việc điều trị hoặc phòng ngừa mỗi trong số các bệnh/các rối loạn chức năng/các trạng thái được nêu trên đây trong phần IV sử dụng hợp chất RTA 408 hoặc muối được dụng của nó, hoặc một hợp chất dạng đa hình đó (chẳng hạn như, bất kỳ một trong số các hợp chất dạng đa hình được mô tả trên đây hoặc dưới đây), hoặc được phẩm chứa bất kỳ trong số các thực thể và chất mang được dụng nêu trên (gồm, ví dụ như, các được phẩm được mô tả trên đây).

V. Các được phẩm và đường sử dụng

RTA 408 có thể được sử dụng bằng nhiều phương pháp khác nhau, ví dụ như, qua đường miệng hoặc bằng cách tiêm (ví dụ như, dưới da, trong tĩnh mạch, trong bụng, v.v...). Tùy thuộc vào đường sử dụng, các hợp chất hoạt động có thể được phủ trong một dạng vật chất để bảo vệ hợp chất khỏi tác động của các axit và các điều kiện tự nhiên khác có thể khử hoạt tính hợp chất. Chúng cũng có thể được sử dụng bằng cách truyền dịch liên tục/tiêm truyền bệnh hoặc vị trí bị thương.

Để sử dụng RTA 408 bằng cách không phải sử dụng ngoài ruột, có thể cần phải phủ lên hợp chất, hoặc sử dụng đồng thời hợp chất với, một dạng vật chất để ngăn ngừa sự khử hoạt tính. Ví dụ như, hợp chất điều trị có thể được sử dụng cho người bệnh trong một chất mang thích hợp, ví dụ như, các hạt mỡ, hoặc một chất pha loãng. Các chất pha loãng được dụng gồm muối và các dung dịch đệm nước. Các hạt mỡ gồm các nhũ tương CGF nước trong dầu trong nước cũng như các hạt mỡ thông thường (Strejan và đồng tác giả, 1984).

RTA 408 cũng có thể được sử dụng ngoài ruột, trong bụng, trong cột sống, hoặc trong não. Các chất làm phân tán có thể được điều chế trong glyxeryl, các glycol polyetylen dạng lỏng, và các hỗn hợp của chúng và trong dầu. Trong các điều kiện bảo quản và sử dụng bình thường, các chế phẩm này may chứa một chất bảo quản để ngăn ngừa sự phát triển của các vi sinh vật.

Các dung dịch có thể tiêm vô trùng có thể được điều chế bằng cách cho RTA 408 vào với lượng yêu cầu trong một dung môi thích hợp có một hoặc một hỗn hợp các thành phần được liệt kê trên đây, theo yêu cầu, sau đó tiệt trùng bằng cách lọc. Nói chung, các chất làm phân tán được điều chế bằng cách cho hợp chất điều trị vào một chất mang sát trùng chứa một môi trường phân tán bazơ và các thành phần khác được yêu cầu trong số các thành phần được liệt kê trên đây. Trong trường hợp các bột sát trùng để điều chế các dung dịch có thể tiêm vô trùng, các phương án điều chế ưu

tiên là sấy chân không và đông khô, giúp mang lại bột của hoạt chất (nghĩa là, hợp chất điều trị) cùng với bất kỳ thành phần mong muốn bổ sung nào từ dung dịch được lọc sát trùng trước đó của nó.

RTA 408 có thể được làm cho hoàn toàn vô định hình sử dụng phương pháp sấy khô phun trực tiếp. RTA 408 có thể được sử dụng qua đường miệng, ví dụ như, bằng một chất pha loãng mất hoạt tính hoặc một chất mang ăn được có thể tiêu hóa. Hợp chất trị bệnh và các thành phần khác cũng có thể được bọc trong viên nang gelatin vỏ cứng hoặc mềm, được nén thành thuốc viên, hoặc được đưa trực tiếp vào khẩu phần ăn của người bệnh. Đối với việc sử dụng điều trị qua đường miệng, hợp chất điều trị có thể được đưa vào, ví dụ như, với các tá dược và được sử dụng dưới dạng thuốc viên có thể ăn vào bụng, thuốc viên ngậm trong má, viên ngậm dẹt, viên nang gồm viên nang cứng hoặc mềm, còn ngọt, nhũ tương, chất phân tán dạng rắn, dịch huyền phù, sirô, viên nhện, và các dạng tương tự. Tất nhiên, phần trăm hợp chất điều trị trong các hợp phần và chế phẩm có thể thay đổi. Lượng hợp chất điều trị trong cá hợp phần hữu ích cho việc điều trị như vậy ở mức mà thu được liều lượng thích hợp.

Đặc biệt là thuận lợi để bào chế các hợp phần ngoài ruột ở dạng đơn vị liều lượng để dễ sử dụng và định liều đồng đều. Dạng đơn vị liều lượng như được sử dụng ở đây đề cập đến các đơn vị riêng biệt của cơ thể được làm thích hợp dưới dạng các liều đơn nhất cho người bệnh cần điều trị, mỗi đơn vị chứa lượng hợp chất điều trị xác định trước được tính toán để mang lại tác động điều trị mong muốn kết hợp với chất mang dược phẩm được yêu cầu. Đặc điểm kỹ thuật cho các dạng đơn vị liều lượng của sáng chế được quyết định bởi và trực tiếp phụ thuộc vào (a) các đặc điểm độc đáo của hợp chất điều trị và tác động điều trị cụ thể cần đạt được, và (b) các hạn chế vốn có trong lĩnh vực kỹ thuật trong việc trộn hợp chất điều trị như thế để điều trị trạng thái được lựa chọn ở người bệnh.

RTA 408 cũng có thể được sử dụng cục bộ cho da, mắt, hoặc niêm mạc. Theo một số phương án, hợp chất có thể được điều chế trong nước thơm, kem, chất gel, dầu, thuốc mỡ, sáp, dung dịch, dịch huyền phù, hoặc nhũ tương. Theo lựa chọn, nếu muốn phân phối cục bộ cho phổi, hợp chất điều trị có thể được sử dụng bằng hít trong chế phẩm son khí hoặc bột khô.

RTA 408 thông thường được sử dụng với liều lượng hiệu quả cho việc điều trị đủ để điều trị tình trạng liên quan đến người bệnh xác định. Ví dụ như, tính hiệu quả của hợp chất có thể được đánh giá ở hệ thống mẫu con vật có thể dự báo tính hiệu quả trong việc điều trị bệnh ở người, chẳng hạn như các hệ thống mẫu được thể hiện trong các ví dụ và các hình vẽ.

Lượng định liều RTA 408 hoặc chế phẩm chứa RTA 408 thực tế được sử dụng cho người bệnh có thể được xác định bằng các yếu tố vật lý và sinh lý, chẳng hạn như độ tuổi, giới tính, trọng lượng cơ thể, sự nghiêm trọng của tình trạng, loại bệnh được điều trị, những can thiệp điều trị trước hoặc đồng thời, bệnh tự phát của người bệnh, và tuyến sử dụng. Các yếu tố này có thể được xác định bởi một chuyên gia. Bác sĩ chịu trách nhiệm cho sử dụng thường xác định nồng độ của (các) hoạt chất trong chế phẩm và (các) liều thích hợp cho người bệnh. Liều lượng có thể được điều chỉnh bởi thầy thuốc trong trường hợp có bất kỳ biến chứng nào.

Một lượng hiệu quả thông thường sẽ thay đổi từ khoảng 0,001 mg/kg đến khoảng 1000 mg/kg, từ khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 750 mg/kg, từ khoảng 100 mg/kg đến khoảng 500 mg/kg, từ khoảng 1,0 mg/kg đến khoảng 250 mg/kg, từ khoảng 10,0 mg/kg đến khoảng 150 mg/kg trong một hoặc nhiều lần sử dụng liều hàng ngày, cho một hoặc một vài ngày (tùy thuộc vào phương thức sử dụng và các yếu tố được trình bày trên đây). Các khoảng liều lượng thích hợp khác gồm 1 mg đến 10000 mg/ngày, 100 mg đến 10000 mg/ngày, 500 mg đến 10000 mg/ngày, và 500 mg đến 1000 mg/ngày. Theo một số phương án cụ thể, lượng ít hơn 10,000 mg/ngày trong khoảng 750 mg đến 9000 mg/ngày.

Lượng hiệu quả có thể ít hơn 1 mg/kg/ngày, ít hơn 500 mg/kg/ngày, ít hơn 250 mg/kg/ngày, ít hơn 100 mg/kg/ngày, ít hơn 50 mg/kg/ngày, ít hơn 25 mg/kg/ngày, hoặc ít hơn 10 mg/kg/ngày. Theo lựa chọn, nó có thể nằm trong khoảng 1 mg/kg/ngày đến 200 mg/kg/ngày. Theo một số phương án, lượng có thể là 10, 30, 100, hoặc 150 mg/kg được bào chế dưới dạng dịch huyền phù trong dầu vừng như được mô tả dưới đây trong Ví dụ C1. Theo một số phương án, lượng có thể là 3, 10, 30 hoặc 100 mg/kg được sử dụng hàng ngày qua nhồi ống qua miệng như được mô tả dưới đây trong các Ví dụ C2 và C3. Theo một số phương án, lượng có thể là 10, 30, hoặc 100 mg/kg được sử dụng qua đường miệng như được mô tả dưới đây trong Ví dụ C6. Ví dụ như, liên quan đến việc điều trị những người mắc bệnh đái tháo đường, liều lượng đơn vị có thể

là lượng làm giảm glucoza trong máu ít nhất 40% so với người bệnh không được điều trị. Trong một phương án khác, liều lượng đơn vị là lượng làm giảm glucoza trong máu xuống mức là $\pm 10\%$ mức glucoza trong máu của người bệnh không bị đái tháo đường.

Trong các ví dụ không giới hạn khác, một liều lượng cũng có thể bao gồm từ khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ trọng lượng cơ thể, khoảng 5 $\mu\text{g/kg}$ trọng lượng cơ thể, khoảng 10 $\mu\text{g/kg}$ trọng lượng cơ thể, khoảng 50 $\mu\text{g/kg}$ trọng lượng cơ thể, khoảng 100 $\mu\text{g/kg}$ trọng lượng cơ thể, khoảng 200 $\mu\text{g/kg}$ trọng lượng cơ thể, khoảng 350 $\mu\text{g/kg}$ trọng lượng cơ thể, khoảng 500 $\mu\text{g/kg}$ trọng lượng cơ thể, khoảng 1 mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5 mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10 mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50 mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100 mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200 mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350 mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500 mg/kg trọng lượng cơ thể, đến khoảng 1000 mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc nhiều hơn cho một lần sử dụng, và bất kỳ khoảng nào bắt nguồn từ đó. Trong các ví dụ không giới hạn về khoảng bắt nguồn từ các con số liệt kê ở đây, một khoảng là khoảng 5 mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 100 mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5 $\mu\text{g/kg}$ trọng lượng cơ thể đến khoảng 500 mg/kg trọng lượng cơ thể, v.v..., có thể được sử dụng, dựa trên các con số được mô tả trên đây.

Theo các phương án nhất định, được phẩm theo sáng chế này có thể chứa, ví dụ như, ít nhất khoảng 0,01% của RTA 408. Theo các phương án khác, RTA 408 có thể bao gồm giữa khoảng 0,01% đến khoảng 75% trọng lượng của đơn vị, hoặc giữa khoảng 0,01% đến khoảng 5%, ví dụ như, và bất kỳ khoảng nào bắt nguồn từ đó. Theo một số phương án, RTA 408 có thể được sử dụng trong một chế phẩm chẳng hạn như một dịch huyền phù trong dầu vừng 0,01%, 0,1%, hoặc 1% như được mô tả dưới đây trong các Ví dụ F và G. Theo một số phương án, RTA 408 có thể được bào chế để sử dụng cục bộ cho da hoặc mắt, sử dụng một chất mang thích hợp về mặt dược hoặc dưới dạng một dịch huyền phù, nhũ tương, hoặc dung dịch có các nồng độ từ khoảng 0,01% đến 10%. Theo một số phương án, nồng độ là từ khoảng 0,1% đến khoảng 5%. Nồng độ tối ưu có thể thay đổi tùy thuộc vào cơ quan đích, chế phẩm cụ thể, và tình trạng cần điều trị.

Các liều đơn hoặc đa liều tác nhân bao gồm RTA 408 được dự liệu. Các khoảng thời gian mong muốn để đưa vào đa liều có thể được xác định bởi một người có kỹ

năng bình thường trong lĩnh vực kỹ thuật sử dụng thí nghiệm không nhiều hơn mức bình thường. Ví dụ như, người bệnh có thể được sử dụng hai liều hàng ngày với các khoảng thời gian gần 12 giờ. Theo một số phương án, tác nhân được sử dụng một lần một ngày. (Các) tác nhân có thể được sử dụng trên lịch biểu thường lệ. Như được sử dụng ở đây một lịch biểu thường lệ đề cập đến một khoảng thời gian được chỉ định xác định trước. Lịch biểu thường lệ có thể bao gồm các khoảng thời gian giống nhau hoặc khác nhau về độ dài, miễn là lịch biểu được xác định trước. Ví dụ, lịch biểu thường lệ có thể liên quan đến việc sử dụng hai lần một ngày, hàng ngày, hai ngày một lần, ba ngày một lần, bốn ngày một lần, năm ngày một lần, sáu ngày một lần, hàng tuần, hàng tháng, hoặc bất kỳ số ngày hoặc tuần định ra giữa các khoảng thời gian đó. Theo lựa chọn, lịch biểu thường lệ xác định trước có thể liên quan đến việc sử dụng hai lần một ngày cho tuần đầu tiên, sau đó là hàng ngày cho một vài tháng, v.v... Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất rằng (các) tác nhân có thể được đưa qua đường miệng và việc định thời phụ thuộc hoặc không phụ thuộc vào việc nạp thức ăn. Do đó, ví dụ như, tác nhân có thể được đưa vào hàng sáng và/hoặc hàng tối, bất kể người bệnh đã ăn hoặc sẽ ăn khi nào.

VI. Liệu pháp kết hợp

Ngoài việc được sử dụng làm liệu pháp đơn trị, RTA 408 và các hợp chất dạng đa hình được mô tả trong sáng chế này cũng có thể được sử dụng trong các liệu pháp kết hợp. Hiệu quả liệu pháp kết hợp có thể đạt được bằng một thành phần đơn lẻ hoặc chế phẩm được lý gồm cả hai tác nhân, hoặc bằng hai thành phần hoặc chế phẩm phân biệt, được sử dụng đồng thời, trong đó một thành phần gồm RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó, và thành phần kia gồm (các) tác nhân thứ hai. Phương thức điều trị kia có thể được sử dụng trước, đồng thời, hoặc sau khi sử dụng RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó. Liệu pháp sử dụng RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó có thể thực hiện trước khi hoặc sau khi sử dụng (các) tác nhân kia với các khoảng thời gian từ nhiều phút đến nhiều tuần. Ở các phương án mà tác nhân kia và RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó được sử dụng tách biệt, nói chung cần đảm bảo rằng không hết khoảng thời gian đáng kể giữa thời gian mỗi lần đưa vào, sao cho mỗi tác nhân vẫn có thể có tác động kết hợp có lợi. Trong các trường hợp như vậy, điều được dự liệu là thường phải sử dụng RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình và tác nhân điều trị kia trong khoảng 12-24 giờ của nhau và, tốt hơn nữa

là, trong khoảng 6-12 giờ của nhau, với thời gian trễ chỉ là khoảng 12 giờ được ưu tiên nhất. Trong một số trường hợp, có thể cần kéo dài khoảng thời gian điều trị đáng kể, tuy nhiên, ở đó một vài ngày (2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7) đến một vài tuần (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8) trôi đi giữa các lần cho tương ứng.

Cũng cần hiểu rằng nhiều hơn một lần sử dụng RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó, hoặc tác nhân kia được mong muốn. Về mặt này, những sự kết hợp khác nhau có thể được sử dụng. Với mục đích minh họa, trong đó RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó là “A” và tác nhân kia là “B”, các phép hoán vị dưới đây dựa trên 3 và 4 lần sử dụng tổng cộng được dẫn chứng:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B
 A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A
 A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

Các kết hợp khác cũng được dự liệu. Các ví dụ không giới hạn về các tác nhân được lý có thể được sử dụng trong sáng chế này gồm bất kỳ tác nhân được lý nào được biết đến là có lợi trong việc điều trị bệnh ung thư. Theo một số phương án, các kết hợp của RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó với liệu pháp miễn dịch nhằm vào bệnh ung thư, liệu pháp gen, phép trị liệu bằng tia X, tác nhân hóa học trị liệu, hoặc phẫu thuật được dự liệu. Cũng được dự liệu là sự kết hợp của RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó với nhiều hơn một trong số các phương pháp nêu trên gồm nhiều hơn một loại liệu pháp cụ thể. Theo một số phương án, liệu pháp miễn dịch có thể là các kháng thể nhằm vào ung thư chẳng hạn như nhưng không giới hạn ở trastuzumab (Herceptin®), alemtuzumab (Campath®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Eribitux®), và panitumumab (Vectibix®) hoặc các kháng thể kết hợp chẳng hạn như ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), brentuximab vedotin (Adcetris®), ado-trastuzumab emtansin (Kadcyla™), hoặc denileukin ditox (Ontak®). Hơn nữa, theo một số phương án, RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó được hình dung là được sử dụng trong các liệu pháp kết hợp với các liệu pháp miễn dịch dựa trên tế bào đuôi gai chẳng hạn như Sipuleucel-T (Provenge®) hoặc các liệu pháp miễn dịch tế bào T nuôi.

Hơn nữa, điều được dự liệu là RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó được sử dụng kết hợp với tác nhân hóa học trị liệu chẳng hạn như nhưng không giới hạn ở anthracyclin, taxan, methotrexat, mitoxantron, estramustin, doxorubicin,

etoposit, vinblastin, cacboplatin, vinorelbin, 5-flouraxil, xisplatin, topotecan, ifosfamit, xyclophosphamit, epirubixin, gemcitabin, vinorelbin, irinotecan, etoposit, vinblastin, pemetrexed, melphalan, capecitabin, và oxaliplatin. Theo một số phương án, RTA 408 hoặc các hợp chất dạng đa hình của nó được sử dụng kết hợp với liệu pháp bức xạ gồm nhưng không giới hạn ở việc sử dụng bức xạ ion hóa. Theo một số phương án, các tác động của tác nhân điều trị ung thư được nâng cao đồng vận thông qua sử dụng RTA 408 và các hợp chất dạng đa hình của nó. Theo một số phương án, các liệu pháp kết hợp chứa RTA 408 được sử dụng để điều trị ung thư, gồm, ví dụ như, ung thư tuyến tiền liệt. Xem, ví dụ như, Ví dụ H dưới đây.

Theo một số phương án, các phương pháp có thể bao gồm thêm (1) cho tế bào khối u tiếp xúc với hợp chất trước khi cho tế bào khối u tiếp xúc với tác nhân hóa học trị liệu thứ hai, (2) cho tế bào khối u tiếp xúc với tác nhân hóa học trị liệu thứ hai trước khi cho tế bào khối u tiếp xúc với hợp chất, hoặc (3) cho tế bào khối u tiếp xúc với hợp chất và tác nhân hóa học trị liệu thứ hai đồng thời. Tác nhân hóa học trị liệu thứ hai, theo các phương án nhất định, có thể là thuốc kháng sinh, thuốc chống viêm, thuốc kháng khối u, thuốc chống tăng sinh, kháng virus, thuốc điều biến miễn dịch, hoặc ức chế miễn dịch. Theo các phương án khác, tác nhân hóa học trị liệu thứ hai có thể là tác nhân alkyl hóa, thuốc điều biến thụ thể androgen, chất phá vỡ bộ xương tế bào, thuốc điều biến thụ thể estrogen, chất ức chế histon-deacetylaza, chất ức chế reductaza HMG-CoA, chất ức chế transferaza prenyl-protein, chất điều biến thụ thể dạng vòng mạc, chất ức chế topoisomeraza, hoặc chất ức chế tyrosin kinaza. Theo các phương án nhất định, tác nhân hóa học trị liệu thứ hai là 5-azaxitidin, 5-flouraxil, 9-is-retinoic axit, actinomycin D, alitretinoin, axit all-trans-retinoic, annamycin, axitinib, belinostat, bevacizumab, bexaroten, bosutinib, busulfan, capecitabin, cacboplatin, cactustin, CD437, xediranib, xetuximab, clorambuxil, xisplatin, xyclophosphamit, xytarabin, dacarbazine, dasatinib, daunorubicin, decitabin, docetaxel, dolastatin-10, doxifluridin, doxorubicin, doxorubicin, epirubicin, erlotinib, etoposit, gefitinib, gemcitabin, gemtuzumab ozogamixin, hexametylmelamin, idarubicin, ifosfamit, imatinib, irinotecan, isotretinoin, ixabepilone, lapatinib, LBH589, lomustin, meclizetamin, melphalan, mercaptopurin, methotrexat, mitomycin, mitoxantron, MS-275, neratinib, nilotinib, nitrosourea, oxaliplatin, paclitaxel, plicamycin, procarbazine, semaxanib, semustin, natri butyrat, natri phenylacetat, streptozotocin, axit

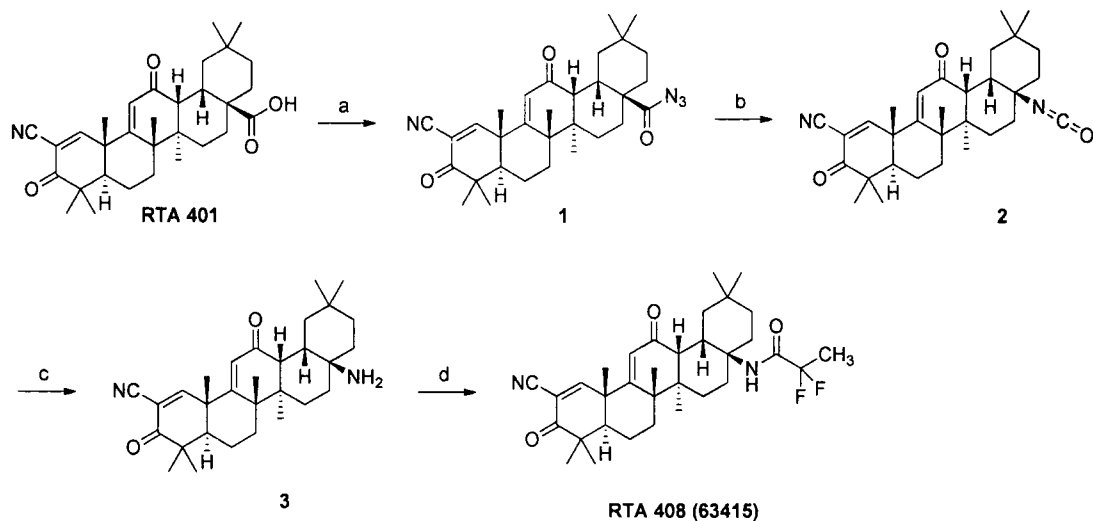
suberoylanilit hydroxamic, sunitinib, tamoxifen, teniposit, thiopeta, tioguanin, topotecan, TRAIL, trastuzumab, tretinoin, trichostatin A, axit valproic, valrubixin, vandetanib, vinblastin, vincristin, vindesin, hoặc vinorelbin.

Ngoài ra, các liệu pháp kết hợp để điều trị bệnh tim mạch sử dụng RTA 408, các hợp chất dạng đa hình, và các dược phẩm theo sáng chế này được dự liệu. Ví dụ như, các phương pháp này có thể bao gồm thêm bước sử dụng một lượng hiệu quả về mặt dược của một hoặc nhiều thuốc tim mạch ngoài RTA 408 ra, các hợp chất dạng đa hình, và các dược phẩm theo sáng chế này. Thuốc tim mạch có thể là nhưng không giới hạn ở, ví dụ như, thuốc làm giảm cholesterol, thuốc chống mỡ máu cao, thuốc ngăn chặn kênh canxi, thuốc chống tăng huyết áp, hoặc chất ức chế reductaza HMG-CoA. Theo một số phương án, các ví dụ không giới hạn về thuốc tim mạch gồm amlodipin, aspirin, ezetimibe, felodipin, laxitipin, lercanidipin, nicardipin, nifedipin, nimodipin, nisoldipin hoặc nitrendipin. Theo các phương án khác, các ví dụ không giới hạn khác về thuốc tim mạch gồm atenolol, bucindolol, cacvedilol, clonidin, doxazosin, indoramin, labetalol, metyldopa, metoprolol, nadolol, oxprenolol, phenoxybenzamin, phentolamin, pindolol, prazosin, propranolol, terazosin, timolol hoặc tolazolin. Theo các phương án khác, thuốc tim mạch có thể là, ví dụ như, statin, chẳng hạn như atorvastatin, xerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin hoặc simvastatin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đưa ra để chứng minh cho các phương án ưu tiên theo sáng chế. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật nên hiểu rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ theo sau thể hiện các kỹ thuật được khám phá bởi tác giả sáng chế để thực hiện chức năng tốt trong việc thực hiện sáng chế, và do đó có thể được coi là tạo thành các phương thức ưu tiên cho việc thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, dưới góc độ sáng chế này, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật nên hiểu rằng có thể thực hiện nhiều thay đổi trong các phương án cụ thể được bộc lộ và vẫn thu được kết quả giống hoặc tương tự mà không nằm ngoài tinh thần và phạm vi của sáng chế.

A. Sự tổng hợp RTA 408 (63415)



Các thuốc thử và các điều kiện: (a) $(\text{PhO})_2\text{PON}_3$ (DPPA), Et_3N , toluen, $0\text{ }^\circ\text{C}$ trong 5 phút, sau đó là ở nhiệt độ phòng qua đêm, ~94%; (b) benzen, $80\text{ }^\circ\text{C}$ trong 2 giờ; (c) HCl , CH_3CN , r.t. trong 1 giờ; (d) $\text{CH}_3\text{CF}_2\text{CO}_2\text{H}$, DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , nhiệt độ phòng qua đêm, 73% từ RTA 401 (4 bước).

Hợp chất 1: Đối với dung dịch toluen (400 mL), RTA 401 (có thể được điều chế theo các phương pháp được đưa ra, ví dụ như, bởi Honda, và đồng tác giả, 1998; Honda và đồng tác giả, 2000b; Honda và đồng tác giả, 2002; Yates và đồng tác giả, 2007; và các Patent Mỹ 6,326,507 và 6,974,801 được đưa vào đây để tham chiếu) (20,0 g, 40,6 mmol) và Et_3N (17,0 mL, 122,0 mmol) được thêm vào một lò phản ứng và được làm nguội đến $0\text{ }^\circ\text{C}$ có khuấy. Diphenyl phosphoryl azit (DPPA) (13,2 mL, 61,0 mmol) được thêm vào có khuấy ở $0\text{ }^\circ\text{C}$ trong 5 phút và hỗn hợp được khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng qua đêm (kiểm tra HPLC-MS cho thấy không còn lại RTA 401). Hỗn hợp phản ứng được tải trực tiếp trên một cột chất gel silic và được lọc sạch bằng phép sắc ký cột (chất gel silic, 0% đến 5% EtOAc trong CH_2Cl_2) để cho ra hợp chất 1 (19,7 g, ~94%, được chuyển hóa một phần thành hợp chất 2) dưới dạng bột trắng.

Hợp chất 2: Hợp chất 1 (19,7 g, ~38,1 mmol) và benzen (250 mL) được thêm vào một lò phản ứng và được gia nhiệt đến $80\text{ }^\circ\text{C}$ rồi khuấy trong 2 giờ (kiểm tra HPLC-MS cho thấy không còn lại hợp chất 1). Hỗn hợp phản ứng được cô đặc với áp suất giảm để có được hợp chất thô 2 dưới dạng cặn rắn được sử dụng cho bước tiếp theo mà không lọc sạch.

Hợp chất 3: Hợp chất thô 2 ($\leq 38,1$ mmol) và CH_3CN (200 mL) được thêm vào một lò phản ứng và được làm nguội đến $0\text{ }^\circ\text{C}$ có khuấy. HCl (12 N, 90 mL) được thêm ở $0\text{ }^\circ\text{C}$ trong 1 phút và hỗn hợp được khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ

(kiểm tra HPLC-MS cho thấy không còn lại hợp chất **2**). Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến 0 °C và 10% NaOH (~500 mL) được thêm vào có khuấy. Sau đó, NaHCO₃ bão hòa (1 L) được thêm vào có khuấy. Pha nước được tách chiết bằng EtOAc (2×500 mL). Pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng H₂O (200 mL), NaCl bão hòa (200 mL), được sấy khô qua Na₂SO₄, và được cô đặc để có được hợp chất thô **3** (16,62 g) dưới dạng bột vàng nhạt được sử dụng cho bước tiếp theo mà không lọc sạch.

RTA 408: Amin thô **3** (16,62 g, 35,9 mmol), CH₃CF₂CO₂H (4,7388 g, 43,1 mmol), và CH₂Cl₂ (360 mL) được thêm vào một lò phản ứng có khuấy ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (11,129 g, 53,9 mmol) và 4-(dimethylamino)-pyridin (DMAP) (1,65 g, 13,64 mmol) được thêm vào và hỗn hợp được khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng qua đêm (kiểm tra HPLC-MS cho thấy không còn lại hợp chất **3**). Hỗn hợp phản ứng được lọc để loại bỏ các sản phẩm phụ dạng rắn và sản phẩm lọc được tải trực tiếp lên một cột chất gel silic và được lọc sạch bằng phép sắc ký cột (chất gel silic, 0% đến 20% EtOAc trong các Hexan) hai lần để cho ra hợp chất **RTA 408** (16,347 g, 73% từ **RTA 401** qua 4 bước) dưới dạng bột trắng: ¹H NMR (400 MHz, CD₃Cl) δ 8,04 (s, 1H), 6,00 (s, 1H), 5,94 (s, br, 1H), 3,01 (d, 1H, J = 4,8 Hz), 2,75-2,82 (m, 1H), 1,92-2,18 (m, 4H), 1,69-1,85 (m, 7H), 1,53-1,64 (m, 1H), 1,60 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,42 (s, 3H), 1,11-1,38 (m, 3H), 1,27 (s, 3H), 1,18 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 1,04 (s, 3H), 0,92 (s, 3H); m/z 555 (M+1).

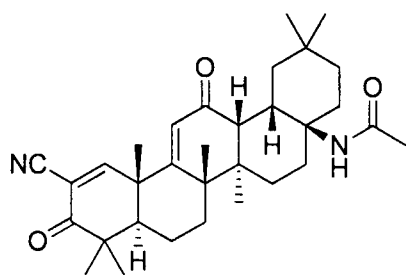
B. Dược lực học

Nội dung tóm tắt các nghiên cứu in vitro và in vivo để đánh giá các tác động dược lực học chính của RTA 408 được cung cấp dưới đây.

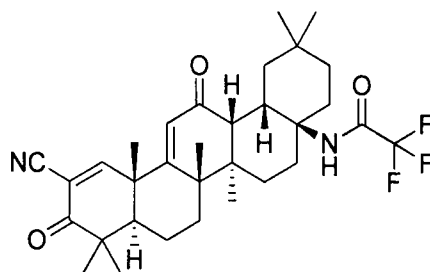
1. Các tác động của RTA 408 đến Keap1-Nrf2 và NF-κB in Vitro

Sự ức chế việc tạo thành NO gây cảm ứng bởi IFN γ bởi các AIM phụ thuộc vào Nrf2 (Dinkova-Kostova, 2005). Các đại thực bào ở chuột RAW264.7 được đặt trong các đĩa 96 giếng với mức 30,000 tế bào/giếng chia làm ba phần trong RPMI 1640 được bổ sung 0,5% FBS và được ủ ở 37 °C với 5% CO₂. Vào ngày tiếp theo, các tế bào được điều trị trước bằng DMSO (chất dẫn thuốc) hoặc RTA 408 trong 2 giờ, sau đó được điều trị bằng 20 ng/mL của IFN γ chuột nhất trong 24 giờ. Các mức độ nitrit (NO₂⁻) trong các môi trường được đo làm chất thay thế cho oxit nitric sử dụng Hệ Thuốc thử Griess (mèo # G2930, Promega), theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất, do

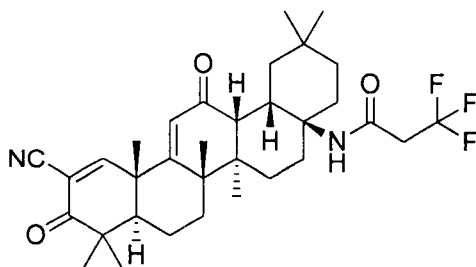
nitrit là sản phẩm phân hóa chủ yếu và ổn định của NO. Khả năng sống được của tế bào được đánh giá sử dụng thuốc thử làm gia tăng tế bào WST-1 (mào # 11644807001, Roche Applied Science) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các giá trị IC_{50} được xác định dựa trên việc ngăn chặn sự tạo thành oxit nitric gây cảm ứng bởi IFN γ được bình thường hóa cho khả năng sống được của tế bào. Việc điều trị bằng RTA 408 dẫn đến việc ngăn chặn phụ thuộc vào liều lượng sự tạo thành NO gây cảm ứng bởi IFN γ , với giá trị IC_{50} trung bình là $3,8 \pm 1,2$ nM. Các kết quả từ thí nghiệm chỉ thị được thể hiện ở FIG.1. Giá trị IC_{50} cho RTA 408 được thấy là 45%-65% thấp hơn các giá trị IC_{50} cho các hợp chất 63170 (8 ± 3 nM), 63171 ($6,9 \pm 0,6$ nM), 63179 (11 ± 2 nm), và 63189 (7 ± 2 nM). 63170, 63171, 63179, và 63189 là các hợp chất có các công thức:



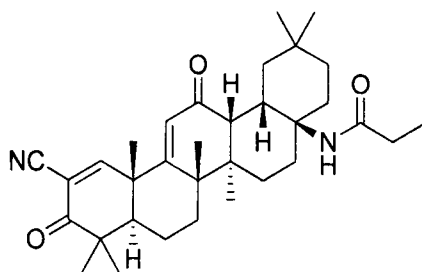
63170



63171



63179



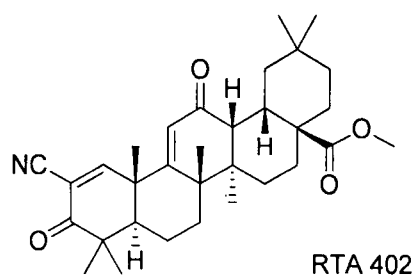
63189.

2. Tác động của RTA 408 đến các gen đích Nrf2

RTA 408 được thử nghiệm trong hai phân tích chất chỉ thị enzym luciferaza khác nhau để đánh giá sự hoạt hóa của ARE. Chất chỉ thị enzym luciferaza thứ nhất được thử nghiệm chịu sự kiểm soát của một ARE đơn lẻ dẫn xuất từ chất hoạt hóa của gen NQO1 ở người, điều này cho phép đánh giá định lượng hoạt tính nội sinh của yếu tố phiên mã Nrf2 trong các tế bào động vật có vú được nuôi cấy. Biểu hiện của Luciferaza của đom đóm từ Plasmid chất chỉ thị enzym luciferaza NQO1-ARE được kiểm soát bằng cách liên kết Nrf2 với một trình tự chất nâng cao cụ thể tương ứng với yếu tố phản ứng chống oxy hóa (ARE) được nhận dạng trong vùng chất hoạt hóa của NADPH ở người: gen quinone oxidoreductaza 1 (NQO1) (Xie và đồng tác giả, 1995). Plasmid chất chỉ thị enzym luciferaza NQO1-ARE được xây dựng bằng cách chèn NQO1-ARE ở người (5'-CAGTCACAGTGACTCAGCAGAATCTG-3') vào vector pLuc-MCS sử dụng các vị trí nhận dòng HindIII/XhoI (GenScript Corp., Piscataway, NJ). Dòng tế bào hepatoma ở người HuH-7, được duy trì trong DMEM (Invitrogen) được bổ sung 10% FBS và 100 U/mL (mỗi loại) penixilin và streptomycin, được truyền nhiễm tạm thời sử dụng Lipofectamin 2000 (Invitrogen) với plasmid chất chỉ thị enzym luciferaza NQO1-ARE và plasmid pRL-TK mà chủ yếu biểu hiện luciferaza Renilla và được sử dụng để kiểm soát bên trong để bình thường hóa các mức độ truyền nhiễm. Ba mươi giờ truyền nhiễm, các tế bào được điều trị bằng RTA 408 trong 18 giờ. Hoạt tính luciferaza Renilla và Đom đóm được phân tích bằng Phân tích Luciferaza Glo Kép (mèo # E2920, Promega), và tín hiệu phát quang được đo trên máy đo độ phát quang L-Max II (Các thiết bị phân tử). Hoạt tính luciferaza của đom đóm được bình thường hóa cho hoạt tính Renilla, và số lần kiểm soát chất dẫn thuốc (DMSO) của hoạt tính Đom đóm bình thường hóa được tính toán. FIG.2a thể hiện cảm ứng phụ thuộc vào liều lượng của hoạt tính luciferaza do RTA 408 trong dòng tế bào này. Các giá trị thể hiện mức trung bình của ba thí nghiệm độc lập. Cần ít hơn hai mươi phần trăm RTA 408 (12 nM) so với 63189 (14,9 nM) để tăng phiên mã từ NQO1 ARE trong các tế bào HuH-7 lên 2 lần. Tương tự, cần ít hơn 2,1-2,4 lần RTA 408 tương ứng so với 63170 (25,2 nM) và 63179 (29,1 nM) để tăng phiên mã từ NQO1 ARE trong các tế bào HuH-7 lên 2 lần.

Tác động của RTA 408 đến chất chỉ thị enzym luciferaza hoạt hóa cũng được đánh giá trong dòng tế bào chỉ thị AREc32. Dòng tế bào này dẫn xuất từ các tế bào

MCF-7 ung thư biểu mô ở vú người và được truyền nhiễm ổn định với một chất chỉ thị enzym luciferaza Đom đóm dưới sự kiểm soát phiên mã của tám bản sao trình tự GSTA2 ARE ở chuột cống (Wang, và đồng tác giả, 2006, được đưa vào đây để tham chiếu). Sau khi điều trị bằng RTA 408 trong 18 giờ, hoạt tính luciferaza của đom đóm được đo sử dụng Hệ thống Phân tích Luciferase MỘT-Glo (Promega, Catalog #E6110) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Một phản ứng phụ thuộc vào liều lượng được quan sát thấy trong dòng tế bào chỉ thị AREc32 (FIG.2b). Cảm ứng gấp ~2 lần của hoạt tính luciferaza là rõ ràng sau khi điều trị bằng 15,6 nM RTA 408 trong cả hai hệ thống phân tích gen chỉ thị NQO1-ARE và GSTA2-ARE. Khi xem các kết quả từ nghiên cứu hoạt tính luciferaza GSTA2-ARE (AREc32), các tác động của 63415 (RTA 408) đến cảm ứng GSTA2-ARE có thể được so sánh trực tiếp với tác động của RTA 402, 63170, 63171, 63179, và 63189 cùng với khả năng sống được của các nghiên cứu WST1 (FIG.3a-f). So với các giá trị của RTA 402, 63415 thể hiện sự cảm ứng nhanh nhất phiên mã qua trung gian GSTA2-ARE của năm hợp chất so sánh với nồng độ là 93 nM cần để đạt được cảm ứng gấp 4 lần trong phân tích chất chỉ thị enzym luciferaza. Tất cả các hợp chất khác thể hiện cảm ứng tương tự chỉ với các nồng độ cao hơn nhiều với 63170 cần nồng độ là 171 nM, 63171 cần nồng độ là 133 nM, 63179 cần nồng độ là 303 nM và 63189 cần nồng độ là 174 nM để đạt được cảm ứng gấp 4 lần của hoạt tính luciferaza. Các giá trị này tương ứng với lượng tăng 1,86 (63415), 3,40 (63170), 2,65 (63171), 6,05 (63179) và 3,47 (63189) lần lượng hợp chất hoạt động cần thiết so với RTA 402 để có được cùng lượng hoạt tính.



RTA 408 cũng được thể hiện là tăng các mức phiên mã của các gen đích Nrf2 đã biết nguyên bào sợi phổi ở thai nhi người HFL1 và các dòng tế bào biểu mô ở phế quản người BEAS-2B. Các tế bào HFL1 được nuôi cấy trong môi trường F-12K được bổ sung 10% huyết thanh thai nhi bò và 1% penixilin-streptomycin. Các tế bào BEAS-2B được nuôi cấy trong các môi trường DMEM/F-12 được bổ sung 10% huyết thanh thai nhi bò và 1% penixilin-streptomycin. Các tế bào được đặt trong các đĩa 6 giếng

với mật độ là $2,5 \times 10^5$ tế bào/giếng. Vào ngày tiếp theo, các tế bào được điều trị bằng DMSO (chất dẫn thuốc) hoặc RTA 408 (7,8, 15,6, 31,3, 62,5, hoặc 125 nM) trong 18 giờ. Mỗi tế bào nhận cùng một lượng chất dẫn thuốc. Sau khi điều trị, môi trường được loại bỏ và các tế bào được thu hoạch sử dụng đệm RLT (Qiagen). Các dịch thủy phân được đồng nhất hóa sử dụng các cột QIAshredder (Qiagen, Catalog #79654) và RNA được tách sử dụng các bộ kit RNeasy Mini (Qiagen, Catalog #74104). Đối với phiên mã ngược, RNA (1 μ g) được kết hợp với đoạn mồi Oligo(dT)₁₂₋₁₈ và H₂O với thể tích cuối cùng là 23,25 μ L. Hỗn hợp được đun nóng đến 70°C trong 10 phút và sau đó được đặt trên nước đá. Một hỗn hợp chính chứa 8 μ L đệm chuỗi ban đầu 5X, 2 μ L 1 mg/mL BSA, 2 μ L 20 mM DTT, 4 μ L 5 mM hỗn hợp dNTP, 0,25 μ L RNaseOUT™ và 0,5 μ L enzyme phiên mã ngược Superscript® II được thêm vào hỗn hợp RNA và được ủ ở 42°C trong 1 giờ. Phản ứng bị giải hoạt bằng cách đun nóng đến 70°C trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng theo tỷ lệ 1:3 bằng H₂O trước khi sử dụng trong qPCR. 2,5 μ L phản ứng phiên mã ngược pha loãng được kết hợp với một bộ các đoạn mồi PCR (nồng độ cuối cùng là 0,36 μ M), 2X iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Catalog #170-8885) và H₂O đến thể tích cuối cùng là 20 μ L các trình tự cho các đoạn mồi PCR như sau: Glutamat-xystein ligaza, đơn vị con của chất biến đổi (GCLM), mồi xuôi 5'-GCTGTGGCTACTGCGGTATT-3' (SEQ ID NO: 1) mồi ngược 5'-ATCTGCCTCAATGACACMÈO-3' (SEQ ID NO: 2); Heme oxygenaza-1 (HMOX1) mồi xuôi 5'-TCCGATGGGTCCTTACACTC-3' (SEQ ID NO: 3), mồi ngược 5'-TAGGCTCCTTCCTCCTTTCC-3' (SEQ ID NO: 4); NAD(P)H dehydroaza, quinone 1 (NQO1) mồi xuôi 5'-AAAACACTGCCCTCTTGTGG-3' (SEQ ID NO: 5), mồi ngược 5'-GTGCCAGTCAGMÈOCTGGTA-3' (SEQ ID NO: 6); Protein ribô thể S9 (RPS9) mồi xuôi 5'-GATGAGAAGGACCCACGGCGTCTG-3' (SEQ ID NO: 7), mồi ngược 5'-GAGACAATCCAGCAGCCCAGGAGGG-3' (SEQ ID NO: 8); Thioredoxin Reductaza 1 (TXNRD1) mồi xuôi 5'-ATTGCCACTGGTGAAAGACC-3' (SEQ ID NO: 9), mồi ngược 5'-ACCAATTTTGTGGCMÈOGT-3' (SEQ ID NO: 10). Tất cả các mồi đã được hợp thức hóa trước đây về mức độ đặc hiệu và hiệu quả khuếch đại. cDNA được khuếch đại sử dụng các điều kiện chu trình sau đây: (95 °C trong 3 phút, 44 chu trình ở nhiệt độ 95 °C trong 30 giây, 60 °C trong 15 giây, 72 °C trong 15 giây, sau đó là đường cong nóng chảy 55 °C đến 95 °C với lượng tăng là 0,5 °C). Độ phong phú tương đối mỗi Gen đích Nrf2 được xác định sử dụng phương pháp

C_T so sánh ($\Delta\Delta C_T$). Các phản ứng PCR được thực hiện trong ba giếng cho mỗi mẫu. Hai thí nghiệm độc lập được thực hiện sử dụng các điều kiện được mô tả trên đây. Việc điều trị Các nguyên bào sợi phổi HFL1 bằng RTA 408 trong 18 giờ dẫn đến biểu hiện gia tăng của một vài gen đích Nrf2, gồm NQO1, HMOX1, GCLM, và TXNRD1, như được đo bởi PCR định lượng (FIG.4a-d). Đối với tất cả các gen được thử nghiệm, cảm ứng do RTA 408 phụ thuộc vào liều lượng và rõ ràng ở các nồng độ thấp ở mức 15,6 nM. Việc điều trị các tế bào biểu mô cuống phổi BEAS-2B bằng RTA 408 trong 18 giờ dẫn đến sự tăng phụ thuộc vào liều tương tự của tất cả các gen đích Nrf2 được đánh giá (FIG.5a-d). RTA 408 cũng gia tăng biểu hiện của các gen đích Nrf2 trong các tế bào màng nang cuộn mao mạch của người thường (nHMC), dòng tế bào tiểu thần kinh đệm BV2 ở chuột nhắt, và dòng tế bào u nguyên bào thần kinh SH-SY5Y ở người với các nồng độ tương tự.

Các mức protein của các đích Nrf2 NQO1 và HMOX1 được đo trong các tế bào SH-SY5Y và BV-2 bằng phương pháp Western blot sau khi điều trị bằng RTA 408. SH-SY5Y các tế bào được đặt trong các đĩa 6 giếng với mật độ là 4×10^5 tế bào/giếng. Các tế bào BV-2 được đặt trong các đĩa 6 giếng với mật độ là $2,5 \times 10^4$ tế bào/giếng. Hai mươi bốn (BV-2) hoặc 48 giờ (SH-SY5Y) giờ sau khi đặt, các tế bào được điều trị bằng RTA 408 trong 24 giờ. Sau khi điều trị, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS lạnh và được thu hoạch trong đệm phân giải. Các tế bào được nghiền bằng sóng âm và mảnh vỡ được dọn sạch bằng ly tâm (10 phút @ lực ly tâm tối đa 18.000, Beckman Coulter, máy ly tâm Microfuge 18). Tổng protein trên bề mặt được định lượng sử dụng thuốc thử protein Bio-Rad có BSA làm chuẩn. Các lượng bằng nhau của tổng protein tế bào được tách trên SDS-PAGE, và các protein được chuyển đến màng nitrocellulose. Các màng bị ngăn chặn trong 1 giờ trong TBST (1× TBS với 0,1% Tween-20) chứa 5% sữa, được rửa 3 lần bằng TBST, và được ủ bằng các kháng thể nguyên phát qua đêm ở 4 °C. Kháng thể NQO1 là từ Abcam (#AB2346); kháng thể HMOX1 (HO-1) là từ Santa Cruz (#sc-10789); kháng thể actin là từ Millipore (#MAB 1501). Sau khi rửa bằng TBST, các kháng thể thứ cấp được thêm vào TBST + 5% sữa trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các kháng thể thứ cấp IgG kháng chuột nhắt hoặc kháng thỏ dê AffiniPure là từ Jackson ImmunoResearch (tương ứng Catalog #111-035-144 và #115-035-146). Các màng được rửa trong TBST, được phát triển sử dụng ECL, và được phơi ra Phim tia X. Việc điều trị bằng RTA 408 cũng làm tăng các mức protein

NQO1 trong các tế bào SH-SY5Y theo cách phụ thuộc vào liều lượng (FIG.6a). Protein HMOX1 không được dò tìm trong các tế bào SH-SY5Y không được điều trị hoặc được điều trị bằng RTA 408. Trong các tế bào BV2, việc điều trị bằng RTA 408 làm tăng các mức protein NQO1 và HMOX1 ở các nồng độ lên đến 125 nM (FIG.6b). Giá trị EC_{50} cho việc cảm ứng biểu hiện protein Nrf2 trong các tế bào SK-N-SH bởi RTA 408 (56,4 nM) là ít hơn 45%-65% so với các giá trị EC_{50} cho 63171 (122 nM), 63189 (102 nM), và 63179 (126 nM). Liều tương tự của 63170 (54.6 nM) được yêu cầu.

EC_{50} được đo sử dụng phép phân tích NQO1 western trong tế bào, trong đó các tế bào được ủ với hợp chất được đánh giá trong ba ngày. Sau khi ủ với hợp chất cần quan tâm, các tế bào được phản ứng với kháng thể NQO1 ở chuột nhất và sau đó vào ngày kế tiếp, các tế bào được phản ứng với kháng thể IgG kháng chuột nhất IRDye-800CW. Các tín hiệu đích được hiển thị và sau đó được phân tích.

Phù hợp với cảm ứng các gen đích Nrf2 và các sản phẩm protein tương ứng, việc điều trị các tế bào đại thực bào ở chuột RAW264.7 trong 24 giờ làm tăng hoạt tính enzym NQO1 theo cách phụ thuộc vào liều lượng, với mức tăng rõ ràng ở mức 7,8 nM (FIG.7). Hoạt tính enzym NQO1 được đo bằng phép phân tích Prochaska biến đổi (Prochaska và Santamaria, Anal Biochem. 169:328–336, 1988, được đưa vào đây để tham chiếu).

Kết hợp cùng nhau, các dữ liệu này từ nhiều dòng tế bào cho thấy việc điều trị bằng RTA 408 làm tăng hoạt tính phiên mã được kiểm soát bởi các yếu tố phản ứng chống oxy hóa, làm tăng biểu hiện của các gen đích Nrf2, và làm tăng hoạt tính của NQO1, một sản phẩm gen đích Nrf2.

3. Tác động của RTA 408 lên các chất đánh dấu có khả năng oxy hóa khử tế bào

Glutathion và NADPH là các yếu tố quan trọng cần cho việc duy trì khả năng oxy hóa khử tế bào. Một vài gen liên quan đến sự tổng hợp glutathion (ví dụ như, GCLC và GLCM) và NADPH [ví dụ như, hexose-6-phosphat dehydroaza (H6PD) và enzym malat 1 (ME1)] đã được chứng minh là được điều chỉnh bởi Nrf2 (Wu, 2011). Tác động của Việc điều trị bằng RTA 408 đến tổng các mức glutathion được đánh giá ở dòng tế bào gan AML-12 ở chuột nhất sử dụng bộ kit Phân tích Glutathion GSH-Glo™ (Promega, Catalog #V6912) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Việc điều trị Các tế bào AML-12 trong 24 giờ bằng RTA 408 làm tăng tổng các mức glutathion tế

bào theo cách phụ thuộc vào liều lượng (FIG.8). Dữ liệu được thể hiện thể hiện hai thí nghiệm độc lập. Sự tăng $A > 2$ lần trong tổng glutathion được quan sát thấy ở các nồng độ RTA 408 thấp ở mức 15,6 nM. Giá trị EC_{50} sử dụng mẫu chuột nhắt RAW264.7 để cảm ứng các mức glutathion bởi RTA 408 (9,9 nM) thấp hơn 22%-57% so với các giá trị EC_{50} cho 63170 (12,1 nM), 63171 (23,2 nM), và 63189 (16 nM).

Tác động của việc điều trị bằng RTA 408 đến các mức NADPH, như được đo bởi khả năng hút của chất nhuộm nhạy oxy hóa khử, WST-1 (Roche Applied Science, Catalog #11644807001), được đánh giá trong các tế bào HCT-116. Khả năng hút WST-1 thường được sử dụng để đánh giá khả năng sống được của tế bào bằng cách đo sự tạo ra phân hủy đường NAD(P)H bởi các tế bào có thể sống được. Do đó, trong các trường hợp việc tạo ra NADPH tăng lên mà không có bất kỳ tác động nào đến khả năng sống được của tế bào, khả năng hút WST-1 cũng làm tăng (Berridge và đồng tác giả, 1996, được đưa vào đây để tham chiếu). Một vài gen chủ yếu liên quan đến việc tạo ra NADPH cũng đã được thể hiện là được điều chỉnh bởi Nrf2 (Thimmulappa và đồng tác giả, 2002; Wu, và đồng tác giả, 2011, cả hai tài liệu này được đưa vào đây để tham chiếu). Việc điều trị bằng RTA 408 trong 24 giờ làm tăng khả năng hút WST-1 theo cách phụ thuộc vào liều lượng (FIG.9), gợi ý rằng các mức NADPH tăng lên.

Tác động của RTA 408 đến biểu hiện của các gen liên quan đến sự tổng hợp Các con đường NADPH cũng được đánh giá trong nghiên cứu này. Các tế bào HCT-116 được điều trị bằng RTA 408 trong 24 giờ, và các mức mRNA của H6PD, photphogluconat dehydroaza (PGD), transketolaza (TKT), và ME1 được đo sử dụng PCR định lượng. Các tế bào HCT-116 được đặt trong các đĩa 6 giếng với mật độ là 3×10^5 các tế bào/giếng. Vào ngày kế tiếp, các tế bào được điều trị bằng DMSO (chất dẫn thuốc), 10 nM RTA 408, hoặc 50 nM RTA 408 trong 24 giờ. Mỗi giếng nhận cùng lượng chất dẫn thuốc. Sau khi điều trị, môi trường được loại bỏ và các tế bào được thu hoạch sử dụng dung dịch đệm RLT (Qiagen). Các dịch thủy phân được đồng nhất hóa sử dụng các cột QIAshredder (Qiagen, Catalog #79654) và RNA được tách sử dụng các bộ kit RNeasy Mini (Qiagen, Catalog #74104). Đối với phiên mã ngược, RNA (1 μ g) được kết hợp với đoạn mồi Oligo(dT)12-18 và H₂O với thể tích cuối cùng là 23.25 μ L. Hỗn hợp được đun nóng đến 70 °C trong 10 phút và sau đó được đặt trên nước đá. Một hỗn hợp chính chứa 8 μ L 5X đệm chuỗi ban đầu, 2 μ L 1 mg/mL BSA, 2 μ L 20 mM DTT, 4 μ L 5 mM hỗn hợp dNTP, 0.25 μ L RNaseOUT™ và 0,5 μ L enzym phiên

mã ngược Superscript® II được thêm vào hỗn hợp RNA và được ủ ở 42 °C trong 1 giờ. Phản ứng bị giải hoạt bằng cách đun nóng đến 70 °C trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng theo tỷ lệ 1:3 với H₂O trước khi sử dụng trong qPCR. 2,5 µL phản ứng phiên mã ngược pha loãng được kết hợp với một bộ các đoạn mồi PCR (nồng độ cuối cùng 0,36 µM), 2X iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Catalog #170-8885) và H₂O đến thể tích cuối cùng là 20 µL. Các trình tự cho các đoạn mồi PCR như sau: Protein ribô thể S9 (RPS9) mồi xuôi 5'-GATGAGAAGGACCCACGGCGTCTG-3' (SEQ ID NO: 7), mồi ngược 5'-GAGACAATCCAGCAGCCCAGGAGGG-3' (SEQ ID NO: 8); Hexose-6-phosphat dehydroaza (H6PD) mồi xuôi 5'-GAGGCCGTGTACACCAAGAT-3' (SEQ ID NO: 11), mồi ngược 5'-AGCAGTGGGGTGAAAATACG-3' (SEQ ID NO: 12), Photphogluconat dehydroaza (PGD) mồi xuôi 5'-AAGGCACTCTACGCTTCCAA-3' (SEQ ID NO: 13), mồi ngược 5'-AGGAGTCCTGGCAGTTTTCA-3' (SEQ ID NO: 14), Transketolaza (TKT) mồi xuôi 5'-MÈOCTCCGAGAGCAAMÈOCA-3' (SEQ ID NO: 15), mồi ngược 5'-TTGTATTGGCGGCTAGTTCC-3' (SEQ ID NO: 16); Enzym malat 1 (ME1) mồi xuôi 5'-TATATCCTGGCCAAGGCAAC-3' (SEQ ID NO: 17) mồi ngược 5'-GGATAAAGCCGACCCTCTTC-3' (SEQ ID NO: 18). Tất cả các mồi đã được hợp thức hóa trước đây về mức độ đặc hiệu và hiệu quả khuếch đại. cDNA được khuếch đại sử dụng các điều kiện chu trình sau đây: (95 °C trong 3 phút, 44 chu trình ở nhiệt độ 95 °C trong 30 giây, 60 °C trong 15 giây, 72 °C trong 15 giây, sau đó là đường cong nóng chảy là 55 °C đến 95 °C với mức tăng lên là 0.5 °C). Độ phong phú tương đối mỗi gen đích được xác định sử dụng phương pháp CT so sánh ($\Delta\Delta CT$). Các phản ứng PCR được thực hiện trong ba giếng cho mỗi mẫu. Hai thí nghiệm độc lập được thực hiện sử dụng các điều kiện được mô tả trên đây. Việc điều trị bằng RTA 408 dẫn đến sự tăng phụ thuộc vào liều lượng trong biểu hiện của các gen liên quan đến việc tổng hợp NADPH (FIG.10a-d).

Tóm lại, việc điều trị bằng RTA 408 làm tăng tổng các mức glutathion trong các tế bào gan AML-12 và làm tăng khả năng hút WST-1, một chất đánh dấu của sản phẩm NADPH, trong các tế bào HCT-116. Quan sát này có tương quan với sự tăng biểu hiện của một vài gen chính mã hóa các enzyme mã hóa liên quan đến sự tổng hợp NADPH.

4. Tác động của RTA 408 đến việc phát tín hiệu NF- κ B gây ra do TNF α

NF- κ B là một yếu tố phiên mã đóng vai trò trung tâm trong việc điều chỉnh nhiều phản ứng miễn dịch và dễ viêm. RTA 402 và các AIM khác đã được thể hiện để ức chế phát tín hiệu NF- κ B gây viêm trong nhiều dòng tế bào (Shishodia, 2006; Ahmad, 2006; Yore, 2006). Sử dụng dòng tế bào NIH3T3/NF- κ B-luc ở chuột nhắt (Panomics), các tác động của RTA 408 và các hợp chất 63171, 63179, 63170, và 63189 trên gen chỉ thị NF- κ B-Luc được khám phá. Dòng tế bào NIH3T3/NF- κ B-luc duy trì sự kết hợp nhiễm sắc thể của cấu trúc chất chỉ thị enzym luciferaza ở Đom đóm được điều chỉnh bởi tám bản sao của phần tử phản ứng NF- κ B. Các tác dụng của các hợp chất này có thể được định lượng bằng cách đo giá trị của NF- κ B IC₅₀. RTA 408 thể hiện 1,2 μ M IC₅₀, mà khi được bình thường hóa cho khả năng sống được thể hiện IC₅₀ là 1,4 μ M. Bốn hợp chất khác thể hiện các giá trị NIH3T3/NF- κ B IC₅₀ là 1,7, 0,2, 1,1, và 1,1 μ M, mà khi khả năng sống được bình thường hóa thể hiện các giá trị IC₅₀ tương ứng là 1,8, 0,6, 1,1, và 1,0 μ M. RTA 408 và các tác động của nó đến NF- κ B được thể hiện là hàm định liều và sự thay đổi số lần tương đối cũng như WST1 và WST1/2 được thể hiện ở FIG.11a & b. Tác động của RTA 408 đến việc phát tín hiệu NF- κ B do TNF α được đánh giá trong các tế bào HeLa/NF- κ B-Luc, dòng tế bào ung thư tuyến cổ ở người được truyền nhiễm ổn định với một cấu trúc chất chỉ thị enzym luciferaza dưới sự kiểm soát của nhiều phần tử phản ứng phiên mã NF- κ B. Các tế bào HeLa/NF- κ B-Luc được điều trị trước trong 1 giờ bằng RTA 408, sau đó được điều trị bằng TNF- α (10 ng/mL) thêm 5 giờ. Sau khi điều trị, độ phát quang được đo, và tác động của Việc điều trị trước bằng RTA 408 đến hoạt tính luciferaza do TNF- α được xác định. Các kết quả trung bình và các độ lệch chuẩn từ ba thí nghiệm độc lập được thể hiện ở FIG.12. RTA 408 ức chế phụ thuộc vào liều lượng sự hoạt hóa NF- κ B do TNF- α với giá trị IC₅₀ là 517 ± 83 nM. Các kết quả tương tự được quan sát thấy trong một dòng tế bào chỉ thị NF- κ B khác (A549/NF- κ B-Luc) ở đó RTA 408 ức chế sự hoạt hóa NF- κ B do TNF- α với giá trị IC₅₀ là 627 nM (trong dải 614-649 nM). RTA 408 hiệu quả hơn 1,6-1,8 lần trong việc làm giảm biểu hiện chỉ thị chất hoạt hóa NF- κ B trong các tế bào HeLa/NF- κ B-Luc tương ứng so với 63189 (854 nM) và 63170 (953 nM). Tiếp tục làm thí nghiệm với dòng tế bào A549 của người thể hiện giá trị IC₅₀ cho RTA 408 là 1,7 μ M và một giá trị là khả năng sống được bình thường hóa đến 1,7 μ M. IC₅₀ của RTA 408 thể hiện hoạt tính tương tự cho 63189, 63179, 63171, và

63170 thể hiện các giá trị IC_{50} tương ứng là 1,1, 1,4, 2,0, và 1,0. Khi các giá trị đó là khả năng sống được bình thường hóa, phân tích thể hiện tương ứng là 1,2, 1,5, 2,1 và 1,1 μM IC_{50} . Sự thay đổi số lần cho NF- κB dưới dạng hàm nồng độ RTA 408 cùng với các đường cong WST1 và WST1/2 được vẽ và được thể hiện ở FIG.13a & b.

Tác động của RTA 408 đến sự phosphoryl hóa do TNF- α của I κ B α , một bước quan trọng trong sự hoạt hóa của con đường NF- κB , cũng được đánh giá trong các tế bào HeLa. Các tế bào HeLa được điều trị trước bằng RTA 408 trong 6 giờ, sau đó được điều trị bằng TNF- α (20 ng/mL) trong 5 phút. Các mức tổng và được photphorylat hóa của I κ B α được đánh giá bằng phương pháp Westen blot. Các kháng thể I κ B α nguyên phát là từ Santa-Cruz (sc-371), kháng thể pI κ B α là từ sự phát tín hiệu tế bào (9246), kháng thể actin là từ Millipore (MAB 1501). Các kháng thể thứ cấp IgG kháng chuột nhất đề affini-pure kết hợp với peroxidaza và (IgG) kháng thỏ đề affini-pure kết hợp với peroxidaza được mua từ Jackson ImmunoResearch. Các vết protein được phát triển sử dụng ECL, và được phơi ra phim tia X. Phù hợp với các kết quả từ phân tích chất chỉ thị enzym luciferaza, RTA 408 ức chế sự phosphoryl hóa do TNF- α của I κ B α theo cách phụ thuộc vào liều lượng (FIG.14).

RTA 408 cũng được chứng minh là ức chế các con đường tín hiệu gây viêm khác, chẳng hạn như bộ chuyển đổi tín hiệu do IL-6 và bộ hoạt hóa photphoryl hóa phiên mã 3 (STAT3) và bộ hoạt hóa thụ thể sự sinh hủy cốt bào do phối tử NF- κB (RANKL). Trong các tế bào HeLa, việc điều trị trước bằng 1 μM RTA 408 trong 6 giờ ức chế sự photphoryl hóa STAT3 do IL-6. STAT3 (124H6) và các kháng thể đơn dòng photpho-STAT3 (Tyr705) là từ công nghệ phát tín hiệu tế bào. Các kháng thể thứ cấp IgG kháng chuột nhất đề affini-pure kết hợp với peroxidaza và IgG kháng thỏ đề affini-pure kết hợp với peroxidaza là từ Jackson ImmunoResearch. Sinh hủy cốt bào là một quy trình biệt hóa nhiều bước do liên kết RANKL với thụ thể của nó, RANK, trên các tế bào có nguồn gốc sinh huyết. Điều này dẫn đến sự hoạt hóa NF- κB và MAPK, lần lượt làm tăng phiên mã của các gen đích đặc hiệu hủy cốt bào, gồm phosphataza axit kháng tartrat (TRAP). Tác động của RTA 408 đến việc sinh hủy cốt bào do RANKL được đánh giá trong dòng tế bào đại thực bào ở chuột RAW264.7. Các tế bào RAW 264.7 được đặt trong các đĩa 24 giếng với mật độ là 5.000 tế bào/giếng. Vào ngày kế tiếp, các tế bào được điều trị bằng RTA 408 trong 2 giờ và sau đó được điều trị bằng 50 ng/mL RANKL chuột nhất tái tổ hợp (các hệ R&D). Các tế bào được điều

trị được ủ trong bốn ngày để cho phép biệt hóa thành các hủy cốt bào. Biệt hóa thành các hủy cốt bào được đánh giá bằng cách đo hoạt tính TRAP. Tóm lại, 90 μ L môi trường nuôi cấy tế bào được điều hòa được loại bỏ khỏi mỗi giếng thử nghiệm và được phân chia thành ba giếng (30 μ L/giếng) của đĩa 96 giếng. Sau đó, 170 μ L dung dịch đệm Phân tích TRAP (Kamiya Biomedical) được thêm vào mỗi giếng và đĩa được ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 3 giờ. Sau khi ủ, khả năng hút ở mức 540 nm được xác định sử dụng quang phổ kế đọc đĩa Spectramax M2. RTA 408 ức chế phụ thuộc vào liều lượng Hoạt tính TRAP do RANKL và sự tạo thành các hủy cốt bào, với IC₅₀ là ~5-10 nM.

5. Tác động của RTA 408 đến biểu hiện của các gen mã hóa các enzym transaminaza

Sự tăng transaminaza được quan sát thấy trong cuộc nghiên cứu độc tính kéo dài 28 ngày với RTA 408 ở chuột cống và, ở mức độ thấp hơn nhiều, ở khỉ. Các kết quả tương tự được quan sát thấy sau khi sử dụng qua đường miệng một AIM có liên quan (bardoxolon metyl) ở người (Pergola, 2011). Một giả thuyết cho tác động chính là các AIM trực tiếp hoặc gián tiếp làm tăng biểu hiện gen transaminaza không có độc tính tế bào. Để đánh giá xem việc điều trị bằng RTA 408 có ảnh hưởng đến các mức mRNA của transaminaza, các tế bào gan AML-12 ở chuột được điều trị bằng RTA 408 trong 18 giờ, và các mức mRNA của các gen mã hóa các transaminaza được đo sử dụng PCR định lượng. Các tế bào AML-12 được đặt trong các đĩa nuôi cấy 6 giếng với mức 3×10^5 tế bào/giếng sử dụng 2 mL môi trường cho một giếng. Vào ngày kế tiếp, các tế bào được điều trị bằng DMSO (chất dẫn thuốc) hoặc 250 nM và 500 nM RTA 408 trong 18 giờ ở 37 °C. Mỗi giếng nhận 0,1% DMSO. Ba thí nghiệm lặp lại độc lập được thực hiện. Sau khi điều trị, môi trường được loại bỏ và các tế bào được thu hoạch sử dụng Dung dịch đệm RLT (Qiagen). Các dịch thủy phân được đồng nhất hóa sử dụng các cột QIAshredder (Qiagen, Catalog #79654) và RNA được tách sử dụng các bộ kit RNeasy Mini (Qiagen, Catalog #74104). Đối với phiên mã ngược, RNA (1 μ g) được kết hợp với đoạn mồi Oligo(dT)12-18 và H₂O với thể tích cuối cùng là 23.25 μ L. Hỗn hợp được đun nóng đến 70 °C trong 10 phút và sau đó được đặt trên nước đá. Một hỗn hợp chính chứa 8 μ L 5X đệm chuỗi ban đầu, 2 μ L 1 mg/mL BSA, 2 μ L 20 mM DTT, 4 μ L 5 mM hỗn hợp dNTP, 0,25 μ L RNaseOUT™ và 0,5 μ L enzym phiên mã ngược Superscript® II được thêm vào hỗn hợp RNA và được ủ ở 42 °C trong 1 giờ. Phản ứng bị giải hoạt bằng cách đun nóng đến 70 °C trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng theo tỷ lệ 1:3 với H₂O trước khi sử dụng trong qPCR. 2,5 μ L

phản ứng phiên mã ngược pha loãn được kết hợp với một bộ các đoạn mồi PCR (nồng độ cuối cùng 0,36 μ M), 2X iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, Catalog #170-8885) và H₂O đến thể tích cuối cùng là 20 μ L. Các trình tự cho các đoạn mồi PCR như sau: Protein ribô thể L19 (Rpl19) mồi xuôi 5'-TCAGGCTACAGAAGAGGCTTGC-3' (SEQ ID NO: 19), mồi ngược 5'-ACAGTCACAGGCTTGCGGATG-3' (SEQ ID NO: 20); NAD(P)H dehydroaza, quinone 1 (Nqo1) mồi xuôi 5'-TCGGGCTAGTCCCAGTTAGA-3' (SEQ ID NO: 21), mồi ngược 5'-AAAGAGCTGGAGAGCCAACC-3' (SEQ ID NO: 22); Glutamic pyruvic transaminaza 1 (Gpt1 hoặc Alt1) mồi xuôi 5'-CACGGAGCAGGTCTTCAACG-3' (SEQ ID NO: 23), mồi ngược 5'-AGAATGGTMÈOCCGGAAATG-3' (SEQ ID NO: 24); Glutamic pyruvic transaminaza 2 (Gpt2 hoặc Alt2) mồi xuôi 5'-CGCGGTGCAGGTCAACTACT-3' (SEQ ID NO: 25), mồi ngược 5'-CCTMÈOCAGCCAGGAGAAAA-3' (SEQ ID NO: 26); Glutamat oxaloaxetat transaminaza 1 (Got1 hoặc Ast1) mồi xuôi 5'-GGCTATTCGCTATTTTGTGT-3' (SEQ ID NO: 27), mồi ngược 5'-GACCAGGTGATTCGTACAAT-3' (SEQ ID NO: 28); Glutamat oxaloaxetat transaminaza 2 (Got2 hoặc Ast2) mồi xuôi 5'-AGAGTCCTCTTCAGTMÈOTG-3' (SEQ ID NO: 29), mồi ngược 5'-ATGATTAGAGCAGATGGTGG-3' (SEQ ID NO: 30). Tất cả các mồi đã được hợp thức hóa trước đây về mức độ đặc hiệu và hiệu quả khuếch đại. cDNA được khuếch đại sử dụng các điều kiện chu trình sau đây: (95 °C trong 3 phút, 44 chu trình ở 95 °C trong 30 giây, 60 °C trong 15 giây, 72 °C trong 15 giây, sau đó là đường cong nóng chảy ở 55 °C đến 95 °C với mức tăng lên là 0,5 °C). Độ phong phú tương đối mỗi gen đích được xác định sử dụng phương pháp CT so sánh ($\Delta\Delta$ CT). Các phản ứng PCR được thực hiện trong ba giếng cho mỗi mẫu. Việc điều trị bằng RTA 408 làm tăng các mức mRNA của alanin transaminaza 1 (Alt1 hoặc Gpt1) và atpatat transaminaza 1 (ASt1 hoặc Got1) (FIG.15a,c). RTA 408 không có tác động nào đến các mức mRNA của alanin transaminaza 2 (Alt2 hoặc Gpt2) và làm giảm các mức mRNA của atpatat transaminaza 2 (ASt2 hoặc Got2) (FIG.15b,d). Các kết quả này cho thấy RTA 408, ở các nồng độ được thử nghiệm (250 nM hoặc 500 nM), ảnh hưởng đến biểu hiện gen transaminaza in vitro.

6. Tác động của RTA 408 đến các mức độ của các chất trung gian phân hủy đường

Các nghiên cứu ở chuột nhất đái tháo đường đã cho thấy bardoxolon metyl làm tăng khả năng hấp thu glucoza kích thích bởi insulin đặc hiệu cho cơ bắp (Saha, 2010). Ở người, phần trăm cao hơn người bệnh tiếp nhận bardoxolon metyl theo báo cáo trải qua các chứng co rút cơ bắp so với người bệnh tiếp nhận giả dược (Pergola, 2011). Co cứng cơ bắp cũng đã được thể hiện ở những người mắc bệnh đái tháo đường sau khi sử dụng insulin, điều này cho thấy mối liên hệ có thể có với sự chuyển hóa glucoza ở cơ bắp. Tác động của RTA 408 đến sự chuyển hóa phân hủy đường được đánh giá thông qua việc đánh giá lactat và các mức pyruvat ở các tế bào cơ bắp C2C12 ở loài gặm nhấm được nuôi cấy. Để đo các mức lactat, các ống cơ C2C12 biệt hóa được điều trị bằng 1 μM hoặc 2 μM RTA 408 hoặc insulin trong 3 giờ ở nhiệt độ 37 °C. Đệm được loại bỏ và được lưu giữ lại để đo các mức lactat ngoại bào. Mảnh vỡ tế bào được vê tròn ly tâm (10 phút với tốc độ 14,000 vòng/phút) trước khi đo lactat. Để đo lactat nội bào, các tế bào được treo lơ lửng trong 0,1% Triton X-100 trong PBS và được dung giải bằng cách cắt bằng kim 25 gauge. Hợp chất dung giải tế bào được ly tâm (10 phút với tốc độ 14.000 vòng/phút, 4° C) và lactat được đo trên bề mặt. Lactat nội bào và ngoại bào được đo sử dụng Bộ Kit Phân tích Lactat (BioVision, Catalog # K607-100). Tương tự với việc điều trị bằng insulin, việc điều trị các ống cơ C2C12 biệt hóa với 1 μM hoặc 2 μM RTA 408 trong 3 giờ làm tăng đáng kể các mức lactat nội bào và ngoại bào theo cách phụ thuộc vào liều lượng.

Để đo các mức pyruvat, các ống cơ C2C12 biệt hóa được điều trị bằng 250 hoặc 500 nM RTA 408 hoặc 100 nM insulin trong 18 giờ. Sau khi điều trị bằng thuốc, môi trường được loại bỏ và các tế bào được rửa bằng PBS. Các tế bào được dung giải trong Đệm Phân tích Pyruvat (Bộ Kit Phân tích Lactat, BioVision, Catalog # K609-100). Các dịch thủy phân tế bào được ly tâm (10 phút với tốc độ 14,000 vòng/phút, 4 °C) và các mức pyruvat được đo trên bề mặt. Việc điều trị các ống cơ C2C12 biệt hóa bằng 250 nM hoặc 500 nM RTA 408 trong 18 giờ ($P < 0,0001$, được chú thích bằng các dấu hoa thị) cũng làm tăng đáng kể các mức pyruvat nội bào theo cách phụ thuộc vào liều lượng (FIG.16). Kết hợp với nhau, các kết quả này cho thấy RTA 408, ở các nồng độ được thử nghiệm, có thể ảnh hưởng đến các chất trung gian phân hủy đường ở cơ bắp in vitro; tuy nhiên, không rõ ràng là các kết quả từ hệ in vitro này như thế nào ở các

nồng độ RTA 408 được thử nghiệm liên quan đến các tác động có thể có đối với sự chuyển hóa glucoza ở các mức liều lượng liên quan đến lâm sàng ở người.

7. Đánh giá in vitro sự chảy thoát ra RTA 408 do MRP-1

Một trong những đặc điểm của ứng viên thuốc là tỉ lệ chảy thoát của hợp chất. Tỷ lệ chảy thoát đo mức dễ dàng hợp chất được vận chuyển qua màng. Protein MRP-1, hoặc protein hỗ trợ kháng nhiều loại thuốc 1, thuộc họ protein giúp tạo thuận lợi cho việc vận chuyển các anion hữu cơ và các phân tử nhỏ khác qua các màng tế bào. Tỷ lệ chảy thoát lớn hơn thường có nghĩa là ứng viên thuốc dễ được vận chuyển ra khỏi màng hơn và ít sẵn có cho việc điều biến các quy trình nội bào hơn. Các protein tương tự cũng điều chỉnh việc vận chuyển các hợp chất qua vách ngăn máu não. Tỷ lệ chảy thoát MRP-1 cho RTA 408 (1,3) được xác định bằng thí nghiệm là thấp hơn gần 10 lần so với 63170 (10) và 63171 (11,2) và thấp hơn trên 40 lần so với 63179 (56,5) và 63189 (57,1). Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, RTA 408 có thể không phải là nền tốt cho MRP-1 và/hoặc ứng viên cho sự chảy thoát qua trung gian p-glycoprotein tại vách ngăn máu não. Theo một số phương án, RTA 408 có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn chức năng của hệ thần kinh trung ương (CNS).

C. Các tác động bảo vệ của RTA 408 trong các mẫu bệnh phổi ở con vật

RTA 408 được thử nghiệm trong một vài mẫu bệnh phổi để đánh giá tính hiệu quả có thể của nó trong phổi. Đối với tất cả các nghiên cứu, RTA 408 được sử dụng hàng ngày qua đường miệng trong đầu vùng với các mức liều lượng trong khoảng 3 đến 150 mg/kg. Trong phần lớn các trường hợp, RTA 408 được sử dụng bắt đầu một vài ngày trước khi gây ra phản ứng tổn thương phổi.

1. Chứng viêm phổi do LPS ở chuột nhắt

RTA 408 được thử nghiệm trong hai nghiên cứu về chứng viêm phổi do LPS ở chuột nhắt. Ở nghiên cứu thứ nhất, nhằm tìm ra khoảng liều lượng sơ bộ, RTA 408 (30, 100, hoặc 150 mg/kg) được sử dụng qua đường miệng một lần hàng ngày trong ba ngày, sau đó là cho LPS 1 giờ sau liều cuối cùng. Chất lỏng thụ rửa cuống phổi (BALF) được thu thập 20 giờ sau khi cho LPS (21 giờ sau liều RTA 408 cuối cùng) và được đánh giá các mức độ của các chất đánh dấu gây viêm (nghĩa là, IL-6, IL-12p40, TNF- α , và RANTES) sử dụng công nghệ Luminex™. Việc điều trị bằng RTA 408 dẫn đến sự giảm đáng kể trong IL-12p40 ở tất cả các liều lượng và trong TNF- α với các

liều 100 và 150 mg/kg (FIG.17). Trong nghiên cứu thứ hai, RTA 408 (10, 30, hoặc 100 mg/kg) được sử dụng hàng ngày trong 6 ngày, sau đó cho LPS 1 giờ sau liều cuối cùng. Trong nghiên cứu này, sự giảm đáng kể trong trọng lượng cơ thể được quan sát thấy ở mức liều lượng 100 mg/kg bắt đầu vào ngày 3. Sự giảm đáng kể trong TNF- α được quan sát thấy ở liều lượng 10 mg/kg, và sự giảm đáng kể trong IL-12p40, TNF- α , và RANTES được quan sát thấy ở liều lượng 30 mg/kg (FIG.18a). Tiếp tục đánh giá phổi từ chuột nhắt trong nghiên cứu này cho thấy sự tham gia có ý nghĩa của các gen đích Nrf2 có liên quan, gồm cảm ứng đáng kể hoạt tính enzym NQO1 (bằng cách đo tỷ lệ giảm 2,6-diclorophenol-indophenol) và sự tăng tổng GSH (GSH-Glo™, Promega, Madison, WI) ở mức 10 và 30 mg/kg (FIG.18b).

2. Xơ hoá phổi do bleomycin

Tác động của RTA 408 cũng được đánh giá trong các mẫu xơ hoá phổi do bleomycin ở chuột nhắt và chuột cống. Trong nghiên cứu sơ bộ thứ nhất, RTA 408 (10, 30, hoặc 100 mg/kg) được sử dụng hàng ngày cho chuột nhắt bằng cách nhồi ống qua miệng trong 39 ngày, có thử thách bleomycin (trong mũi) vào ngày 10. Vào ngày sử dụng liều cuối cùng, mô phổi được thu thập và mô học được thực hiện để đánh giá mức độ của chứng viêm và xơ hóa mô kẽ. Trong mẫu này, không có tác động đáng kể về mặt thống kê nào được quan sát thấy ở các liều RTA 408 được thử nghiệm (FIG.19a & b). Tiếp tục đánh giá sử dụng mẫu xơ hoá phổi ở chuột cống đã định rõ đặc điểm rộng rãi tại Lovelace Respiratory Research Institute. Trong nghiên cứu này, chuột cống được thử thách với bleomycin hoặc muối bằng cách cho trong khí quản vào ngày 0. Sau thử thách, các con vật nhận RTA 408 (3, 10, hoặc 30 mg/kg) hằng ngày thông qua nhồi ống qua miệng trong 28 ngày. Việc sử dụng liều 30 mg/kg tạm ngừng vào ngày 14 do sự khử nước và tiêu chảy quá mức ở các con vật. Đối với các con vật còn lại, chất lỏng rửa rửa cuống phổi được thu thập vào ngày 28 để đánh giá các thâm nhiễm gây viêm bằng phương pháp đo lưu lượng tế bào, và mô phổi được phân tích các mức hydroxyprolin bằng LC-MS và mô bệnh học. Việc thử thách với bleomycin sulfat gây ra sự giải phóng đáng kể các bạch cầu trung tính và sự tăng collagen tan được trong BALF, cũng như sự tăng hydroxyprolin trong phổi. Việc điều trị bằng 3 và 10 mg/kg RTA 408 ngăn chặn đáng kể sự thâm nhiễm tế bào nhiều dạng nhân (PMN) vào phổi và cũng làm giảm có ý nghĩa (~10%-20%) sự lắng đọng hydroxyprolin (FIG.20a & FIG.20b).

Điều quan trọng là sự đánh giá mô bệnh học cho thấy sự giảm đáng kể sự lắng đọng collagen, được đánh giá bằng nhuộm ba màu, ở chuột cống được điều trị bằng RTA 408. Trong khi các con vật đối chứng dùng bleomycin chủ yếu thể hiện mức nhuộm màu vừa phải, các con vật được điều trị bằng 10 mg/kg RTA 408 có mức nhuộm màu chủ yếu là rất nhỏ cho đến nhẹ (Bảng 2).

Bảng 2: Tác động của RTA 408 đến sự lắng đọng collagen trong phổi chuột cống được đánh giá bằng cường độ nhuộm ba màu

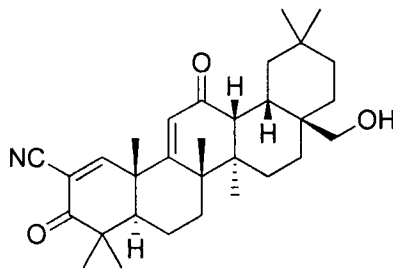
Cường độ Nhuộm màu ^a	Đối chứng Bleomycin	RTA 408 (3 mg/kg)	RTA 408 (10 mg/kg)
Rất nhỏ	0	0	3
Nhẹ	1	0	4
Vừa phải	7	7	1

^a Các giá trị thể hiện cường độ nhuộm màu ở các con vật nhuộm ba màu ở kẽ ở các khu vực có những biến đổi ở phổi do bleomycin.

Đánh giá thêm về phổi từ chuột cống trong nghiên cứu này cũng cho thấy sự tham gia có ý nghĩa của các gen đích Nrf2 có liên quan như được phân tích bằng phương pháp phân tích đa hợp Quantigene Plex 2,0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) (FIG.21). RTA 408 làm tăng đáng kể và phụ thuộc vào liều lượng hoạt tính enzyme NQO1, Txnrd, Gsr, và Gst trong phổi của chuột cống được phơi ra bleomycin, thể hiện sự hoạt hóa Nrf2 do RTA 408 trong việc điều tiết bệnh này. Hoạt tính enzym NQO1 được đánh giá bằng cách đo tỷ lệ giảm DCPIP. Các hoạt tính enzyme Txnrd, Gst, và Gst được đo sử dụng các bộ kit sẵn có thương mại từ Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

3. COPD do khói thuốc lá ở chuột nhắt

RTA 408 cũng được thử nghiệm ở mẫu chuột nhắt có COPD do khói thuốc lá. Chuột nhắt nhận RTA 408 (3, 10, hoặc 30 mg/kg) hàng ngày thông qua nhồi ống qua miệng trong 2 tuần và được phơi nhiễm khói thuốc 5 ngày/tuần trong suốt thời kỳ cho uống RTA 408 theo liều. Ở cuối nghiên cứu, mô phổi và BALF được thu thập để phân tích các thâm nhiễm để gây viêm và các xytokin. Trong thí nghiệm này, việc sử dụng nhiều liều RTA 408 với các liều thấp ở mức 3 mg/kg RTA 408 dẫn đến sự ngăn chặn đáng kể các xytokin gây viêm, gồm KC (đồng đẳng chuột nhắt chức năng có IL-8 của người) và TNF- α như được đo sử dụng Công nghệ Luminex™. Thông tin tóm lược các kết quả từ nghiên cứu này được thể hiện ở FIG.22a-e. Dạng AIM tương tự (63355) được thử nghiệm trong cùng nghiên cứu để so sánh. 63355 là hợp chất có công thức:



Sự đánh giá thêm về phổi từ chuột nhắt trong nghiên cứu này cũng cho thấy sự tham gia có ý nghĩa của các gen đích Nrf2 có liên quan (FIG.23). Hoạt tính enzym NQO1 trong phổi, được đo là tỷ lệ giảm DCPIP, bị giảm đáng kể do phơi nhiễm khói thuốc; việc sử dụng RTA 408 cứu giúp sự hao hụt này. Hoạt tính enzyme Txnrd cũng do liều 30 mg/kg RTA 408 gây ra. Nói chung, hoạt tính enzyme Gsr không bị biến đổi, và hoạt tính enzyme Gst giảm đi theo điều trị – cả hai điều này là do phản ứng thái dương cho các enzym này. Các hoạt tính enzyme Txnrd, Gst, và Gsr enzym được đo sử dụng các bộ kit sẵn có thương mại từ Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

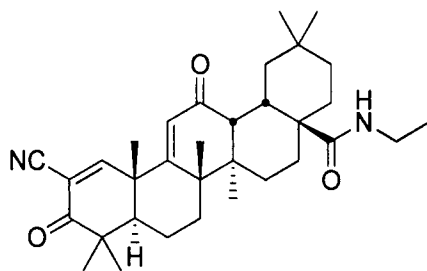
4. Bệnh hen do albumin trứng ở chuột nhắt

Hoạt tính có thể có của RTA 408 cũng được đánh giá trong một nghiên cứu thí điểm ở mẫu chuột nhắt có bệnh hen do albumin trứng. Chuột nhắt được làm nhạy với việc tiêm IP albumin trứng và nhôm hydroxit vào ngày 0 và ngày 14 và được thử thách trong mũi với albumin trứng trong muối vào các ngày 14, 25, 26, và 27. Chuột nhắt nhận RTA 408 (3, 10, hoặc 30 mg/kg) hàng ngày thông qua nhồi ống qua miệng vào các ngày 1-13 và 15-27. Sau khi làm cho nhạy và thử thách với albumin trứng, chuột được điều trị chất dẫn thuốc tăng đáng kể tổng số các bạch cầu so với chuột được điều trị (dexamethason) đối chứng dương. Sự tăng số lượng các tế bào T và các tế bào B cũng được quan sát thấy ở chuột được điều trị chất dẫn thuốc. Việc điều trị bằng RTA 408 ở mức 30 mg/kg làm giảm đáng kể số lượng và phần trăm các tế bào B trong các đường không khí. RTA 408 (3 và 30 mg/kg) cũng làm giảm đáng kể số lượng các đại thực bào, nhưng không giảm phần trăm trung bình các đại thực bào, được tìm thấy trong các đường không khí. Các kết quả quan sát này cho thấy tính hiệu quả có thể có trong mẫu này.

5. Các tác động của RTA 408 đến sự nhiễm trùng ở chuột nhắt do LPS

Nhiễm trùng được gây ra vào ngày 0 bằng việc tiêm IP LPS (21 mg/kg), và sự sống sót kéo dài cho đến ngày 4. RTA 408 (10, 30, hoặc 100 mg/kg) được sử dụng hàng ngày thông qua nhồi ống qua miệng từ ngày -2 đến ngày 2. Trong nhóm đối

chứng chất dẫn thuốc, 60% các con vật sống sót cho đến ngày 4 (cao hơn ~40% tỷ lệ sống sót được kỳ vọng trong mẫu này). Trong các nhóm điều trị bằng RTA 408, 80% các con vật trong nhóm liều lượng 10 mg/kg và 90% các con vật trong nhóm liều lượng 30 mg/kg sống sót cho đến ngày 4 (FIG.24c & d). Đối với nhóm liều lượng 100 mg/kg, 90% các con vật sống sót cho đến ngày 4, chỉ có một con chết vào ngày 4. Mặc dù các tác dụng do RTA 408 này biểu thị tính hiệu quả sâu sắc trong mẫu này, tỷ lệ sống sót khá cao trong nhóm đối chứng chất dẫn thuốc loại trừ sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê giữa nhóm đối chứng và nhóm điều trị bằng RTA 408. Các kết quả thu được sử dụng hợp chất RTA 405 cũng được trình bày (FIG.24a & b). RTA 405 là hợp chất có công thức:



6. Các tác động của RTA 408 chống lại viêm niêm mạc miệng do bức xạ

Sự phơi nhiễm bức xạ cấp tính hướng đến túi đựng thức ăn ở má miệng của chuột hamster gây ra các tác động tương tự với các tác động được quan sát thấy ở viêm niêm mạc gây loét miệng ở người. Các tác dụng này gồm viêm niêm mạc vừa phải cho đến nghiêm trọng đặc trưng bởi biểu hiện ban đỏ nghiêm trọng và giãn mạch máu, sự ăn mòn niêm mạc bề mặt, và sự tạo thành các chỗ loét. Một nghiên cứu riêng lẻ được thực hiện để đánh giá các tác động của RTA 408 trong mẫu này. Vào ngày 0, mỗi chuột hamster được cho một liều lượng bức xạ cấp tính 40 Gy hướng đến túi đựng thức ăn ở má miệng bên trái. RTA 408 (10, 30, hoặc 100 mg/kg) được cho qua đường miệng hai lần mỗi ngày từ ngày -5 đến ngày -1, và ngày 1 đến ngày 15. Bắt đầu vào ngày 6 và tiếp tục cho đến ngày 28 vào các ngày xen kẽ, viêm niêm mạc miệng được đánh giá sử dụng thang ghi điểm 6 điểm tiêu chuẩn. Cả hai liều 30 và 100 mg/kg RTA 408 làm giảm đáng kể thời gian viêm niêm mạc gây loét (FIG.25). Hơn nữa, sự giảm phụ thuộc vào liều lượng phần trăm các con vật có điểm viêm niêm mạc ≥ 3 cũng được quan sát thấy. Tuy nhiên, việc sử dụng RTA 408 ở mức 30 hoặc 100 mg/kg gây ra sự giảm đáng kể phụ thuộc vào liều lượng ở trọng lượng ở chuột hamster bị bức xạ. Do

sự hao hụt trọng lượng vượt mức 20%, hai trong số tám con chuột hamster trong nhóm liều lượng 100 mg/kg bị gây chết nhẹ nhàng vào ngày 2.

7. Tác động của RTA 408 đến sự cảm ứng các chất đánh dấu sinh học Nrf2 in Vivo

Như được mô tả trên đây, một đích phân tử chính của RTA 408 là Nrf2, một chất điều chỉnh phiên mã trung tâm giúp bảo vệ tế bào chống oxy hóa. Sự hoạt hóa của Nrf2 làm tăng cường điều chỉnh nhóm các gen bảo vệ tế bào, gồm NQO1, các enzym liên quan đến sự tổng hợp GSH [nghĩa là, các đơn vị con chất biến đổi và xúc tác ligaza glutamat-xystein (Gclc và Gclm)], các enzym liên quan đến giải độc (nghĩa là, các glutathion S-transferaza [Gsts]), và các chất vận chuyển dòng thoát ra [nghĩa là, các protein liên quan đến kháng nhiều loại thuốc (các Mrp)]. Sự cảm ứng các gen dẫn đến nỗ lực phối hợp của tế bào để bảo vệ chống lại chấn thương do oxy hóa, nổi bật bởi việc làm tăng khả năng chống oxy hóa, cảm ứng tổng hợp glutathion, và tiếp hợp vào đào thải các phân tử có tiềm năng gây hại khỏi tế bào. Ngoài các điểm đầu nút hiệu quả và biểu hiện gen đích Nrf2 được đánh giá trong các mẫu được mô tả trên đây, khả năng của RTA 408 trong việc gây ra biểu hiện của các gen đích Nrf2 cũng được đánh giá sử dụng các mô được thu thập từ chuột nhắt, chuột cống và khi được điều trị bằng RTA 408 khỏe mạnh.

Trong một phần của các nghiên cứu độc tính kéo dài 14 ngày không GLP của RTA 408 ở chuột nhắt, chuột cống, và khi, các mô được thu thập nhằm mục đích đo mRNA và các mức hoạt tính enzym của các gen đích Nrf2 được lựa chọn. Đối với chuột nhắt và chuột cống, các mẫu gan được thu thập 4 giờ sau liều cuối cùng vào ngày 14. Đối với khi, máu (để tách riêng PBMC), gan, phổi, và mô não được thu thập 24 giờ sau liều cuối cùng vào ngày 14. Hoạt tính enzym cho NQO1, Gst, và glutathion reductaza (Gsr), như được mô tả trên đây, được đo trong các dịch treo mô đồng thể của mô. Các mức mRNA được xác định sử dụng công nghệ Quantigene Plex 2,0 theo phác đồ của nhà sản xuất, liên quan đến phân tích dựa trên lai giống sử dụng các chuỗi hạt từ tính xMAP® Luminex® để định lượng trực tiếp các đích mRNA. Ngoài ra, các nồng độ RTA 408 được đo trong huyết tương và các mô bằng các phương pháp LC/MS/MS trên khối phổ kế TQD (Waters, Milford, MA).

RTA 408 nói chung làm tăng biểu hiện của các gen đích Nrf2 khác nhau theo cách phụ thuộc vào liều lượng với các liều lượng là 10, 30, và 100 mg/kg (FIG.26, FIG.27a, FIG.28a & b). Sự tăng cường điều chỉnh phiên mã các gen đích Nrf2 bởi

RTA 408 cũng dẫn đến sự tăng chức năng trong phản ứng chống oxy hóa, như được thể hiện bởi sự tăng phụ thuộc vào liều lượng trong NQO1, Gst, và hoạt tính enzym Gsr trong gan loài gặm nhấm, cũng như gan và phổi khỉ (FIG.29a & b, FIG.30a & b, FIG.31a & b). Hơn nữa, ở các loài gặm nhấm, sự phơi nhiễm gan của RTA 408 có tương quan với mức độ hoạt tính enzym của NQO1, gien đích nguyên mẫu cho Nrf2 (FIG.32b, FIG.33b). Ở khỉ, mức độ biểu hiện mRNA ở các PBMC của cả NQO1 và sulfiredoxin 1 (SRXN1) có tương quan với sự phơi nhiễm huyết tương với RTA 408 (FIG.37a & b). Về mặt tổng thể, RTA 408 làm tăng các mức mRNA và hoạt tính của các đích Nrf2, và sự tăng này nói chung có tương quan với các phơi nhiễm mô và huyết tương, cho thấy các đích Nrf2 có thể đóng vai trò là các chất đánh dấu sinh học khả thi cho sự hoạt hóa Nrf2 (FIG.34a & b) và có thể hữu ích cho việc đánh giá hoạt tính dược lý của RTA 408 ở các chủ thể là người khỏe mạnh.

D. Dược lý học an toàn

Một chương trình dược lý học an toàn phù hợp với GLP được hoàn thành sử dụng RTA 408. Chương trình này bao gồm các nghiên cứu (khỉ) in vitro và in vivo (khỉ) trên hệ tim mạch, cũng như các nghiên cứu trên hệ hô hấp và hệ thần kinh trung ương ở chuột cống.

1. Đánh giá các tác động của RTA 408 đến các kênh hERG nhân bản vô tính được biểu hiện ở các tế bào HEK293

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá các tác động của RTA 408 đến dòng kali tinh lọc phía trong kích hoạt nhanh (I_{Kr}) được thực hiện bởi các kênh hERG (human *ete-a-go-go-related gene*) được biểu hiện ổn định ở dòng tế bào thận phôi của người (HEK293). Các tác động của RTA 408 trên dòng kali liên quan đến hERG được đánh giá sử dụng các phương pháp điện sinh lý học kẹp rập nối toàn bộ tế bào. RTA 408 được xác định là có giá trị IC_{50} là 12,4 μM trong phân tích hERG QPatch_Kv11.1. Giá trị này cao hơn gấp 2,5-3 lần các giá trị tương ứng cho 63170 (4,9 μM) và 63189 (3,8 μM). Giá trị IC_{50} RTA 408 tương tự với giá trị 63171 (15,7 μM).

2. Đánh giá tác động của RTA 408 đến tim mạch ở khỉ cynomolgus

Một nghiên cứu riêng lẻ được thực hiện để đánh giá các tác động tim mạch có thể có của RTA 408 ở khỉ cynomolgus di chuyển tự do có ý thức. Bốn con khỉ cynomolgus cái và bốn con khỉ cynomolgus đực giống nhau được cho chất dẫn thuốc

(dầu vùng) và RTA 408 với các mức liều lượng là 10, 30, và 100 mg/kg theo một thiết kế ô vuông Latin, với một con vật/giới/lần điều trị được định liều mỗi tuần sau đó là thời kỳ rửa là 14 ngày giữa các lần cho, cho đến khi mỗi con vật nhận tất cả số lần điều trị. Chất dẫn thuốc và RTA 408 được sử dụng cho tất cả các con vật thông qua nhồi ống qua miệng với thể tích liều lượng là 5 mL/kg.

Các con vật được cung cấp các máy phát đo từ xa để đo nhiệt độ cơ thể, huyết áp, số lần đập của tim, và đánh giá điện tâm đồ (ECG). Nhiệt độ cơ thể, huyết áp tâm thu, huyết áp tâm trương, và huyết áp động mạch trung bình, số lần đập của tim, và các thông số ECG (thời gian QRS và các khoảng RR, PR, và QT) được theo dõi liên tục từ ít nhất 2 giờ trước liều dùng cho đến ít nhất 24 giờ sau liều dùng. Các vạch ECG được in tại các điểm thời gian được chỉ định từ dữ liệu theo dõi tim mạch và được đánh giá định tính bởi bác sỹ chuyên khoa tim thú y được hội đồng chuyên khoa chứng nhận. Trước khi cho lần đầu khi nghiên cứu, các con vật không được điều trị được theo dõi liên tục các điểm đầu nút tim mạch trong ít nhất 24 giờ, và các dữ liệu này được sử dụng trong tính toán khoảng QT được điều chỉnh trong suốt cuộc nghiên cứu.

Các quan sát trạng thái bệnh, tử vong, chấn thương, và mức độ sẵn có thức ăn và nước được thực hiện ít nhất hai lần hàng ngày cho tất cả các con vật. Các quan sát lâm sàng được thực hiện trước liều dùng, gần 4 giờ sau liều dùng, và sau khi hoàn thành thời kỳ theo dõi tim mạch. Trọng lượng cơ thể được đo và được ghi chép vào ngày trước mỗi lần cho thuốc điều trị.

RTA 408 với các mức liều lượng là 10, 30, và 100 mg/kg không gây tử vong, các dấu hiệu lâm sàng bất lợi, hoặc dẫn đến những thay đổi có ý nghĩa về trọng lượng cơ thể, nhiệt độ cơ thể, huyết áp, hoặc các thông số ECG (các khoảng PR, RR, QRS, QT) định tính hoặc định lượng (FIG.35; Bảng 45). Trong nhóm liều lượng 100 mg/kg, sự tăng nhỏ (trung bình là 1,6%) nhưng đáng kể về mặt thống kê về khoảng QT được điều chỉnh được quan sát thấy; tuy nhiên, dữ liệu con vật riêng lẻ không cho thấy sự tăng nhất quán trong QTc biểu thị tác động liên quan đến bài thử nghiệm. Do đó, do sự thay đổi nhỏ và thiếu phản ứng nhất quán ở các con vật riêng lẻ, sự tăng nhỏ này ở QTc không được xem là có liên quan đến việc điều trị bằng RTA 408. Do vậy, việc sử dụng RTA 408 qua đường miệng không gây ra các tác động đến chức năng tim mạch ở khỉ cynomolgus với các liều lượng lên đến và gồm 100 mg/kg.

3. Đánh giá tác động của RTA 408 đến hành vi thần kinh ở chuột cống

Độc tính hành vi thần kinh cấp tính có thể có của RTA 408 được đánh giá ở chuột cống. Ba nhóm điều trị gồm 10 chuột cống đực và 10 chuột cống cái CD® [CrI:CD® (SD)] nhận RTA 408 với các mức liều lượng là 3, 10, hoặc 30 mg/kg. Một nhóm bổ sung gồm 10 con vật/giống đóng vai trò là đối chứng và nhận chất dẫn thuốc (dầu vừng). Chất dẫn thuốc hoặc RTA 408 được sử dụng cho tất cả các nhóm thông qua nhồi ống qua miệng một lần vào ngày 1 với thể tích liều lượng là 10 mL/kg.

Các quan sát đối với trạng thái bệnh, tử vong, chấn thương, và mức độ sẵn có của thức ăn và nước được thực hiện hai lần hàng ngày cho tất cả các con vật. Các quan sát đối với các dấu hiệu lâm sàng được thực hiện trước khi cho liều dùng vào ngày 1 và sau mỗi lần đánh giá nhóm quan sát chức năng (FOB). Các đánh giá FOB được thực hiện trước liều dùng (Ngày -1) và ở gần 4 và 24 giờ sau liều dùng. Trọng lượng cơ thể được đo và được ghi chép trước liều dùng vào ngày 1.

RTA 408 với các liều lượng là 3, 10, và 30 mg/kg không gây ra tử vong, các quan sát lâm sàng bất lợi, hoặc các tác động đến bất kì giá trị đo hành vi thần kinh được thử nghiệm. Sự giảm nhỏ mức tăng trọng lượng cơ thể được quan sát thấy gần 24 giờ sau khi cho liều dùng ở nhóm 30 mg/kg mà có thể liên quan đến bài thử nghiệm. Liên quan đến các điểm đầu nút hành vi thần kinh cơ bản được đánh giá trong nghiên cứu này, RTA 408 không gây ra bất kỳ tác dụng bất lợi nào ở chuột cống với các liều lượng lên đến và gồm 30 mg/kg.

4. Đánh giá tác động của RTA 408 đến phổi ở chuột cống

Các tác động có thể có của RTA 408 đến chức năng phổi được đánh giá ở chuột cống. Ba nhóm điều trị gồm 8 chuột cống đực và 8 chuột cống cái CD® [CrI:CD® (SD)] chuột cống nhận RTA 408 với các mức liều lượng là 3, 10, hoặc 30 mg/kg. Một nhóm bổ sung gồm 8 các con vật/giống đóng vai trò là đối chứng và nhận chất dẫn thuốc (dầu vừng). Chất dẫn thuốc hoặc RTA 408 được sử dụng cho tất cả các nhóm thông qua nhồi ống qua miệng một lần vào ngày 1 với thể tích liều lượng là 10 mL/kg.

Các quan sát đối với tình trạng tử vong, trạng thái bệnh, chấn thương, và mức độ sẵn có của thức ăn và nước được thực hiện hai lần hàng ngày cho tất cả các con vật. Các quan sát lâm sàng được thực hiện trước khi cho liều dùng, gần 4 giờ sau liều dùng, và sau khi hoàn thành thời kỳ theo dõi phổi kéo dài 8 giờ. Trọng lượng cơ thể được đo và được ghi chép vào ngày sử dụng RTA 408. Chức năng phổi (tần số hô hấp, thể tích

khí lưu thông, và thể tích thông khí phút) được theo dõi trong ít nhất 1 giờ trước khi cho liều dùng để thiết lập đường cơ sở và trong ít nhất 8 giờ sau liều dùng.

RTA 408 với các liều lượng là 3, 10, và 30 mg/kg không gây ra tử vong, các quan sát lâm sàng bất lợi, hoặc các tác động đến bất kỳ thông số phổi nào được đánh giá. Do vậy, liên quan đến các điểm đầu nút phổi cơ bản được đánh giá trong nghiên cứu này, RTA 408 không gây ra bất kỳ tác động bất lợi nào ở chuột cống với các liều lượng lên đến và gồm 30 mg/kg.

E. Tổng quan phi lâm sàng

1. Dược động học

RTA 408 đã được nghiên cứu cả in vitro và in vivo để đánh giá các tính chất chuyển hóa và PK của nó. Các nghiên cứu in vitro đã được thực hiện để xác định sự liên kết protein huyết tương RTA 408 và sự phân chia máu/huyết tương, sự ức chế và gây cảm ứng P450 (CYP450) sắc tố tế bào, và để nhận dạng các chất chuyển hóa được tạo ra bởi các vi lập thể gan của chuột nhắt, chuột cống, khỉ, và người. Dữ liệu liên quan đến sự hấp thụ và phân phối in vivo sau khi cho lặp lại RTA 408 thu được chủ yếu thông qua theo dõi các mức thuốc trong huyết tương và lựa chọn các mô từ các nghiên cứu độc chất. Các phương pháp phân tích sinh học dựa trên phép đo khối phổ sắc ký chất lỏng nhạy và chọn lọc (LC/MS/MS) đã được sử dụng để đo các nồng độ của RTA 408 trong huyết tương, máu, và các mô có độ chuẩn xác và chính xác thích hợp. Các phép đo được thực hiện khối phổ kế TQD và QToF (Waters).

a. Hấp thụ

Hành vi dược động học toàn thân và hấp thụ của RTA 408 được nghiên cứu ở chuột nhắt, chuột cống, và khỉ sau khi cho qua đường miệng (hàng ngày) đơn lẻ và lặp lại. Sau khi cho qua đường miệng một chế phẩm dịch huyền phù với các liều lượng là 10 đến 100 mg/kg, các nồng độ tối đa được quan sát thấy trong vòng 1 đến 2 giờ ở chuột nhắt, và trong vòng 1 đến 24 giờ ở chuột cống và khỉ. Phơi nhiễm toàn thân với RTA 408 có xu hướng cao nhất ở chuột cống, với các mức thấp hơn được quan sát thấy ở chuột nhắt và khỉ. Nói chung, các ước lượng về chu kỳ nửa phân rã cuối cùng biểu kiến của RTA 408 được quan sát sau khi cho qua đường miệng là trong khoảng 6 đến 26 giờ, mặc dù giai đoạn hấp thụ kéo dài biểu kiến trong một số trường hợp loại trừ giá trị tính toán ước lượng chu kỳ nửa phân rã cuối cùng.

Nói chung, sự phơi nhiễm toàn thân với RTA 408 tương tự ở các giống đực và các giống cái. Sự phơi nhiễm RTA 408 sau khi sử dụng qua đường miệng lặp lại hàng ngày có xu hướng cao hơn một chút (≤ 2 lần) so với phơi nhiễm được quan sát sau một liều đơn lẻ. Việc sử dụng RTA 408 với một khoảng liều lượng từ 3 đến 100 mg/kg trong một chế phẩm dịch huyền phù nói chung dẫn đến sự tăng theo tỷ lệ liều lượng trong phơi nhiễm toàn thân. Tuy nhiên, việc sử dụng các liều lượng cao hơn (100 đến 800 mg/kg ở khỉ; 500 đến 2000 mg/kg ở chuột cống) không dẫn đến sự tăng phơi nhiễm tương tự, cho thấy sự bão hòa hấp thụ ở các liều lượng trên 100 mg/kg. Sau khi sử dụng qua đường miệng một chế phẩm viên nang (nhồi lỏng lẻo) không tối ưu hóa RTA 408 (3 mg/kg) cho khỉ, mức phơi nhiễm toàn thân bình thường hóa liều lượng có xu hướng hơi thấp hơn so với mức phơi nhiễm quan sát thấy khi dùng với chế phẩm dịch huyền phù.

Hành vi dược động học toàn thân và hấp thụ của RTA 408 được nghiên cứu ở chuột cống sử dụng cách thức cho cục bộ đơn lẻ và lặp lại. Việc cho RTA 408 trong khoảng 0,01% đến 3% thể hiện các nồng độ huyết tương thấp hơn tương ứng với cách định liều qua miệng tương tự. Nói chung, sự phơi nhiễm toàn thân đối với RTA 408 làm tăng theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Việc sử dụng cục bộ được thực hiện dưới dạng dịch huyền phù trong dầu vùng.

Sử dụng thỏ, hành vi dược động học toàn thân và hấp thụ qua mắt của RTA 408 được đánh giá. RTA 408 được sử dụng cục bộ cho mắt một lần/ngày trong 5 ngày. Việc sử dụng qua mắt thể hiện nồng độ huyết tương thấp hơn của RTA 408 tương ứng với khi RTA 408 được sử dụng qua đường miệng (FIG.36). Lượng RTA 408 trong huyết tương thậm chí sau 5 ngày liên tục chỉ thể hiện sự thay đổi nhỏ so với nồng độ sau liều đầu tiên tương ứng với khi RTA 408 được sử dụng qua đường miệng, mà ở đó các nồng độ huyết tương cao hơn gần 100 lần (FIG.36).

b. Phân phối

Liên kết protein huyết tương của RTA 408 được đánh giá ở chuột nhắt, chuột cống, thỏ, chó, lợn con, khỉ, và huyết tương người ở các nồng độ RTA 408 là 10-2000 ng/mL sử dụng phương pháp luận siêu ly tâm. RTA 408 được liên kết rộng rãi với các protein huyết tương. Liên kết protein huyết tương trong các loài phi lâm sàng là từ 93% (chuột nhắt) đến >99% (lợn con), với liên kết 95% ở các loài độc (chuột cống và khỉ) và 97% ở người. Không có dấu hiệu nào cho liên kết protein phụ thuộc vào nồng

độ ở các loài được thử nghiệm. Các kết quả từ các thí nghiệm phân chia máu so với huyết tương biểu thị rằng RTA 408 có xu hướng phân phối chủ yếu trong phần huyết tương của máu theo hướng thẳng, với tỷ lệ máu:huyết tương $<1,0$ cho tất cả các loài và tất cả các nồng độ được thử nghiệm.

Sự phân phối RTA 408 vào các mô đã được nghiên cứu sau khi sử dụng qua đường miệng cho chuột nhắt, chuột cống, và khỉ. Trong các nghiên cứu độc tính không GLP kéo dài 14 ngày, lựa chọn các mô (gan, phổi, và não) được thu thập tại một điểm thời gian đơn lẻ (4 giờ cho chuột cống và chuột nhắt; 24 giờ cho khỉ) sau liều lượng cuối cùng của cuộc nghiên cứu được sử dụng và được phân tích hàm lượng RTA 408 sử dụng LC/MS/MS. RTA 408 dễ dàng phân phối vào phổi, gan, và não. Ở phổi, các nồng độ RTA 408 với thời gian 4 giờ ở chuột nhắt và chuột cống tương tự với hoặc cao hơn một chút (<2 lần) so với các nồng độ ở huyết tương, trong khi với thời gian 24 giờ ở khỉ, các nồng độ RTA 408 ở phổi cao hơn 6 đến 16 lần so với các nồng độ huyết tương. Một mẫu hình tương tự được quan sát thấy cho não. Ngược lại, các nồng độ RTA 408 ở gan cao hơn 5 đến 17 lần so với huyết tương cho chuột nhắt và chuột cống với thời gian 4 giờ, và cao hơn 2 đến 5 lần so với huyết tương với thời gian 24 giờ ở khỉ.

Các tác động dược lực học của RTA 408 trong các mô được đánh giá ở chuột nhắt, chuột cống, và khỉ, bằng cách theo dõi sự gây cảm ứng các gen đích Nrf2 trong các mô giống nhau được thu thập để phơi nhiễm thuốc từ các nghiên cứu độc tính kéo dài 14 ngày. Việc gây cảm ứng các gen đích Nrf2 bởi RTA 408 dẫn đến sự tăng phản ứng chống oxy hóa như được thể hiện bởi sự tăng phụ thuộc vào liều lượng hoạt tính enzym NQO1, glutathion S-transferaza (Gst), và glutathion reductaza (Gsr) ở các mô được kiểm tra. Các hoạt tính enzym được đo như được mô tả trên đây. Hơn nữa, ở các loài gặm nhấm, hàm lượng gan RTA 408 có tương quan với mức độ hoạt tính enzym cho NQO1, gen đích nguyên mẫu cho Nrf2. Ở khỉ, mức độ biểu hiện mRNA ở các tế bào máu đơn nhân ngoại vi (PBMC) cho cả NQO1 và sulfiredoxin 1 (SRXN1) có tương quan với sự phơi nhiễm huyết tương của RTA 408 (FIG.37a & b). Về tổng thể, RTA 408 gây cảm ứng các chất đánh dấu sinh học của Nrf2 ở các loài gặm nhấm và khỉ, và sự gây cảm ứng này nói chung có tương quan đến sự phơi nhiễm huyết tương và mô với RTA 408.

Khi RTA 408 được sử dụng cho thở cục bộ qua mắt, các nồng độ cao nhất của hợp chất được tìm thấy trong giác mạc, võng mạc, hoặc mống mắt trong khi pha lê dịch, thủy dịch, và huyết tương thể hiện làm giảm đáng kể các nồng độ của RTA 408 (FIG.38).

c. Chuyển hóa

Sự chuyển hóa RTA 408 đã được nghiên cứu sau khi ủ in vitro RTA 408 trong 60 phút với các vi lập thể gan từ chuột nhắt, chuột cống, khỉ, và người có sự hiện diện của một hệ tái tạo nicotinamid adenin dinucleotit phosphat (NADPH) và một hỗn hợp phản ứng uridin diphosphat glucuronosyltransferaza (UGT). Sự luân chuyển rộng rãi RTA 408 được quan sát thấy ở các vi lập thể động vật linh trưởng, với <10% phân tử mẹ còn lại ở cuối thời gian ủ 60 phút ở cả vi lập thể của khỉ và người. Ngược lại, mức độ chuyển hóa thấp hơn ở các vi lập thể loài gặm nhấm, với >65% phân tử mẹ còn lại ở cuối thời gian ủ. Việc thiếu tiêu chuẩn xác thực sẵn có cho các chất chuyển hóa tiềm năng khác nhau của RTA 408 loại trừ đánh giá định lượng các chất chuyển hóa được quan sát. Từ góc độ định tính, một mẫu hình tương tự của các chất chuyển hóa RTA 408 được quan sát thấy ở các loài, và bao gồm các đỉnh với khối lượng phù hợp với sự giảm và hydroxyl hóa RTA 408 cũng như glucuronit hóa RTA 408 hoặc các chất chuyển hóa giảm/hydroxyl hóa của nó. Không chất chuyển hóa ở người độc đáo nào được quan sát thấy, trong đó tất cả các đỉnh trong các lần ủ vi lập thể ở người cũng được quan sát ở một hoặc nhiều loài tiền lâm sàng. Cụ thể là, dựa trên dữ liệu vi lập thể in vitro, tất cả các vi lập thể ở người hiện diện ở chuột cống hoặc khỉ, các loài độc gặm nhấm và không gặm nhấm.

d. Các tương tác thuốc được động học

Khả năng RTA 408 gây ức chế sự chuyển hóa qua trung gian P450 (CYP450)-sắc tổ tế bào được đánh giá sử dụng các vi lập thể gan người hỗn hợp và các nền chuẩn cho các enzyme CYP450 đặc hiệu. RTA 408 ức chế trực tiếp CYP2C8 và CYP3A4/5 với các giá trị K_i là gần 0,5 μ M cho mỗi enzyme. Không quan sát thấy sự ức chế có ý nghĩa nào cho các enzyme khác được thử nghiệm (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, hoặc CYP2D6), với mức ức chế <50% ở nồng độ cao nhất được thử nghiệm (3 μ M). Ngoài ra, có rất ít hoặc không có dấu hiệu cho sự ức chế phụ thuộc vào sự chuyển hóa bất kỳ enzyme nào được thử nghiệm. Các nghiên cứu trong tương lai xem xét khả năng xảy ra các tương tác thuốc-thuốc qua trung gian CYP3A4/5 có

thể được đảm bảo dựa trên các dữ liệu này, và các nồng độ cao tiềm tàng có thể đạt được cục bộ trong ống dạ dày ruột non (GI) sau khi dùng qua đường miệng.

Khả năng RTA 408 gây biểu hiện enzym CYP450 được đánh giá sử dụng các tế bào gan người được nuôi cấy. Trong các điều kiện các tác nhân gây cảm ứng nguyên mẫu làm tăng như kỳ vọng hoạt tính CYP, RTA 408 (lên đến 3 μ M) không phải là tác nhân gây cảm ứng hoạt tính enzym CYP1A2, CYP2B6, hoặc CYP3A4 ở các tế bào gan người được nuôi cấy. Hoạt tính enzym được đo bằng cách theo dõi sự biến đổi nền phenaxetin, bupropion, và testosterone tương ứng cho CYP1A2, CYP2B6, và CYP3A4 trong các vi lập thể cách ly.

F. Các tác động của RTA 408 đến chứng viêm da do bức xạ cấp tính

Các tác động của RTA 408 theo hướng phòng ngừa tại chỗ hoặc qua đường miệng đối với chứng viêm da do bức xạ cấp tính đã được kiểm tra. Bằng việc sử dụng chuột nhắt BALB/c đực, một liều bức xạ 30 Gy được cho vào ngày 0 (Bảng 3). Dầu vùng chất dẫn thuốc hoặc RTA 408 được sử dụng cho chuột cống vào ngày -5 đến -1 và ngày 1 đến 30. RTA 408 được sử dụng qua đường miệng trong 3, 10, và 30 mg/kg dưới dạng dầu vùng và cục bộ với thành phần phần trăm là 0,01%, 0,1%, và 1% dưới dạng dầu vùng. Chứng viêm da được đánh giá mô cứ hai ngày một lần từ ngày 4 đến ngày 30. Vào ngày 12, đỉnh đặc trưng của chứng viêm da được quan sát thấy và 4 chuột nhắt bị giết 4 giờ sau khi cho liều dùng. Chuột nhắt còn lại bị giết vào ngày 30 vào thời điểm 4 giờ sau liều dùng. Huyết tương được thu thập vào các ngày 12 và 30 cũng như các mẫu da bị bức xạ để kiểm tra mRNA và mô học.

Bảng 3: Thiết kế nghiên cứu mẫu chứng viêm da do bức xạ cấp tính

Nhóm	Số lượng các con vật	Bức xạ (Ngày 0)	Điều trị	Lịch điều trị
1	9 con đực	---	Không được điều trị	---
2	10 con đực	30 Gy	Không được điều trị	---
3	14 con đực	30 Gy	Đối chứng Chất dẫn thuốc (dầu vùng)	Ngày -5 đến -1 & Ngày 1 đến 30
4	14 con đực	30 Gy	RTA 408 – 0,01% hoặc 3 mg/kg	Ngày -5 đến -1 & Ngày 1 đến 30
5	14 con đực	30 Gy	RTA 408 – 0,1% hoặc 10 mg/kg	Ngày -5 đến -1 & Ngày 1 đến 30
6	14 con đực	30 Gy	RTA 408 – 1% hoặc 30 mg/kg	Ngày -5 đến -1 & Ngày 1 đến 30

Trong các nhóm thử nghiệm mà ở đó chuột nhắt được điều trị bằng RTA 408, tỷ lệ mắc mới chứng viêm da đường như giảm nghiêm trọng đi một chút khi RTA 408 được đưa cục bộ hoặc qua đường miệng (FIG.39-42). Hơn nữa, các đường cong vẽ điểm lâm sàng chứng viêm da trung bình cho các nhóm thử nghiệm dưới dạng hàm thời gian thể hiện sự thay đổi nhất định với việc sử dụng RTA 408 qua đường miệng hoặc dưới dạng cục bộ từ các nhóm thử nghiệm không được điều trị (FIG.43-45) đặc biệt là trong trường hợp mà RTA 408 được sử dụng qua đường miệng. Hơn nữa, như có thể thấy trong các Bảng 4 và 5 dưới đây, phần trăm chuột nhắt mắc chứng viêm da với điểm lâm sàng trên 3 thấp hơn đáng kể đối với chuột nhắt được điều trị bằng RTA 408 thông qua sử dụng qua đường miệng trong khi phần trăm chuột nhắt mắc chứng viêm da với điểm lâm sàng trên 2 thấp hơn một chút cho các nhóm thử nghiệm được sử dụng cục bộ RTA 408.

Bảng 4: Phần trăm chuột nhất cho một nhóm thử nghiệm có điểm trên 2 trong cuộc kiểm tra chứng viêm da lâm sàng của chúng và được điều trị tại chỗ có RTA 408

	Ngày 12	Ngày 14	Ngày 16	Ngày 18	Ngày 20	Ngày 22	Ngày 24	Ngày 26	Ngày 28	Ngày 30	% con vật- ngày >=2	% con vật- ngày >=3
1	không bức xạ, không được điều trị	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	không được bức xạ, không được điều trị	0,0	50,0	83,3	83,3	100,0	66,7	50,0	50,0	50,0	35,6	0,0
3	không được bức xạ, dầu vùng	21,4	45,0	60,0	50,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,6	0,0
4	không được bức xạ, RTA 408- 0,01%	0,0	0,0	20,0	50,0	40,0	40,0	40,0	20,0	10,0	14,4	0,0
5	không được bức xạ, RTA 408-0,1 %	7,1	10,0	20,0	80,0	40,0	30,0	10,0	0,0	0,0	16,3	0,0
6	không được bức xạ, RTA 408-1,0%	10,7	20,0	10,0	70,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,7	0,0

Bảng 5: Phần trăm chuột nhất cho một nhóm thử nghiệm có điểm trên 3 trong cuộc kiểm tra chứng viêm da lâm sàng của chúng và được điều trị qua đường miệng có RTA 408

		Ngày 16	Ngày 18	Ngày 20	Ngày 22	Ngày 24	Ngày 26	Ngày 28	% con vật- ngày >=2	% con vật- ngày >=3
1	không bức xạ, không được điều trị	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
2	không được bức xạ, không được điều trị	20	40	20	20	20	20	20	39,0	8,8
3	không được bức xạ, dầu vùng	35	50	40	30	20	0	0	45,6	10,9
4	không được bức xạ, RTA 408-3 mg/kg	10	10	0	0	0	0	0	32,5	1,3
5	không được bức xạ, RTA 408-10 mg/kg	10	25	30	0	0	0	0	33,8	4,1
6	không được bức xạ, RTA 408-30 mg/kg	10	20	10	0	0	0	0	28,8	2,5

G. Các tác động của RTA 408 đến chứng viêm da do bức xạ được phân đoạn

Khi sử dụng RTA 408 bằng cách sử dụng cục bộ, các tác động của RTA 408 hướng đến việc cải thiện các tác động của chứng viêm da do bức xạ được phân đoạn được đo. Bằng việc sử dụng chuột nhắt Balb/c, RTA 408 dưới dạng chế phẩm cục bộ được sử dụng cho chuột nhắt này hàng ngày từ ngày -5 đến ngày 30 với ba liều trong khoảng từ 0,01% đến 1%. Chuột nhắt được bức xạ vào các ngày 0-2 và 5-7 với sáu liều 10-Gy/ngày. Các điểm số của chứng viêm da lâm sàng cho chuột nhắt được đánh giá mờ hai ngày một lần từ ngày 4 cho đến khi kết thúc cuộc nghiên cứu. Ở FIG.46, biểu đồ thể hiện sự thay đổi về điểm lâm sàng trung bình cho mỗi nhóm được vẽ dưới dạng hàm thời gian. Biểu đồ thể hiện sự cải thiện đáng kể về mặt thống kê ở các điểm số cho chuột nhắt được điều trị bằng 0,1% đến 1% các chế phẩm RTA 408 cục bộ. Có thể thấy các thông số nghiên cứu và điều trị trong Bảng 6.

Bảng 6: Các điều kiện nghiên cứu đối với chứng viêm da do bức xạ được phân đoạn

Nhóm	Số lượng các con vật	Bức xạ (Ngày 0-2, 5-7)	Điều trị	Lịch điều trị
1	9 con đực	---	Không được điều trị	---
2	14 con đực	6x 10 Gy	Không được điều trị	---
3	18 con đực	6x 10 Gy	Đối chứng chất dẫn thuốc (dầu vùng)	QD Ngày -5 đến 30
4	18 con đực	6x 10 Gy	RTA 408 – 0,01%	QD Ngày -5 đến 30
5	18 con đực	6x 10 Gy	RTA 408 – 0.1%	QD Ngày -5 đến 30
6	18 con đực	6x 10 Gy	RTA 408 – 1%	QD Ngày -5 đến 30

Bằng cách phân tích các điểm lâm sàng được thể hiện trong FIG.46, việc phân tích một khu vực dưới đường cong (AUC) được thực hiện, điều này cho thấy mức độ nghiêm trọng của chứng viêm da tương ứng với mức thời gian dài

dằng kéo dài của chứng viêm da. Phân tích AUC này cho phép so sánh trực tiếp giữa các nhóm chuột nhất khác nhau và tác động của các thành phần phần trăm RTA 408 khác nhau (FIG.47 và Bảng 7). Việc sử dụng các chế phẩm RTA 408 cục bộ làm giảm các thương tổn Cấp độ 2 và Cấp độ 3 từ 60% và 33% khi chuột nhất chỉ được phơi ra chất dẫn thuốc tương ứng xuống 21% và 6% nhờ RTA 408 ở nồng độ 1%. Hợp phần RTA thể hiện hoạt tính nhất định nhưng không đáng kể như được thể hiện bởi chế phẩm 1%.

Bảng 7: Phần trăm điểm số liên quan đến chứng viêm da cho mỗi nhóm điều trị

Nhóm	%Ngày ≥ 2	%Ngày ≥ 3
Không bức xạ, Không Tx	0 %	0 %
Bức xạ, Không Tx	66%	31%
Bức xạ, Dầu vùng	60%	33%
Bức xạ, RTA 408 (0,01%)	54%	29%
Bức xạ, RTA 408 (0.1%)	40%	13%
Bức xạ, RTA 408 (1%)	21%	6%

H. Các tác dụng đồng vận của RTA 408 và các tác nhân trị bệnh ung thư đến sự phát triển khối u

Một nghiên cứu về các tác động của RTA 408 được sử dụng kết hợp với các tác nhân hóa học trị liệu truyền thống đã được thực hiện để xác định tính hiệu quả của tiềm năng năng điều trị. Các nghiên cứu in vitro được thực hiện để xác định các tác động của RTA 408 đến hai dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt khác nhau, LNCaP và DU-145. Như có thể thấy trong FIG.48a, việc điều trị các dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt (LNCaP) in vitro bằng 5-floraxil thể hiện sự tăng đáng kể về mật thống kê độc tính đối với tế bào khi kết hợp với RTA 408 với các liều lượng nằm trong khoảng từ 0,125 đến 0,5 μM . Khi sử dụng dòng tế bào tuyến tiền liệt DU-145 và docetaxel, RTA 408 tăng cường độc tính đối với tế bào của tác nhân hóa học trị liệu một cách đáng kể về mặt thống kê để định liều RTA 408 từ 0,125 đến 0,75 μM như được thể hiện trong FIG.48b. Dấu hiệu này hỗ trợ cho quan điểm rằng RTA 408 có thể hợp lực với các tác nhân trị bệnh ung thư và có thể được sử dụng theo một số phương án để mang lại tính hiệu quả lớn hơn trong việc điều trị cho những người bị bệnh ung thư.

Sau các kết quả thành công của phân tích in vitro, một phân tích in vivo thí điểm đã được thực hiện sử dụng chứng bệnh ung thư tuyến tiền liệt ở người LNCaP/C4-2B và DU145 được bố trí để biểu hiện luciferaza của đom đóm (sau đây tương ứng được gọi là C4-2B-Luc và DU145-Luc). Lưu ý rằng cả hai dòng tế bào này phát triển theo cách androgen độc lập. Các tế bào được nuôi cấy trong RPMI 1640 được bổ sung 10% FBS. Các tế bào được thu hoạch sử dụng TrypLE Express (Invitrogen) và được rửa trong PBS và được đếm. Các tế bào được hoàn nguyên trong PBS để đạt được nồng độ cuối cùng là 3×10^6 tế bào/30 μ L (trừ khi được thể hiện khác đi) và được phân chia trong các ống riêng biệt. Matrigel giảm yếu tố tăng trưởng (Khoa học áp dụng sinh học BD) được làm tan qua đêm ở +4 °C và được chuyển vào trong các ống trong các phân ước 30 μ L. Các dung dịch Matrigel/tế bào được chuyển đến nhà nuôi động vật thí nghiệm và được trộn ngay trước khi tiêm với tỷ lệ 1:1. Mỗi con chuột nhắt (n = 1/nhóm với tổng là ba con vật) tiếp nhận một liều tiêm dưới da các tế bào khối u. Các khối u đã được tạo trước trong 4 tuần. Sau đó, một con vật được điều trị bằng RTA 408 (17,5 mg/kg, trong màng bụng) một lần một ngày trong 3 ngày (Ngày -3 đến -1). Vào ngày kế tiếp (Ngày 0), RTA 408 đã điều trị các con vật và một con vật khác được điều trị bằng một liều đơn lẻ 18 Gy IR, khu trú ở vùng khung xương chậu nơi mà các khối u được cấy. Chuột nhắt được điều trị trước bằng RTA 408 tiếp nhận thêm ba liều RTA 408 (17,5 mg/kg, trong màng bụng), cứ hai ngày một lần, qua tuần tiếp theo. Con vật thứ ba không được điều trị và đóng vai trò là đối chứng dương. Sự tiến triển của khối u được theo dõi hàng tuần qua chiếu chụp trực tiếp. Để tìm ra các tế bào khối u biểu hiện luciferaza, chuột nhắt được tiêm IP với D-Luciferin 5 phút trước khi chiếu chụp theo phác đồ của nhà sản xuất (Caliper LifeScience). Trước khi chiếu chụp chuột nhắt được gây mê bằng cách hít isoflurane và được chiếu chụp trên hệ thống IVIS Lumina XR (Caliper LifeScience). Để tiêu chuẩn hoá, thời gian phơi nhiễm tối thiểu cần thiết để chiếu chụp khối u đối chứng được xác định và tất cả các con vật được chiếu chụp dưới các điều kiện này. Vào Ngày 7, không thấy sự giảm rõ rệt nào về kích cỡ khối u ở con vật được điều trị bằng IR so với đối chứng, trong khi con vật tiếp nhận cả RTA 408 và IR thể hiện hình ảnh

khối u nhỏ hơn. Vào Ngày 14 và Ngày 21, con vật đối chứng tiếp tục thể hiện sự phát triển và tăng trưởng khối u trong khi con vật được điều trị bằng bức xạ ion hóa thể hiện sự cải thiện nhất định, đáng lưu ý nhất là ở Ngày 21. Mặt khác, con vật được điều trị bằng RTA 408 và bức xạ ion hóa không thể hiện sự tiến triển từ Ngày 7 đến Ngày 14 và không nhìn thấy khối u vào Ngày 21. Có thể thấy được sự tiến triển của khối u trong một tuần ở FIG.49. Cả dữ liệu in vitro và in vivo cho thấy rằng RTA 408 dường như bổ sung cho hoạt tính của các tác nhân trị bệnh ung thư khác nhau, nhờ đó làm tăng tính hiệu quả của tác nhân.

I. Các tác động của RTA 408 đến mẫu chứng viêm mắt

Một nghiên cứu về các tác động của RTA 408 đến chứng viêm mắt đã được thực hiện sử dụng thỏ thuộc giống bạch tạng New Zealand. Thỏ được chia thành 5 nhóm gồm 12 thỏ được đưa ba nồng độ RTA 408 khác nhau (0,01%, 0,1%, và 1%), Voltarene[®] collyre ở nồng độ 0,1% và chất dẫn thuốc (dầu vừng). Mỗi con thỏ được cho ba giọt trong vòng 60 phút trước khi tiến hành chọc hút và hai giọt trong vòng 30 phút sau khi tiến hành chọc hút. Mỗi giọt là 50 μ L và được cho vào cả hai mắt. Thủy dịch cho 6 con vật với mỗi điểm thời gian được thu thập 30 phút và lại thêm 2 giờ sau khi tiến hành chọc hút. Lượng viêm được xác định bởi nồng độ protein trong thủy dịch. Như được thể hiện ở FIG.50, RTA 408 thể hiện sự giảm về protein thủy dịch tương tự với protein thủy dịch có nồng độ cao nhất của bất kỳ trong số các hợp chất tham chiếu kia (MaxiDex hoặc mapracorat) chỉ với RTA 408 0,01% trong chế phẩm. Các tác động làm tăng nồng độ của RTA 408 dường như là không đáng kể do tất cả các nồng độ của RTA 408 dường như thể hiện các tác động tương đối giống nhau trong phạm vi lỗi làm giảm nồng độ protein thủy dịch.

J. Sàng lọc chất đa hình

Một nghiên cứu về tiền chế phẩm và hiện tượng đa hình được thực hiện cho hợp chất 63415. Với tư cách là một phần của nghiên cứu này, một chương trình hiện tượng đa hình sơ bộ đã được thực hiện với mục đích nhận dạng dạng khan thích hợp nhất ở nhiệt độ phòng và có thể hydrat hóa với khả năng khá

cao. Tổng 30 thí nghiệm kết tinh, gồm sự cân bằng pha, các thí nghiệm sấy khô và các kỹ thuật khác, được thực hiện. Tất cả các chất rắn thu được đặc trưng bởi quang phổ học FT-Raman. Tất cả các dạng mới được đặc trưng bởi PXRD và TG-FTIR, và theo tùy chọn được đặc trưng bởi DSC và DVS.

Ngoài ra, dạng vô định hình được điều chế và biểu thị đặc điểm. Một vài thí nghiệm sử dụng các kỹ thuật và phương thức khác nhau được thực hiện để điều chế dạng vô định hình. Dạng vô định hình được đặc trưng bởi quang phổ học FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, DSC, DVS, và chuẩn độ Karl-Fischer. Độ ổn định của dạng vô định hình được thử nghiệm ở các điều kiện nhiệt độ và độ ẩm cao trong khoảng thời gian bốn tuần.

1. Nguyên liệu ban đầu và danh pháp

Hai mẻ 63415 được sử dụng làm các nguyên liệu ban đầu (Bảng 8). 63415 cũng được gọi là PP415 trong bản mô tả sáng chế này. Tất cả các mẫu được tiếp nhận và tạo ra trong suốt dự án này nhận một mã nhận dạng duy nhất của dạng PP415-Px, trong đó Px đề cập đến mẫu/số thí nghiệm ($x = 1, 2, \dots, n$).

Bảng 8: Các nguyên liệu ban đầu

Mẫu	Nguyên liệu	Lượng	Ngày tiếp nhận
PP415-P1	63415, mẻ #: 0141-66-1; MW = 554,7 g/mol, $C_{33}H_{44}F_2N_2O_3$	5,0 g	25/03/2011
PP415-P40	63415, mẻ #: 2083-69-DC; MW = 554,7 g/mol, $C_{33}H_{44}F_2N_2O_3$	5,0 g	27/05/2011

2. Hợp chất 63415, mẻ # 0414-66-1 (PP415-P1): Dạng vô định hình

Nguyên liệu ban đầu 63415, mẻ # 0414-66-1, được đặc trưng bởi quang phổ học FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, chuẩn độ Karl-Fischer, 1H -NMR, DSC, DVS, và các số đo độ hòa tan gần đúng. Các kết quả được tóm lược trong Bảng 9.

Bảng 9: Mô tả đặc điểm của nguyên liệu ban đầu 63415 (PP415-P1)

Phương pháp	Các kết quả
FT-Raman	sẽ được sử dụng làm tham chiếu
PXRD	không có mẫu hình đỉnh nhọn, nguyên liệu vô định hình
TG-FTIR	~0,9 wt.-% (~0,1 đương lượng) EtOH với một chút H ₂ O từ 25°C đến 200°C, phân giải ở T > 290°C
Karl-Fischer	0,5 wt.-% H ₂ O
¹ H-NMR	phù hợp với cấu trúc, ~0,08 đương lượng EtOH
DSC	Lần quét nhiệt thứ nhất: chuyển hóa thủy tinh T _g = 152,7°C (ΔC_p = 0,72 J/g°C); Lần quét nhiệt thứ hai: chuyển hóa thủy tinh T _g = 149,7°C (ΔC_p = 0,45 J/g°C)
DVS	hơi hút ẩm; Δm = +0,4% (50% → độ ẩm tương đối 85%); FT-Raman và PXRD không đổi

Phổ FT-Raman (FIG.58) sẽ được sử dụng làm phổ tham chiếu cho nguyên liệu ban đầu. PXRD (FIG.59) thể hiện không có mẫu hình đỉnh nhọn. Halogen rộng ở ~10-20 °2 θ đặc trưng cho các nguyên liệu vô định hình.

Nhiệt độ TG-FTIR (FIG.60) thể hiện sự hao hụt dần của ~0,9 wt.-% EtOH (nghĩa là, ~0,1 đương lượng) với một chút H₂O giữa 25 và 200 °C. Sự phân giải bắt đầu ở T > 290 °C.

Hàm lượng nước 0,5 wt.-% được xác định bởi chuẩn độ Karl-Fischer.

Phổ ¹H-NMR (FIG.61) phù hợp với cấu trúc và thể hiện ~0,08 đương lượng EtOH, theo nhiệt độ TG-FTIR.

Biểu đồ nhiệt DSC (FIG.62) thể hiện ở lần quét nhiệt thứ nhất, sự chuyển hóa thủy tinh của nguyên liệu vô định hình diễn ra ở T_g = 152,7 °C (ΔC_p = 0,72 J/g°C). Ở lần quét thứ hai sau khi làm nguội do tôi, sự chuyển hóa thủy tinh diễn ra ở T_g = 149,7 °C (ΔC_p = 0,45 J/g°C).

Biểu đồ đẳng nhiệt DVS (FIG.63) thể hiện rằng sự hao hụt dần khối lượng 1,0 wt.-% diễn ra khi giảm độ ẩm tương đối từ độ ẩm tương đối 50% xuống độ ẩm tương đối 0%; sự cân bằng đạt được ở mức độ ẩm tương đối 0%.

Khi tăng độ ẩm tương đối đến độ ẩm tương đối 95%, đã xảy ra sự tăng dần khối lượng là 2,1 wt.-% (tương ứng với khối lượng ở độ ẩm tương đối 0%); sự cân bằng đạt được ở mức độ ẩm tương đối 95%. Khi giảm độ ẩm tương đối từ độ ẩm tương đối 95% xuống độ ẩm tương đối 50%, khối lượng cuối cùng là 0,2 wt.-% dưới mức khối lượng ban đầu. Sự tăng khối lượng là 0,4 wt.-% ở độ ẩm tương đối 85% (tương ứng với khối lượng ban đầu) xếp mẫu vào loại hơi hút ẩm.

Phổ FT-Raman (FIG.64) và mẫu hình PXRD (FIG.65) của mẫu sau khi đo DVS không thay đổi so với phổ và mẫu hình của mẫu trước khi đo.

Độ hòa tan gần đúng của nguyên liệu ban đầu PP415-P1 được đo trong 12 dung môi và 4 hỗn hợp dung môi ở nhiệt độ phòng bằng cách pha loãng bằng tay kết hợp với quan sát bằng mắt (Bảng 10). Do sai số thí nghiệm vốn có trong phương pháp này, các giá trị độ hòa tan nhằm được coi là các số lượng ước đoán đại khái và thường chỉ được sử dụng cho việc thiết kế các thí nghiệm kết tinh. Tất cả các hỗn hợp dung môi được liệt kê là các tỷ lệ theo thể tích (v/v).

Bảng 10: Độ hòa tan gần đúng của nguyên liệu ban đầu PP415-P1 (vô định hình)

Dung môi	Độ hòa tan S [mg/mL]
toluen	$S > 200$
DCM	$S > 200$
EtOAc	$S > 210$
axeton	$S > 230$
MeCN	$S > 230$
DMF	$S > 210$
MeOH	$S < 210$
EtOH ^a	$105 < S < 210$
2PrOH	$16 < S < 19$
DEE	$S \geq 1^d$
heptan	$S < 1$
H ₂ O	$S < 1$
2PrOH / H ₂ O (9:1) ^b	$7.9 < S < 8.5$
MeCN / H ₂ O (2:3) ^c	$S < 1$

Dung môi	Độ hòa tan S [mg/mL]
EtOAc / heptan (1:1) ^a	100 < S < 200
toluen / DEE (1:1) ^a	S > 220

^a kết tủa được quan sát thấy sau ~ 1 ngày;

^b hoạt tính của nước a(H₂O) ~ 0,7 ở 25 °C;

^c hoạt tính của nước a(H₂O) > 0,9 ở 50 °C;

^d hòa tan không hoàn toàn lúc đầu (S < 1), nhưng cặn rắn bị hòa tan hoàn toàn qua đêm (S > 1).

3. Hợp chất 63415, mẻ # 2083-69-DC (PP415-P40): Nhóm 2

63415, mẻ # 2083-69-DC, là một solvat heptan. Nguyên liệu này (PP415-P40) được đặc trưng bởi PXRD và được thấy là tương ứng với nhóm 2 (FIG.66).

Nhóm 2 có thể tương ứng với các solvat đẳng cấu, không hợp thức (<0,5 đương lượng) (của heptan, cyclohexan, isopropyl ete, 1-butanol, triethyl amin, và các dung môi có thể khác, chẳng hạn như hexan và các ete khác) với dung môi liên kết chặt.

Các đỉnh nhỏ nhìn thấy trong mẫu hình của PP415-P40 ở 7,9 °2θ và 13,8 °2θ không tương ứng với các đỉnh của các nhóm 3, 4, hoặc 5. Nguồn gốc của chúng không rõ ràng tại điểm này.

4. Độ bền hóa học của dạng vô định hình

Độ bền hóa học của dạng vô định hình được kiểm tra trong các dung môi khác nhau trong khoảng thời gian 7 ngày.

Các dung dịch/các dịch huyền phù với nồng độ là 1 mg/mL được điều chế trong bốn dung môi hữu cơ (axeton, MeOH, MeCN, EtOAc) và ba môi trường chất hoạt động bề mặt dạng nước (SDS dạng nước 1%, Tween 80 dạng nước 1%, CTAB dạng nước 1%).

Bốn dung dịch/dịch huyền phù tách biệt được điều chế cho mỗi dung môi, được cân bằng trong 6 giờ, 24 giờ, 2 ngày, và 7 ngày và sau đó được phân tích bởi HPLC.

Khu vực tương đối-% thu được từ các biểu đồ sắc ký HPLC được đưa vào trong Bảng 11. Hợp chất dường như hơi không thích hợp trong chất pha loãng (0,1% axit formic trong MeCN); theo trình tự (nghĩa là, trong vòng ~24

giờ) khu vực-% của một mẫu tham chiếu (PP415-P1, hoạt động ở đầu và cuối trình tự) giảm từ 99,9% xuống 99,3% ở 254 nm và từ 99,9% xuống 99,5% ở 242 nm. Do tác động này, các mẫu được đo hướng về cuối trình tự (được thiết lập theo trật tự sau: 7 ngày, 2 ngày, 24 giờ, 6 giờ), có thể bị ảnh hưởng và khu vực-% thu được có thể bị đánh giá thấp.

Bảng 11: Các thí nghiệm về độ bền hóa học với dạng vô định hình của 63415 (PP415-P1)^a

Dung môi	ở 254 nm				ở 242 nm			
	7 d	2 d	24 h	6 h	7 d	2 d	24 h	6 h
axeton	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,7%	99,7%	99,6%	99,6%
EtOAc	99,8%	99,8%	99,8%	99,7%	99,8%	99,9%	99,8%	99,7%
MeOH	99,8%	99,8%	99,7%	99,8%	99,8%	99,9%	99,7%	99,8%
MeCN	97,7%	99,5%	99,3%	99,4%	97,4%	99,5%	99,3%	99,3%
Tween 1% ^b	97,7%	97,1%	95,1%	97,6%	98,7%	98,7%	96,2%	99,1%
SDS 1% ^c	99,7%	99,6%	99,7%	99,7%	99,8%	99,7%	99,7%	99,7%
CTAB 1%	99,3%	99,4%	99,4%	99,6%	99,3%	99,4%	99,4%	99,7%

^a ở chiều dài bước sóng thứ ba (210 nm), cường độ tín hiệu yếu và tỷ lệ tín hiệu-nhiều lớn, do đó sự kết hợp không được thực hiện

^b các dịch huyền phù, không phải tất cả nguyên liệu bị hòa tan cho tất cả các điểm thời gian

^c các dịch huyền phù, không phải tất cả chất rắn bị hòa tan ở các điểm thời gian 24 giờ và 6 giờ

Sự phân giải $\geq 1\%$ được quan sát thấy cho các dung dịch trong MeCN sau bảy ngày và cho các dịch huyền phù trong môi trường Tween 80 chứa nước 1% (ở tất cả các điểm thời gian ở 254 nm và sau 24 giờ, 2 ngày, và 7 ngày ở 242 nm).

5. Độ bền bảo quản của dạng vô định hình

Để biết các tính chất cơ bản và độ bền vật lý của nó, dạng vô định hình của 63415 bị tác dụng ứng suất bằng cách bảo quản ở nhiệt độ cao và độ ẩm tương đối.

Các mẫu của dạng vô định hình (nguyên liệu ban đầu PP415-P1) được bảo quản mở ở 25 °C/độ ẩm tương đối ~62% (qua dung dịch nước bão hòa của

NH_4NO_3) và 40 °C/độ ẩm tương đối ~75%. (qua dung dịch nước bão hòa của NaCl) và đóng ở 60 °C và 80 °C (Bảng 12). Ở các điểm thời gian 0 tuần, 1 tuần, 2 tuần, và 4 tuần các mẫu được kiểm tra bằng PXRD và so với nguyên liệu ban đầu, PP415-P1.

Bảng 12. Các thí nghiệm về độ bền bảo quản với dạng vô định hình của 63415 (PP415-P1)

Mẫu	Các điều kiện	Điểm thời gian	Kết quả PXRD
PP415-P2a	mở, 25 °C / độ ẩm tương đối ~62%	1 tuần	vô định hình
PP415-P2b	mở, 25 °C / độ ẩm tương đối ~62%	2 tuần	vô định hình
PP415-P2c	mở, 25 °C / độ ẩm tương đối ~62%	4 tuần	vô định hình
PP415-P3a	mở, 40 °C / độ ẩm tương đối ~75%	1 tuần	vô định hình
PP415-P3b	mở, 40 °C / độ ẩm tương đối ~75%	2 tuần	vô định hình
PP415-P3c	mở, 40 °C / độ ẩm tương đối ~75%	4 tuần	vô định hình
PP415-P4a	đóng, 60 °C	1 tuần	vô định hình
PP415-P4b	đóng, 60 °C	2 tuần	vô định hình
PP415-P4c	đóng, 60 °C	4 tuần	vô định hình
PP415-P5a	đóng, 80 °C	1 tuần	vô định hình
PP415-P5b	đóng, 80 °C	2 tuần	vô định hình
PP415-P5c	đóng, 80 °C	4 tuần	vô định hình

Sau một tuần (điểm thời gian 1 tuần, FIG.67), hai tuần (điểm thời gian 2 tuần, FIG.68), và bốn tuần (điểm thời gian 4 tuần, FIG.69), cả bốn mẫu vẫn vô định hình, khi các biểu đồ nhiễu xạ tia X bột không cho thấy sự khác biệt nào so với nguyên liệu ban đầu ở điểm thời gian 0 tuần.

6. Sự kết tinh và các thí nghiệm sấy khô

a. Các thí nghiệm kết tinh

Sự cân bằng pha, sự kết tinh từ các dung dịch nóng, và các thí nghiệm làm bay hơi được thực hiện bắt đầu từ dạng vô định hình để nhận dạng với khả

năng tương đối cao dạng khan thích hợp nhất ở nhiệt độ phòng và sự hydrat hóa có thể. Tất cả các nguyên liệu thu được được đặc trưng bởi quang phổ học FT-Raman; các mẫu được lựa chọn cũng được đặc trưng bởi PXRD.

Các phổ FT-Raman được tập hợp vào các nhóm theo sự tương tự của các vị trí đỉnh của chúng. Mẫu gốc (PP415-P1, xem Bảng 8) được phân nhóm cùng với các sản phẩm kết tinh. Tuy nhiên, các phổ trong một nhóm không hoàn toàn giống nhau, nhưng tương tự nhau. Có thể có những khác biệt nhỏ và những thay đổi đỉnh. Chỉ xét riêng các phổ FT-Raman, thật khó để xác định liệu các phổ của một nhóm có thuộc về cùng một hợp chất dạng đa hình.

Các đỉnh trong các mẫu hình PXRD được xác định và khi đó các mẫu hình được phân nhóm vào các nhóm sử dụng phần mềm PANalytical X'Pert (Highscore Plus). Các nhóm này nhận dạng các mẫu hình có mức độ tương tự cao. Tuy nhiên, có những khác biệt nhỏ nhưng đáng kể trong một nhóm. Do đó, các mẫu hình trong một nhóm không nhất thiết tương ứng với các chất đa hình giống nhau, nhưng thể hiện các dạng khác nhau có các cấu trúc phân tử rất tương tự. Các nhóm FT-Raman tương ứng trong tất cả các trường hợp với các nhóm PXRD.

b. Các thí nghiệm làm cân bằng dịch huyền phù

Các thí nghiệm làm cân bằng dịch huyền phù được thực hiện trong một dung môi và 11 hỗn hợp dung môi (Bảng 13). Các dịch huyền phù chứa ~100 mg PP415-P1 trong 0,2-2,0 mL các dung môi được lựa chọn được điều chế và lắc trong 4-15 ngày ở 22-24 °C. Các chất rắn được thu hồi và đặc trưng bởi quang phổ học FT-Raman; phần lớn cũng được đặc trưng bởi PXRD.

Bảng 13. Các thí nghiệm làm cân bằng dịch huyền phù bắt đầu từ dạng vô định hình (PP415-P1)

Mẫu	Dung môi/Hỗn hợp	Nhóm FT-Rama	Nhóm PXRD
PP415-P6	2PrOH	3	3
PP415-P7	1:2 EtOAc/heptan	2	2
PP415-P8	1:2 axeton/hexan	2	2
PP415-P9	1:3 toluen/DEE	2 ^d	--

Mẫu	Dung môi/Hỗn hợp	Nhóm FT-Raman	Nhóm PXRD
PP415-P10	1:3 MeOH/TBME	2	2
PP415-P11	1:2 MEK/xyclohexan	2 ^d	--
PP415-P12	9:1 EtOH/H ₂ O ^a	3	3
PP415-P13	7:3 MeCN/H ₂ O ^b	4 ^d	4
PP415-P14	~1:1 THF/H ₂ O ^c	5 ^d	5
PP415-P29	1:2 EtOAc/TEA	2	2
PP415-P31	9:1 PEG/H ₂ O	1	1
PP415-P35	7:3 MeCN/H ₂ O ^b	4 ^d	4

các hoạt tính của nước: ^a a(H₂O) ~ 0,5 ở 50 °C; ^b a(H₂O) ~ 0,85 ở 50 °C; ^c a(H₂O) > 0,99 ở 64 °C;

^d phổ chứa các dấu hiệu dung môi

c. Sự kết tinh từ các dung dịch nóng

Các dung dịch nóng của PP415-P1 được điều chế trong một dung môi và bốn hỗn hợp dung môi (Bảng 14). Khi làm nguội chậm đến 5 °C với tốc độ ~0,2 K/phút, kết tủa được quan sát thấy trong ba trường hợp (-P20, -P21, -P24). Trong hai trường hợp (-P22, -P23), không chất rắn nào bị kết tủa, thậm chí sau khi bảo quản ở 4-5 °C trong hai ngày. Do đó, dung môi bị bay hơi dưới dòng khí N₂ ở nhiệt độ phòng. Các chất rắn được thu hồi và đặc trưng bởi quang phổ học FT-Raman và đối với những chất rắn có quang phổ khác với nguyên liệu ban đầu vô định hình, nhóm FT-Raman 1, cũng bằng PXRD.

Bảng 14: Các thí nghiệm làm nguội chậm bắt đầu từ dạng vô định hình (PP415-P1)

Mẫu	Dung môi/hỗn hợp	Các điều kiện	Nhóm FT-Rama	Nhóm PXRD
PP415-P20	~2:1 axeton/H ₂ O	55 °C → 5 °C	3 ^b	3
PP415-P21	~1:5 EtOH/xyclohexan	75 °C → 5 °C	2	2
PP415-P22	~1:3 MeCN/toluen	75 °C → 5 °C ^a	1 ^b	--
PP415-P23	1:3 EtOAc/dioxan	75 °C → 5 °C ^a	1 ^b	--
PP415-P24	1BuOH	75 °C → 5 °C	2 ^b	2

^a không có kết tủa sau khi làm nguội chậm và khuấy ở 5 °C trong 2 ngày; dung môi bay hơi dưới dòng khí N₂ ở nhiệt độ phòng.

^b phổ chứa các dấu hiệu dung môi

d. Các thí nghiệm làm bay hơi/kết tủa

Các dung dịch trong của PP415-P1 được điều chế trong ba hỗn hợp dung môi (Bảng 15). Các dung môi sau đó bị bay hơi chậm ở nhiệt độ phòng dưới các điều kiện xung quanh. Tuy nhiên, ở hai trong số ba thí nghiệm (-P15 và -P17), chất rắn trắng bị kết tủa trước khi việc làm bay hơi bắt đầu. Các chất rắn thu được được kiểm tra bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD.

Bảng 15. Các thí nghiệm làm bay hơi chậm với dạng vô định hình (PP415-P1)

Mẫu	Dung môi/hỗn hợp	Nhóm FT-Rama	Nhóm PXRD
PP415-P15	1:2 DCM/IPE	2 ^a	2
PP415-P16	1:2 MeOH/toluen	1 ^a	--
PP415-P17	1:3 EtOAc/heptan	2 ^a	2

^a phổ chứa các dấu hiệu dung môi

e. Các thí nghiệm sấy khô

Ít nhất một mẫu của mỗi nhóm được sấy khô trong chân không với mục đích khử solvat cho các solvat và thu được các dạng tinh thể không được solvat hóa của 63415 (Bảng 16). Các nguyên liệu được sấy khô cũng được đặc trưng bởi FT-Raman, PXRD, và TG-FTIR.

Bảng 16. Các thí nghiệm sấy khô được thực hiện trên các mẫu thu được từ các thí nghiệm kết tinh

Mẫu	Nguyên liệu ban đầu (Nhóm)	Các điều kiện	Kết quả
PP415-P18	PP415-P15 (2)	nhiệt độ phòng, 2-10 mbar, ~2 giờ	2
PP415-P19	PP415-P17 (2)	nhiệt độ phòng, 2-10 mbar, ~2 giờ	2
PP415-P25	PP415-P6 (3)	nhiệt độ phòng, ~3 mbar, ~5 ngày; 60 °C, 5-10 mbar, 2×1 giờ; 40-50 °C, 5-20 mbar, ~1 ngày	3
PP415-P26	PP415-P13 (4)	nhiệt độ phòng, ~3 mbar, ~5 ngày; 60 °C, 5-10 mbar, 2×1 giờ; 40-50 °C, 5-20 mbar, ~1 ngày	4
PP415-P27	PP415-P14 (5)	nhiệt độ phòng, ~3 mbar, ~5 ngày; 60 °C, 5-10 mbar, 2×1 giờ; 40-50 °C, 5-20 mbar, ~1 ngày	1 ^a
PP415-P28	PP415-P21 (2)	nhiệt độ phòng, ~3 mbar, ~5 ngày; 60 °C, 5-10 mbar, 2×1 giờ; 40-50 °C, 5-20 mbar, ~1 d	2 ^b
PP415-P30	PP415-P7 (2)	50-70 °C, 1-10 mbar, 3 ngày	2
PP415-P32	PP415-P19 (2)	80 °C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 ngày	2 ^b
PP415-P33	PP415-P25 (3)	80 °C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 ngày	3
PP415-P34	PP415-P28 (2)	80 °C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 ngày	2 ^b
PP415-P36	PP415-P35 (4)	80 °C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 ngày	4 ^c

Mẫu	Nguyên liệu ban đầu (Nhóm)	Các điều kiện	Kết quả
PP415-P37	PP415-P35 (4)	80 °C, dòng khí N ₂ , 3 ngày	4 ^c
PP415-P44a	PP415-P41 (5)	80 °C, 100 mbar, 2 ngày	1 ^a
PP415-P46a	PP415-P45 (6)	80 °C, 100 mbar, 4 ngày	1 ^a

^a khử solvat hóa thành công, giảm đáng kể hàm lượng dung môi, mẫu chủ yếu là vô định hình; chỉ ít đỉnh rộng ở PXRD

^b mẫu ít kết tinh hơn, như được biểu thị bởi rộng hơn các đỉnh ở PXRD

^c khử solvat hóa thành công, giảm đáng kể hàm lượng dung môi, mẫu vẫn kết tinh; không có sự thay đổi về cấu trúc

7. Mô tả đặc điểm của các dạng (các nhóm) mới

a. Tóm lược các nhóm mới

Ngoài dạng vô định hình của 63415 ra, thu được bốn dạng tinh thể mới trong nghiên cứu này (Bảng 17).

Bảng 17: Tóm lược các nhóm thu được

Nhóm	Các đặc điểm	Kết quả của các thí nghiệm sấy khô
Nhóm 1	dạng vô định hình	--
Nhóm 2	các solvat đẳng cấu (ví dụ như, heptan)	sấy khô không thành công
Nhóm 3	các solvat đẳng cấu (ví dụ như, etanol)	sấy khô không thành công
Nhóm 4	Solvat MeCN & solvat được khử solvat	sấy khô thành công, cấu trúc không đổi
Nhóm 5	Solvat THF	sấy khô dẫn đến dạng vô định hình

Nhóm 2: Phần lớn các thí nghiệm kết tinh dẫn đến nguyên liệu rắn của nhóm 2. Các mẫu này có thể tương ứng với đẳng cấu, không hợp thức (<0,5 đương lượng) các solvat (của heptan, xyclohexan, isopropyl ete, 1-butanol, trietylamin, và có thể là hexan và các ete khác, v.v...) có các phân tử dung môi liên kết chặt. Các phổ Rama và các mẫu hình PXRD trong nhóm này rất tương tự nhau, do đó các cấu trúc có thể giống nhau về cơ bản chỉ có những khác biệt nhỏ do các dung môi khác mà đã được đưa vào.

Các thí nghiệm sấy khô trên các mẫu nhóm 2 đã mang lại một dạng phi solvat, kết tinh. Thậm chí nhiệt độ cao (80 °C) và chân không cao ($<1 \times 10^{-3}$ mbar) không thể loại bỏ hoàn toàn các phân tử dung môi liên kết chặt; hàm lượng dung môi là >2 wt.-% luôn được duy trì. Độ kết tinh của các mẫu này bị giảm đi, nhưng không quan sát thấy sự biến đổi thành một cấu trúc khác hoặc sự vô định hình hóa đáng kể.

Nhóm 3: Nguyên liệu rắn của nhóm 3 thu được từ một vài thí nghiệm kết tinh. Các mẫu của nhóm 3 có thể là các solvat đẳng cấu của 2PrOH, EtOH, và có thể là axeton với các phân tử dung môi liên kết chặt. Chúng có thể tương ứng với các hemisolvat hợp thức hoặc các solvat không hợp thức với hàm lượng dung môi là $\sim 0,5$ đương lượng. Đối với nhóm 2, các phổ Rama và các mẫu hình PXRD trong nhóm này rất tương tự nhau, biểu thị các cấu trúc tương tự có đưa vào các dung môi khác nhau.

Tương tự với nhóm 2, các thí nghiệm sấy khô cũng không thành công. Các phân tử dung môi liên kết rất chặt chỉ có thể được loại bỏ một phần ($\sim 5,4$ wt.-% đến $\sim 4,8$ wt.-%, lên đến 3 d ở 1×10^{-3} mbar và 80 °C). Mẫu hình PXRD giữ nguyên không đổi.

Nhóm 4: Nguyên liệu của nhóm 4 chỉ thu được từ một hệ dung môi 7:3 MeCN/H₂O. Nó chắc chắn tương ứng với một hemisolvat axetonitri kết tinh.

Bằng cách sấy khô (trong chân không hoặc dòng khí N₂ ở nhiệt độ cao), phần lớn dung môi có thể được loại bỏ mà không làm thay đổi hay phá hủy cấu trúc tinh thể (PXRD giữ nguyên không đổi). Do đó, thu được một dạng phi solvat, kết tinh (hay đúng hơn là solvat được khử solvat). Nó hơi hút ẩm (khối lượng tăng thêm là $\sim 0,7$ wt.-% từ độ ẩm tương đối 50% đến độ ẩm tương đối 85%) và có thể có điểm nóng chảy tại 196,1 °C ($\Delta H = 29,31$ J/g).

Nhóm 5: Nhóm 5 cũng thu được từ chỉ một hệ dung môi ($\sim 1:1$ THF/H₂O) và chứa THF được liên kết (và có thể là H₂O). Do hàm lượng của hai thành phần không thể được định lượng một cách riêng rẽ, không thể xác định được tính chất chính xác của solvat kết tinh này.

Việc sấy khô nhóm 5 dẫn đến sự khử solvat hóa hoàn toàn và biến đổi thành dạng vô định hình (nhóm 1). Một quy trình có thể để điều chế dạng vô

định hình từ nguyên liệu nhóm 2 là biến đổi nhóm 2 thành nhóm 5, sau đó sấy khô và vô định hình hóa.

b. Nhóm 1 - Dạng vô định hình

Nhóm 1, dạng vô định hình của 63415, thu được từ vài thí nghiệm kết tinh (Bảng 18). Phần lớn các thí nghiệm kết tinh dẫn đến nguyên liệu kết tinh của các nhóm 2, 3, 4, hoặc 5.

Nguyên liệu ban đầu, PP415-P1, là vô định hình và thuộc về nhóm 1. Các thí nghiệm bổ sung, chỉ nhằm mục đích điều chế dạng vô định hình (nhóm 1), được thực hiện.

Bảng 18. Các thí nghiệm kết tinh dẫn đến nguyên liệu rắn của nhóm 1

Mẫu	Phương pháp	Dung môi	Mô tả đặc điểm	Sấy khô
PP415-P31	làm cân bằng huyền phù	9:1 PEG/H ₂ O	Raman, PXRD	--
PP415-P22	làm nguội chậm ^a	~1:3 MeCN/toluen	quan sát bằng mắt, Raman	--
PP415-P23	làm nguội chậm	1:3 EtOAc/dioxan	quan sát bằng mắt, Raman	--
PP415-P16	bay hơi/kết tủa	1:2 MeOH/toluen	quan sát bằng mắt, Raman	--

^akhông kết tủa sau khi làm nguội chậm và khuấy ở 5 °C trong 2 ngày; dung môi bay hơi dưới dòng khí N₂ ở nhiệt độ phòng.

c. Nhóm 2 - Các solvat đẳng cấu (ví dụ như, Heptan)

Phần lớn các thí nghiệm kết tinh dẫn đến nguyên liệu rắn của nhóm 2 (Bảng 19). Ngoài ra, một mẻ solvat heptan nhóm 2, PP415-P40, được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu (xem Bảng 8).

Các phổ FT-Raman của nhóm 2 tương tự nhau một cách rõ ràng (FIG.70) nhưng thể hiện những khác biệt nhỏ. Chúng khác biệt đáng kể so với phổ của nguyên liệu ban đầu vô định hình, nhóm 1 (FIG.71) và từ các phổ của các nhóm 3, 4, và 5 (FIG.72).

Các mẫu hình PXRD của nhóm 2 (FIG.73) xác nhận độ kết tinh của các nguyên liệu. Các mẫu hình của các mẫu rất tương tự nhau nhưng thể hiện

những khác biệt nhỏ (FIG.74). Các mẫu hình nhóm 2 khác biệt một cách rõ ràng so với các mẫu hình của các nhóm 3, 4, và 5 (FIG.75).

Nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P7 (FIG.76) thể hiện sự hao hụt là ~7,5 wt.-% EtOAc và heptan trong hai bước từ ~100 °C đến 290 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 290$ °C. Trước các thí nghiệm TG-FTIR, các mẫu được sấy khô thoáng qua (trong ~5 phút) trong chân không (10-20 mbar) để loại bỏ phần thừa, dung môi không liên kết. Sự hao hụt cả EtOAc và heptan xảy ra cùng nhau trong cùng khoảng nhiệt độ; cả hai dung môi dường như liên kết chặt trong cấu trúc. Hàm lượng EtOAc theo lý thuyết (điểm sôi = 76 °C) của một hemisolvat là 7,4 wt.-%, hàm lượng heptan theo lý thuyết (điểm sôi = 98 °C) của một hemisolvat là 8,3 wt.-%. Đáng tiếc là không thể định lượng hàm lượng của hai thành phần một cách riêng rẽ.

Nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P21 (FIG.77) thể hiện sự hao hụt là ~5,8 wt.-% xyclohexan trong hai bước từ ~140 °C đến ~250 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 250$ °C. Với điểm sôi của xyclohexan ở 81 °C, dung môi dường như liên kết chặt trong cấu trúc. Hàm lượng xyclohexan theo lý thuyết của một hemisolvat là 7,1 wt.-%. Do đó, mẫu PP415-P18 có thể tương ứng với một solvat xyclohexan không hợp thức (với <0,5 đương lượng hàm lượng dung môi).

Nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P24 (FIG.78) thể hiện sự hao hụt là ~16,6 wt.-% 1BuOH trong một bước từ ~50 °C đến ~160 °C, sự hao hụt thêm là 1BuOH (6,6 wt.-%) trong bước thứ hai từ 160 °C đến 230 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 230$ °C. Với điểm sôi của 1BuOH ở 117 °C, dung môi của ít nhất bước thứ hai dường như liên kết chặt trong cấu trúc. Hàm lượng 1BuOH theo lý thuyết của một hemisolvat là 6,3 wt.-%.

Nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P29 (FIG.79) thể hiện sự hao hụt là ~5,1 wt.-% EtOAc và TEA từ ~50 °C đến ~220 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ 180 °C đến 210 °C. Sự phân giải diễn ra ở các nhiệt độ $T > 220$ °C. Sự hao hụt của cả EtOAc và TEA xảy ra cùng nhau trong cùng khoảng nhiệt độ; cả hai dung môi dường như liên kết chặt trong cấu trúc (với điểm sôi của EtOAc ở 77 °C và của TEA ở 89 °C).

Nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu PP415-P47 (FIG.80) thể hiện sự hao hụt khối lượng hai bước điển hình cho nhóm 2 (tổng là ~7,9 wt.-% EtOAc) ở các nhiệt độ lên đến 240 °C, biểu thị các phân tử dung môi liên kết rất chặt.

Nhiệt đồ TG-FTIR của mẫu PP415-P48 (FIG.81) thể hiện sự hao hụt khối lượng là ~3,5 wt.-% etyl fomat và nước, lúc đầu dần dần và sau đó trong một bước rõ ràng giữa 180 °C và 200 °C. Có thể có thêm sự hao hụt etyl fomat đi kèm với sự phân giải ở $T > 240$ °C.

Do đó, tất cả các mẫu của nhóm 2 có thể tương ứng với các solvat đẳng cấu, không hợp thức (<0,5 đương lượng) với các phân tử dung môi liên kết chặt. Do các phổ Rama và các mẫu hình PXRD trong nhóm này rất tương tự nhau, các cấu trúc có thể cơ bản giống nhau với chỉ những biến dạng nhỏ về các kích cỡ tế bào đơn vị hoặc những thay đổi nhỏ của các vị trí nguyên tử trong tế bào đơn vị, do các kích cỡ và hình dạng khác nhau của các phân tử dung môi được đưa vào.

Bảng 19: Các thí nghiệm kết tinh dẫn đến nguyên liệu rắn của nhóm 2

Mẫu	Phương pháp	Dung môi	Mô tả đặc điểm	Sấy khô
PP415-P7	làm cân bằng huyền phù	1:2 EtOAc/heptan	Raman, PXRD, TG-FTIR	x
PP415-P8	làm cân bằng huyền phù	1:2 axeton/hexan	Raman, PXRD	--
PP415-P9	làm cân bằng huyền phù	1:3 toluen/DEE	Raman, PXRD	--
PP415-P10	làm cân bằng huyền phù	1:3 MeOH/TBME	Raman, PXRD	--
PP415-P11	làm cân bằng huyền phù	1:2 MEK/xyclohexan	Raman	--
PP415-P29	làm cân bằng huyền phù	EtOAc/TEA	Raman, PXRD, TG-FTIR	--
PP415-P15	bay hơi/kết tủa	1:2 DCM/IPE	Raman, PXRD	x

Mẫu	Phương pháp	Dung môi	Mô tả đặc điểm	Sấy khô
PP415-P17	bay hơi/kết tủa	1:3 EtOAc/heptan	Raman, PXRD	x
PP415-P21	làm nguội chậm	~1:5 EtOH/xyclohexan	Raman, PXRD, TG-FTIR	x
PP415-P24	bay hơi/kết tủa	1BuOH	Raman, PXRD, TG-FTIR	--
PP415-P43 ^a	làm bay hơi	(8:2) THF/hexan	PXRD	--
PP415-P47 ^a	làm bay hơi	EtOAc	PXRD, TG-FTIR	--
PP415-P48 ^a	làm bay hơi	ethyl fomate	PXRD, TG-FTIR	--

^a nguyên liệu ban đầu: PP415-P40, nhóm 2; trong tất cả các thí nghiệm PP415-P1 khác, nhóm 1, được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu.

d. Các thí nghiệm sấy khô trên các mẫu của nhóm 2

Một vài mẫu của nhóm 2 được sấy khô trong chân không (và một vài mẫu được sấy khô ở nhiệt độ cao) và để khử solvat chúng với mục đích thu được một dạng khan của 63415. Các chi tiết và đặc điểm của các mẫu khô được đưa ra dưới đây trong Bảng 20.

Tuy nhiên, thậm chí việc sấy khô trong ba ngày ở 80 °C và chân không $<1 \times 10^{-3}$ mbar không thể loại bỏ hoàn toàn các phân tử dung môi liên kết chặt; hàm lượng dung môi là >2 wt.-% vẫn còn lại (xem các mẫu -P32 và -P34). Các mẫu hình PXRD cho thấy độ kết tinh giảm của các mẫu này, nhưng quan sát thấy sự biến đổi thành một cấu trúc khác.

Bảng 20. Các thí nghiệm sấy khô trên các mẫu nhóm 2

Nguyên liệu ban đầu		Sấy khô	Nguyên liệu được sấy khô		
Mẫu	Hàm lượng dung môi	Các điều kiện	Mẫu	Hàm lượng dung môi	Nhóm
PP415-P7	EtOAc/heptan (~7,5%)	50-70 °C, 1-10 mbar, 3 ngày	PP415-P30	heptan (~2,5%)	2
PP415-P15	IPE (không biết)	nhiệt độ phòng, 2-10 mbar, ~2 giờ	PP415-P18	IPE (~7,0%)	2
PP415-P17	EtOAc(?) / heptan (không biết)	nhiệt độ phòng, 2-10 mbar, ~2 giờ	PP415-P19	heptan (~7,6%)	2
PP415-P19	heptan (~7,6%)	80 °C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 ngày	PP415-P32	heptan (~2,2%)	2 ^a
PP415-P21	xyclohexan (~5,8%)	nhiệt độ phòng, ~3 mbar, ~5 ngày; 60 °C, 5-10 mbar, 2×1 giờ; 40-50 °C, 5-20 mbar, ~1 ngày	PP415-P28	xyclohexan (~3,0%)	2 ^a
PP415-P28 ^a	xyclohexan (~3,0%)	80 °C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 ngày	PP415-P34	xyclohexan (~2,3%)	2 ^a

^a theo PXRD ít kết tinh hơn một chút

Do đó, các solvat nhóm 2 dường như có các phân tử dung môi liên kết rất chặt. Chúng khó khử solvat hoặc làm biến đổi/làm vô định hình.

e. PP415-P7 → PP415-P30

Nguyên liệu rắn của mẫu PP415-P7, nhóm 2, thu được từ một thí nghiệm làm cân bằng dịch huyền phù trong 1:2 EtOAc/heptan được sấy khô (dưới dạng PP415-P30) trong chân không trong một vài ngày (1-10 mbar, 50-70 °C).

Phổ FT-Raman của nguyên liệu nhóm 2 được sấy khô (PP415-P30) thể hiện những khác biệt nhỏ so với phổ ban đầu (mẫu PP415-P7, FIG.82) nhưng vẫn tương ứng với nhóm 2.

Mẫu hình PXRD của nguyên liệu nhóm 2 được sấy khô (PP415-P30) thể hiện rộng hơn một chút, ít mạnh hơn các đỉnh (FIG.83) nhưng vẫn tương ứng với nhóm 2.

Nhiệt độ TG-FTIR của mẫu khô PP415-P30 (FIG.84) thể hiện sự hao hụt là ~2,5 wt.-% heptan (và một ít EtOAc) trong hai bước từ ~50 °C đến ~250 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 250$ °C. So với TG-FTIR của mẫu PP415-P7 (FIG.76), hai bước hao hụt dung môi được bảo quản, nhưng tổng lượng dung môi trong mẫu đã giảm từ ~7,5 wt.-% ở PP415-P7 xuống ~2.5 wt.-% ở PP415-P30.

Do đó, nỗ lực khử solvat cho solvat này ở nhiệt độ cao (50-70 °C) và chân không là 1-10 mbar) chỉ gây ra sự hao hụt một phần dung môi.

f. PP415-P15 $\rightarrow$ PP415-P18

Nguyên liệu rắn của mẫu PP415-P15, nhóm 2, thu được từ một thí nghiệm kết tủa trong 1:2 DCM/IPE được sấy khô (dưới dạng PP415-P18) trong chân không (~2-20 mbar) ở nhiệt độ phòng trong ~2 giờ.

Phổ FT-Raman của PP415-P18 giống với phổ của mẫu PP415-P15 (FIG.85), cả hai tương ứng với nhóm 2.

Mẫu hình PXRD của PP415-P18 thể hiện những khác biệt nhỏ so với mẫu hình của PP415-P15 (FIG.86). PP415-P18 vẫn tương ứng với nhóm 2.

Nhiệt độ TG-FTIR (FIG.87) thể hiện sự hao hụt là ~7,0 wt.-% IPE trong hai bước từ ~140 °C đến ~250 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 250$ °C. Với điểm sôi của IPE là 67 °C, dung môi dường như liên kết chặt trong cấu trúc. Hàm lượng IPE theo lý thuyết của một hemisolvat là 8,4 wt.-%.

Đáng tiếc là không TG-FTIR nào được ghi nguyên liệu trước khi sấy khô bước. Tuy nhiên, do dung môi dường như liên kết rất chặt vào trong cấu trúc và không quan sát thấy các thay đổi (hay chỉ là những thay đổi nhỏ) trong các phổ FT-Raman và các mẫu hình PXRD, có thể thấy rằng việc sấy khô không có tác động đáng kể đến cấu trúc hoặc hàm lượng dung môi.

g. PP415-P17 $\rightarrow$ PP415-P19 $\rightarrow$ PP415-P32

Nguyên liệu rắn của mẫu PP415-P17, nhóm 2, thu được từ một thí nghiệm kết tủa trong 1:3 EtOAc/heptan được sấy khô (dưới dạng PP415-P19) trong chân không (~ 2 -20 mbar) ở nhiệt độ phòng trong ~ 2 giờ.

Phổ FT-Raman của PP415-P19 giống với phổ của mẫu PP415-P17 (FIG.88); không thể quan sát thấy những thay đổi, và cả hai tương ứng với nhóm 2.

Mẫu hình PXRD của PP415-P19 hơi khác biệt so với mẫu hình của PP415-P17 (FIG.89) nhưng vẫn tương ứng với nhóm 2.

Nhiệt độ TG-FTIR (FIG.90) thể hiện sự hao hụt là $\sim 7,6$ wt.-% heptan trong hai bước từ ~ 140 °C đến ~ 270 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 270$ °C. Với điểm sôi của heptan là 98 °C, dung môi dường như liên kết chặt trong cấu trúc. Hàm lượng heptan theo lý thuyết của một hemisolvat là 8,3 wt.-%.

Một thí nghiệm sấy khô nữa (80 °C, $< 1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 ngày) đã được thực hiện trên mẫu giống như PP415-P32.

Phổ FT-Raman giữ nguyên không đổi (FIG.88). Mẫu hình PXRD vẫn tương ứng với nhóm 2 (FIG.89), nhưng mẫu này ít kết tinh hơn (do các đỉnh rộng hơn và có tỷ lệ S/N thấp hơn).

Nhiệt độ TG-FTIR (FIG.90) thể hiện sự hao hụt là $\sim 2,2$ wt.-% heptan, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ 170 °C đến 200 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 250$ °C.

Do đó, hàm lượng heptan giảm chỉ từ 7,6 wt.-% to 2,2 wt.-%, điều này xác nhận liên kết mạnh các phân tử dung môi.

h. PP415-P21 $\rightarrow$ PP415-P28 $\rightarrow$ PP415-P34

Nguyên liệu rắn của mẫu PP415-P21, nhóm 2, thu được từ một thí nghiệm làm nguội chậm trong $\sim 1:5$ EtOH/xyclohexan được sấy khô (dưới dạng PP415-P28) trong chân không trong một vài ngày (2-20 mbar, nhiệt độ phòng lên đến 60 °C).

Phổ FT-Raman của nguyên liệu nhóm 2 được sấy khô (PP415-P28) thể hiện những khác biệt nhỏ so với phổ của nhóm 2 (mẫu PP415-P21, FIG.92), nhưng vẫn tương ứng với nhóm 2.

Mẫu hình PXRD của nguyên liệu nhóm 2 được sấy khô (PP415-P28) thể hiện rộng hơn, ít mạnh hơn các đỉnh so với mẫu hình của PP415-P21 (FIG.93), biểu thị rằng mẫu được sấy khô ít kết tinh hơn. Tuy nhiên, mẫu hình vẫn tương ứng với nhóm 2.

Nhiệt độ TG-FTIR của mẫu khô PP415-P28 (FIG.94) thể hiện sự hao hụt là ~3,0 wt.-% xyclohexan trong hai bước từ ~140 °C đến ~250 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 250$ °C. So với TG-FTIR của mẫu PP415-P21 (FIG.77), hai bước hao hụt dung môi được bảo quản, nhưng tổng lượng dung môi trong mẫu đã giảm từ ~5,8 wt.-% ở PP415-P21 xuống ~3,0 wt.-% ở PP415-P28.

Do đó, sự khử solvat hóa của solvat này dường như đã chỉ gây ra sự dụng sự hao hụt một phần dung môi, song song với sự hao hụt một phần độ kết tinh.

Sự tiếp tục sấy khô mẫu này (ở 80 °C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 ngày) đã được thực hiện dưới dạng PP415-P34.

Phổ FT-Raman giữ nguyên không đổi (FIG.92). Mẫu hình PXRD vẫn tương ứng với nhóm 2 (FIG.93), nhưng mẫu ít kết tinh hơn (do các đỉnh rộng hơn và có tỷ lệ S/N thấp hơn).

Nhiệt độ TG-FTIR (FIG.95) thể hiện sự hao hụt là ~2,3 wt.-% xyclohexan, trong hai bước từ 25 °C đến 270 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 270$ °C.

Do đó, hàm lượng xyclohexan giảm chỉ từ 3,0 wt.-% xuống 2.3 wt.-%, điều này xác nhận liên kết mạnh của các phân tử dung môi.

i. Nhóm 3 - Các solvat đẳng cấu (ví dụ như, Etanol)

Một vài thí nghiệm kết tinh dẫn đến nguyên liệu rắn của nhóm 3 và được đặc trưng bởi quang phổ học FT-Raman, PXRD, và TG-FTIR (Bảng 21).

Các phổ FT-Raman của nhóm 3 tương tự nhau một cách rõ ràng (FIG.96) nhưng thể hiện những khác biệt nhỏ (FIG.97). Các phổ của nhóm 3 khác biệt đáng kể so với phổ của nguyên liệu ban đầu vô định hình, nhóm 1 (FIG.98), và từ các phổ của các nhóm 2, 4, và 5 (FIG.72).

Các mẫu hình PXRD của nhóm 3 (FIG.99) xác nhận độ kết tinh của các nguyên liệu. Các mẫu hình của ba mẫu là tương tự nhau nhưng thể hiện những khác biệt nhỏ nhưng đáng kể (FIG.100). Mẫu hình nhóm 3 khác biệt một cách rõ ràng so với các mẫu hình kết tinh của các nhóm 2, 4, và 5 (FIG.75).

Nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P6 (FIG.100) thể hiện sự hao hụt là ~5,4 wt.-% 2PrOH từ 25 °C đến 250 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ ~170 °C đến 190 °C. Sự phân giải bắt đầu ở các nhiệt độ $T > 250$ °C. Trước các thí nghiệm TG-FTIR, các mẫu được sấy khô thoáng qua (trong ~5 phút) trong chân không (10-20 mbar) để loại bỏ phần thừa, dung môi liên kết. Hàm lượng 2PrOH theo lý thuyết (điểm sôi = 82 °C) của một hemisolvat là 5,1 wt.-%.

Nhiệt độ TG-FTIR của mẫu PP415-P12 (FIG.101) thể hiện sự hao hụt là ~4,9 wt.-% EtOH (với một chút nước) từ 25 °C đến 250 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ ~160 °C đến 190 °C. Sự phân giải bắt đầu ở các nhiệt độ $T > 250$ °C. Hàm lượng EtOH theo lý thuyết (điểm sôi = 78 °C) của một hemisolvat là 4,0 wt.-%.

Do đó, các mẫu của nhóm 3 dường như là các solvat đẳng cấu của 2PrOH, EtOH, và có thể là axeton với hàm lượng dung môi liên kết chặt. Chúng có thể tương ứng với các hemisolvat hợp thức. Tuy nhiên, không thể loại trừ việc các dạng này là các solvat không hợp thức.

Khi các phổ Rama và các mẫu hình PXRD trong nhóm này rất tương tự nhau, các cấu trúc có thể cơ bản giống với chỉ những biến dạng nhỏ về các kích cỡ tế bào đơn vị hoặc những thay đổi nhỏ của các vị trí nguyên tử trong tế bào đơn vị do đưa vào các phân tử dung môi khác nhau.

Bảng 21. Các thí nghiệm kết tinh dẫn đến nguyên liệu rắn của nhóm 3

Mẫu	Phương pháp	Dung môi / Hỗn hợp	Mô tả đặc điểm	Sấy khô
PP415-P6	làm cân bằng dịch huyền phù	2PrOH	Raman, PXRD, TG-FTIR	X
PP415-P12	làm cân bằng dịch huyền phù	9:1 EtOH/H ₂ O	Raman, PXRD, TG-FTIR	--
PP415-P20	làm nguội chậm	~2:1 axeton/H ₂ O	Raman, PXRD	--

j. Các thí nghiệm sấy khô trên các mẫu của nhóm 3

Một trong số các mẫu của nhóm 3 (PP415-P6), thu được từ một thí nghiệm làm cân bằng dịch huyền phù trong 2PrOH, được sấy khô (dưới dạng PP415-P25) trong chân không trong một vài ngày (2-20 mbar, nhiệt độ phòng lên đến 60 °C, Bảng 22).

Nhiệt độ TG-FTIR của nguyên liệu nhóm 3 được sấy khô này, mẫu PP415-P25 (FIG.102), thể hiện sự hao hụt là ~5,4 wt.-% 2PrOH từ 50 °C đến 250 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ 170 °C đến 190 °C, một sự hao hụt khác là ~1,0 wt.-% 2PrOH từ 290 °C đến 320 °C, và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 320$ °C. So với TG-FTIR của mẫu PP415-P6 nhóm 3 ban đầu (FIG.103), với hàm lượng dung môi là ~5,4 wt.-% 2PrOH, hàm lượng dung môi dường như không giảm đáng kể.

Nguyên liệu này được sấy khô thêm (dưới dạng PP415-P33, Bảng 22) trong ba ngày dưới chân không cao và nhiệt độ cao ($<1 \times 10^{-3}$ mbar, 80 °C) với mục đích khử solvat cho solvat và để thu được một dạng khan, không được solvat hóa của 63415.

Nhiệt độ TG-FTIR của nguyên liệu nhóm 3 được sấy khô thêm này, mẫu PP415-P33 (FIG.103) thể hiện sự hao hụt là ~4,2 wt.-% 2PrOH từ 50 °C đến 210 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ 160 °C đến 190 °C, một sự hao hụt khác là ~0,5 wt.-% 2PrOH từ 210 °C đến 290 °C, và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 290$ °C.

So với hàm lượng dung môi của các mẫu PP415-P6 và PP415-P25, hàm lượng dung môi chỉ giảm từ ~5,4 wt.-% xuống ~4,8 wt.-%.

Bảng 22. Các thí nghiệm sấy khô trên các mẫu của nhóm 3

Nguyên liệu ban đầu		Sấy khô	Nguyên liệu được sấy khô		
Mẫu	Hàm lượng dung môi	Các điều kiện	Mẫu	Hàm lượng dung môi	Nhóm
PP415-P6	2PrOH (~5,4%)	nhiệt độ phòng, ~3 mbar, ~5 ngày; 60 °C, 5-10 mbar, 2×1 giờ; 40-50 °C, 5-20 mbar, ~1 ngày	PP415-P25	2PrOH (~5,4%)	3
PP415-P25	2PrOH (~5,4%)	80 °C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 ngày	PP415-P33	2PrOH (~4,8%)	3

Các phổ FT-Raman của nhóm 3 (mẫu PP415-P6), của nguyên liệu được sấy khô của nhóm 3 (mẫu PP415-P25), và của nguyên liệu được sấy khô thêm của nhóm 3 (mẫu PP415-P33) giống nhau và không thể hiện sự thay đổi (FIG.104).

Các mẫu hình PXRD của nhóm 3 (mẫu PP415-P6) và của nguyên liệu được sấy khô thêm của nhóm 3 (mẫu PP415-P33) không thể hiện những sự thay đổi đáng kể, trong khi có ít thay đổi và khác biệt nhỏ từ mẫu hình của nguyên liệu được sấy khô ban đầu của nhóm 3 (mẫu PP415-P25, FIG.105). Tất cả các mẫu hình tương ứng với nhóm 3.

Do việc sấy khô không có tác động lớn đến hàm lượng dung môi, không bất ngờ là các phổ FT-Raman và các mẫu hình PXRD của các nguyên liệu được sấy khô không thể hiện những khác biệt so với nguyên liệu được sấy khô không khô.

Do đó, nhóm 3 là một nhóm các solvat đẳng cấu (2PrOH, EtOH, và có thể là axeton) với các phân tử dung môi liên kết rất chặt mà có thể được loại bỏ chỉ một phần (~5,4 wt.-% xuống ~4,8 wt.-%) bằng các điều kiện sấy khô được áp dụng ở đây (lên đến 3 ngày ở 1×10^{-3} mbar và 80 °C).

k. Nhóm 4 – Solvat Axetonitril

Nhóm 4 chỉ thu được từ một hỗn hợp dung môi 7:3 MeCN/H₂O (Bảng 23). Thí nghiệm dẫn đến nhóm 4 (PP415-P13) được lặp lại dưới dạng PP415-P35 để điều chế thêm nguyên liệu các nghiên cứu sấy khô thêm.

Phổ FT-Raman (FIG.72) và mẫu hình PXRD (FIG.75) của nhóm 4 (mẫu PP415-P13) khác biệt đáng kể so với các phổ và các mẫu hình của các nhóm 2, 3, và 5.

Nhiệt độ TG-FTIR của nhóm 4 (mẫu PP415-P13, FIG.106) thể hiện sự hao hụt là ~3,4 wt.-% MeCN (với một chút nước) từ 25 °C đến 270 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ ~180 °C đến 210 °C. Sự phân giải bắt đầu ở các nhiệt độ T>270 °C. Trước các thí nghiệm TG-FTIR, các mẫu được sấy khô thoáng qua (trong ~5 phút) trong chân không (10-20 mbar) để loại bỏ phần thừa, dung môi không liên kết. Hàm lượng MeCN theo lý thuyết (điểm sôi = 81 °C) của một hemisolvat là 3,6 wt.-%.

Bảng 23. Các thí nghiệm kết tinh dẫn đến nguyên liệu rắn của nhóm 4

Mẫu	Phương pháp	Dung môi	Mô tả đặc điểm	Sấy khô
PP415-P13	làm cân bằng dịch huyền phù	7:3 MeCN/H ₂ O	Raman, PXRD, TG-FTIR	X
PP415-P35	làm cân bằng dịch huyền phù	7:3 MeCN/H ₂ O	Raman, PXRD, TG-FTIR	X

l. Các thí nghiệm sấy khô đối với Nhóm 4

Các mẫu của nhóm 4 thu được từ các thí nghiệm làm cân bằng dịch huyền phù trong ~7:3 MeCN/H₂O được sấy khô trong chân không trong một vài ngày hoặc dưới dòng khí N₂ (Bảng 24).

Bảng 24. Các thí nghiệm sấy khô trên các mẫu của nhóm 4

Nguyên liệu ban đầu		Sấy khô	Nguyên liệu được sấy khô		
Mẫ u	Hàm lượn g dung môi	Các điều kiện	Mẫ u	Hà m lượn g dun g môi	N h ó m
PP415- P13	MeCN (~3,4%)	nhiệt độ phòng, ~3 mbar, ~5 ngày; 60 °C, 5-10 mbar, 2×1 giờ; 40-50 °C, 5-20 mbar, ~1 ngày	PP415- P26	MeCN (~2,8%)	4
PP415- P35	MeCN (~2,9%)	80 °C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 ngày	PP415- P36	MeCN/H ₂ O ^a (~0,6%)	4
PP415- P35	MeCN (~2,9%)	80 °C, dòng khí N ₂ , 3 ngày	PP415- P37	MeCN/H ₂ O ^a (~0,9%)	4

^a hàm lượng dung môi có thể là MeCN và H₂O, nhưng khó xác định do lượng nhỏ

Phổ FT-Raman của nguyên liệu nhóm 4 được sấy khô (PP415-P26) giống với phổ của nhóm 4 (PP415-P13, FIG.107).

Mẫu hình PXRD của nguyên liệu nhóm 4 được sấy khô (PP415-P26) chỉ thể hiện những khác biệt rất nhỏ so với mẫu hình của nhóm 4, mẫu PP415-P13 (FIG.108). Một số đỉnh dường như được phân giải tốt hơn, và các cường độ đỉnh đã được thay đổi. Không quan sát thấy sự vô định hình hóa nào. Mẫu hình PP415-P26 tương ứng với nhóm 4.

Nhiệt độ TG-FTIR của nguyên liệu nhóm 4 được sấy khô, mẫu PP415-P26 (FIG.109) thể hiện sự hao hụt là ~2,8 wt.-% MeCN từ 170 °C đến 250 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 300$ °C. So với TG-FTIR của mẫu PP415-P13 (FIG.106), hàm lượng dung môi của mẫu đã giảm từ 3,4 wt.-% xuống 2,8 wt.-%.

Do đó, mẫu dường như là solvat được khử solvat một phần. Do không còn đủ nguyên liệu cho thí nghiệm sấy khô thứ hai có sự mô tả đặc điểm sau đó, thí nghiệm PP415-P13 được lặp lại (dưới dạng PP415-P35). Thêm nguyên liệu của nhóm 4 được điều chế và hai thí nghiệm sấy khô được thực hiện với nguyên liệu vừa mới được điều chế này:

- PP415-P36: sấy khô trong chân không ($<1 \times 10^{-3}$ mbar) ở 80 °C trong ba ngày
- PP415-P37: sấy khô dưới dòng khí N₂ ở 80 °C trong ba ngày

Các phổ FT-Raman của các mẫu nhóm 4 được sấy khô này (PP415-P36 và -P37) tương ứng với phổ của nhóm 4 (nghĩa là, PP415-P35, FIG.110).

Các mẫu hình PXRD (FIG.111) của nguyên liệu nhóm 4 (mẫu PP415-P35) và các mẫu khô của nhóm 4 (các mẫu PP415-P36 và PP415-P37) giống nhau. Các mẫu khô là kết tinh.

Các nhiệt đồ TG-FTIR của các mẫu được sấy khô này của nhóm 4 (FIG.112 cho PP415-P36 và FIG.113 cho PP415-P37) chỉ thể hiện hàm lượng dung môi nhỏ (MeCN và/hoặc H₂O) là ~0,6 wt.-% và ~0,9 wt.-% tương ứng cho PP415-P36 và PP415-P37, trong hai bước từ 25 °C đến 280 °C. Hàm lượng dung môi có thể là MeCN và H₂O, nhưng khó để xác định do các lượng nhỏ. Sự phân giải bắt đầu ở nhiệt độ $T > 280$ °C.

Do đó, phần lớn dung môi của solvat này có thể được loại bỏ mà không phá hủy cấu trúc tinh thể. Thu được một dạng phi solvat, kết tinh (hay đúng hơn là solvat được khử solvat).

m. Mô tả thêm đặc điểm cho nhóm 4 được sấy khô và được khử solvat

Sự sấy khô nhóm 4 (solvat MeCN) tạo ra solvat được khử solvat với hàm lượng dung môi được giảm xuống <1 wt.-% (TG-FTIR).

Không có sự thay đổi nào về cấu trúc xảy ra khi khử solvat hóa (FT-Raman và PXRD). Không quan sát thấy sự hao hụt độ kết tinh đáng kể.

Do đó, thu được một dạng kết tinh, không được solvat hóa của 63415, là dạng duy nhất được biết đến cho đến nay.

Nguyên liệu nhóm 4 được khử solvat này còn được đặc trưng bởi DVS và DSC.

Biểu đồ đẳng nhiệt DVS (FIG.114) thể hiện rằng trong suốt thời gian làm cân bằng ban đầu ở độ ẩm tương đối 50%, khối lượng tăng thêm là ~0,4 wt.-%. Trong quá trình đo, sự hao hụt khối lượng đảo ngược, dần dần là ~1,3 wt.-% diễn ra khi giảm độ ẩm tương đối từ độ ẩm tương đối 50% xuống độ ẩm tương đối 0%. Đạt được sự cân bằng. Khi tăng độ ẩm tương đối đến độ ẩm tương đối 95%, quan sát thấy khối lượng tăng dần thêm là ~0.8 wt.-% (tương ứng với sự làm cân bằng khối lượng ở độ ẩm tương đối 50%). Đạt được sự cân bằng. Sau khi giảm độ ẩm tương đối đến độ ẩm tương đối 50%, khối lượng cuối cùng còn lại là 0,1 wt.-% dưới mức khối lượng ban đầu được làm cân bằng. Khối lượng tăng thêm là ~0,7 wt.-% khi tăng độ ẩm tương đối từ độ ẩm tương đối 50% lên độ ẩm tương đối 85% đã phân mẫu vào nhóm hơi hút ẩm.

Mẫu hình PXRD của mẫu sau khi đo không bị thay đổi so với mẫu hình trước khi đo (FIG.115).

Biểu đồ nhiệt DSC của một mẫu nguyên liệu nhóm 4 được khử solvat (FIG.116) không thể hiện sự chuyển hóa thủy tinh nào có thể quy cho dạng vô định hình, mà đã được kỳ vọng ở ~150 °C, nhưng thay vào đó là một đỉnh thu nhiệt nhọn với mức tối đa là $T = 196,1\text{ °C}$ ($\Delta H = 29.31\text{ J/g}$), có thể tương ứng với sự nóng chảy, và không có sự phân giải lên đến 270 °C.

Ngoài ra, một thí nghiệm DSC đã được thực hiện với một hỗn hợp ~1:1 của nguyên liệu vô định hình, nhóm 1, với nguyên liệu nhóm 4 được khử solvat để kiểm tra xem nguyên liệu vô định hình có biến đổi và kết tinh thành nhóm 4 được khử solvat không, một biến cố được kỳ vọng xảy ra (nếu có) trên mức nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh của dạng vô định hình ($T_g \approx 150\text{ °C}$) và dưới mức nóng chảy của nhóm 4 được khử solvat ($T_m \approx 196\text{ °C}$).

Biểu đồ nhiệt DSC của hỗn hợp (FIG.117) thể hiện một biến cố thu nhiệt có đỉnh tại $T = 156,7\text{ °C}$ ($\Delta H = 1,47\text{ J/g}$) và một biến cố thu nhiệt thứ hai có đỉnh tại $197,0\text{ °C}$ ($\Delta H = 14,1\text{ J/g}$). Biến cố thứ nhất có thể quy cho nguyên liệu vô định hình (chuyển hóa thủy tinh ở $T_g \approx 150\text{ °C}$). Biến cố thứ hai có thể tương ứng với mức nóng chảy của nhóm 4 được khử solvat ở $T_m \approx 196\text{ °C}$. Nhiệt nóng chảy ($\Delta H = 14,1\text{ J/g}$) của hỗn hợp có tương quan với nửa lượng nhiệt nóng chảy ($\Delta H = 29,3\text{ J/g}$) của nhóm 4 được khử solvat thuần túy.

Không thể quan sát thấy biến cố tỏa nhiệt nào trong khoảng nhiệt độ giữa sự chuyển hóa thủy tinh và sự nóng chảy tương ứng với sự kết tinh có thể của nguyên liệu vô định hình. Do đó, không có sự biến đổi dạng vô định hình thành dạng nhóm 4 được khử solvat dường như đã xảy ra trên thang thời gian này.

Ở một thí nghiệm DSC khác nữa với hỗn hợp ~1:1 của nguyên liệu vô định hình, nhóm 1, với nguyên liệu nhóm 4 được khử solvat, sự gia nhiệt tạm ngừng ở 173 °C (ở giữa sự chuyển hóa thủy tinh và sự nóng chảy) để có thời gian cho sự kết tinh có thể.

Biểu đồ nhiệt DSC của hỗn hợp (FIG.118) thể hiện một biến cố thu nhiệt có đỉnh tại $T = 161,4\text{ °C}$ ($\Delta H = 0,31\text{ J/g}$) và một biến cố thu nhiệt thứ hai có đỉnh tại $201,4\text{ °C}$ ($\Delta H = 11,4\text{ J/g}$). Như ở trong thí nghiệm thứ nhất, nhiệt nóng chảy của đỉnh thứ hai đã không tăng; không thấy các dấu hiệu cho sự biến đổi dạng vô định hình thành dạng nhóm 4 được khử solvat.

Đường cong cơ sở (-50 °C đến 150 °C) chắc chắn là giả tạo (do nắp cốc đựng mẫu bị uốn cong).

n. Nhóm 5 - Solvat THF

Nhóm 5 chỉ thu được từ một hỗn hợp dung môi 1:1 THF/H₂O (Bảng 25).

Phổ FT-Raman (FIG.71) và mẫu hình PXRD (FIG.75) của nhóm 5 khác đáng kể so với các phổ và các mẫu hình của các nhóm 2, 3, và 4.

Nhiệt độ TG-FTIR của nhóm 5 (mẫu PP415-P14, FIG.119) thể hiện sự hao hụt là ~36,1 wt.-% THF và H₂O từ 25 đến 200 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ ~100 °C đến 130 °C. Trước các thí nghiệm TG-FTIR, các mẫu được sấy khô thoáng qua (trong ~5 phút) trong chân không (10-20 mbar) để loại bỏ phần thừa, dung môi không liên kết. Sự hao hụt của cả THF và H₂O xảy ra cùng nhau trong cùng khoảng nhiệt độ. Sự phân giải bắt đầu ở các nhiệt độ $T > 300\text{ °C}$. Hàm lượng THF theo lý thuyết (điểm sôi = 66 °C) của một trisolvat là 28,1 wt.-%. Đáng tiếc là do không thể định lượng một cách riêng rẽ hàm lượng của hai thành phần cho nên không thể xác định được trạng thái solvat hóa chính xác.

Các chi tiết về các thí nghiệm và các đặc điểm của các mẫu PP415-P41 và PP415-P45 được cung cấp.

Bảng 25. Các thí nghiệm kết tinh dẫn đến nguyên liệu rắn của nhóm 5

Mẫu	Phương pháp	Dung môi	Mô tả đặc điểm	Sấy khô
PP415-P14	làm cân bằng dịch huyền phù	1:1 THF/H ₂ O	Raman, PXRD, TG-FTIR	X
PP415-P41 ^b	làm cân bằng dịch huyền phù	1:1 THF/H ₂ O	PXRD	X
PP415-P45 ^{b,c}	làm cân bằng dịch huyền phù	1:1 THF/H ₂ O	PXRD	X

^bnguyên liệu ban đầu: PP415-P40, nhóm 2; trong tất cả các thí nghiệm khác trong bảng này, PP415-P1, nhóm 1, được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu

^cthí nghiệm trên quy mô 3 g thay vì quy mô 100 mg

o. Các thí nghiệm sấy khô trên các mẫu của nhóm 5

Mẫu của nhóm 5 (PP415-P14), thu được từ một thí nghiệm làm cân bằng dịch huyền phù trong THF/H₂O ~1:1, được sấy khô (dưới dạng PP415-P27) trong chân không trong một vài ngày (2-20 mbar, nhiệt độ phòng lên đến 60 °C, Bảng 26).

Bảng 26. Các thí nghiệm sấy khô của các mẫu của Nhóm 5

Nguyên liệu ban đầu		Sấy khô	Nguyên liệu được sấy khô		
Mẫu	Hàm lượng dung môi	Các điều kiện	Mẫu	Hàm lượng dung môi	Nhóm
PP415-P14	THF & H ₂ O (~36 wt.-%)	nhiệt độ phòng, ~3 mbar, ~5 ngày; 60 °C, 5-10 mbar, 2×1 giờ; 40-50 °C, 5-20 mbar, ~1 ngày	PP415-P27	-- (~0,3 wt.-%)	1 (+5) ^a

^a chủ yếu là vô định hình, chỉ ít định hướng với tỷ lệ S/N thấp

Phổ FT-Raman của nguyên liệu được sấy khô (PP415-P27) khác với phổ của nhóm 5 (PP415-P14, FIG.120) và, với các đỉnh được làm rộng của nó, giống với phổ của nhóm 1 hơn, nguyên liệu ban đầu vô định hình, PP415-P1.

Mẫu hình PXRD của nguyên liệu nhóm 5 được sấy khô (PP415-P27) chỉ thể hiện một số đỉnh cường độ thấp, rộng với tỷ lệ S/N thấp, biểu thị độ kết tinh kém của mẫu (FIG.121). Một vài trong số các đỉnh có thể tương ứng với nhóm 5, trong khi các đỉnh khác, nghĩa là, ở $7,35^\circ 2\theta$, là mới hoặc được thay đổi.

Nhiệt độ TG-FTIR của nguyên liệu nhóm 5 được sấy khô (FIG.122) thể hiện sự hao hụt khối lượng là $\sim 0,3 \text{ wt.}\%$ từ 25°C đến 290°C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 290^\circ\text{C}$. Mẫu là khan.

Do đó, bằng cách sấy khô trong chân không, nguyên liệu đã làm hao hụt hàm lượng dung môi và phần nhiều độ kết tinh của nó.

8. Các thí nghiệm để điều chế dạng vô định hình

Các thí nghiệm với mục đích điều chế dạng vô định hình, nhóm 1, được thực hiện sử dụng nguyên liệu nhóm 2 (PP415-P40, Bảng 8) làm nguyên liệu ban đầu. Một vài chiến lược và các phương pháp được thử:

- Biến đổi nhóm 2 thành nhóm 5, sau đó sấy khô của nhóm 5 để thu được dạng vô định hình, nhóm 1.
- Việc điều chế dạng vô định hình, nhóm 1, trực tiếp từ nhóm 2, nếu có thể sử dụng các dung môi nhóm 3 ICH.

Chủ yếu là nguyên liệu vô định hình được điều chế bắt đầu từ nguyên liệu nhóm 2 trong một quy trình hai bước thông qua nhóm 5 trên quy mô 100 mg và 3 g.

Các thí nghiệm nữa được thực hiện với mục đích đơn giản hóa thủ tục cho một quy trình gồm một bước, để tránh dung môi THF nhóm 2 ICH, và để thu được nguyên liệu vô định hình hoàn toàn. Phương pháp triển vọng nhất được thấy là kết tủa từ dung dịch axeton trong bể nước lạnh. Phương pháp trực tiếp này mang lại các kết quả tốt hơn nhiều so với phương pháp gồm hai bước thông qua nhóm 5.

a. Việc điều chế dạng vô định hình thông qua Nhóm 5

Các thí nghiệm kết tinh sử dụng nhóm 2, PP415-P40, làm nguyên liệu ban đầu được thực hiện với mục đích biến đổi solvat heptan này thành nhóm 5

(có thể là solvat THF), sau đó sấy khô của nhóm 5 để thu được nguyên liệu vô định hình (Bảng 27).

Nhóm 5 được cho là bước trung gian tốt, do nó dễ khử solvat và làm vô định hình hơn so với các nhóm 2 hoặc 3.

Bảng 27. Tóm lược của các thí nghiệm nhằm mục đích điều chế dạng vô định hình, nhóm 1, thông qua nguyên liệu nhóm 5

Bước	Mẫu	Phương pháp	Các điều kiện	Các kết quả
1	PP415-P41	làm cân bằng dịch huyền phù	1:1 THF/H ₂ O, 24 °C, 3 d	nhóm 5
“	PP415-P45	làm cân bằng dịch huyền phù	1:1 THF/H ₂ O, r.t. 1 d	nhóm 5
2	PP415-P44a	sấy khô	100 mbar, 80 °C, 2 d	nhóm 1 ^a ; 0,9 wt.-% THF
“	PP415-P46a	sấy khô	100 mbar, 80 °C, 4 d	nhóm 1 ^a ; 0,4 wt.-% H ₂ O

^a chủ yếu là vô định hình, chỉ ít định rộng với tỷ lệ S/N thấp

b. Bước 1: Biến đổi của nhóm 2 thành nhóm 5

Sự biến đổi solvat heptan, nhóm 2, thành solvat THF, nhóm 5, được thực hiện thành công bằng cách tạo huyền phù nguyên liệu PP415-P40 (solvat heptan) trong một hỗn hợp THF/H₂O (1:1) và làm cân bằng dịch huyền phù ở nhiệt độ phòng. (PP415-P41, quy mô 100 mg). Nguyên liệu rắn thu được tương ứng với solvat THF, nhóm 5 (FIG.123).

Một thí nghiệm với quy mô tăng lên thứ nhất từ quy mô mg lên quy mô g (×30, nghĩa là, quy mô 3 g) đã được thực hiện tương tự với PP415-P41: nguyên liệu ban đầu solvat heptan nhóm 2 (PP415-P40) được cân bằng trong THF/H₂O (1:1) trong một ngày và được biến đổi thành công thành nhóm 5, solvat THF (PP415-P45, FIG.124).

c. Bước 2: Vô định hình hóa nguyên liệu nhóm 5 bằng cách sấy khô

Nguyên liệu nhóm 5 (solvat THF) được sấy khô ở nhiệt độ cao (80 °C) trong chân không (~100 mbar) có xem xét các điều kiện có thể được sử dụng tại vị trí API MFG.

Sau khi sấy khô nguyên liệu của thí nghiệm trên quy mô 100 mg, PP415-P41, trong một ngày ở 80 °C và 100 mbar, nó biến đổi thành chủ yếu là nguyên liệu vô định hình (PP415-P44, FIG.125). Mẫu hình PXRD chỉ thể hiện một số đỉnh rộng với cường độ thấp. Sau khi sấy khô thêm (80 °C, 100 mbar) qua đêm, cường độ của các đỉnh rộng này tiếp tục giảm đi (PP415-P44a). TG-FTIR của nguyên liệu này thể hiện sự hao hụt là ~0,9 wt.-% THF (với một chút nước) dần dần từ 25 °C đến 280 °C và sự phân giải ở các nhiệt độ $T > 300$ °C (FIG.126).

Nguyên liệu của thí nghiệm trên quy mô 3 g, PP415-P45, cũng được sấy khô ở 80 °C và 100 mbar (dưới dạng PP415-P46). Nó biến đổi qua đêm thành chủ yếu là nguyên liệu vô định hình với chỉ một số đỉnh rộng với cường độ thấp (FIG.127). Sau tổng bốn ngày sấy khô (80 °C, 100 mbar), các đỉnh rộng này vẫn hiện diện (-P46a, FIG.128). TG-FTIR của nguyên liệu này không thể hiện hàm lượng THF nào, nhưng thể hiện sự hao hụt là ~0,4 wt.-% nước dần dần từ 25 °C đến 250 °C và sự phân giải ở nhiệt độ $T > 250$ °C (FIG.129).

d. Trực tiếp thu được dạng vô định hình

Việc điều chế dạng vô định hình bắt đầu từ nguyên liệu nhóm 2 trong quy trình gồm hai bước qua nhóm 5 là phần lớn, nhưng không hoàn toàn, thành công. Do đó, các thí nghiệm nữa được thực hiện với mục đích đơn giản hóa thủ tục cho một quy trình gồm một bước, để tránh việc sử dụng dung môi THF nhóm 2 ICH, và để thu được nguyên liệu vô định hình hoàn toàn (Bảng 28).

Dạng vô định hình, nhóm 1, được điều chế trực tiếp từ nguyên liệu nhóm 2 trong một thí nghiệm làm bay hơi một dung dịch nhóm 2 trong THF dưới dòng khí N₂ (PP415-P42, FIG.129).

Với nỗ lực kích thích một solvat hexan/heptan được sấy khô không hoàn toàn với lượng dung môi còn lại đáng kể, việc làm bay hơi một dung dịch nhóm 2 trong một dung dịch THF/hexan 8:2 đã được thực hiện (hexan được sử dụng thay vì heptan để có các điểm sôi tương tự trong hỗn hợp dung môi). Tuy nhiên, chất rắn thu được tương ứng với nhóm 2, nhóm của các solvat đẳng cấu, không tương ứng với nhóm 5 (PP415-P43, FIG.130).

Để tránh dung môi THF nhóm 2 ICH, các thí nghiệm làm bay hơi được thực hiện trong các dung môi nhóm 3 ICH.

Việc làm bay hơi một dung dịch nhóm 2 trong EtOAc dưới dòng khí N₂ tạo ra nguyên liệu kết tinh với một mẫu hình PXRD tương ứng với nhóm 2 (PP415-P47, FIG.130). TG-FTIR (FIG.80) thể hiện sự hao hụt khối lượng gồm hai bước đặc trưng của nhóm 2 (tổng là ~7,9 wt.-% EtOAc) ở các nhiệt độ lên đến 240 °C, biểu thị các phân tử dung môi liên kết rất chặt.

Việc làm bay hơi trong etyl fomat cũng mang lại nguyên liệu nhóm 2 kết tinh và không phải là dạng vô định hình (PP415-P48, FIG.131). TG-FTIR (FIG.78) thể hiện sự hao hụt khối lượng là ~3,5 wt.-% etyl fomat, lúc đầu dần dần và sau đó trong một bước rõ ràng giữa 180 °C và 200 °C. Có thể có thêm sự hao hụt etyl fomat đi kèm với sự phân giải ở T > 240 °C.

Tuy nhiên, nguyên liệu nhóm 2 được biến đổi thành công thành dạng vô định hình, nhóm 1, bằng cách thêm một dung dịch axeton vào một bể nước lạnh (5 °C) (PP415-P49, FIG.132).

Phương pháp trực tiếp này để điều chế dạng vô định hình mang lại các kết quả tốt hơn và là một cách triển vọng hơn quy trình gồm hai bước.

Bảng 28. Tóm lược các thí nghiệm nhằm thu được dạng vô định hình trực tiếp từ nhóm 2 nguyên liệu ban đầu

Mẫu	Phương pháp	Dung môi	Điều kiện	Kết quả
PP415-P42	làm bay hơi	THF	dòng khí N ₂ , 1 ngày	nhóm 1
PP415-P43	làm bay hơi	8:2 THF/hexan	dòng khí N ₂ , 1 ngày	nhóm 2
PP415-P47	làm bay hơi	EtOAc	dòng khí N ₂ , 1 ngày	nhóm 2
PP415-P48	làm bay hơi	ethyl fomat	dòng khí N ₂ , 1 ngày	nhóm 2
PP415-P49	kết tủa	axeton	bể H ₂ O ở 5 °C	nhóm 1

9. Các điều kiện đo đặc trưng bằng dụng cụ

Quang phổ học FT-Raman: Bruker RFS100 với phần mềm OPUS 6.5; kích thích Nd:YAG 1064-nm, máy dò Ge, dải 3500-100 cm^{-1} ; các điều kiện đo đặc trưng: công suất laze danh định 100-300 mW, 64-128 lần quét, độ phân giải 2 cm^{-1} .

PXRD: Stoe Stadi P; máy dò Mythen1K; bức xạ Cu-K α ; các điều kiện đo tiêu chuẩn: hệ số truyền dẫn; công suất ống 40 kV và 40 mA; máy đơn sắc Ge cong; kích thước bước 0,02 $^{\circ}2\theta$, thời gian bước 12 giây hoặc 60 giây, dải quét 1,5-50,5 $^{\circ}2\theta$ hoặc 1,0-55 $^{\circ}2\theta$; chế độ máy dò: quét bước; bước máy dò 1 $^{\circ}2\theta$ hoặc 6 $^{\circ}2\theta$; chuẩn bị mẫu chuẩn: mẫu 10 đến 20 mg được đặt giữa hai lá axetat; cốc đựng mẫu: cốc đựng mẫu truyền dẫn Stoe; mẫu được quay trong quá trình đo.

TG-FTIR: Cân vi lượng-Nhiệt Netzsch TG 209 với Vector Phổ kế FT-IR Bruker 22; nồi nung nhôm (có lỗ nhỏ), khí quyển N₂, tốc độ gia nhiệt 10 K/phút, dải 25-250 $^{\circ}\text{C}$ hoặc 25-350 $^{\circ}\text{C}$.

DSC: Perkin Elmer DSC 7; các nồi nung vàng (kín hoặc có lỗ nhỏ), mẫu được nạp trong một môi trường N₂, tốc độ gia nhiệt 10 K/phút, -50 đến 250 $^{\circ}\text{C}$ hoặc 350 $^{\circ}\text{C}$ range, đôi khi làm nguội (ở -200 K/phút) xuống -50 $^{\circ}\text{C}$ giữa những lần quét.

DVS: Projekt Messtechnik Sorptions Prüfsystem SPS 11 - 100n hay các Hệ thống Đo Bề mặt DVS-1. Mẫu được đặt trên một cốc đựng nhôm hoặc platin trên đỉnh cân vi lượng và được phép làm cân bằng trong 2 giờ ở độ ẩm tương đối 50% trước khi bắt đầu chương trình độ ẩm được xác định trước:

- (1) độ ẩm tương đối 50 $\rightarrow$ 0% (5%/giờ); 5 giờ ở độ ẩm tương đối 0%
- (2) độ ẩm tương đối 0 $\rightarrow$ 95% (5%/ giờ); 5 giờ ở độ ẩm tương đối 95%
- (3) độ ẩm tương đối 95 $\rightarrow$ 50% (5%/ giờ); 2 giờ ở độ ẩm tương đối 50%

Độ hút ẩm được phân nhóm dựa trên sự tăng thêm khối lượng ở độ ẩm tương đối 85% tương ứng với khối lượng ban đầu như sau: tan rữa (hấp thụ đủ nước để tạo thành một chất lỏng), rất hút ẩm (mức tăng khối lượng $\geq 15\%$), hút

ẩm (mức tăng khối lượng $<15\%$ nhưng $\geq 2\%$), hơi hút ẩm (mức tăng khối lượng $<2\%$ nhưng $\geq 0,2\%$), hoặc không hút ẩm (mức tăng khối lượng $<0,2\%$).

Các dung môi: Cho tất cả các thí nghiệm, các dung môi cấp độ phân tích Fluka, Merck, hoặc ABCR được sử dụng.

Xác định độ hòa tan gần đúng: Độ hòa tan gần đúng được xác định bởi sự pha loãng từng bước một dịch huyền phù là khoảng 10 mg chất trong 0,05 mL dung môi. Nếu chất không bị hòa tan bằng cách thêm tổng >10 mL dung môi, độ hòa tan được biểu thị là <1 mg/mL. Do sai số thí nghiệm cố hữu trong phương pháp này, các giá trị độ hòa tan nhằm được coi là các số lượng ước đoán gần đúng và chỉ để được sử dụng để thiết kế các thí nghiệm kết tinh.

Xác định độ bền hóa học: Bốn mẫu của 1,0 mg của nguyên liệu PP415-P1 trong 1,0 mL dung môi tương ứng được điều chế. Các dịch huyền phù/dung dịch thu được được cân bằng trong một Máy lắc ủ rung nhiệt Eppendorf được điều khiển bởi nhiệt độ trong 7 ngày, 2 ngày, 24 giờ, và 6 giờ ở 25°C với tốc độ lắc là 500 vòng/phút. Nếu cần thiết, pha rắn được tách bởi máy ly tâm lọc (màng PVDF 0,5- μm). Các sản phẩm lọc được pha loãng trong chất pha loãng (axit fomic 0,1% trong MeCN) đến nồng độ $\leq 0,2$ mg/mL (không biết và có thể thấp hơn cho các dịch huyền phù) và được kiểm tra sử dụng phương pháp HPLC được nêu ra trong Bảng 29. Là tham chiếu, nguyên liệu PP415-P1 được pha loãng trong chất pha loãng đến nồng độ là 0,25 mg/mL và được thêm vào phần đầu và phần cuối của trình tự HPLC.

Các kết quả HPLC

Bảng 29. Phương pháp HPLC được sử dụng cho việc xác định độ bền hóa học

Cột	Zorbax Eclipse XDB-C18, 3×150 mm, 5 μm (CC19)		
Dung môi rửa giải hấp A	H ₂ O + axit fomic 0,1%		
Dung môi rửa giải hấp B	MeCN + axit fomic 0,1%		
Gradient	0 phút	50% A	50% B
	10,0 phút	10% A	90% B
	15,0 phút	0% A	100% B
	15.1 phút	50% A	50% B
	20,0 phút	50% A	50% B
Lưu lượng	0,75 mL/phút		
Khối lượng tiêm	10 μL		
Chiều dài bước sóng	254 nm, 242 nm, 210 nm		
Thời gian thu nhận	20 phút		
Thời gian thực hiện	20 phút		
Nhiệt độ cột	25 °C		
Thời gian lưu trữ	8,9-9,0 phút		

10. Các chữ viết tắt

Các phương pháp:

AUC	phân tích khu vực dưới đường cong
DSC	đo nhiệt lượng quét vi sai
DVS	sự hút hơi động
FT Raman	quang phổ học Raman biến đổi Fourier
¹ H-NMR	quang phổ học cộng hưởng từ hạt nhân proton
HPLC	sắc ký lỏng hiệu suất cao
PXRD	nhiều xạ tia X bột
TG-FTIR	phân tích nhiệt trọng kết hợp với quang phổ học hồng ngoại biến đổi Fourier

Các chất hóa học:

1BuOH	1-butanol
CTAB	cetyl trimethylammonium bromit
DCM	diclorometan
DEE	dietyl ete
DMF	N,N-dimetylformamit
EtOAc	etyl axetat
EtOH	etanol
IPE	isopropyl ete
MeCN	axetonitril
MEK	metyl etyl xeton
MeOH	metanol
PEG	propylen glycol
PTFE	polytetrafluetylen, Teflon
2PrOH	2-propanol, isopropanol
SDS	natri dodecyl sulfat
TBME	tert-butyl metyl ete
TEA	trietylamin
THF	tetrahydrofuran
Tween 80	polyoxyetylen (80) sobitan monooleat hoặc polysobat 80

Các gen, protein, và các thông số sinh học:

AIM	tác nhân điều biến chứng viêm chống oxy hóa
Akr1c1	aldo-keto reductaza họ 1, thành viên c1
ALP	alkalin phosphataza
ALT	alanin transaminaza
ARE	yếu tố phản ứng chống oxy hóa
AST	aspartat transaminaza
AUC	khu vực dưới đường cong
BAL	cường phổi thụt rửa
BALF	chất lỏng thụt rửa cường phổi

Bil	sắc tố mật
BUN	nitơ urê trong máu
COPD	bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính
COX-2	cyclooxygenaza-2
Cr	creatin
CYP450	sắc tố tế bào P450
Eh-1	epoxit hydrolaza 1
G6PD	glucoza-6 phosphat dehydroaza
Gclc	glutamat-xystein ligaza, subunit xúc tác
Gclm	glutamat-xystein ligaza, subunit chất biến đổi
Ggt1	gamma-glutamyltransferaza
Glrx	glutaredoxin-1
Glu	glucoza
GOT	glutamic-oxaloacetic transaminaza
GPT1	glutamic-pyruvat transaminaza
Gpx3	glutathion peroxidaza 3
GSH	glutathion
GSR	glutathion reductaza
GSs	glutathion synthetaza
GST	glutathion S-transferaza
GSTa1	glutathion S-transferaza alpha 1
GSTp1	glutathion S-transferaza pi 1
Gy	Gray
H6PD	hexose-6-phosphat dehydroaza
hERG	human ete a-go-go-related gene
HMOX1	heme oxygenaza (loại bỏ chu trình) 1
HO-1	heme oxygenaza
IFN γ	interferon-gamma
IL	interleukin
iNOS	men tổng hợp oxyt nitric cảm ứng

I κ B α	yếu tố hạt nhân của chất nâng cao gien polypeptit ánh sáng kappa trong chất ức chế các tế bào B, alpha
KC	protein liên quan đến IL-8 ở chuột nhắt
Keap1	protein-1 liên quan đến ECH giống như Kelch
LPS	lipopolysaccarit
ME1	enzym malat 1
MPCE	các hồng cầu đa sắc vi nhân
Mrp	protein liên quan đến metG
Mrps	các protein liên quan đến khả năng kháng nhiều thuốc
NADPH	nicotinamit adenin dinucleotit phosphat, giảm bớt
NF κ B	yếu tố hạt nhân của chất nâng cao chuỗi ánh sáng kappa của các tế bào B hoạt hóa
NO	oxit nitric
NQO1	NAD(P)H quinone oxidoreductaza 1
Nrf2	yếu tố hạt nhân (dẫn xuất từ dòng hồng cầu)-giống như 2
p- I κ B α	I κ B α được photphorylat hóa
PBMC	tế bào máu đơn nhân thuộc vùng ngoại vi
PCE	các hồng cầu đa sắc
PGD	photphogluconat dehydroaza
PMN	nhiều dạng nhân
RANTES	được biểu hiện và sinh tiết bởi tế bào T bình thường và được điều chỉnh
SOD1	peoxit dismutaza 1
SRXN1	sulfiredoxin-1
TG	tổng số các glyxerit
TKT	transketolaza
TNF α	yếu tố hoại tử khối u alpha
Txn	thioredoxin

TXNRD1	thioredoxin reductaza 1
xCT	chất mang chất hòa tan họ 7, thành viên 11
Các chữ viết tắt khác:	
API	thành phần dược hoạt tính
aq.	dạng nước
b.p	điểm sôi
cryst.	kết tinh
decomp.	sự phân giải
d	(các) ngày
eq.	đương lượng
equil.	làm cân bằng
evap.	làm bay hơi
h	(các) giờ
mat.	nguyên liệu
min	(các) phút
m.p.	điểm nóng chảy
MS	các rây phân tử
part.	một phần
precip.	kết tủa
r.h.	độ ẩm tương đối
rpm	vòng/phút
r.t.	nhiệt độ phòng (~25 °C)
S/N	(tỷ lệ) tín hiệu so với độ nhiễu
solv.	dung môi
susp.	dịch huyền phù
T	nhiệt độ
T _g	nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh
theo.	theo lý thuyết
vis. obs.	quan sát bằng mắt
w	(các) tuần
wt.-%	phần trăm trọng lượng

K. Các bảng khác

Bảng 30: Danh mục các mẫu và các thí nghiệm được thực hiện

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thí nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P1	tiếp nhận ~5 g 63415, mẻ # 0141-66-1, vào ngày 25/03/2011; MW = 554,7 g/mol, C ₃₃ H ₄₄ F ₂ N ₂ O ₃	FT-Raman: PP415P1.0 PP415P1.1 PXRD: 117a TG-FTIR: a4285 ¹ H-NMR: Mar30-2011-ktr/30 DSC: d_9840 DVS: #0305_02 sau khi áp dụng DVS Raman: PP415P1_aDVS sau khi áp dụng DVS PXRD: 179a	FT-Raman: được sử dụng dưới dạng tham chiếu cho P1 PXRD: vô định hình, không có mẫu hình định kết tinh TG-FTIR: mức hao hụt là ~0,9 wt.-% (~0,1 đương lượng) EtOH với một chút H ₂ O từ 25 °C đến 200 °C, phân giải ở T > 290 °C ¹ H-NMR: phù hợp với cấu trúc, ~0,08 đương lượng EtOH DSC: lần quét thứ nhất: T _g = 152,7 °C (ΔC _p = 0,72 J/g°C); lần quét thứ hai: T _g = 149,7 °C (ΔC _p = 0,45 J/g°C) DVS: hơi hút ẩm; Δm = +0,4% (50%→độ ẩm tương đối 85%); tổng khối lượng tăng thêm là 2,1 wt.-% từ độ ẩm tương đối 0% đến độ ẩm tương đối 95% sau khi áp dụng DVS Raman và PXRD: không đổi

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P2	bảo quản nguyên liệu PP415-P1 ở 25 °C mở qua một dung dịch bão hòa của NH_4NO_3 (nghĩa là, ở độ ẩm tương đối ~62%); kiểm tra các mẫu sau 1 tuần (PP415-P2a), 2 tuần (PP415-P2b), và 4 tuần (PP415-P2c).	PXRD: 132a (-P2a) 191a (-P2b) 262a (-P2c)	PXRD: tất cả vô định hình, tương ứng với P1
PP415-P3	bảo quản nguyên liệu PP415-P1 ở 40 °C mở qua một dung dịch bão hòa của NaCl (nghĩa là, ở độ ẩm tương đối ~75%); kiểm tra các mẫu sau 1 tuần (PP415-P3a), 2 tuần (PP415-P3b), và 4 tuần (PP415-P3c).	PXRD: 133a (-P3a) 192a (-P3b) 263a (-P3c)	PXRD: tất cả vô định hình, tương ứng với P1
PP415-P4	bảo quản nguyên liệu PP415-P1 ở 60 °C trong một đồ đựng kín; kiểm tra các mẫu sau 1 tuần (PP415-P4a), 2 tuần (PP415-P4b), và 4 tuần (PP415-P4c).	PXRD: 134a (-P4a) 193a (-P4b) 264a (-P4c)	PXRD: tất cả vô định hình, tương ứng với P1
PP415-P5	bảo quản nguyên liệu PP415-P1 ở 80 °C trong một đồ đựng kín; kiểm tra các mẫu sau 1 tuần (PP415-P5a), 2 tuần (PP415-P5b), và 4 tuần (PP415-P5c).	PXRD: 135a (-P5a) 194a (-P5b) 265a (-P5c)	PXRD: tất cả vô định hình, tương ứng với P1

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P6	tạo huyền phù 97,7 mg PP415-P1 trong 0,4 mL 2PrOH; thu được dịch huyền phù màu trắng; cân bằng dịch huyền phù ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; thêm từng bước tổng 0,5 mL dung môi qua hai ngày tiếp theo; sau 15 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20-μm); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD; nguyên liệu được sấy khô trong 5 phút trong chân không (10-20 mbar); kiểm tra nguyên liệu bằng TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P6.0 PXRD: 225a TG-FTIR: a4323	Raman: tương ứng với nhóm 3 PXRD: tương ứng với nhóm 3 TG-FTIR: mức hao hụt là ~5,4 wt.-% 2PrOH từ 25 °C đến 250 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ ~170 °C đến 190 °C; phân giải bắt đầu ở T>250 °C
PP415-P7	tạo huyền phù 104,3 mg PP415-P1 trong 0,6 mL EtOAc/heptan 1:2; thu được dịch huyền phù màu trắng; cân bằng dịch huyền phù ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; thêm từng bước tổng 0,2 mL hỗn hợp dung môi qua hai ngày tiếp theo; sau 15 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20-μm); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD; nguyên liệu được sấy khô trong 5 phút trong chân không (10-20 mbar); kiểm tra nguyên liệu bằng TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P7.0 PXRD: 227a TG-FTIR: a4338	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2 TG-FTIR: mức hao hụt là ~7,5 wt.-% EtOAc và heptan trong hai bước từ ~100 °C đến 290 °C; phân giải bắt đầu ở T > 290 °C

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P8	tạo huyền phù 102,0 mg PP415-P1 trong 0,4 mL axeton/hexan 1:2; thu được dịch huyền phù màu trắng; cân bằng dịch huyền phù ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; thêm từng bước tổng 0,2 mL hỗn hợp dung môi qua hai ngày tiếp theo; sau 15 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20-µm); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD.	FT-Raman: PP415P8.0 PXRD: 228a	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2
PP415-P9	tạo huyền phù 102.6 mg PP415-P1 trong 0,4 mL toluen/dietyl ete 1:3; thu được dịch huyền phù màu trắng; cân bằng dịch huyền phù ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; thêm từng bước tổng 0,2 mL hỗn hợp dung môi qua hai ngày tiếp theo; sau 15 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20-µm); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman.	FT-Raman: PP415P9.0	Raman: tương ứng với nhóm 2, chứa các dấu hiệu dung môi

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P10	tạo huyền phù 102,5 mg PP415-P1 trong 0,2 mL 1:3 MeOH/TBME; thu được dung dịch trong; cân bằng dung dịch ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; sau 1 ngày, quan sát dịch huyền phù dày; thêm 0,2 mL hỗn hợp dung môi; tiếp tục làm cân bằng dịch huyền phù ở 22°C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; sau tổng 15 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20-µm); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD.	FT-Raman: PP415P10.0 PXRD: 229a	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2
PP415-P11	tạo huyền phù 97,1 mg PP415-P1 trong 0,4 mL MEK/cyclohexan 1:2; thu được dịch huyền phù màu trắng; cân bằng dịch huyền phù ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; sau 15 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20-µm); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman.	FT-Raman: PP415P11.0	Raman: tương ứng với nhóm 2, chứa các dấu hiệu dung môi

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P12	tạo huyền phù 98,6 mg PP415-P1 trong 0,2 mL EtOH/H ₂ O 9:1; thu được dịch huyền phù màu trắng; cân bằng dịch huyền phù ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; thêm từng bước tổng 0,2 mL hỗn hợp dung môi qua hai ngày tiếp theo; sau 15 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20-μm); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD; nguyên liệu được sấy khô trong 5 phút trong chân không (10-20 mbar); kiểm tra nguyên liệu bằng TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P12.0 PXRD: 230a TG-FTIR: a4324	Raman: tương ứng với nhóm 3 PXRD: tương ứng với nhóm 3 TG-FTIR: mức hao hụt là ~4,9 wt.-% EtOH (với một chút nước) từ 25 °C đến 250 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ ~160 °C đến 190 °C; phân giải bắt đầu ở T>250 °C
PP415-P13	tạo huyền phù 95,9 mg PP415-P1 trong 0,2 mL 7,3 MeCN/H ₂ O; thu được hai pha tách biệt, rõ ràng; cân bằng dung dịch ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; sau 1 ngày, quan sát dịch huyền phù dày; thêm 0,2 mL hỗn hợp dung môi; tiếp tục làm cân bằng dịch huyền phù ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; sau tổng 15 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20-μm); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD; nguyên liệu được sấy khô trong 5 phút trong chân không (10-20 mbar); kiểm tra nguyên liệu bằng TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P13.0 PXRD: 231a TG-FTIR: a4321	Raman: tương ứng với nhóm 4, chứa các dấu hiệu dung môi PXRD: tương ứng với nhóm 4 TG-FTIR: mức hao hụt là ~3,4 wt.-% MeCN (với một chút nước) từ 25 °C đến 270 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ ~180 °C đến 210 °C; phân giải bắt đầu ở T>270 °C

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P14	tạo huyền phù 95,8 mg PP415-P1 trong 0,2 mL THF/H ₂ O 9:1; thu được hai pha tách biệt, rõ ràng; cân bằng dung dịch ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; sau 1 ngày, quan sát một pha rõ ràng; thêm 0,2 mL H ₂ O; quan sát chất kết tủa màu trắng; cân bằng dịch huyền phù ở 22 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; sau tổng 15 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20-μm); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD; nguyên liệu được sấy khô trong 5 phút trong chân không (10-20 mbar); kiểm tra nguyên liệu bằng TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P14.0 PXRD: 232a TG-FTIR: a4322	Raman: tương ứng với nhóm 5, chứa các dấu hiệu dung môi PXRD: tương ứng với nhóm 5 TG-FTIR: mức hao hụt là ~36,1 wt.-% THF và H ₂ O từ 25 °C đến 200 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ ~100 °C đến 130 °C; phân giải bắt đầu ở T > 300 °C
PP415-P15	hòa tan 100,6 mg PP415-P1 trong 0,2 mL DCM/IPE 1:2; thu được dung dịch trong; quan sát kết tủa của chất rắn trắng trong < 1 phút; thêm 0,2 mL hỗn hợp dung môi; phủ lọ bằng giấy lụa đơn lớp và để dung môi bay hơi dưới các điều kiện xung quanh; thu được nguyên liệu rắn màu trắng, ẩm sau một vài giờ; kiểm tra chất rắn bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD.	FT-Raman: PP415P15.0 PXRD: 137a	Raman: tương ứng với nhóm 2, chứa các dấu hiệu dung môi PXRD: tương ứng với nhóm 2
PP415-P16	hòa tan 100,3 mg PP415-P1 trong 0,2 mL MeOH/toluene 1:2; thu được dung dịch trong; phủ lọ bằng giấy lụa đơn lớp và để dung môi bay hơi dưới các điều kiện xung quanh; thu được nguyên liệu dạng thủy tinh sau một vài ngày; kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman.	FT-Raman: PP415P16.0	FT-Raman: tương ứng với nhóm 1, chứa toluen dung môi các đỉnh

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P17	hòa tan 101,0 mg PP415-P1 trong 0,3 mL 1:3 EtOAc/heptan; thu được dung dịch trong; quan sát kết tủa của chất rắn trắng trong < 1 phút; thêm 0,2 mL hỗn hợp dung môi; phủ lọ bằng giấy lụa đơn lớp và để dung môi bay hơi dưới các điều kiện xung quanh; thu được nguyên liệu rắn màu trắng, ẩm sau một vài giờ; kiểm tra chất rắn bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD.	FT-Raman: PP415P17.0 PXRD: 138a	Raman: tương ứng với nhóm 2, chứa các dấu hiệu dung môi PXRD: tương ứng với nhóm 2
PP415-P18	sấy khô nguyên liệu PP415-P15 trong chân không (2-20 mbar) ở nhiệt độ phòng trong ~2 giờ; kiểm tra chất rắn trắng, khô bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD, và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P18.0 PXRD: 149a TG-FTIR: a4301	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2 TG-FTIR: mức hao hụt là ~7,0 wt.-% IPE trong hai bước từ ~140 °C đến ~250 °C; phân giải ở T > 250 °C
PP415-P19	sấy khô nguyên liệu PP415-P17 trong chân không (2-20 mbar) ở nhiệt độ phòng trong ~2 giờ; kiểm tra chất rắn trắng, khô bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD, và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P19.0 PXRD: 150a TG-FTIR: a4302	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2 TG-FTIR: mức hao hụt là ~7,6 wt.-% heptan trong hai bước từ ~140 °C đến ~270 °C; phân giải ở T > 270 °C

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P20	tạo huyền phù 98.8 mg PP415-P1 trong 2,0 mL H ₂ O; gia nhiệt dịch huyền phù đến 50 °C; cho thêm dần và từng bước 4,0 mL axeton; thu được dung dịch trong; gia nhiệt dung dịch đến 55 °C và giữ ở 55 °C trong 30 phút; làm nguội dần 4 giờ 10 phút đến 5 °C (ở ~0.2 K/phút); thu hồi chất rắn bằng lọc trong chân không (kích cỡ lỗ P4); kiểm tra chất rắn bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD.	FT-Raman: PP415P20.0 PXRD: 226a	Raman: tương ứng với nhóm 3, chứa các dấu hiệu dung môi PXRD: tương ứng với nhóm 3
PP415-P21	tạo huyền phù 100,9 mg PP415-P1 trong 2,0 mL xyclohexan; gia nhiệt dịch huyền phù đến 70 °C; cho thêm dần dần và từng bước 0,5 mL xyclohexan và 0,5 mL EtOH; dịch huyền phù mỏng trở nên dày hơn do có thêm kết tủa qua quá trình thêm dung môi; gia nhiệt dịch huyền phù đến 75 °C và giữ ở 75 °C trong 30 phút; làm nguội dần 5 giờ đến 5 °C (ở ~0,23 K/phút); thu hồi chất rắn bằng lọc trong chân không (kích cỡ lỗ P4); kiểm tra chất rắn bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD; nguyên liệu được sấy khô trong 5 phút trong chân không (10-20 mbar); kiểm tra nguyên liệu bằng TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P21.0 PXRD: 218a TG-FTIR: a4326	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2 TG-FTIR: mức hao hụt là ~5,8 wt.-% xyclohexan trong hai bước từ ~140 °C đến ~250 °C; phân giải ở T > 250 °C

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P22	tạo huyền phù 151,1 mg PP415-P1 trong 1,5 mL toluen; gia nhiệt dịch huyền phù đến 70 °C; thu được dung dịch trong; thêm 0,5 mL MeCN; gia nhiệt dung dịch đến 75 °C và giữ ở 75 °C trong 30 phút; làm nguội dần 5 giờ đến 5 °C (ở ~ 0,23 K/phút); quan sát dung dịch trong và không có kết tủa; khuấy dung dịch trong ở 5 °C trong 2 ngày; không quan sát thấy kết tủa; dung môi bay hơi dưới dòng khí N ₂ ở nhiệt độ phòng; thu được chất dạng thủy tinh; kiểm tra nó bằng quang phổ học FT-Raman.	FT-Raman: PP415P22.0	Raman: tương ứng với nhóm 1, chứa các dấu hiệu dung môi
PP415-P23	tạo huyền phù 150.6 mg PP415-P1 trong 1,5 mL đioxan; gia nhiệt dịch huyền phù đến 70 °C; thu được dung dịch trong; thêm 0,5 mL EtOAc; gia nhiệt dung dịch đến 75 °C và giữ ở 75 °C trong 30 phút; làm nguội dần 5 giờ đến 5 °C (ở ~ 0,23 K/phút); quan sát dung dịch trong và không có kết tủa; khuấy dung dịch trong ở 5 °C trong 2 ngày; không quan sát thấy kết tủa; dung môi bay hơi dưới dòng khí N ₂ ở nhiệt độ phòng; thu được chất dạng thủy tinh; kiểm tra nó bằng quang phổ học FT-Raman.	FT-Raman: PP415P23.0	Raman: tương ứng với nhóm 1, chứa các dấu hiệu dung môi

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P24	tạo huyền phù 99,4 mg PP415-P1 trong 0,3 mL 1BuOH; gia nhiệt dịch huyền phù đến 70 °C; thu được dung dịch trong; quan sát ngay sau đó kết tủa của chất rắn trắng thêm 0,5 mL 1BuOH; vẩn dịch huyền phù; gia nhiệt dịch huyền phù đến 75 °C và giữ ở 75°C trong 30 phút; làm nguội dần 5 giờ đến 5 °C (ở ~0,23 K/phút); thu hồi chất rắn bằng lọc trong chân không (kích cỡ lỗ P4); kiểm tra chất rắn bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD; nguyên liệu được sấy khô trong 5 phút trong chân không (10-20 mbar); kiểm tra nguyên liệu bằng TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P24.0 PXRD: 219a TG-FTIR: a4325	Raman: tương ứng với nhóm 2, chứa các dấu hiệu dung môi PXRD: tương ứng với nhóm 2 TG-FTIR: mức hao hụt là ~16.6 wt.-% 1BuOH trong một bước từ ~50 °C đến ~160 °C, hao hụt thêm là 1BuOH (6.6 wt.-%) trong bước thứ hai từ 160 °C đến 230 °C; phân giải ở T > 230 °C
PP415-P25	sấy khô nguyên liệu PP415-P25 trong chân không: ở 60 °C và ~5 mbar trong ~1 giờ; ở nhiệt độ phòng và ~3 mbar trong 4,5 ngày; ở 60°C và ~10 mbar trong 1 giờ; ở 40-50 °C và 5-20 mbar trong ~20 h, kiểm tra chất rắn bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD, và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P25.0 PXRD: 258a TG-FTIR: a4337	Raman: tương ứng với nhóm 3 PXRD: tương ứng với nhóm 3 TG-FTIR: mức hao hụt là ~5,4 wt.-% 2PrOH từ 50 °C đến 250 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ 170 °C đến 190 °C, một sự hao hụt khác là ~1,0 wt.-% 2PrOH từ 290 °C đến 320 °C; phân giải ở T > 320 °C

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P26	sấy khô nguyên liệu PP415-P13 trong chân không: ở 60 °C và ~5 mbar trong ~1 giờ; ở nhiệt độ phòng và ~3 mbar trong 4,5 ngày; ở 60 °C và ~10 mbar trong 1 giờ; ở 40-50 °C và 5-20 mbar trong ~20 giờ, kiểm tra chất rắn bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD, và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P26.0 PXRD: 259a TG-FTIR: a4335	Raman: tương ứng với nhóm 4 PXRD: tương ứng với nhóm 4 TG-FTIR: mức hao hụt là ~2,8 wt.-% MeCN từ 170 °C đến 250 °C; phân giải ở T > 300 °C
PP415-P27	sấy khô nguyên liệu PP415-P14 trong chân không: ở 60 °C và ~5 mbar trong ~1 giờ; ở nhiệt độ phòng và ~3 mbar trong 4,5 ngày; ở 60 °C và ~10 mbar trong 1 giờ; ở 40-50 °C và 5-20 mbar trong ~20 giờ, kiểm tra chất rắn bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD, và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P27.0 PXRD: 260a TG-FTIR: a4336	Raman: dường như tương ứng với một hỗn hợp của nhóm 1 và nhóm 5 PXRD: mẫu chỉ kết tinh một phần; ít đỉnh rộng tương ứng với nhóm 5; do đó tương ứng với một hỗn hợp của nhóm 1 và nhóm 5 vô định hình TG-FTIR: mức hao hụt là ~0,3 wt.-% từ 25 °C đến 290 °C; phân giải ở T > 290 °C
PP415-P28	sấy khô nguyên liệu PP415-P21 trong chân không: ở 60 °C và ~5 mbar trong ~1 giờ; ở nhiệt độ phòng và ~3 mbar trong 4,5 ngày; ở 60 °C và ~10 mbar trong 1 giờ; ở 40-50 °C và 5-20 mbar trong ~20 giờ, kiểm tra chất rắn bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD, và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P28.0 PXRD: 261a TG-FTIR: a4334	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2, mẫu ít kết tinh hơn, như được biểu thị bởi rộng hơn các đỉnh TG-FTIR: mức hao hụt là ~3,0 wt.-% xyclohexan trong hai bước từ ~140 °C đến ~250 °C; phân giải ở T > 250 °C

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P29	tạo huyền phù 132,2 mg PP415-P1 trong 0,8 mL 1:2 EtOAc/TEA; quan sát sự thay đổi về diện mạo của pha rắn; khuấy trộn và nghiên cứu bằng sóng âm; cân bằng dịch huyền phù ở 24 °C, lắc ở 500 vòng/phút; sau 4 d, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20-µm); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD; sấy khô nguyên liệu được trong 5 phút trong chân không (10-20 mbar); kiểm tra nguyên liệu bằng TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P29,0 PXRD: 282a TG-FTIR: a4346	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2 TG-FTIR: mức hao hụt là ~5,1 wt.-% EtOAc và TEA từ ~50 °C đến ~220 °C, mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ 180 °C đến 210 °C; phân giải ở T > 220 °C
PP415-P30	sấy khô nguyên liệu PP415-P7 trong chân không ở 50-70 °C và 1-10 mbar trong 3 ngày; kiểm tra chất rắn bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD, và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P30,0 PXRD: 290a TG-FTIR: a4347	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2 TG-FTIR: mức hao hụt là ~2,1 wt.-% heptan (và một ít EtOAc) trong hai bước từ ~50 °C đến ~250 °C; phân giải ở T > 250 °C
PP415-P31	tạo huyền phù 137,6 mg PP415-P1 trong 2 mL H ₂ O/PEG 400 9:1; thu được dịch huyền phù màu trắng; cân bằng dịch huyền phù ở 24 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; sau 5 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng cách lọc trong chân không; rửa chất rắn ba lần bằng lượng nhỏ H ₂ O; kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman và PXRD.	FT-Raman: PP415P31.0 PXRD: 320a	Raman: tương ứng với nhóm 1 PXRD: vô định hình, tương ứng với nhóm 1

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P32	sấy khô nguyên liệu PP415-P19 trong chân không ở 80 °C và <1×10 ⁻³ mbar; sau 1 ngày, kiểm tra nguyên liệu bằng TG-FTIR (a4362); tiếp tục sấy khô; sau tổng 3 ngày, kiểm tra nguyên liệu bằng TG-FTIR (a4365), quang phổ học FT-Raman, và PXRD dưới dạng P32A.	FT-Raman: PP415P32,0 PXRD: 331a (P32A) TG-FTIR: a4362(P32) a4365 (P32A)	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2, ít kết tinh hơn TG-FTIR P32: mức hao hụt là 2,8 wt.-% heptan (25-250 °C), mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ 170 °C đến 200 °C; phân giải ở T > 250 °C TG-FTIR P32A: mức hao hụt là 2,2 wt.-% heptan (25-250 °C), mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ 170 °C đến 200 °C; phân giải ở T > 250 °C
PP415-P33	sấy khô nguyên liệu PP415-P19 trong chân không ở 80 °C và <1×10 ⁻³ mbar; sau 3 ngày, kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P33.0 PXRD: 332a TG-FTIR: a4366	Raman: tương ứng với nhóm 3 PXRD: tương ứng với nhóm 3 TG-FTIR: mức hao hụt là ~4,2 wt.-% 2PrOH (50-210 °C), mà phần lớn trong số đó ở một bước là từ 160 °C đến 190 °C, một sự hao hụt khác là ~0,5 wt.-% 2PrOH (210 °C đến 290 °C); phân giải ở T > 290 °C

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P34	sấy khô nguyên liệu PP415-P19 trong chân không ở 80 °C và $<1 \times 10^{-3}$ mbar; sau 3 ngày, kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P34,0 PXRD: 333a TG-FTIR: a4367	Raman: tương ứng với nhóm 2 PXRD: tương ứng với nhóm 2, ít kết tinh hơn TG-FTIR: mức hao hụt là ~2,3 wt.-% xyclohexan trong hai bước từ 25 °C đến 270 °C; phân giải ở $T > 270$ °C
PP415-P35	tạo huyền phù 158,4 mg PP415-P1 trong 0,2 mL MeCN/H ₂ O, thu được hai pha tách biệt, rõ ràng; cân bằng dung dịch ở 24 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; sau 3 ngày, quan sát dịch huyền phù dày; thêm 0,1 mL hỗn hợp dung môi; tiếp tục làm cân bằng dịch huyền phù ở 24 °C, lắc với tốc độ 400 vòng/phút; sau tổng 5 ngày, thu hồi nguyên liệu rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,20- μ m); kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman; nguyên liệu được sấy khô trong 10 phút trong chân không (10-20 mbar); kiểm tra nguyên liệu bằng PXRD và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P35,0 PXRD: 326a TG-FTIR: a4363	Raman: tương ứng với nhóm 4, chứa các dấu hiệu dung môi PXRD: tương ứng với nhóm 4 TG-FTIR: mức hao hụt là 2,9 wt.-% MeCN từ 25 °C đến 250 °C; phân giải ở $T > 250$ °C
PP415-P36	sấy khô nguyên liệu PP415-P35 trong chân không ở 80 °C và $<1 \times 10^{-3}$ mbar; sau 3 ngày, kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD và TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P36,0 PXRD: 339a TG-FTIR: a4369	Raman: tương ứng với nhóm 4 PXRD: tương ứng với nhóm 4 TG-FTIR: mức hao hụt là ~0,6 wt.-% (có thể là H ₂ O và/hoặc MeCN) trong hai bước từ 25 °C đến 280 °C; phân giải ở $T > 280$ °C

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P37	sấy khô nguyên liệu PP415-P35 dưới dòng khí N ₂ ở 80 °C; sau 3 ngày, kiểm tra nguyên liệu bằng quang phổ học FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, DSC, và DVS.	FT-Raman: PP415P37.0 PXRD: 340a TG-FTIR: a4370 DSC: d_9907 DVS: dvs1176 sau DVS PXRD: 363a	Raman: tương ứng với nhóm 4 PXRD: tương ứng với nhóm 4 TG-FTIR: mức hao hụt là ~0,9 wt.-% (có thể là H ₂ O và/hoặc MeCN) trong hai bước từ 25 °C đến 280 °C; phân giải ở T > 280 °C DSC: đỉnh thu nhiệt nhọn ở T = 196,1 °C ($\Delta H = 29,31 \text{ J/g}$); không có sự phân giải nào lên đến 270 °C DVS: hơi hút ẩm; $\Delta m = +0,7\%$ (50% → độ ẩm tương đối 85%); tổng khối lượng tăng thêm là 2,1 wt.-% từ độ ẩm tương đối 0% đến độ ẩm tương đối 95% sau DVS PXRD: tương ứng với nhóm 4
PP415-P38	Thí nghiệm DSC: kết hợp 1,275 mg PP415-P1 và 1,344 mg PP415-P36; cân bằng trong 3 phút dưới khí N ₂ ; gia nhiệt mẫu từ -50 °C đến 270 °C ở 10 K/phút.	DSC: d_9917	DSC

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P39	Thí nghiệm DSC: kết hợp 2,17 mg PP415-P1 và 2,20 mg PP415-P36; trộn các chất rắn sử dụng que trộn; cân bằng trong 3 phút dưới N ₂ ; gia nhiệt mẫu từ -50 °C đến 173 °C ở 10K/phút; giữ ở 173 °C trong 30 phút; gia nhiệt từ 173 °C đến 270 °C ở 10 K/phút.	DSC: d_9923	DSC
PP415-P40	tiếp nhận ~5 g 63415, mẻ #: 2083-69-DC vào ngày 27/05/2011; MW = 554,7 g/mol, C ₃₃ H ₄₄ F ₂ N ₂ O ₃	PXRD: 390a	PXRD: tương ứng với nhóm 2
PP415-P41	tạo huyền phù 101,3 mg PP415-P40 trong 0,20 mL THF/H ₂ O (1:1); thu được dịch huyền phù màu trắng; cân bằng dịch huyền phù ở 24 °C; sau 3 ngày, thu hồi chất rắn bằng máy ly tâm lọc (màng PTFE 0,2-µm); sấy khô nguyên liệu rắn trong chân không trong 5 phút; kiểm tra chất rắn bằng PXRD.	PXRD: 400a	PXRD: tương ứng với nhóm 5
PP415-P42	hòa tan 104,6 mg PP415-P40 trong 0,20 mL THF; thu được dung dịch trong; dung môi bay hơi dưới dòng khí N ₂ qua đêm; thu được chất rắn trắng; kiểm tra chất rắn bằng PXRD.	PXRD: 405a	PXRD: vô định hình (nhóm 1)
PP415-P43	hòa tan 101,8 mg PP415-P40 trong 0,20 mL THF/hexan (8:2); thu được dung dịch trong; dung môi bay hơi dưới dòng khí N ₂ qua đêm; thu được chất rắn trắng; kiểm tra chất rắn bằng PXRD.	PXRD: 429a	PXRD: tương ứng với nhóm 2

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P44	sấy khô nguyên liệu PP415-P41 trong chân không (~100 mbar) ở 80 °C; kiểm tra chất rắn sau 1 ngày bằng PXRD (474a); tiếp tục sấy khô qua đêm; kiểm tra lại chất rắn bằng PXRD (482a) và TG-FTIR.	PXRD: 474a, 482a TG-FTIR: a4401	PXRD: cả hai chủ yếu là vô định hình (nhóm 1), một số đỉnh rộng với cường độ thấp TG-FTIR: ~0,9 wt.-% THF 25-280 °C, phân giải ở T > 300 °C
PP415-P45	tạo huyền phù 3,03 g PP415-P40 trong 6,0 mL THF/H ₂ O (1:1); thu được dịch huyền phù màu trắng; cân bằng dịch huyền phù ở nhiệt độ phòng; sau 1 ngày, thu hồi phân ước nhỏ bằng máy ly tâm lọc và kiểm tra nó bằng PXRD; thu hồi chất rắn của toàn bộ mẫu bằng cách lọc trong chân không; sấy khô mẫu trong 10 phút trong chân không (~10 mbar).	PXRD: 471a	PXRD: tương ứng với nhóm 5
PP415-P46	sấy khô nguyên liệu PP415-P45 trong chân không (~100 mbar) ở 80 °C; kiểm tra chất rắn sau khi sấy khô qua đêm bằng PXRD (481a); tiếp tục sấy khô; sau 4 ngày, kiểm tra chất rắn là PP415-P46a bằng PXRD (496a) và TG-FTIR.	PXRD: 481a, 496a TG-FTIR: a4410	PXRD: cả hai chủ yếu là vô định hình (nhóm 1), một số đỉnh rộng với cường độ thấp TG-FTIR: ~0,4 wt.-% H ₂ O 25-250 °C, phân giải ở T > 250 °C
PP415-P47	hòa tan 101,8 mg PP415-P40 trong 0,4 mL EtOAc; thu được dung dịch trong; dung môi bay hơi dưới dòng khí N ₂ qua đêm; thu được chất rắn trắng; kiểm tra chất rắn bằng PXRD và TG-FTIR.	PXRD: 492a TG-FTIR: a4412	PXRD: tương ứng với nhóm 2 TG-FTIR: ~6,2 wt.-% EtOAc 25-170 °C, 1,7 wt.-% EtOAc 170-240 °C, phân giải ở T > 240 °C

Mẫu	Mô tả thí nghiệm	Các phương pháp thử nghiệm	Kết quả/nhận xét
PP415-P48	hòa tan 101,1 mg PP415-P40 trong 0,4 mL etyl fomat; thu được dung dịch trong; dung môi bay hơi dưới dòng khí N ₂ qua đêm; thu được chất rắn trắng; kiểm tra chất rắn bằng PXRD và TG-FTIR.	PXRD: 493a TG-FTIR: a4413	PXRD: tương ứng với nhóm 2 TG-FTIR: ~3,5 wt.-% etyl fomat 25-200 °C, phân giải ở T > 200 °C
PP415-P49	hòa tan 205,3 mg PP415-P40 trong 0,3 mL axeton; thu được dung dịch trong; thêm bằng cách nhỏ giọt vào 30,0 mL H ₂ O (làm mát trước đến 5 °C); thu được dịch huyền phù màu trắng, mỏng; khuấy dịch huyền phù mỏng ở 5 °C qua đêm; thu được dịch huyền phù màu trắng, dày hơn; thu hồi chất rắn bằng lọc trong chân không (kích cỡ lỗ P4); thu được 188,3 mg chất rắn trắng; kiểm tra chất rắn bằng PXRD.	PXRD: 593a	PXRD: vô định hình (nhóm 1)

Bảng 31. Các thông số ở FIG.51

Hợp chất	Các mức NOx (% so với các đối chứng LPS)		
	13 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
RTA 405 *	44%	26%	18%
63415	30%	18%	16%

Bảng 32. 63415: ADMET in vivo sơ bộ – Các phân tích ADMET sơ bộ chính và các điểm đầu nút

Phân tích	Các điểm đầu nút chính	
độc tính ở chuột nhắt trong 14 ngày	Khả năng chịu đựng, trọng lượng cơ thể, hóa học lâm sàng Sự phân phối mô	
độc tính ở chuột cống trong 14 ngày	Gien đích Nrf2 biểu hiện mRNA và enzym hoạt hóa ở gan Khả năng chịu đựng, trọng lượng cơ thể, hóa học lâm sàng, & mô bệnh học hạn chế Sự phân phối mô và huyết tương TK Gien đích Nrf2 biểu hiện mRNA và enzym hoạt hóa ở gan	
độc tính ở khỉ trong 14 ngày	Khả năng chịu đựng, trọng lượng cơ thể, hóa học lâm sàng, và mô bệnh học hạn chế Sự phân phối mô và huyết tương TK Gien đích Nrf2 biểu hiện mRNA và enzym hoạt hóa trong nhiều mô và PBMC	

Bảng 33. Các thông số ở FIG.54

	Chất dẫn thuốc	63415		
Liều lượng (mg/kg)	0	10	30	100
ALT (U/L)	100	39	63	91
AST (U/L)	156	98	147	167
ALP (U/L)	120	131	110	98
Tot Bil (mg/dL)	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
BUN (mg/dL)	17	15	15	15
Cr (mg/dL)	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Glu (mg/dL)	288	307	285	273

Bảng 34. 63415 âm tính đối với độc tính ở cấp độ gen trong nghiên cứu nhân nhỏ in vivo

Điều trị (n=5/nhóm)	PCE/Tổng số hồng cầu (Trung bình +/- SD)	Thay đổi từ đối chứng (%)	Số lượng MPCE/1000 PCE (Trung bình +/- SD)	Số lượng MPCE/PCE được ghi điểm
điểm thời gian 24 giờ				
Dầu vừng	0,588 ± 0,04	-	0,2 ± 0,27	2/10000
125 mg/kg	0,543 ± 0,03	-8	0,3 ± 0,27	3/10000
250 mg/kg	0,520 ± 0,06	-12	0,3 ± 0,27	3/10000
500 mg/kg	0,426 ± 0,07	-28	0,0 ± 0,00	0/10000
1000 mg/kg	0,498 ± 0,05	-15	0,2 ± 0,27	2/10000
1500 mg/kg	0,499 ± 0,06	-15	0,4 ± 0,22	4/10000
2000 mg/kg	0,531 ± 0,05	-10	0,2 ± 0,27	2/10000
điểm thời gian 48 giờ				
Dầu vừng	0,526 ± 0,05	-	0,3 ± 0,27	3/10000
125 mg/kg	0,453 ± 0,03	-14	0,2 ± 0,27	2/10000
250 mg/kg	0,391 ± 0,02	-26	0,2 ± 0,27	2/10000
500 mg/kg	0,339 ± 0,05	-36	0,3 ± 0,45	3/10000
1000	0,344 ± 0,04	-35	0,1 ± 0,22	1/10000

{00189930}

mg/kg					
1500 mg/kg	0,376 ± 0,05	-39	0,4 ± 0,42	4/10000	
2000 mg/kg	0,360 ± 0,03	-32	0,1 ± 0,22	1/10000	

Bảng 35. Các thông số ở FIG.35

Điều trị	Ngày	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Tot Bil (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Cr (mg/dL)	Tot Prot (g/dL)	Albumin (g/dL)	Glucosa (mg/dL)	Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
Chất dẫn thuốc	BL	30	29	320	0,15	23	0,63	7,2	4,1	87	124	52
	Ngày 14	37	37	345	0,23	18	0,63	6,9	4,1	63	130	64
10 mg/kg	BL	46	32	351	0,18	35	0,78	7,4	4	74	146	51
	Ngày 14	46	38	382	0,23	27	0,68	7,2	4	39	144	82
30 mg/kg	BL	32	32	409	0,18	23	0,7	7,3	4,2	85	125	47
	Ngày 14	47	43	416	0,2	20	0,58	7,2	4	53	122	64
100 mg/kg	BL	32	35	381	0,15	24	0,7	6,9	4	96	137	37
	Ngày 14	43	37	390	0,18	24	0,55	6	3,2	32	93	61

Bảng 36. Hoạt tính in vitro của 63415 và 63355

	63415	63355
NO IC ₅₀ (nM), RAW264.7	4,0 ±1	0,63 ± 0,06
WST-1 IC ₅₀ (nM), RAW264.7	125	150
NQO1-ARE (tăng lần gấp ở 62,5 nM trong HuH7)	5,3 ± 1,0	6,5 ± 0,9

Bảng 37. Các thông số ở FIG.52

Hợp chất	Huyết tương	Toàn bộ máu	Não	Gan	Phổi	Thận
RTA 405 (nM)	130	1165	93	1143	1631	2357
63415 (nM)	51	679	1081	985	533	1604

Bảng 38. Các thông số ở FIG.53

Hợp chất	Gan	Phổi	Thận
RTA 405	1,93	1,48	8,25
63415	10,9	1,75	10,9

Tất cả các hợp chất, các chất đa hình, các chế phẩm, và các phương pháp được bộc lộ và được yêu cầu bảo hộ ở đây có thể thực hiện và thực hành mà không có thí nghiệm không chính đáng theo sáng chế này. Trong khi các hợp chất, các chất đa hình, các chế phẩm, và các phương pháp theo sáng chế này đã được mô tả thông qua các phương án ưu tiên, điều sẽ rõ ràng với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật là các biến đổi có thể áp dụng cho các hợp chất, các chất đa hình, các chế phẩm, và các phương pháp, cũng như theo các bước hoặc trình tự các bước của phương pháp được mô tả ở đây mà không nằm ngoài khái niệm, tinh thần, và phạm vi của sáng chế. Cụ thể hơn, sẽ rõ ràng là các tác nhân nhất định liên quan đến cả hóa học và sinh lý có thể được thay thế cho các tác nhân được mô tả ở đây trong khi có thể đạt được các kết quả giống hoặc tương tự. Tất cả những thay thế và cải biến tương tự rõ ràng các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này được coi là nằm trong tinh thần, phạm vi và khái niệm của sáng chế như được xác định bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Các tài liệu tham chiếu

Các tham chiếu dưới đây với mức độ cung cấp các chi tiết thủ tục mang tính minh họa hoặc các chi tiết khác bổ sung cho nội dung được trình bày trong tài liệu này được đưa một cách cụ thể vào đây để tham chiếu.

U.S. Patent 6,326,507

U.S. Patent 6,974,801

U.S. Patent 7,915,402

U.S. Patent 7,943,778

U.S. Patent 8,124,799

U.S. Patent 8,129,429

U.S. Patent Publication 2009/0060873

Abraham và Kappas, *Free Radical Biol. Med.*, 39:1-25, 2005.

Aghajan và đồng tác giả, *J Gastroenterol Hepatol.*, Suppl 2:10-14, 2012.

Ahmad và đồng tác giả, *Cancer Res.*, 68:2920-2926, 2008.

Ahmad và đồng tác giả, *J. Biol. Chem.*, 281:35764-9, 2006.

Angulo và đồng tác giả, *Eur. J. Immunol.*, 30:1263-1271, 2000.

Araujo và đồng tác giả, *J. Immunol.*, 171(3):1572-1580, 2003.

Arend và Dayer, *Arthritis Rheum.*, 38:151-160, 1995.

Bach, *Hum. Immunol.*, 67(6):430-432, 2006.

Bagasra và đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:12041-12045, 1995.

Blake và đồng tác giả *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42:524-36, 2010.

Berridge và đồng tác giả, *Biochemica*, 4: 14-19, 1996.

Botoman và đồng tác giả, *Am. Fam. Physician*, 57(1):57-68, 1998.

Brandt và đồng tác giả, *Arthritis Rheum.*, 43:1346-1352, 2000.

Brewerton và đồng tác giả, *Lancet.*, 1:904-907, 1973a.

Brewerton và đồng tác giả, *Lancet.*, 1:956-957, 1973b.

Bronte và đồng tác giả, *Trends Immunol.*, 24:302-306, 2003.

Brown và DuBois *J. Clin. Oncol.*, 23:2840-2855, 2005.

Brynskov và đồng tác giả, *N. Engl. J. Med.*, 321(13):845-850, 1989.

Cantin và đồng tác giả, *J Clin Invest*, 79:1665-73, 1987.

Cai và đồng tác giả, *Nat. Med.*, 11(2):183-190, 2005.

- Calin và Taurog, In: The Spondylarthritides, Calin và đồng tác giả (Eds.), Oxford, UK. Oxford University Press, 179, 1998.
- Car và đồng tác giả, Am J Respir Crit Care Med, 149:655-9, 1994.
- Cernuda-Morollon và đồng tác giả, J Biol Chem, 276:35530-6, 2001.
- Chan và Kan, Proc Natl Acad Sci U S A, 96:12731-6, 1999.
- Chauhan và Chauhan, Pathophysiology, 13(3):171-181, 2006.
- Chen và Kunsch, Curr Pharm Des, 10:879-91, 2004.
- Cho và đồng tác giả, Am J Respir Cell Mol Biol, 26:175-82, 2002.
- Crowell và đồng tác giả, Mol. Cancer Ther., 2:815-823, 2003.
- Cuzzocrea và đồng tác giả, Mol Pharmacol, 61:997-1007, 2002.
- Dickerson và đồng tác giả, Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry, March 6, 2007.
- Dinareello, Int. Rev. Immunol., 16:457-499, 1998.
- Dinkova-Kostova và đồng tác giả, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(12):4584-4589, 2005.
- Dionne và đồng tác giả, Clin. Exp. Immunol., 112(3):435-442, 1998.
- Douglas và đồng tác giả, Am J Respir Crit Care Med, 158:220-5, 1998.
- Dudhgaonkar và đồng tác giả, Eur. J. Pain, 10(7):573-9, 2006.
- Eastgate và đồng tác giả, Lancet, 2(8613):706-9, 1988.
- Eikelenboom và đồng tác giả, Glia, 40(2):232-239, 2002.
- Ettehadhi và đồng tác giả, Clin. Exp. Immunol., 96(1):146-151, 1994.
- Fischer và đồng tác giả, Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 6:413-21, 2011.
- Forstermann, Biol. Chem., 387:1521, 2006.
- Funakoshi và đồng tác giả, Digestion, 59(1):73-78, 1998.
- Gebel và đồng tác giả, Toxicol Sci, 115:238-52, 2010.
- Gehrmann và đồng tác giả, Glia, 15(2):141-151, 1995.
- Genain và Nauser, J. Mol. Med., 75:187-197, 1997.
- Goodman và đồng tác giả, Kidney Int., 72(8):945-953, 2007.
- Graeber và đồng tác giả, Glia, 40(2):252-259, 2002.
- Greten và đồng tác giả, Cell, 118:285-296, 2004.
- Grivennikov và Karin, Cytokine Growth Factor Rev., 21(1):11-19, 2010.

- Guilherme và đồng tác giả, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(5):367-77, 2008.
- Gwee và đồng tác giả, *Gut.*, 44(3):400-406., 1999.
- Hallgren và đồng tác giả, *Am Rev Respir Dis*, 139:373-7, 1989.
- Hahn và Tsao, In: *Dubois' Lupus Erythematosus*, 4th Ed, Wallace and Hahn (Eds.), Lea và Febiger, Philadelphia, 195-201, 1993.
- Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use*, Stahl and Wermuth Eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002.
- Hanson và đồng tác giả, *BMC Medical Genetics*, 6(7), 2005.
- Hansson và đồng tác giả, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1:297–329, 2006.
- Hayden và Ghosh, *Cell*, 132:344-62, 2008.
- He và Karin, *Cell Res.*, 21(1):159-168, 2011.
- Honda và đồng tác giả *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12:1027–1030, 2002.
- Honda và đồng tác giả, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16(24):6306-6309, 2006.
- Honda và đồng tác giả, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7:1623-1628, 1997.
- Honda và đồng tác giả, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8(19):2711-2714, 1998.
- Honda và đồng tác giả, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9(24):3429-3434, 1999.
- Honda và đồng tác giả, *J. Med. Chem.*, 43:4233–4246, 2000a.
- Honda và đồng tác giả, *J. Med. Chem.*, 43:1866–1877, 2000b.
- Hotamisligil, *Nature*, 444(7121):860-7, 2006.
- Iizuka và đồng tác giả, *Genes Cells*, 10:1113-25, 2005.
- Ikezaki và đồng tác giả, *Food Chem Toxicol*, 34:327-35, 1996.
- Ishii và đồng tác giả, *J Immunol*, 175:6968-75, 2005.
- Ishikawa và đồng tác giả, *Circulation*, 104(15):1831-1836, 2001.
- Ishizawa và Dickson, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60(6):647-657, 2001.
- Jarvis, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 10(5):459-467, 1998.
- Jarvis, *Pediatr. Ann.*, 31(7):437-446, 2002.
- Jonsson và đồng tác giả, *Oral Dis.*, 8(3):130-140, 2002.
- Jonsson và đồng tác giả, *Trends Immunol.*, 22(12):653-654 , 2001.
- Kahle và đồng tác giả, *Ann. Rheum. Dis.*, 51:731–734, 1992.
- Kaltschmidt và đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2642–2647, 1997.
- Karin, *Nature*, 441(7092):431-436, 2006.

- Kawakami và đồng tác giả, *Brain Dev.*, 28(4):243-246, 2006.
- Kawamoto và đồng tác giả, *J Biol Chem*, 275:11291-9, 2000.
- Kendall-Tackett, *Trauma Violence Abuse*, 8(2):117-126, 2007.
- Kensler và đồng tác giả, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:89-116, 2007.
- Kikuchi và đồng tác giả, *Respir Res*, 11:31, 2010.
- Kim và đồng tác giả, *Mutat Res*, 690:12-23, 2010.
- King và đồng tác giả, *Am J Respir Crit Care Med*, 184:92-99, 2011.
- Kinnula và đồng tác giả, *Am J Respir Crit Care Med*, 172:417-22, 2005.
- Klingsberg và đồng tác giả, *Respirology*, 15:19-31, 2010.
- Kortylewski và đồng tác giả, *Nat. Med.*, 11:1314-1321, 2005.
- Kotzin và O'Dell, In: *Samler's Immunologic Diseases*, 5th Ed., Frank và đồng tác giả (Eds.), Little Brown & Co., Boston, 667-697, 1995.
- Kotzin, *Cell*, 85:303-306, 1996.
- Kruger và đồng tác giả, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 319(3):1144-1152, 2006.
- Kuboyama, *Kurume Med. J.*, 45(1):33-37, 1998.
- Lee và đồng tác giả, *Mol Cell*, 36:131-40, 2009.
- Lee và đồng tác giả, *Glia.*, 55(7):712-22, 2007.
- Lencz và đồng tác giả, *Mol. Psychiatry*, 12(6):572-80, 2007.
- Levonen và đồng tác giả, *Biochem J*, 378:373-82, 2004.
- Li và Kong, *Mol Carcinog*, 48:91-104, 2009.
- Liby và đồng tác giả, *Cancer Res.*, 65(11):4789-4798, 2005.
- Liby và đồng tác giả, *Mol. Cancer Ther.*, 6(7):2113-9, 2007b.
- Liby và đồng tác giả, *Nat. Rev. Cancer*, 7(5):357-356, 2007a.
- Lipsky, In: *Harrison's principles of internal medicine*, Fauci và đồng tác giả(Eds.), 14th Ed., NY, McGraw-Hill, 1880–1888, 1998.
- Liu và đồng tác giả, *FASEB J.*, 20(2):207-216, 2006.
- Lu và đồng tác giả, *J. Clin. Invest.*, 121(10):4015-29, 2011.
- Lugering và đồng tác giả, *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 30(3):338-344, 1998.
- Malhotra và đồng tác giả, *Am J Respir Crit Care Med*, 178:592-604, 2008.
- March's *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 2007.

- Mazur và đồng tác giả, *Cell Microbiol.*, 9(7):1683-94, 2007.
- Mazzoni và đồng tác giả, *J. Immunol.*, 168:689-695, 2002.
- McAlindon và đồng tác giả, *Gut*, 42(2):214-219, 1998.
- McGeer và McGeer, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 21:195–218, 1995.
- McGeer và đồng tác giả, *Neurology*, 19:331–338, 1996.
- McGonagle và đồng tác giả, *Arthritis Rheum.*, 41:694-700, 1998.
- McGonagle và đồng tác giả, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 11:244-250, 1999.
- McIver và đồng tác giả, *Pain*, 120(1-2):161-9, 2005.
- Mease và đồng tác giả, *Lancet*, 356:385–390, 2000.
- Merrill và Benvenist, *Trends Neurosci.*, 19:331–338, 1996.
- Mochizuki và đồng tác giả, *Am J Respir Crit Care Med*, 171:1260-6, 2005.
- Morbidity & Mortality: 2009 Chart Book on Cardiovascular, Lung, and Blood Diseases. National Heart, Lung, and Blood Institute, 2009.
- Morris và đồng tác giả, *J. Mol. Med.*, 80(2):96-104, 2002.
- Morse và Choi, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 172(6):660-670, 2005.
- Morse và Choi, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 27(1):8-16, 2002.
- Nath và đồng tác giả, *Neurology*, 66(1):149-150, 2006.
- Neal và đồng tác giả, *BMJ.*, 314(7083):779-782, 1997.
- Nichols, *Drug News Perspect.*, 17(2):99-104, 2004.
- Ohnishi và đồng tác giả, *Int. Immunol.*, 6:817-830, 1994.
- Ogushi và đồng tác giả, *J Med Invest*, 44:53-8, 1997.
- Pall, *Med. Hypoth.*, 69:821-825, 2007.
- Parambil và đồng tác giả, *Chest*, 128:3310-5, 2005.
- Partschi và đồng tác giả, *Br. J. Rheumatol.*, 24:518–523, 1997.
- Pergola và đồng tác giả, *N Engl J Med*, 365:327-336, 2011.
- Pica và đồng tác giả, *Antimicrob Agents Chemother.*, 44(1):200-4, 2000.
- Pimentel và đồng tác giả, *Am. J. Gastroenterol.*, 95(12):3503-3506, 2000.
- Place và đồng tác giả, *Clin. Cancer Res.*, 9(7):2798-806, 2003.
- Prochaska và Santamaria, *Anal Biochem.*, 169:328–336, 1988.
- Rajakariar và đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(52):20979-84, 2007.
- Rangasamy và đồng tác giả, *J Clin Invest*, 114:1248-59, 2004.

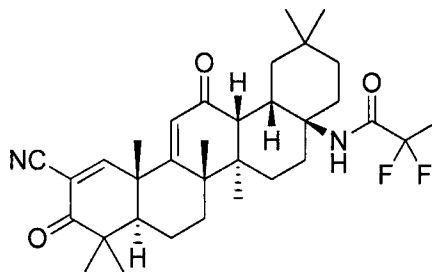
- Rangasamy và đồng tác giả, *J Exp Med*, 202:47-59, 2005.
- Reimund và đồng tác giả, *Eur. J. Clin. Invest.*, 28(2):145-150, 1998.
- Renauld, *J Clin Pathol*, 54:577-89, 2001.
- Rogler và Andus, *World J. Surg.*, 22(4):382-389, 1998.
- Rooney và đồng tác giả, *Rheumatol. Int.*, 10:217-219, 1990.
- Ross và đồng tác giả, *Am. J. Clin. Pathol.*, 120(Suppl):S53-71, 2003.
- Ross và đồng tác giả, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 3(5):573-585, 2003.
- Rossi và đồng tác giả, *Nature*, 403:103-8, 2000.
- Rostom và đồng tác giả, *Ann. Intern. Med.*, 146, 376-389, 2007.
- Ruster và đồng tác giả, *Scand. J. Rheumatol.*, 34(6):460-3, 2005.
- Sacerdoti và đồng tác giả, *Curr Neurovasc Res.*, 2(2):103-111, 2005.
- Saha và đồng tác giả, *J Biol Chem*, 285:40581-92, 2010.
- Saiki và đồng tác giả, *Scand. J. Gastroenterol.*, 33(6):616-622, 1998.
- Salomonsson và đồng tác giả, *Scand. J. Immunol.*, 55(4):336-342, 2002.
- Salvemini và đồng tác giả, *J. Clin. Invest.*, 93(5):1940-1947, 1994.
- Sarchielli và đồng tác giả, *Cephalalgia*, 26(9):1071-1079, 2006.
- Satoh và đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(3):768-773, 2006.
- Schlosstein và đồng tác giả, *NE J. Medicine*, 288:704-706, 1973.
- Schulz và đồng tác giả, *Antioxid. Redox. Sig.*, 10:115, 2008.
- Selman và đồng tác giả, *Ann Intern Med*, 134:136-51, 2001.
- Sheppard, *J Clin Invest*, 107:1501-2, 2001.
- Shishodia và đồng tác giả, *Clin Cancer Res*, 12:1828-38, 2006.
- Simonian và Coyle, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36:83-106, 1996.
- Singh và đồng tác giả, *Free Rad Biol Med*, 46:376-386, 2009.
- Sinha và đồng tác giả, *Cancer Res.*, 67:4507-4513, 2007.
- Sporn và đồng tác giả, *J Nat Prod*, 74:537-45, 2011.
- Sriram và đồng tác giả, *Pulm Pharmacol Ther*, 22:221-36, 2009.
- Stack và đồng tác giả, *Lancet*, 349(9051):521-524, 1997.
- Standiford và đồng tác giả, *Chest*, 103:121S, 1993.
- Standiford và đồng tác giả, *J Immunol*, 151:2852-63, 1993.
- Stewart và đồng tác giả, *Neurology*, 48:626-632, 1997.

- Straus và đồng tác giả, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:4844-9, 2000.
- Strejan và đồng tác giả, *J. Neuroimmunol.*, 7:27, 1984.
- Strieter, *Am J Respir Crit Care Med*, 165:1206-7, 2002.
- Suh và đồng tác giả, *Cancer Res.*, 58:717-723, 1998.
- Suh và đồng tác giả, *Cancer Res.*, 59(2):336-341, 1999.
- Sussan và đồng tác giả, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:250-5, 2009.
- Szabo và đồng tác giả, *Nature Rev. Drug Disc.*, 6:662-680, 2007.
- Takahashi và đồng tác giả, *Cancer Res.*, 57:1233-1237, 1997.
- Tamir và Tannebaum, *Biochim. Biophys. Acta*, 1288:F31-F36, 1996.
- Taniguchi và đồng tác giả, *Eur Respir J*, 35:821-9, 2010.
- Targan và đồng tác giả, *N. Engl. J. Med.*, 337(15):1029-1035, 1997.
- Thimmulappa và đồng tác giả, *Cancer Research*, 62: 5196-5203, 2002.
- Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III, or ATP III), National Institutes of Health, 2001, Công bố NIH số 01-3670.
- Touzani và đồng tác giả, *J. Neuroimmunol.*, 100(1-2):203-215, 1999.
- Tumlin và đồng tác giả, *Am. J. Cardiol.*, 98(6A):14K-20K, 2006.
- van den Berg, *Semin. Arthritis Rheum.*, 30(5S-2):7-16, 2001.
- van Dullemen và đồng tác giả, *Gastroenterol.*, 109(1):129-135, 1995.
- van Hogezaand và Verspaget, *Drugs*, 56(3):299-305, 1998.
- Vazquez và đồng tác giả, *J. Virol.*, 79(7):4479-91, 2005.
- Wakabayashi, và đồng tác giả, *Antioxid Redox Signal*, 13:1649-63, 2010.
- Wang và đồng tác giả, *Cancer Res.*, 66:10983-10994, 2006.
- Wardle, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16(9):1764-8, 2001.
- Weyand và Goronzy, *Ann. NY Acad. Sci.*, 987:140-149, 2003.
- Williams và đồng tác giả, *Clin. Neurosci.*, 2(3-4):229-245, 1994.
- Wordsworth, In: *Genes và Arthritis*, *Brit. Medical Bulletin*, 51:249-266, 1995.
- Wright, *Clin. Orthop. Related Res.*, 143:8-14, 1979.
- Wu và đồng tác giả, *Toxicol Sci*, 123:590-600, 2011.
- Xie và đồng tác giả, *J. Biol. Chem.*, 270(12):6894-6900, 1995.

- Yates và đồng tác giả, *Mol. Cancer Ther*, 6(1):154-162, 2007.
- Yore và đồng tác giả, *Mol Cancer Ther*, 5:3232-9, 2006.
- Yoh và đồng tác giả, *Kidney Int.*, 60(4):1343-1353, 2001.
- Yu và đồng tác giả, *Nat. Rev. Immunol.*, 7:41-51, 2007.
- Zhou và đồng tác giả, *Am. J. Pathol.*, 166(1):27-37, 2005.
- Zhou và đồng tác giả, *Cancer Sci.*, 98:882-889, 2007.
- Zingarelli và đồng tác giả, *J. Immunol.*, 171(12):6827-6837, 2003.

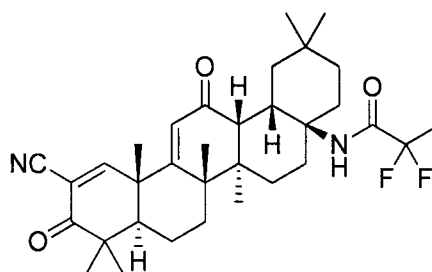
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



hoặc muối được dụng của nó.

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



3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, ở dạng đa hình, trong đó hợp chất dạng đa hình có mẫu nhiễu xạ bột tia X ($\text{CuK}\alpha$) bao gồm đỉnh halogen ở khoảng $14^\circ 2\theta$; hoặc

trong đó hợp chất dạng đa hình là solvat có mẫu nhiễu xạ bột tia X ($\text{CuK}\alpha$) bao gồm các đỉnh ở khoảng $5,6$; $7,0$; $10,6$; $12,7$; và $14,6^\circ 2\theta$; hoặc

trong đó hợp chất dạng đa hình là solvat có mẫu nhiễu xạ bột tia X ($\text{CuK}\alpha$) bao gồm các đỉnh ở khoảng $7,0$; $7,8$; $8,6$; $11,9$; $13,9$ (đỉnh kép); $14,2$; và $16,0^\circ 2\theta$; hoặc

trong đó hợp chất dạng đa hình là axetonitril hemisolvat có mẫu nhiễu xạ bột tia X ($\text{CuK}\alpha$) bao gồm các đỉnh ở khoảng $7,5$; $11,4$; $15,6$; và $16,6^\circ 2\theta$; hoặc

trong đó hợp chất dạng đa hình là solvat có mẫu nhiễu xạ bột tia X ($\text{CuK}\alpha$) bao gồm các đỉnh ở khoảng $6,8$; $9,3$; $9,5$; $10,5$; $13,6$; và $15,6^\circ 2\theta$.

4. Dược phẩm chứa:
hoạt chất bao gồm hợp chất theo điểm 1 hoặc 2 hoặc hợp chất ở dạng đa hình theo điểm 3, và

chất mang dược dụng.

5. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó dược phẩm được bào chế để dùng: qua đường miệng, trong mô mỡ, trong động mạch, trong khớp, trong sọ, trong da, trong vết thương, trong cơ, trong mũi, trong mắt, trong màng ngoài tim, trong màng bụng, trong màng phổi, trong tuyến tiền liệt, trong trực tràng, trong tùy mạc, trong khí quản, trong khối u, trong rốn, trong âm đạo, trong tĩnh mạch, trong bong, trong thủy tinh thể, qua hạt mỡ, khu trú, qua niêm mạc, ngoài ruột, qua trực tràng, dưới kết mạc, dưới da, dưới lưỡi, cục bộ, xuyên miệng, qua da, qua âm đạo, ở dạng kem, ở dạng các chế phẩm lipid, qua ống thông đường tiểu, qua thụt rửa, qua tiêm truyền liên tục, qua tiêm truyền, qua hít, qua tiêm, qua cấp cục bộ, hoặc qua truyền dịch khu trú.
6. Dược phẩm theo điểm 5, trong đó dược phẩm được bào chế dưới dạng viên nang cứng hoặc mềm, thuốc viên, sirô, dịch huyền phù, nhũ tương, dung dịch, thể phân tán dạng rắn, viên nhện, hoặc cốm ngọt.
7. Dược phẩm theo điểm 4 hoặc 5, trong đó dược phẩm được bào chế để sử dụng cục bộ ở dạng được chọn từ nước súc, kem, gel, dầu, thuốc mỡ, sáp, nhũ tương, dung dịch, và dịch huyền phù.
8. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 7, trong đó lượng hoạt chất nằm trong khoảng từ 0,01% đến 5% trọng lượng.

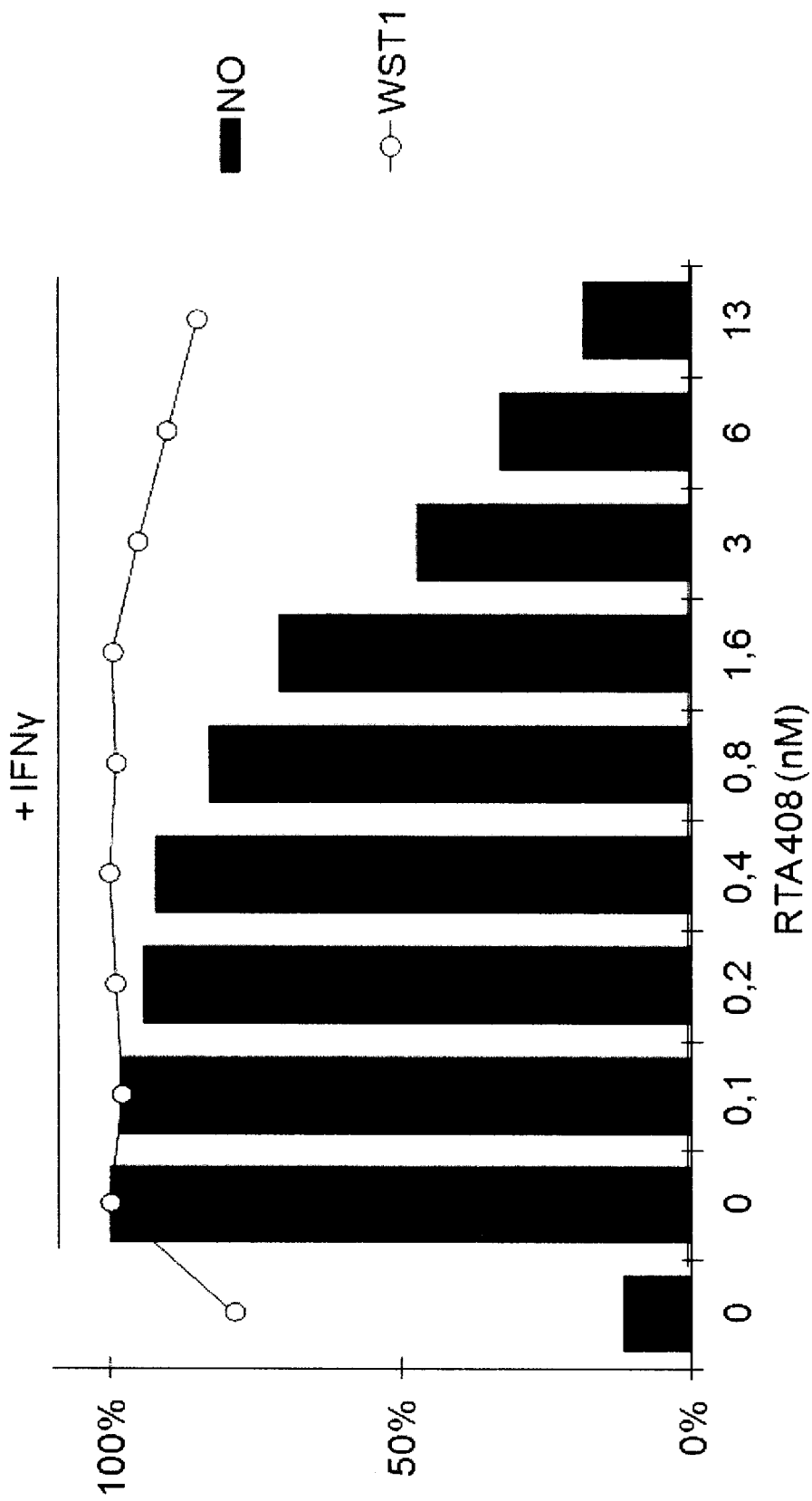
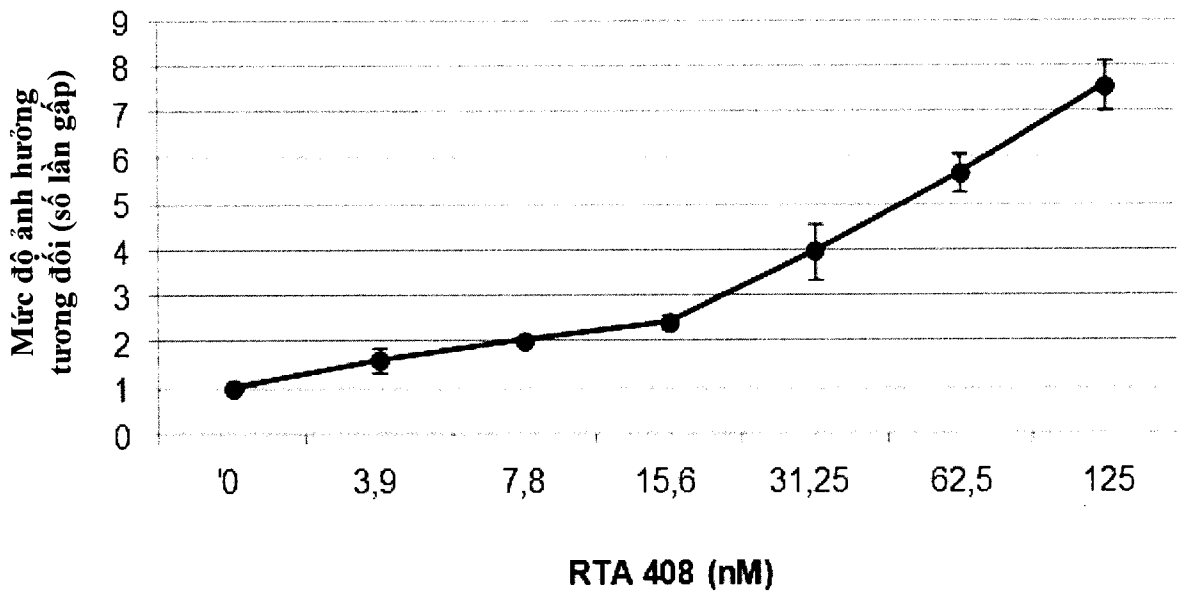
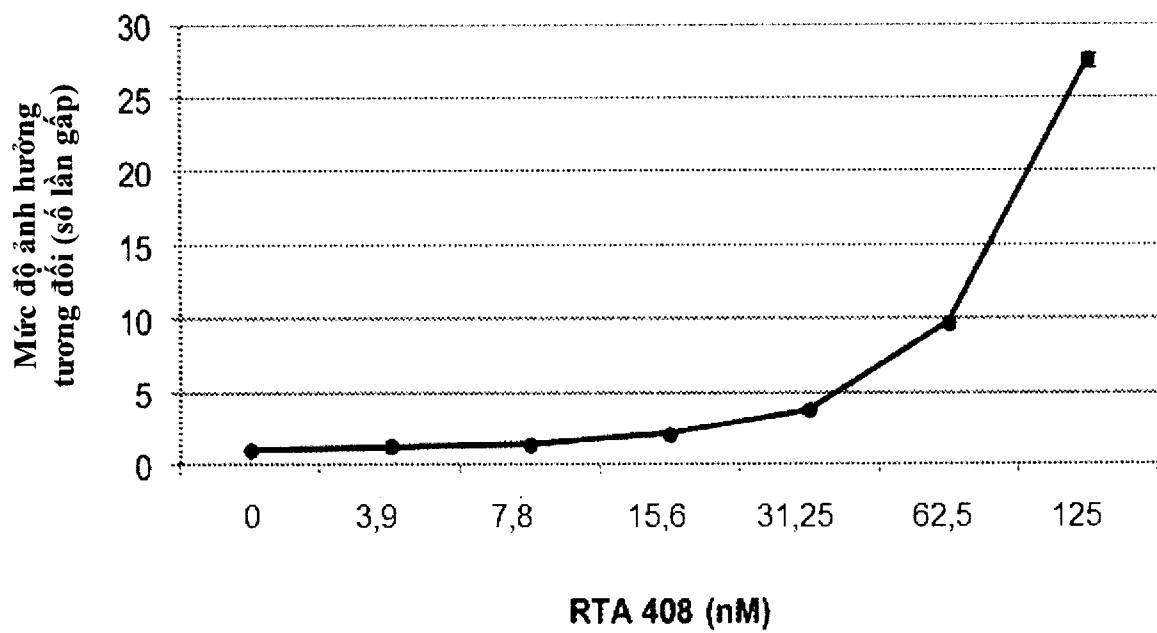


FIG. 1

Hoạt tính Luciferaza NQO1-ARE

(a)

Hoạt tính Luciferaza GSTA2-ARE

(b)

FIG. 2a & b

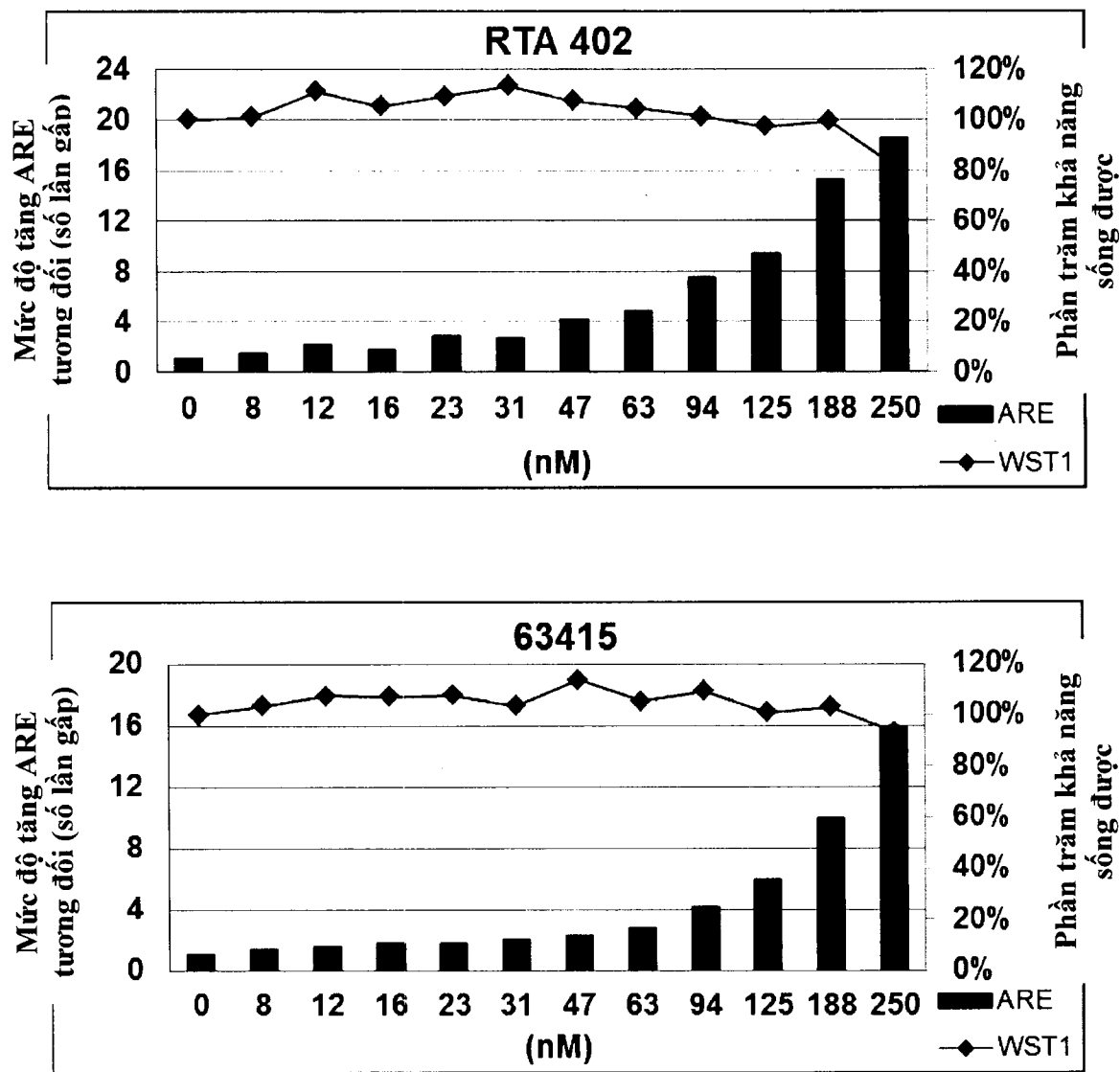


FIG. 3a & b

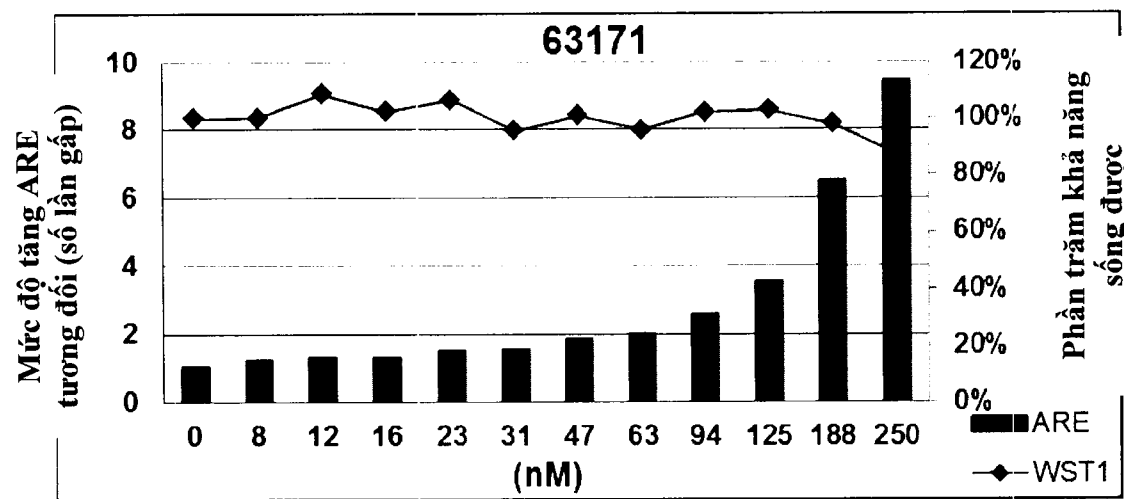
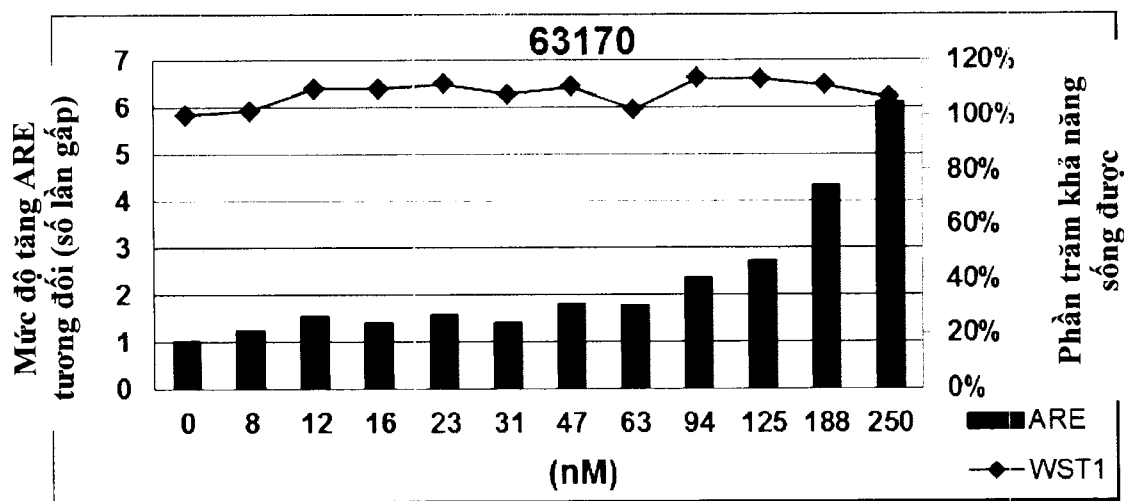


FIG. 3c & d

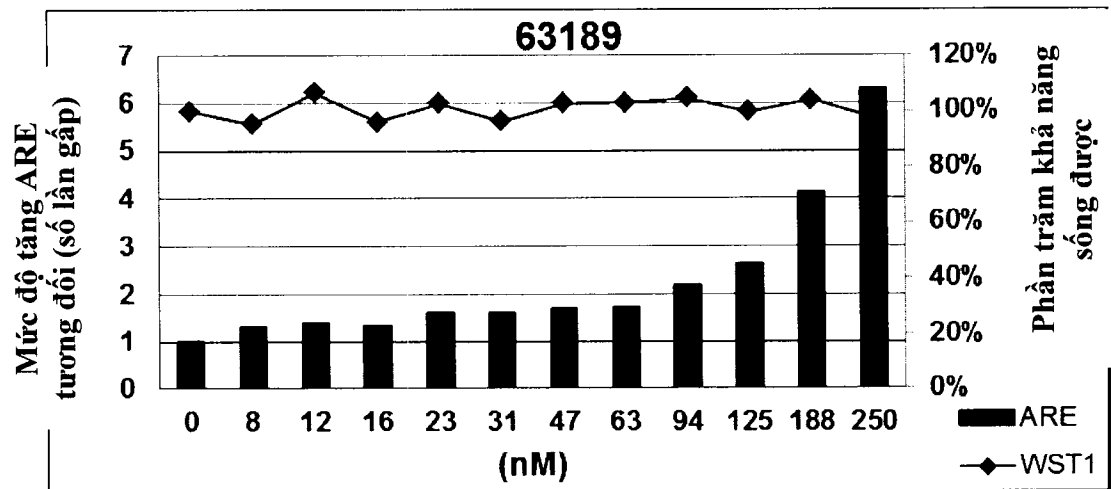
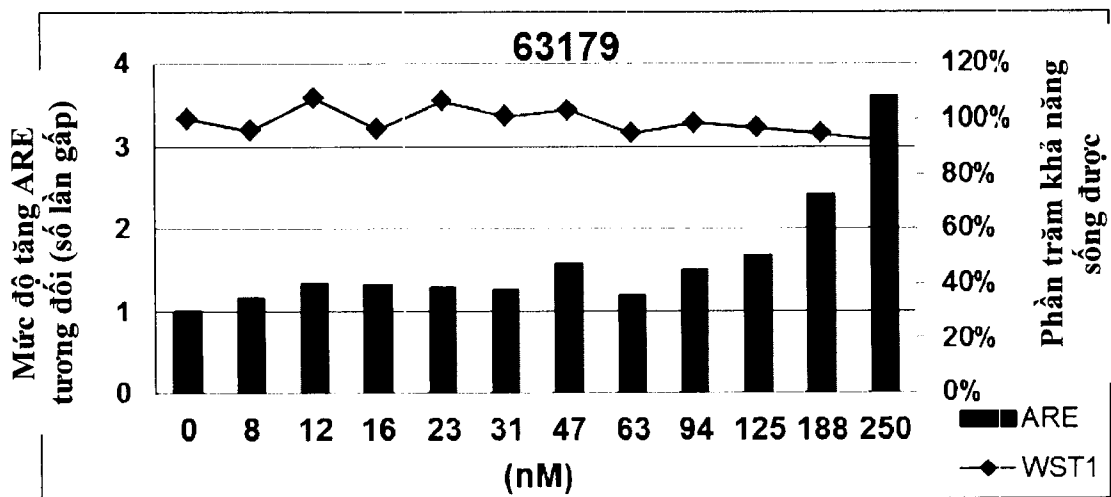


FIG. 3e & f

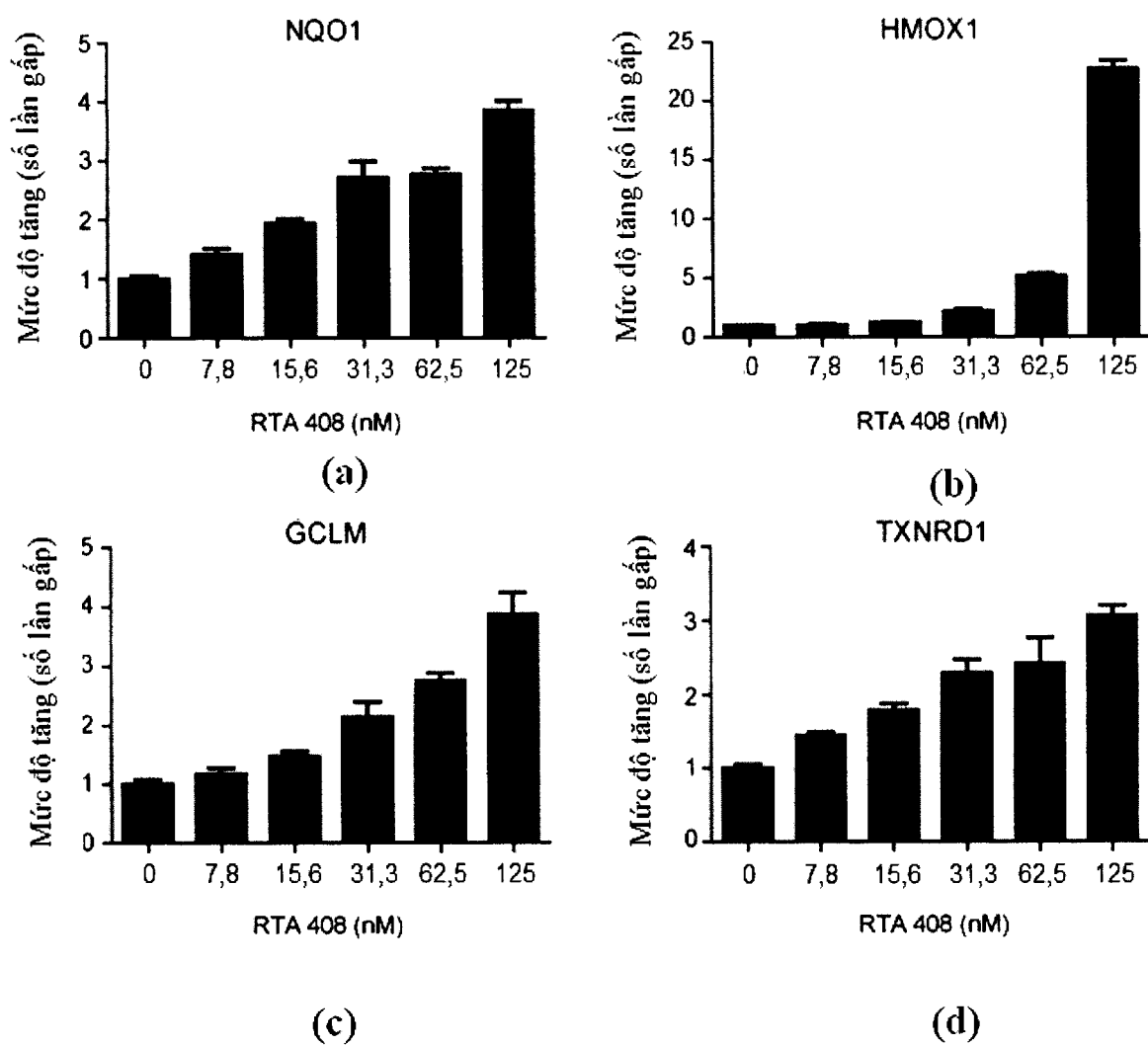


FIG. 4a – d

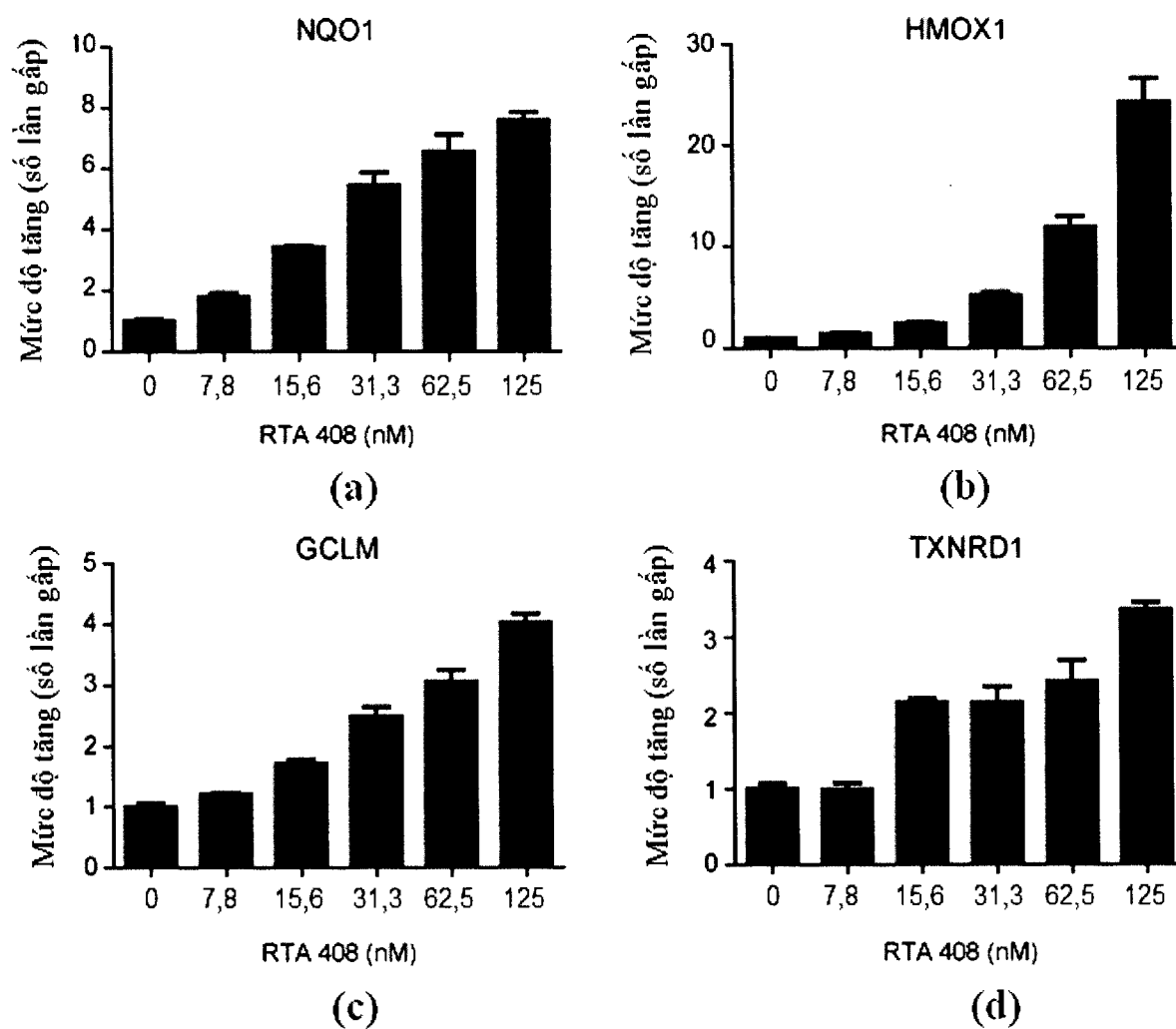


FIG. 5a – d

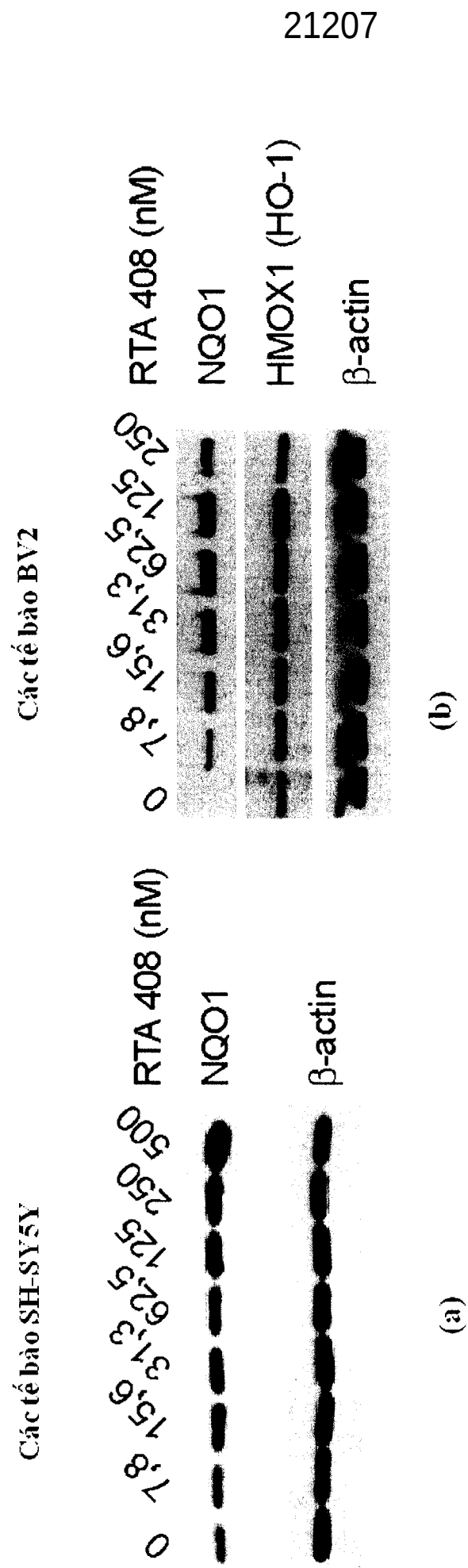


FIG. 6a & b

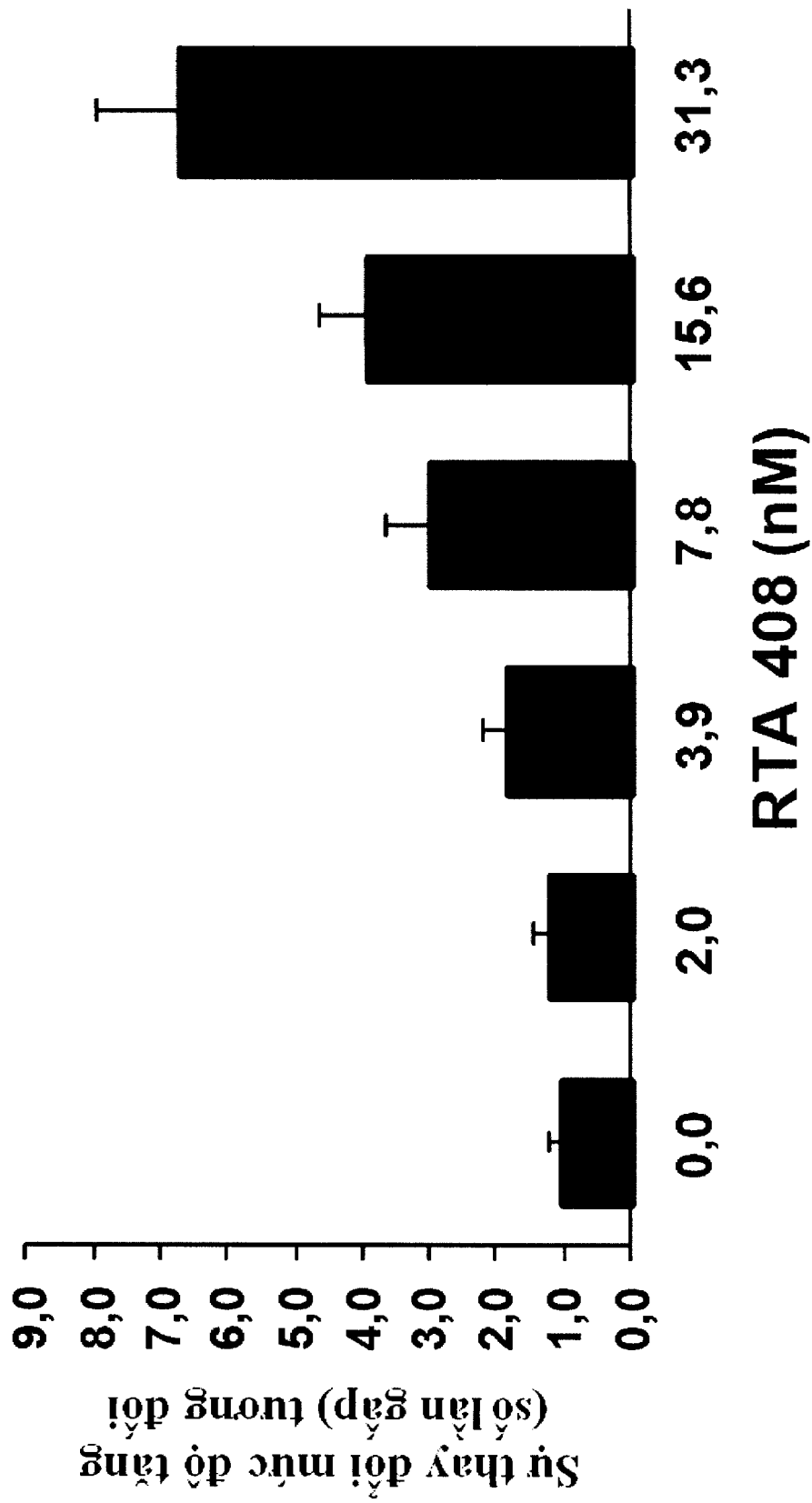


FIG. 7

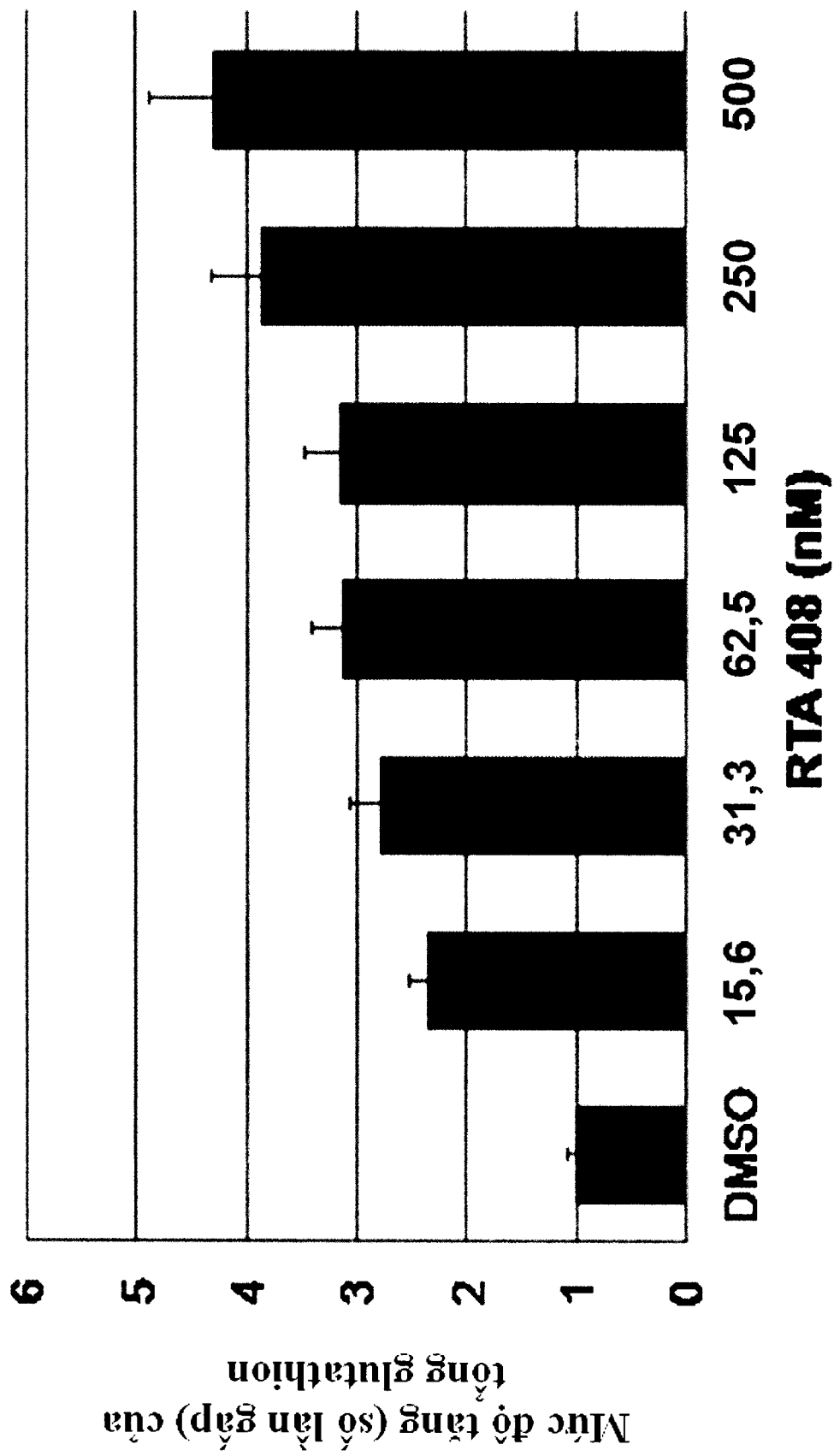


FIG. 8

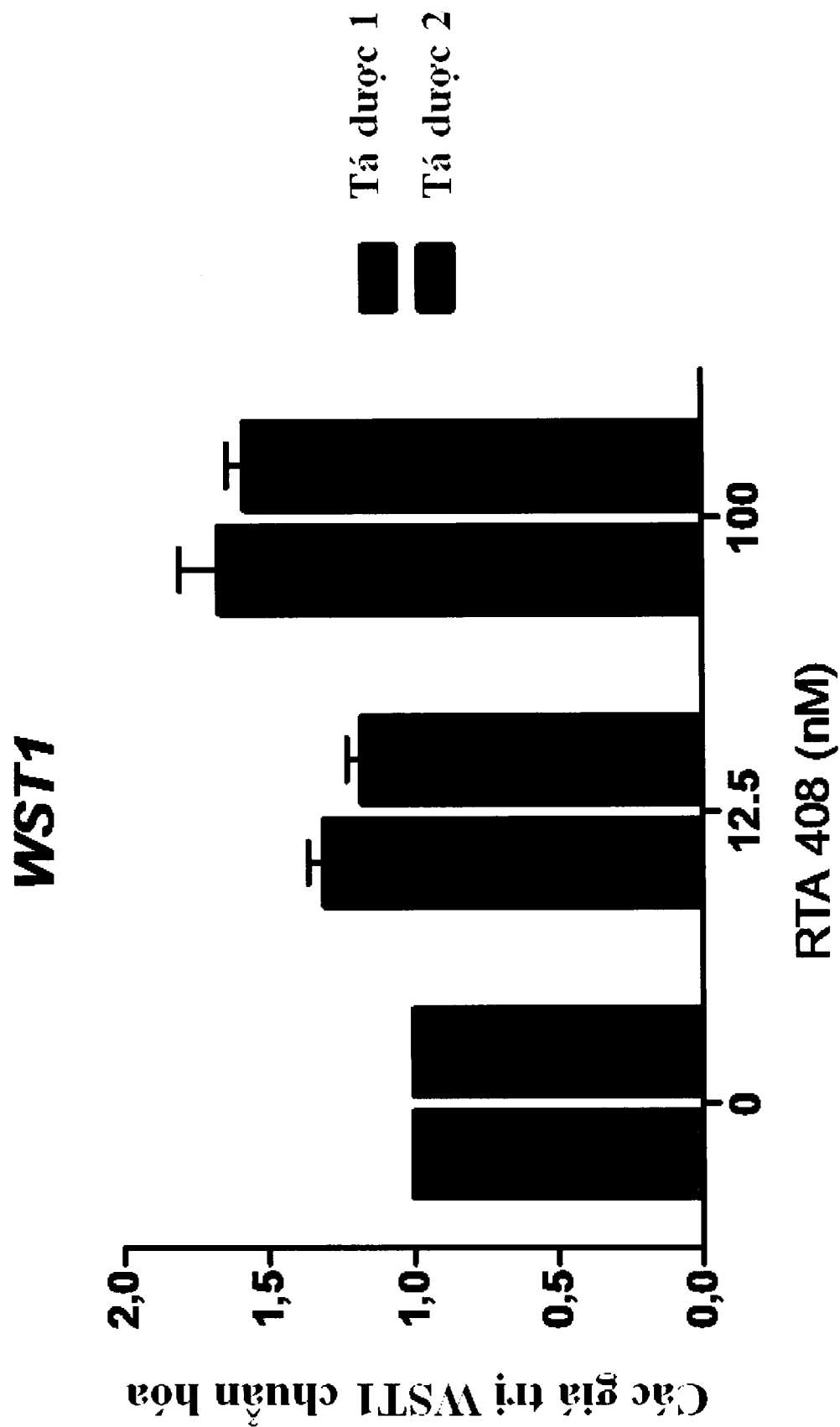
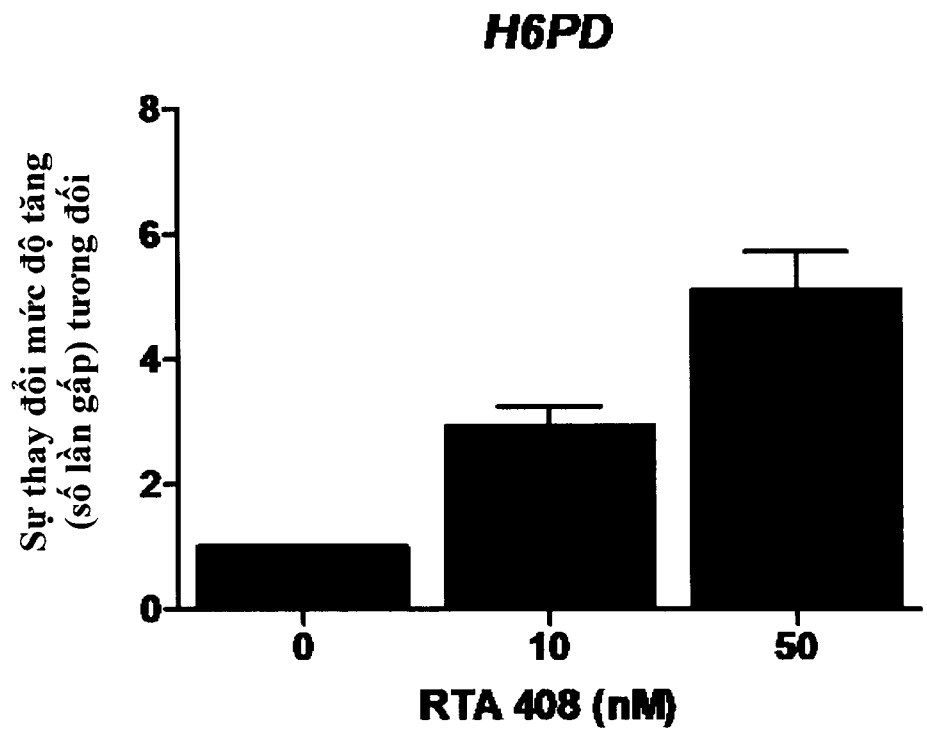
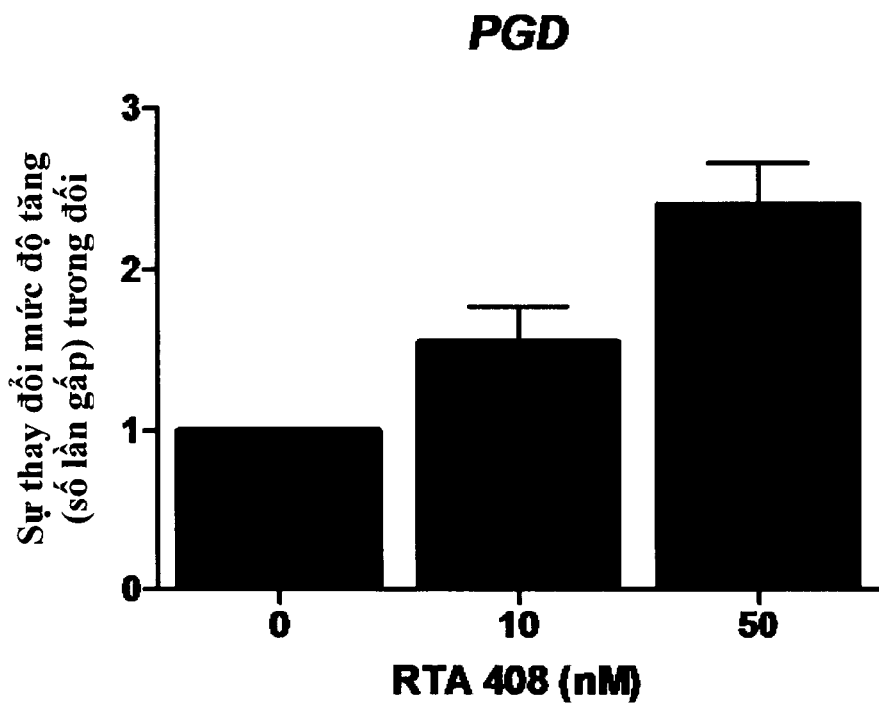


FIG. 9

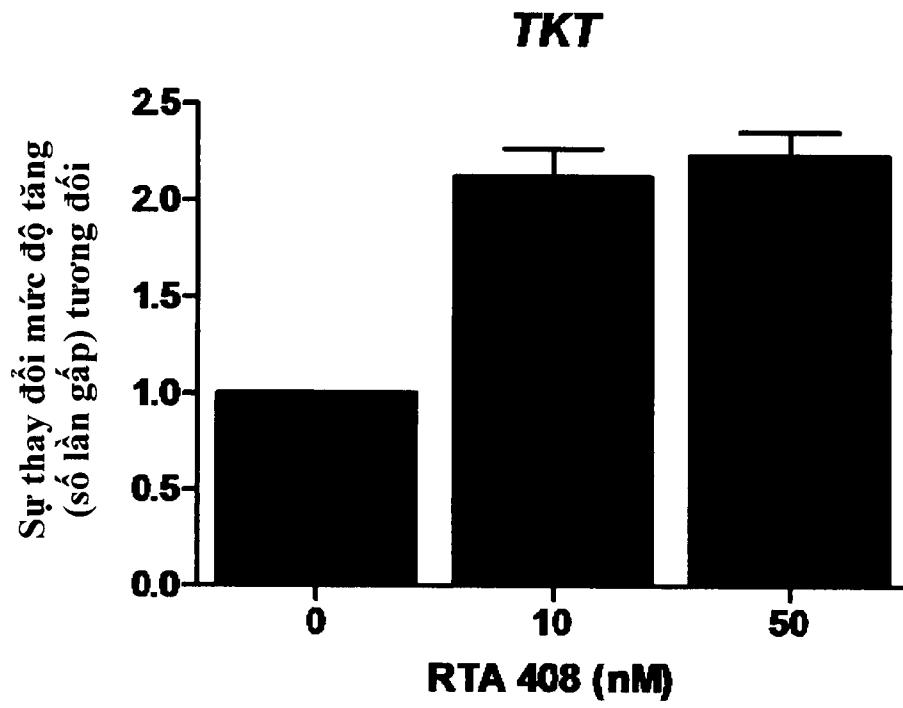


(a)

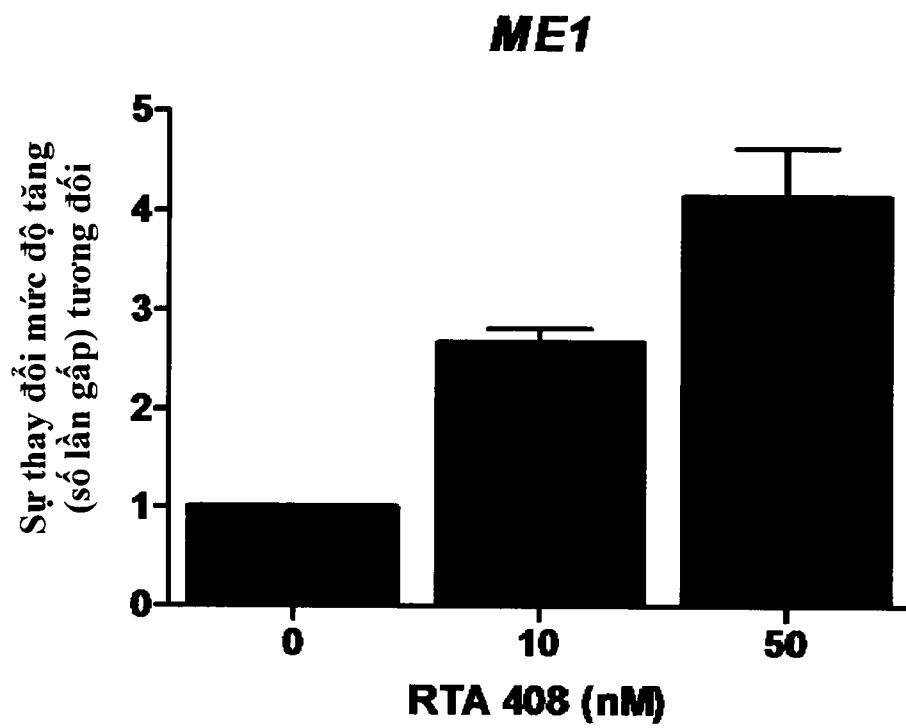


(b)

FIG. 10a & b



(c)



(d)

FIG. 10c & d

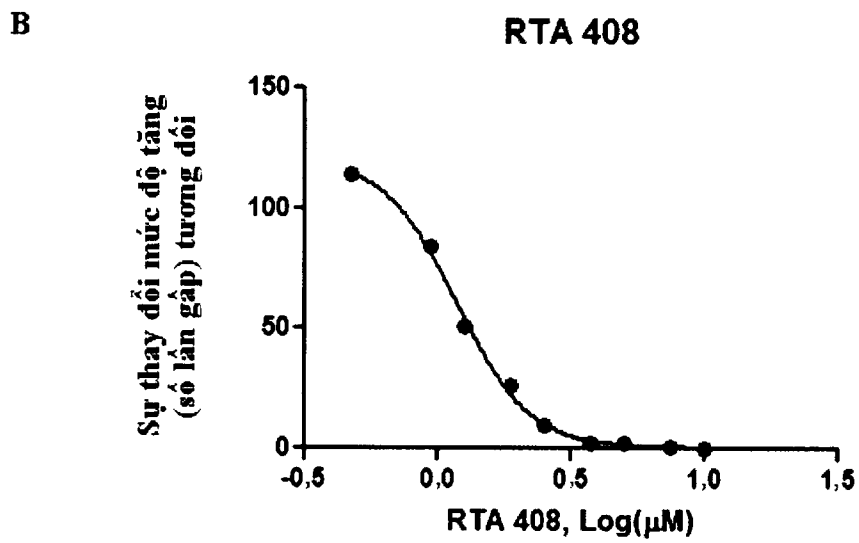
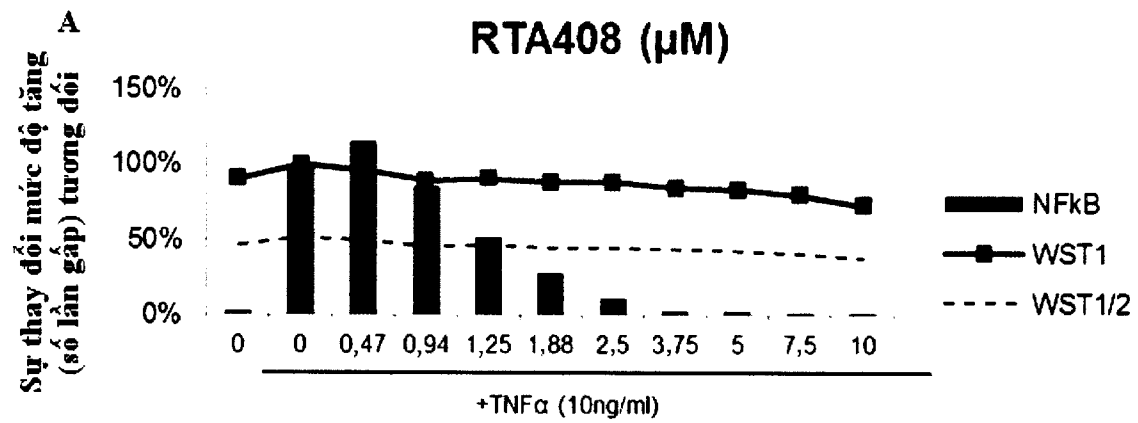


FIG. 11a & b

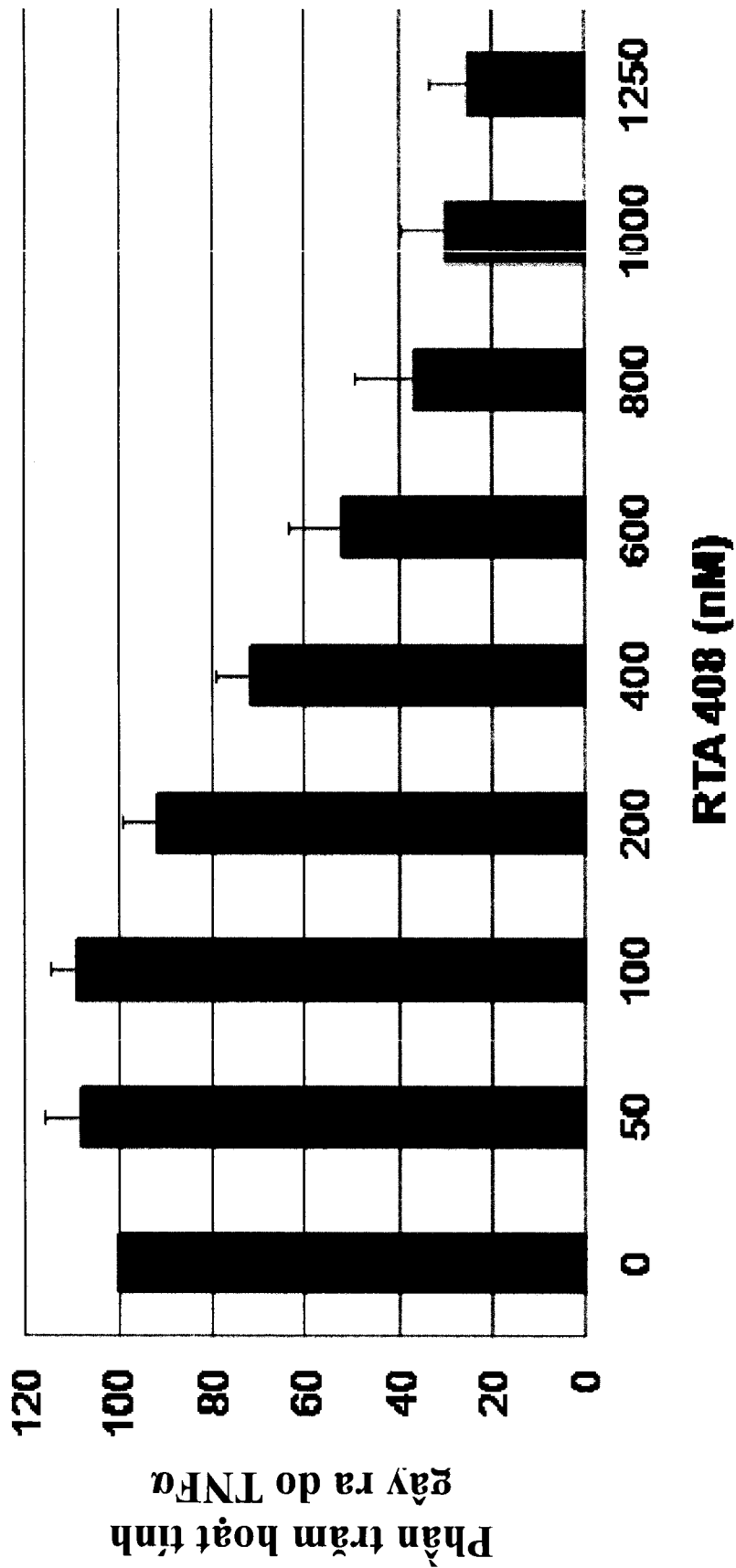


FIG. 12

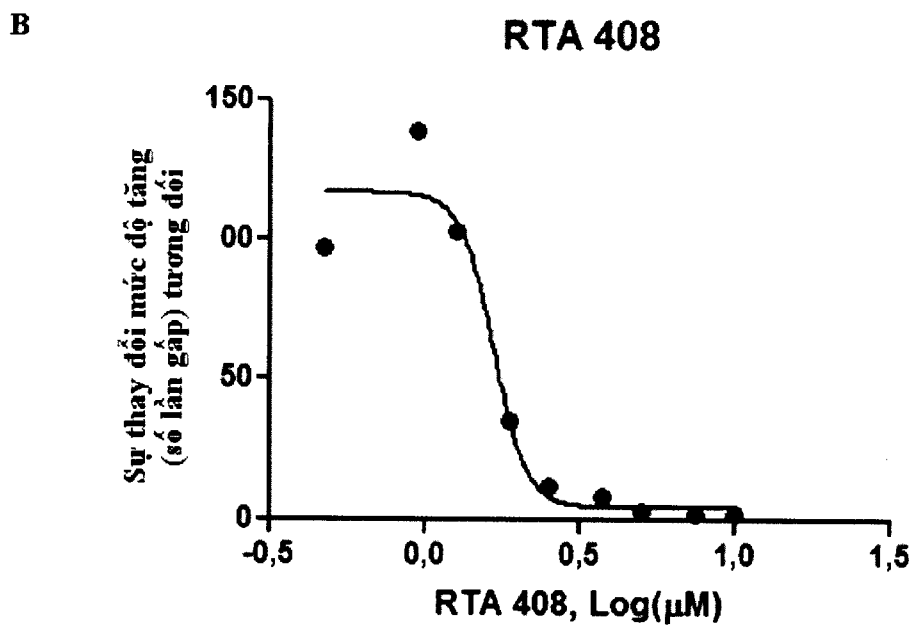
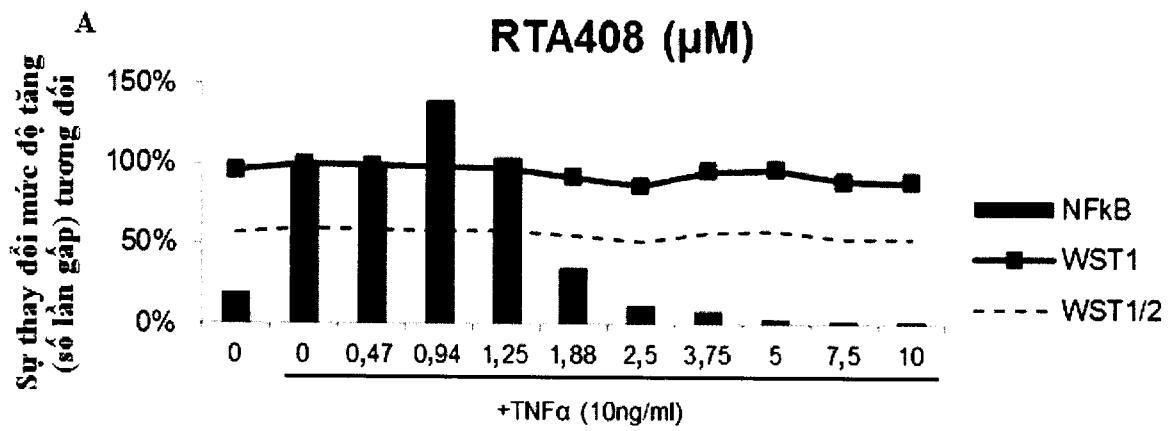


FIG. 13a & b

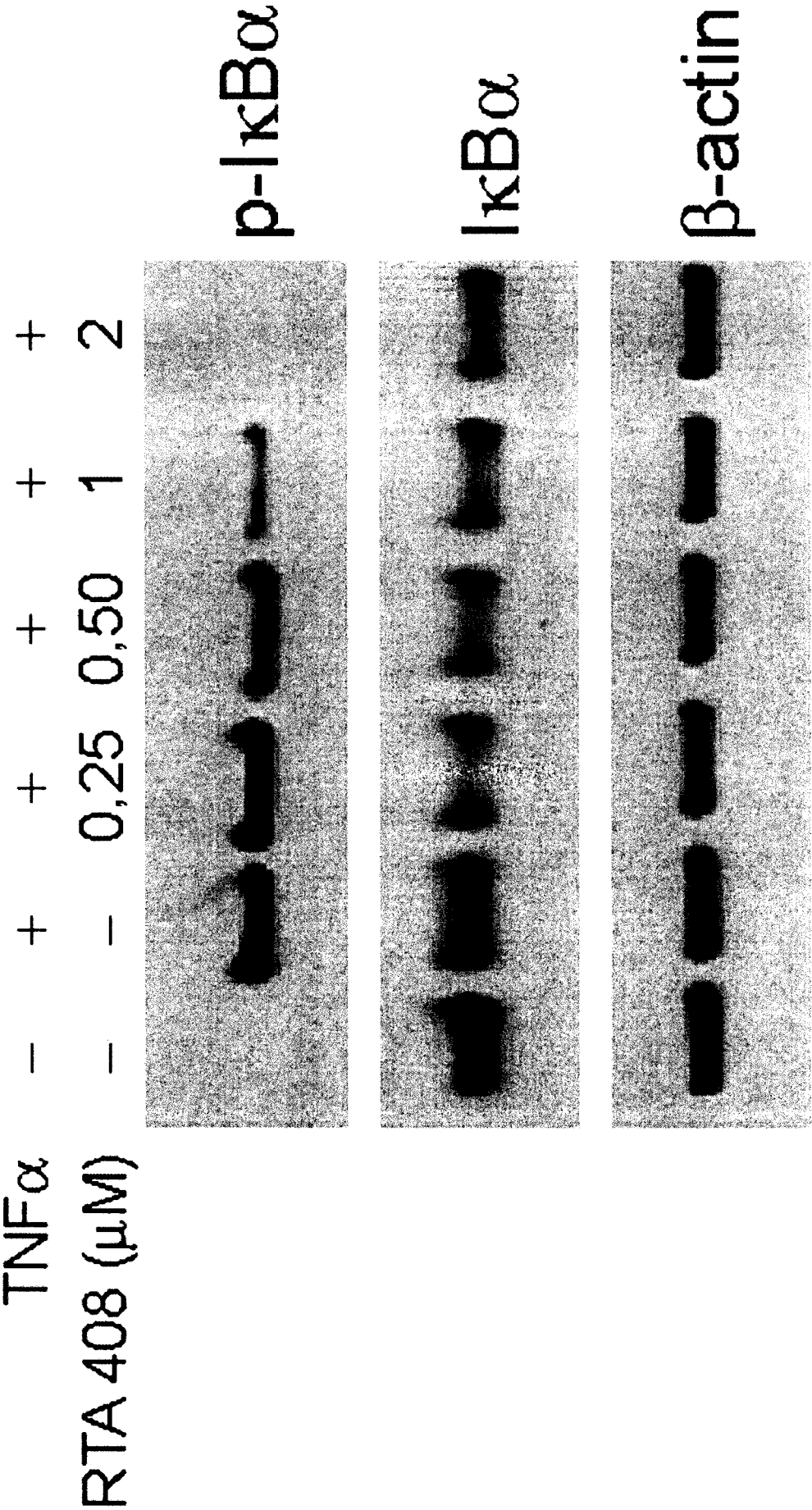
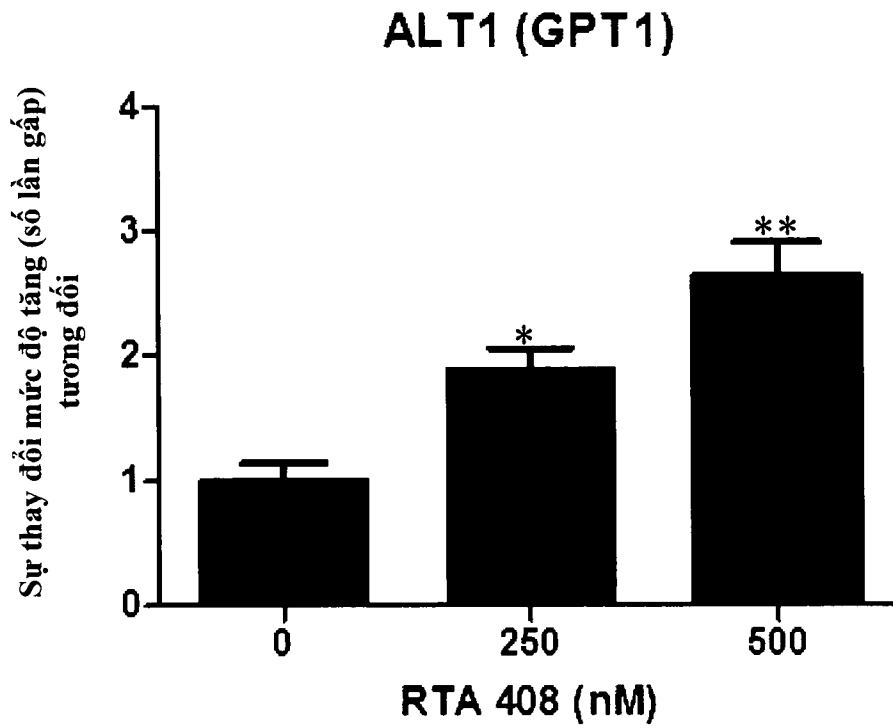
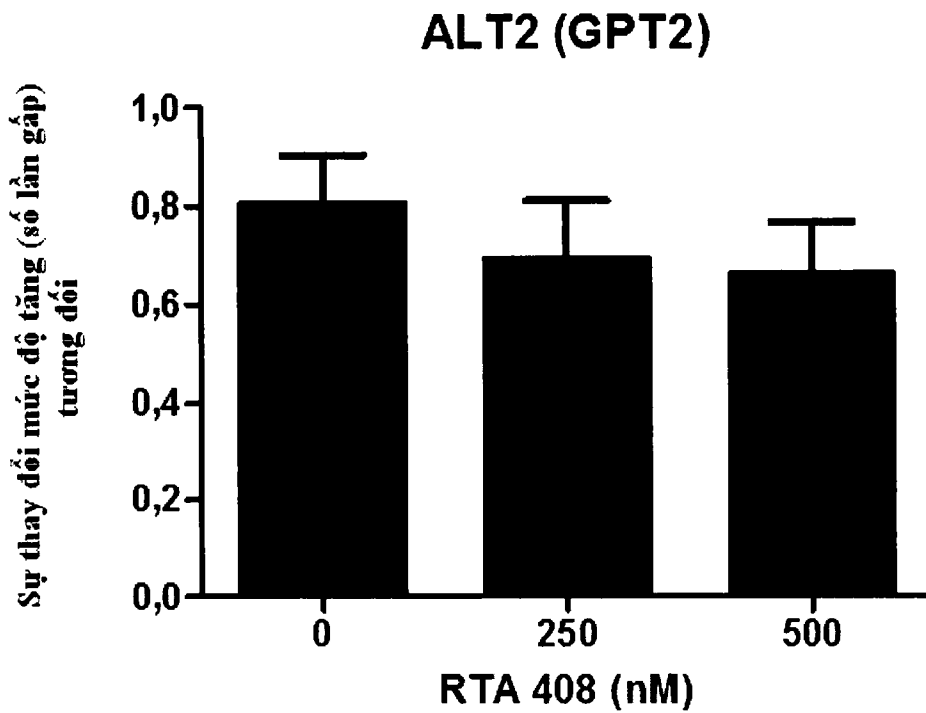


FIG. 14

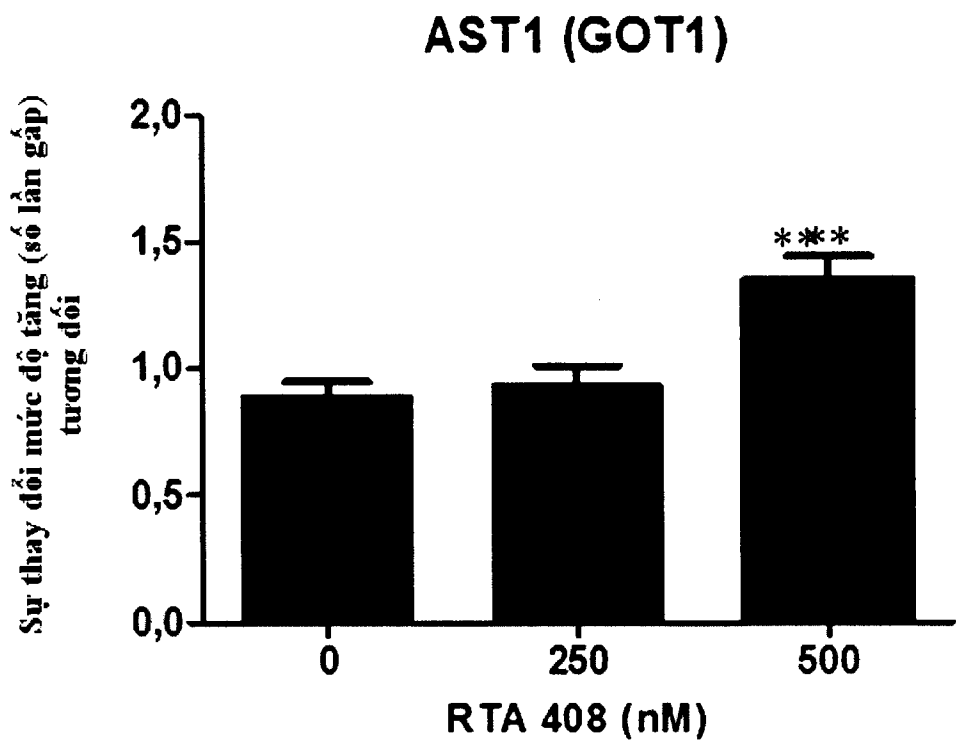


(a)

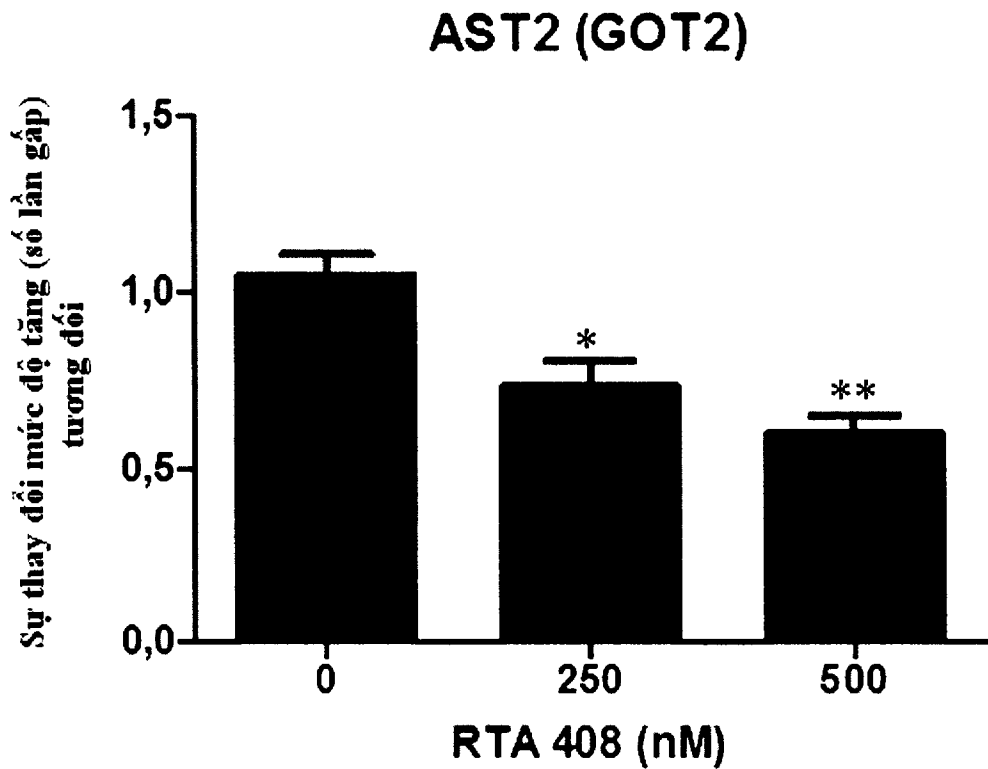


(b)

FIG. 15a & b



(c)



(d)

FIG. 15c & d

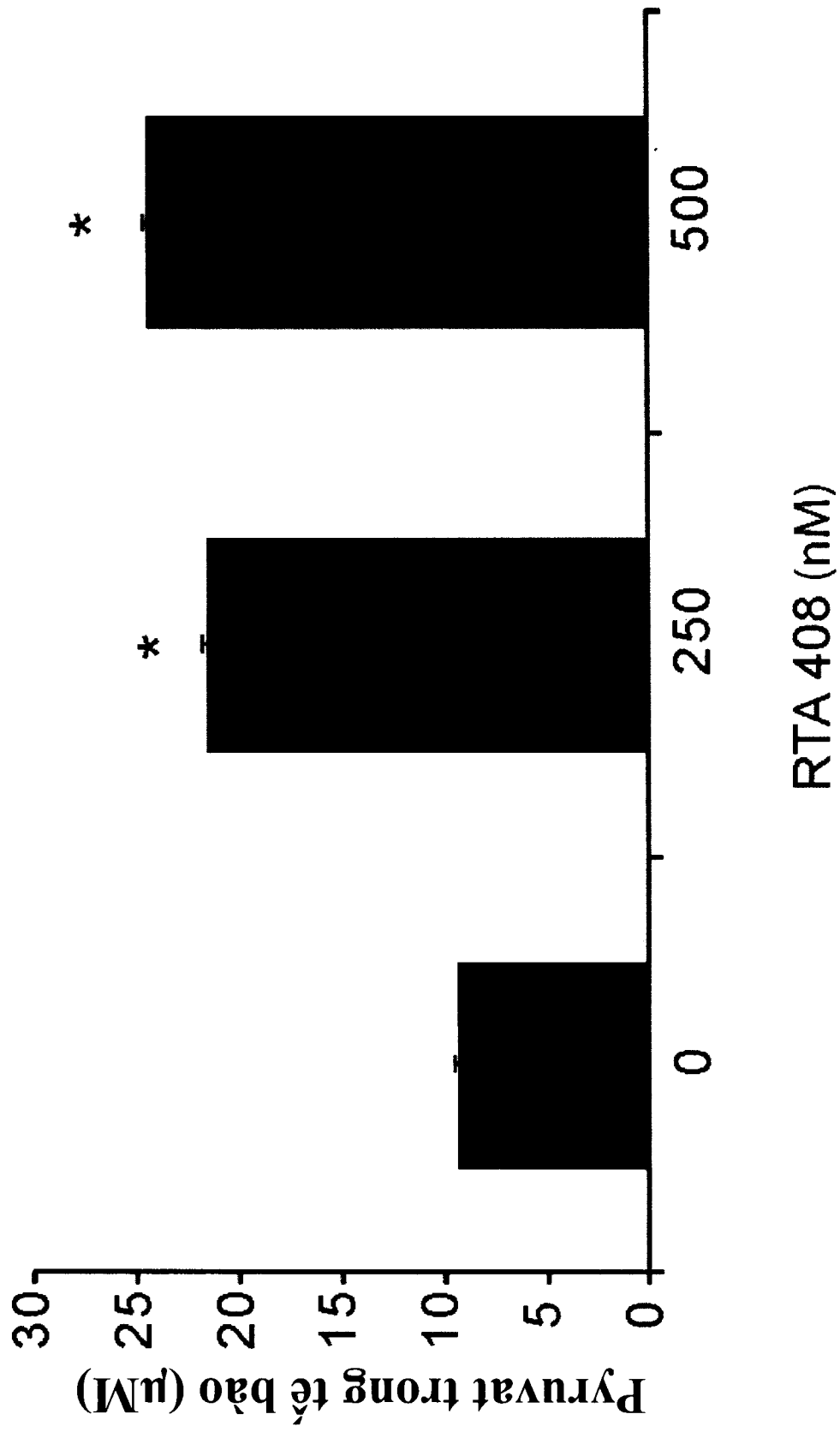


FIG. 16

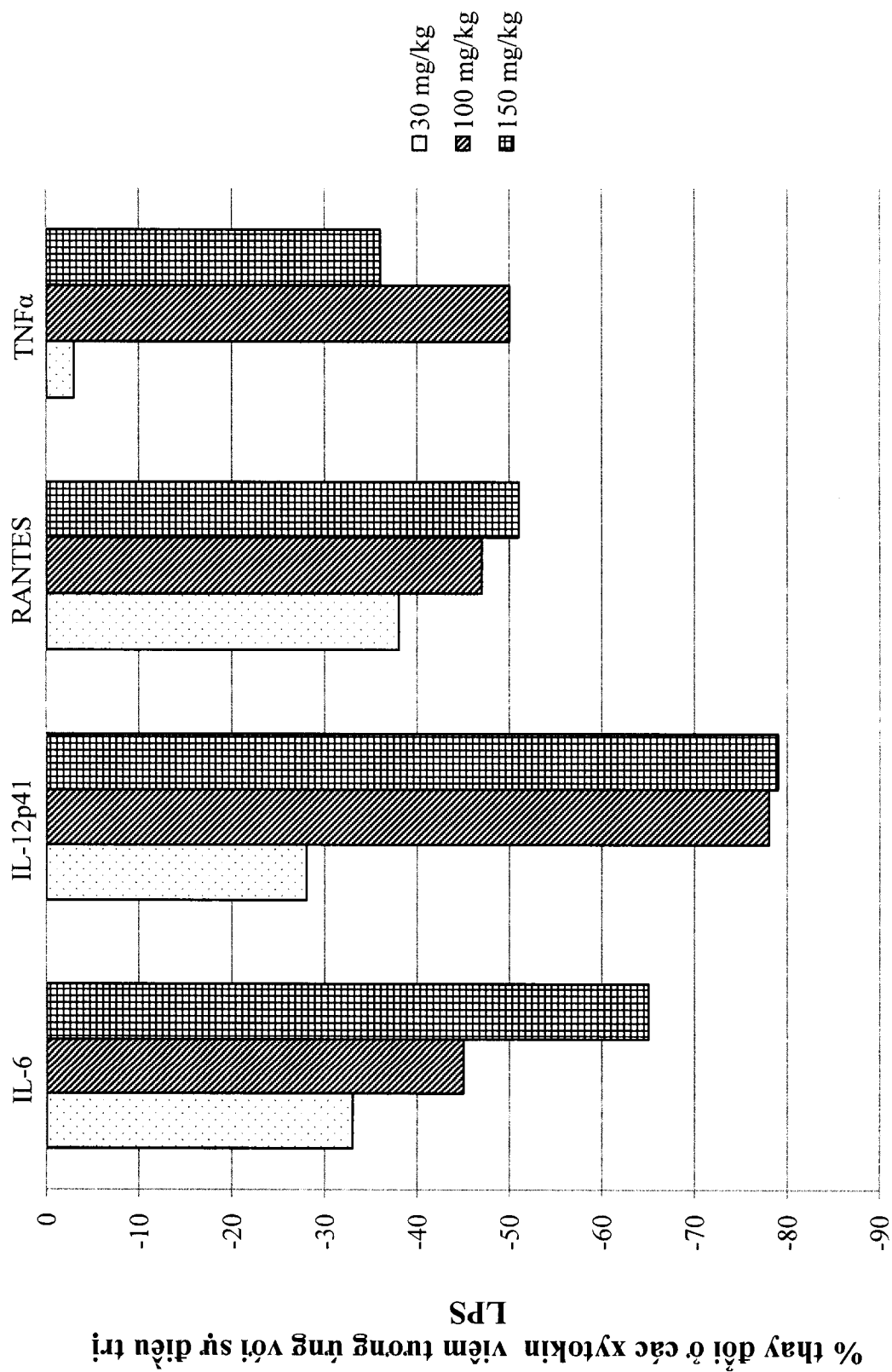


FIG. 17

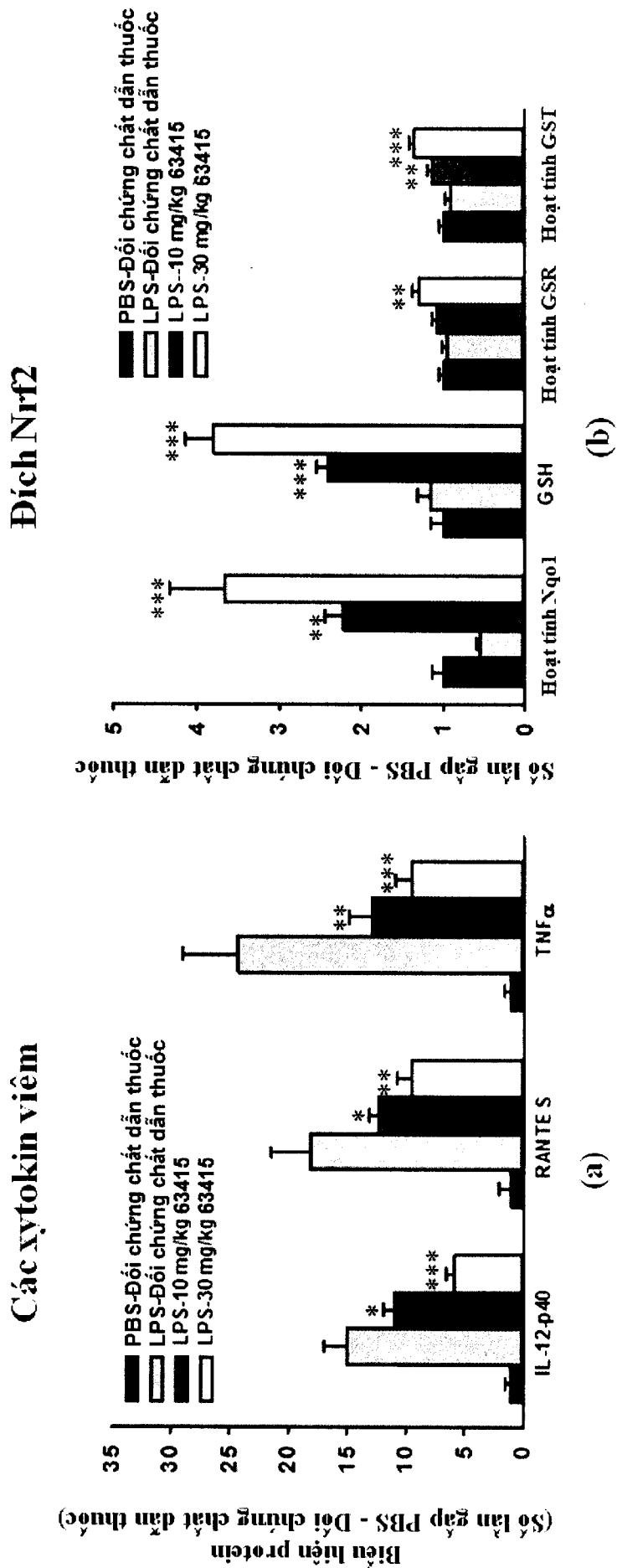
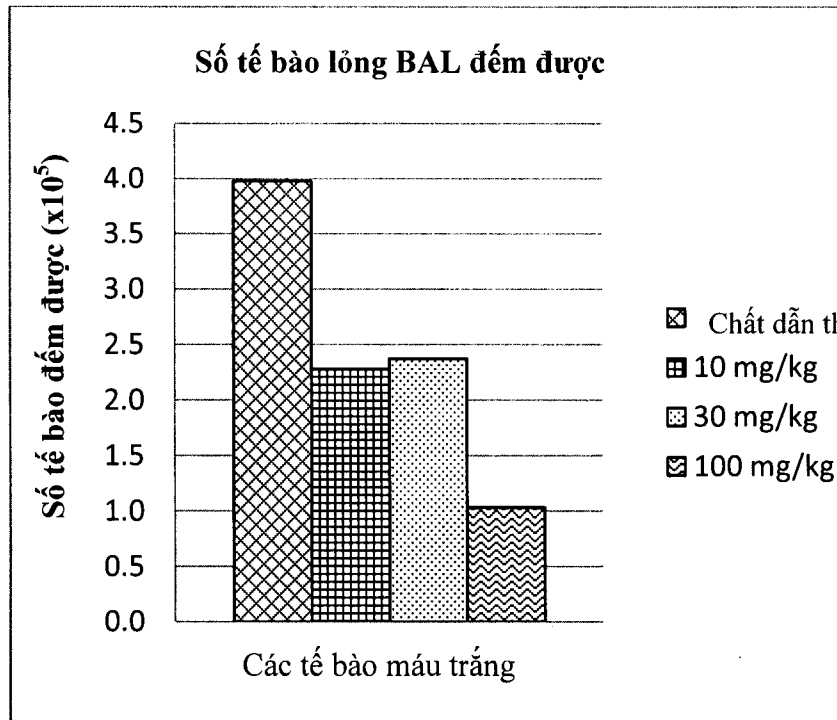
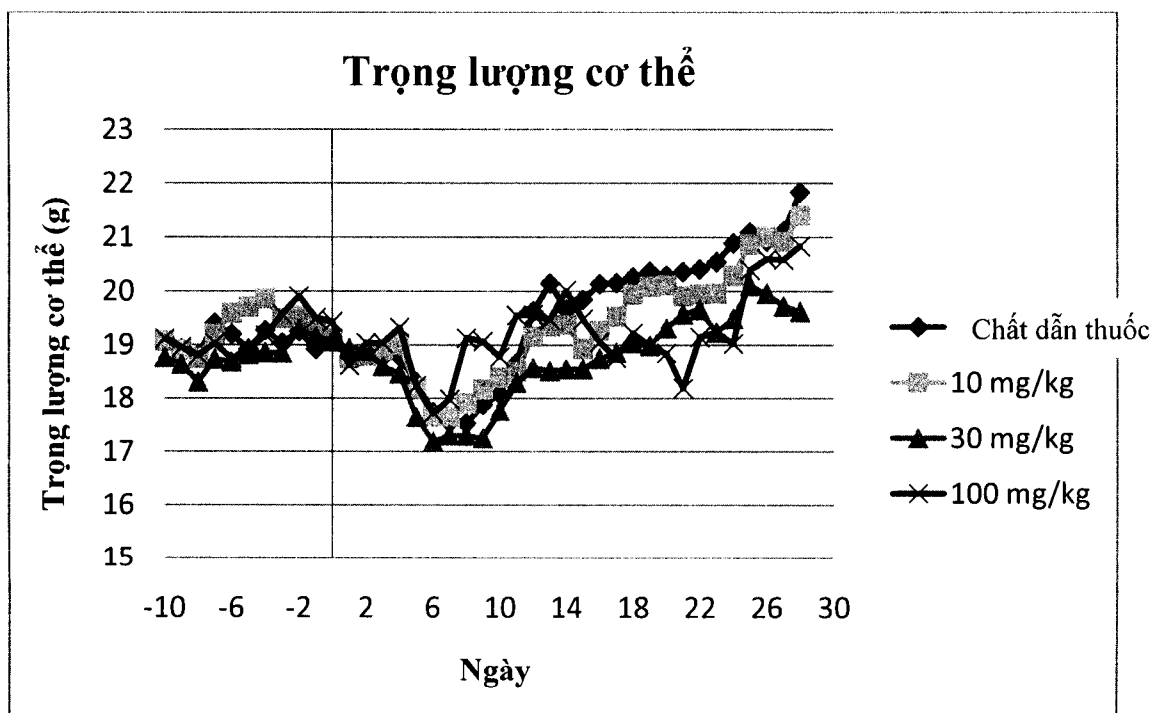


FIG. 18a & b



(a)



(b)

FIG. 19a & b

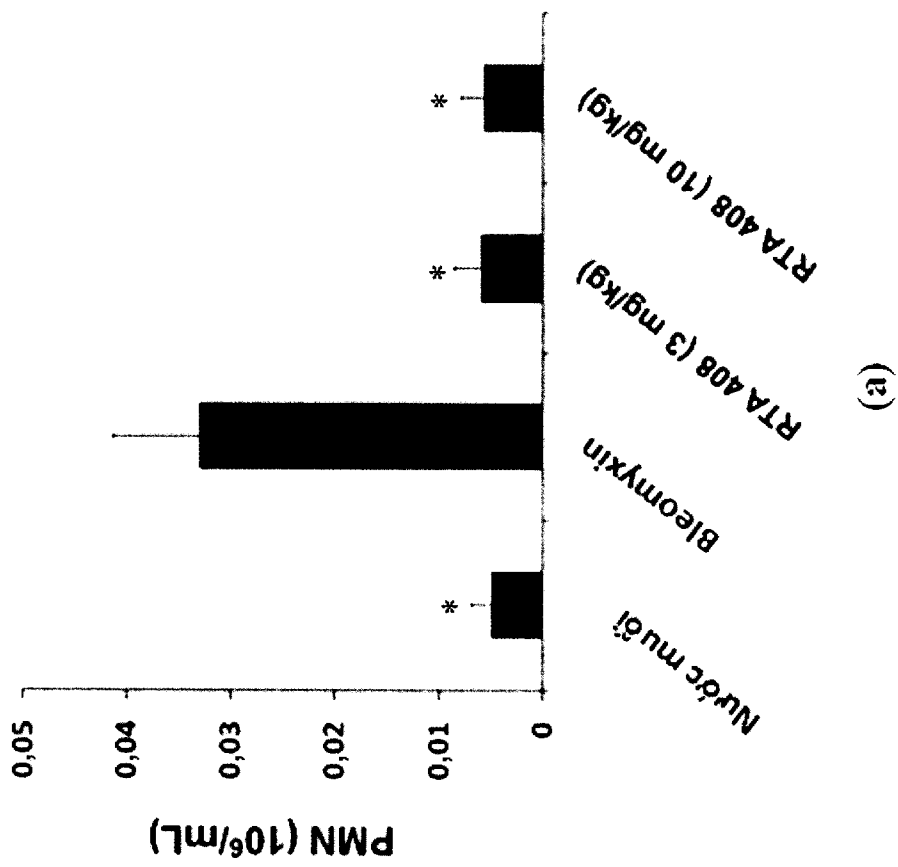
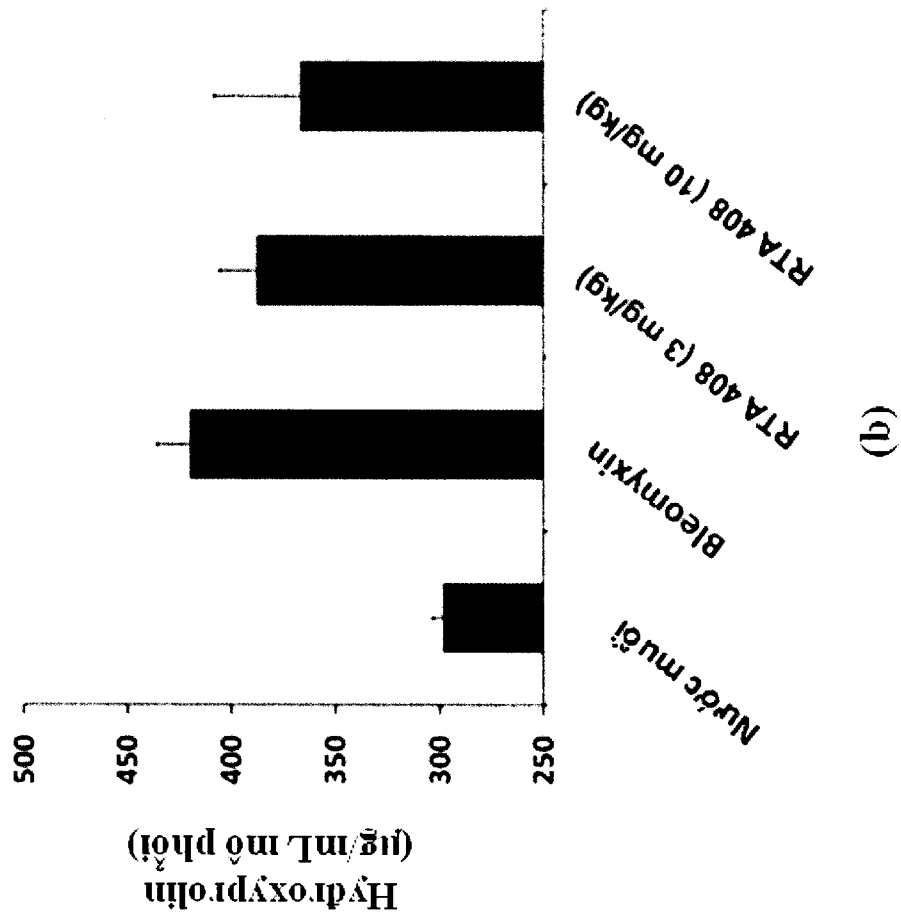


FIG. 20a & b

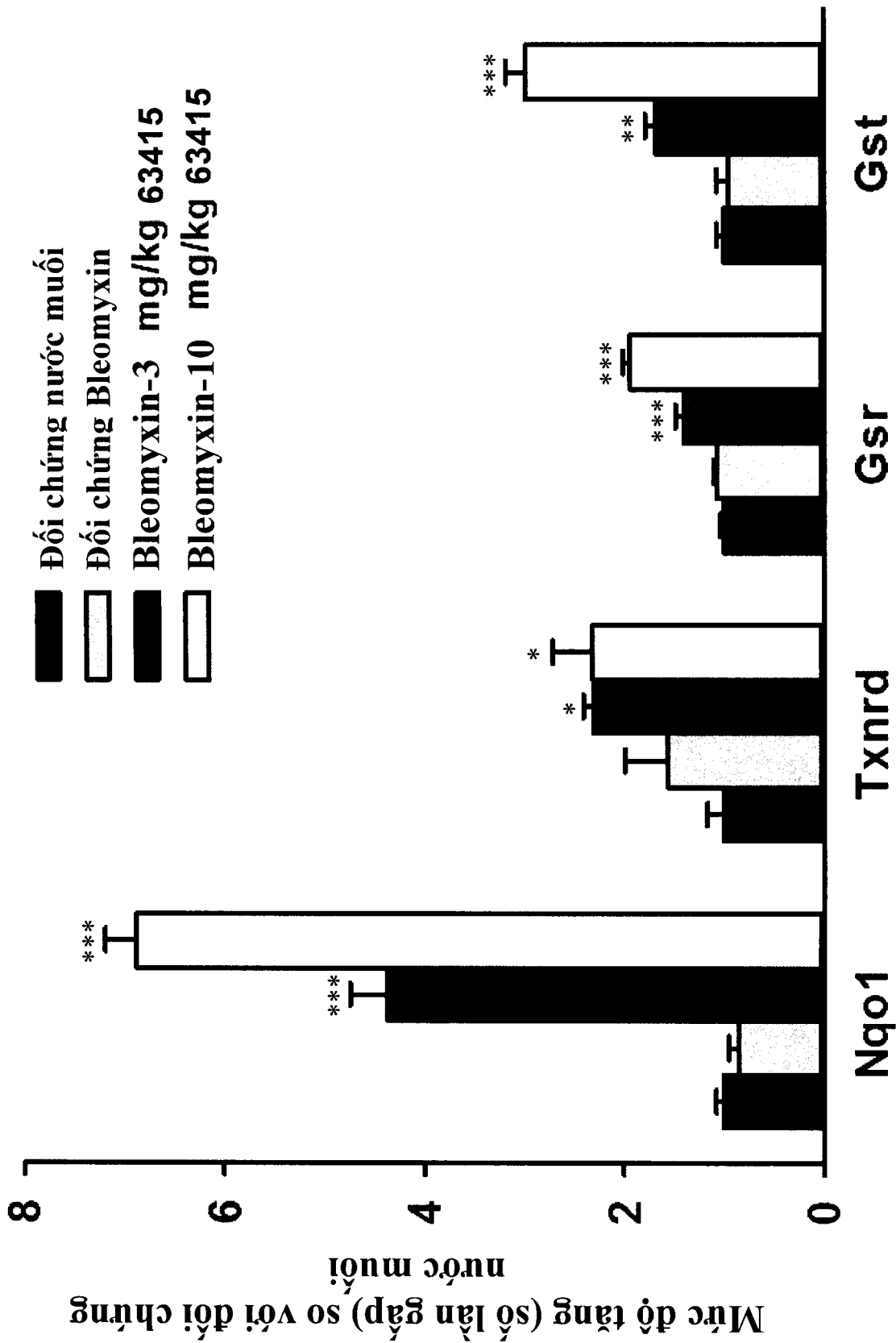


FIG. 21

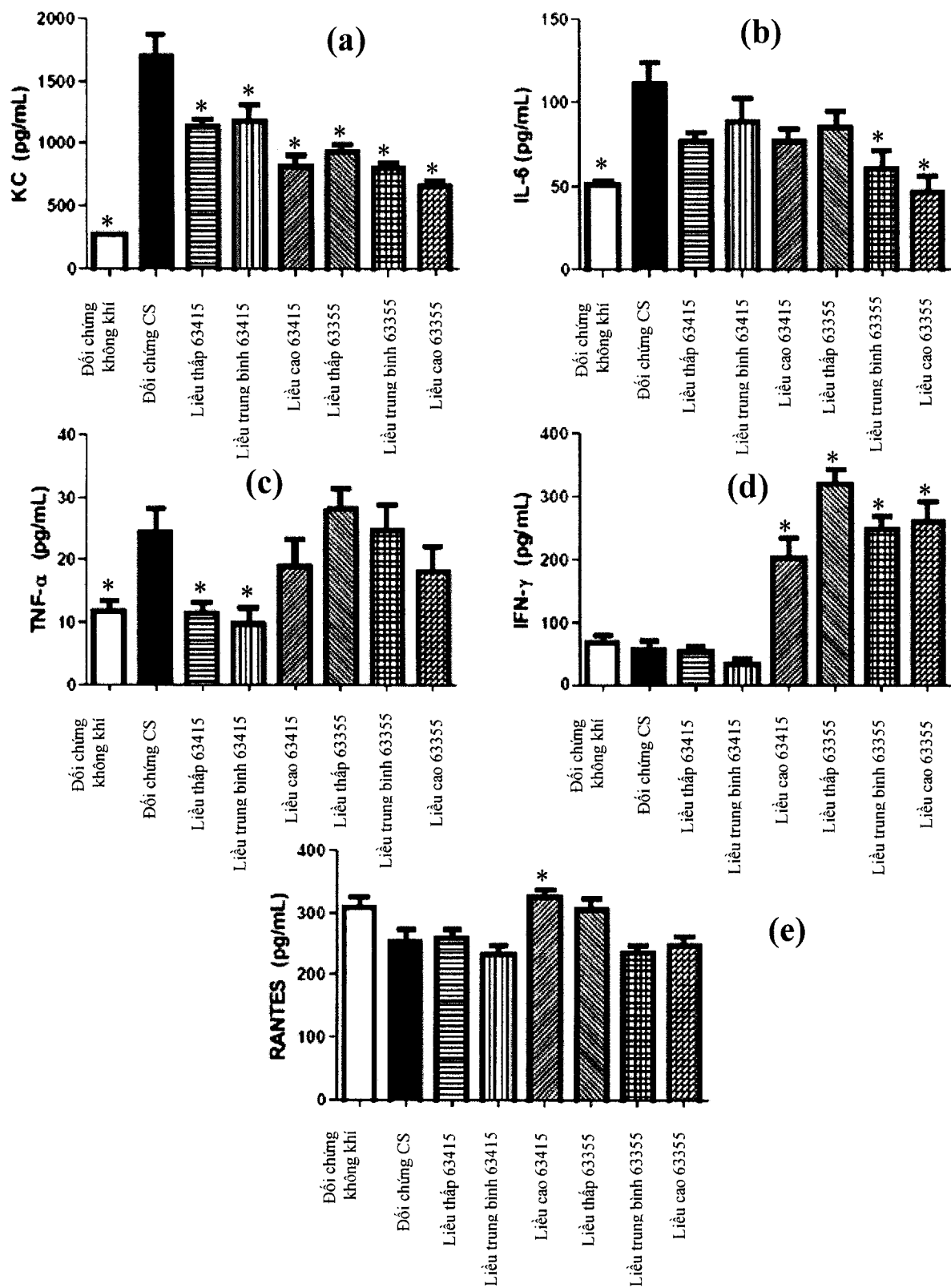


FIG. 22a – e

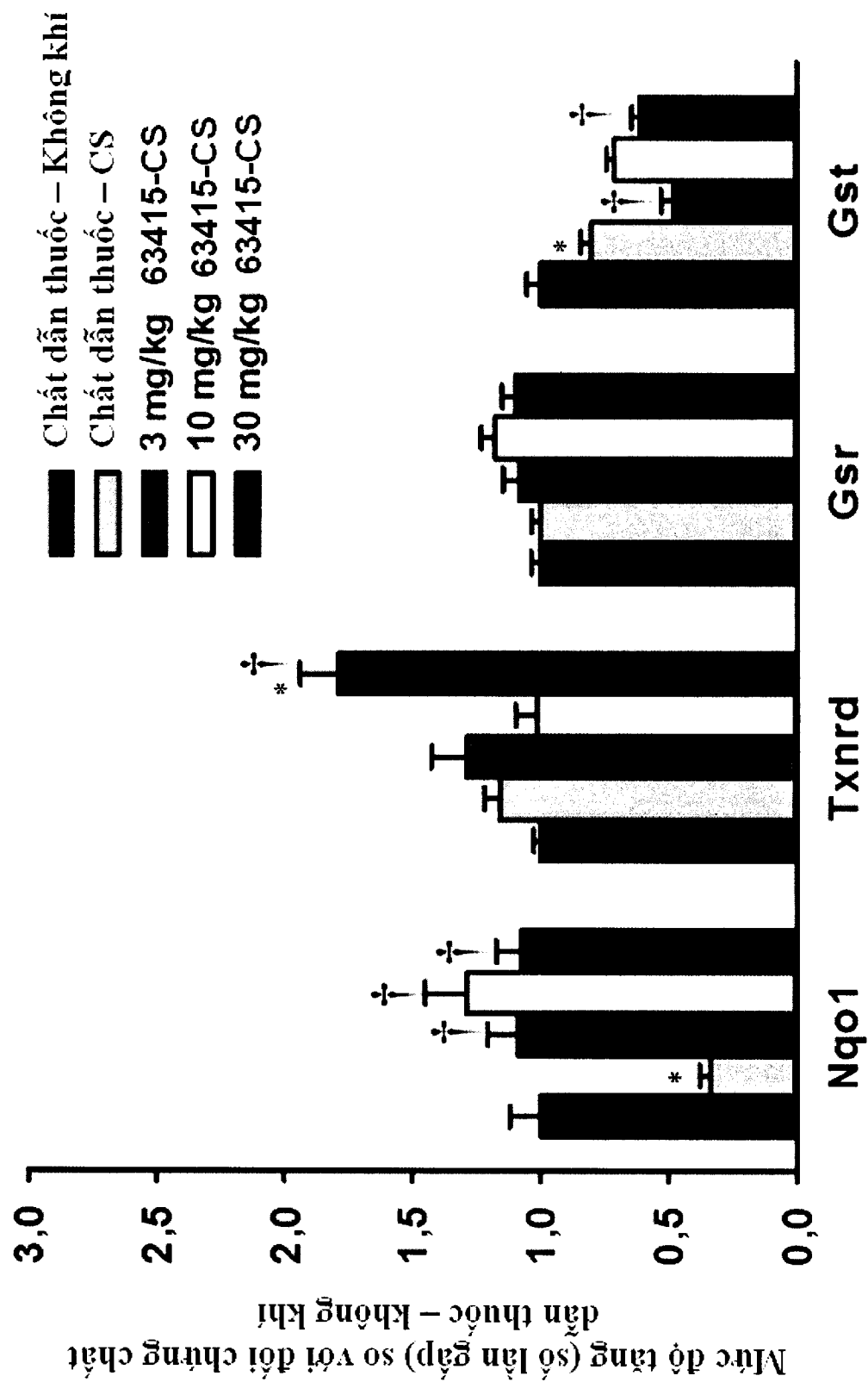
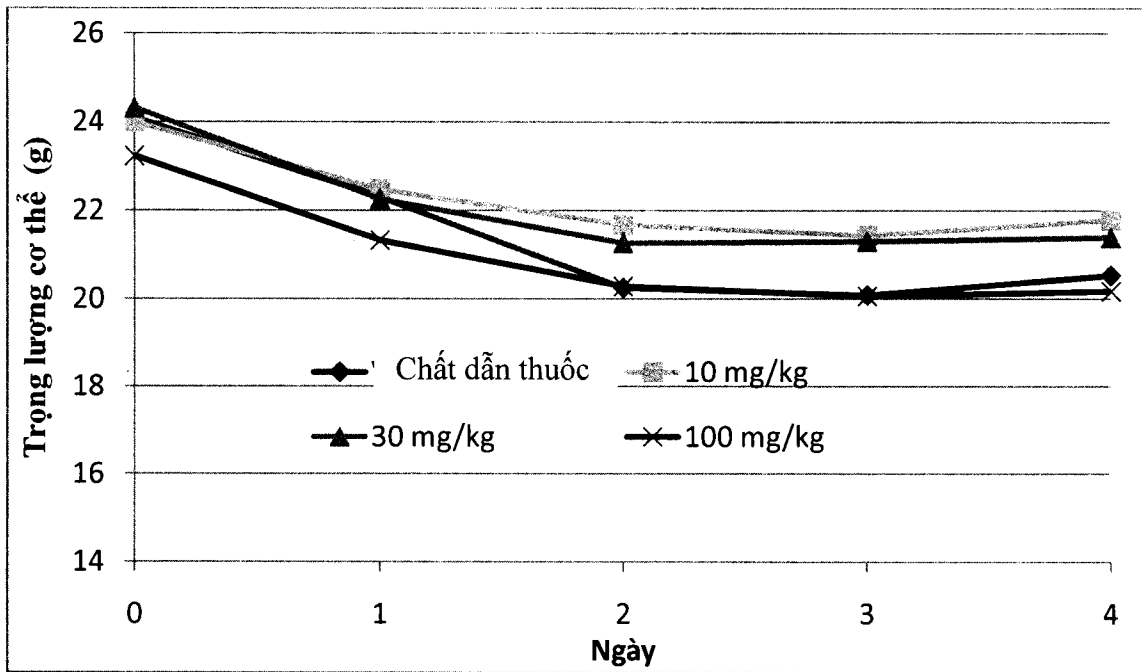


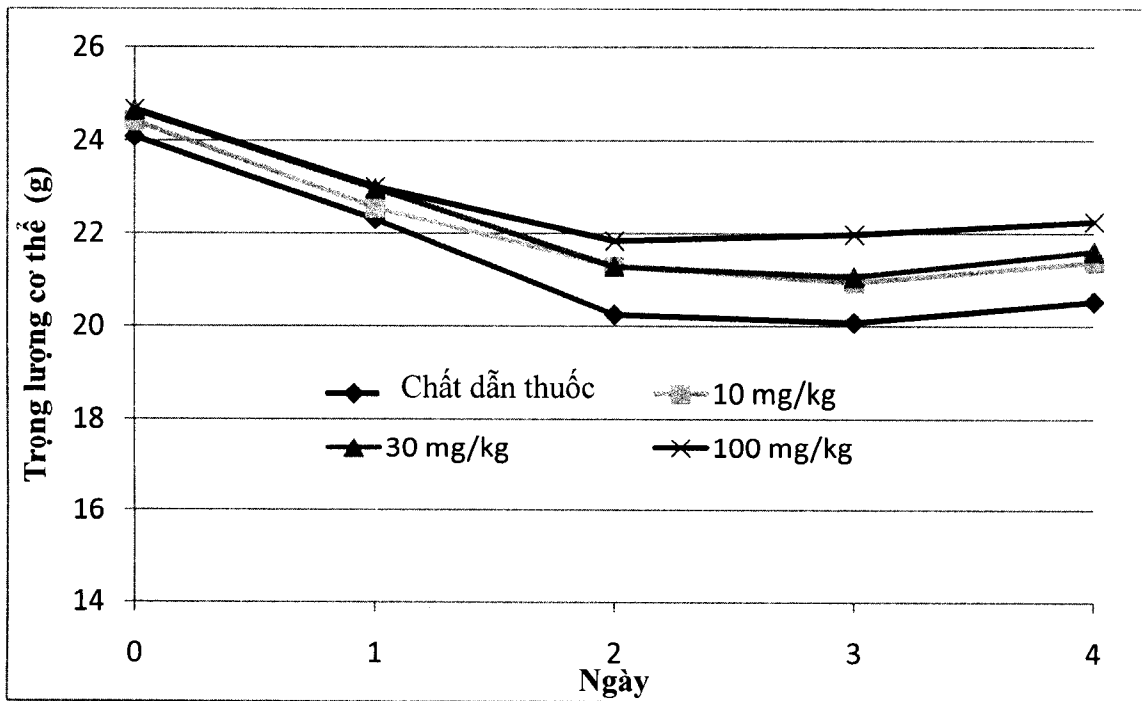
FIG. 23

LPS toàn thân: Trọng lượng cơ thể: 63415



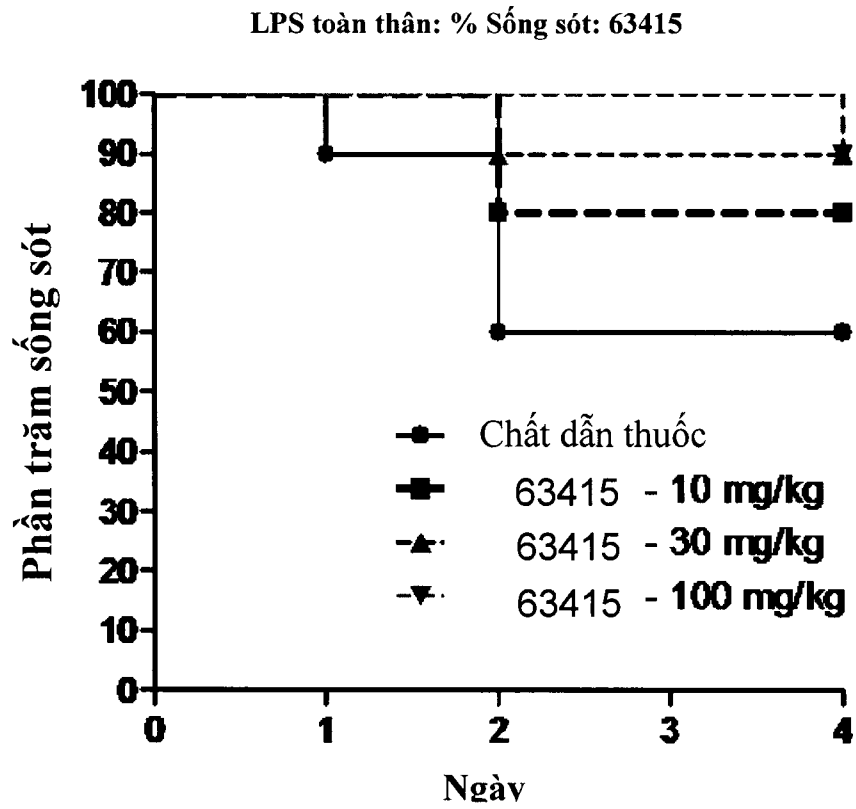
(a)

LPS toàn thân: Trọng lượng cơ thể: RTA 405

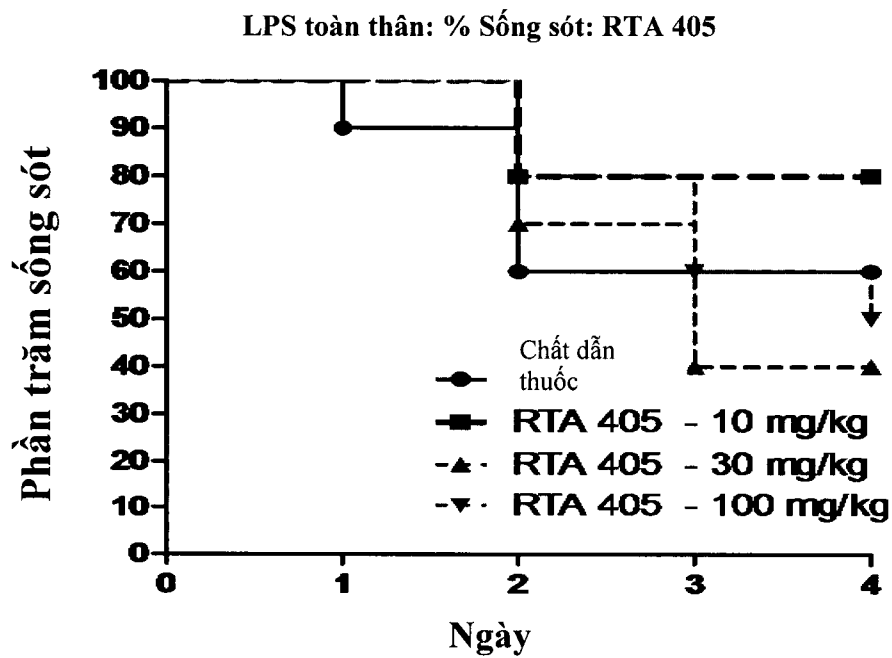


(b)

FIG. 24a & b



(c)



(d)

FIG. 24c & d

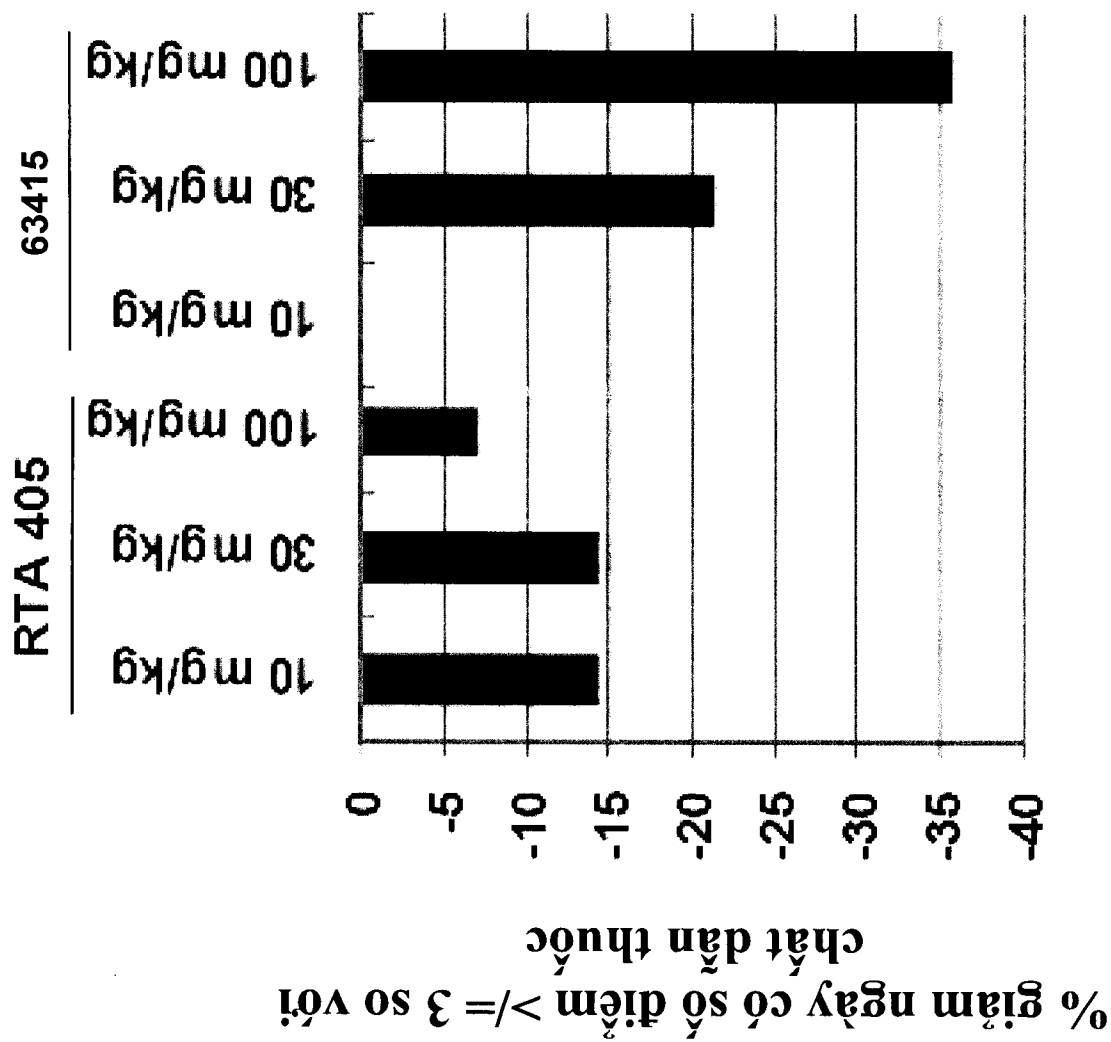


FIG. 25

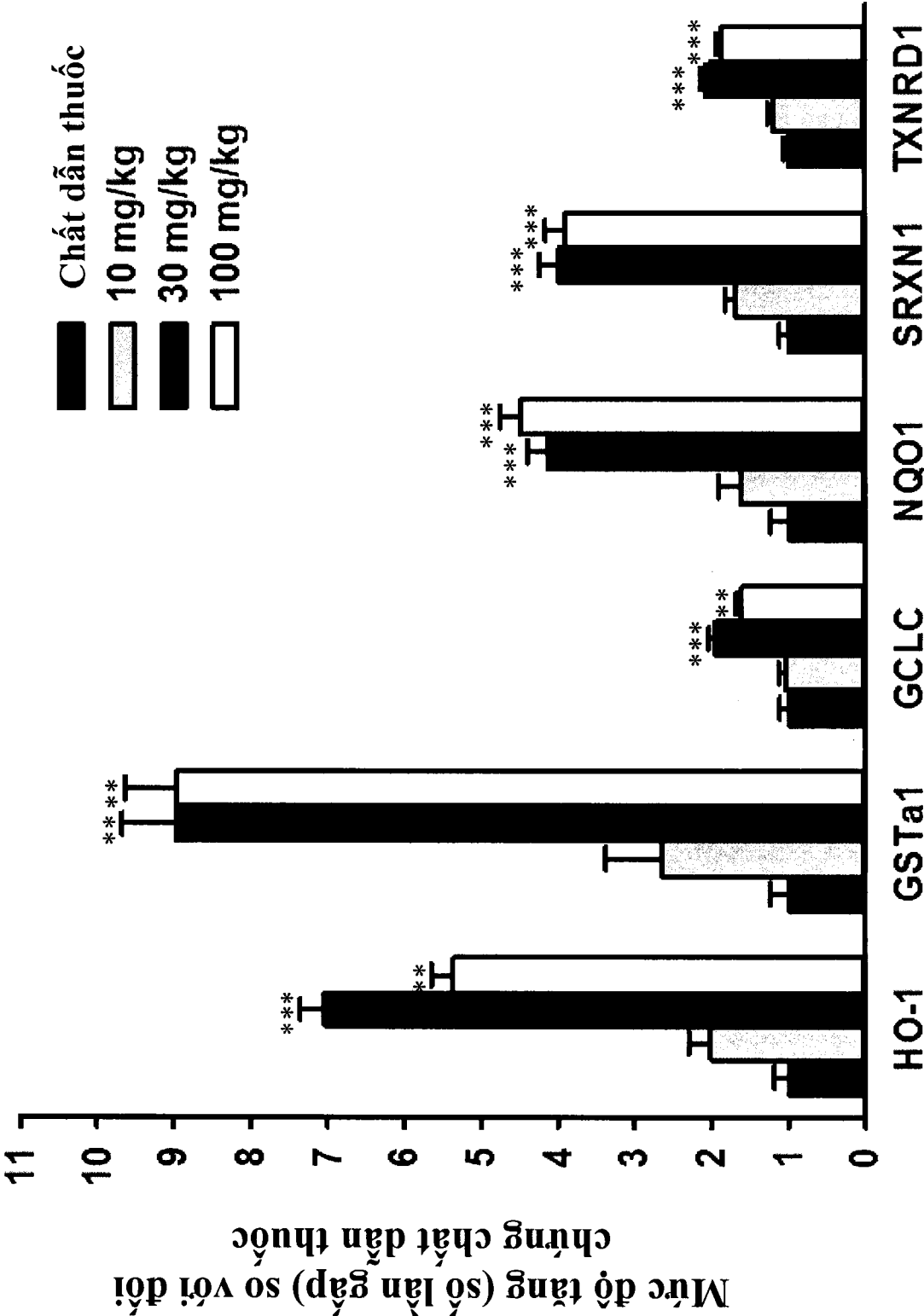
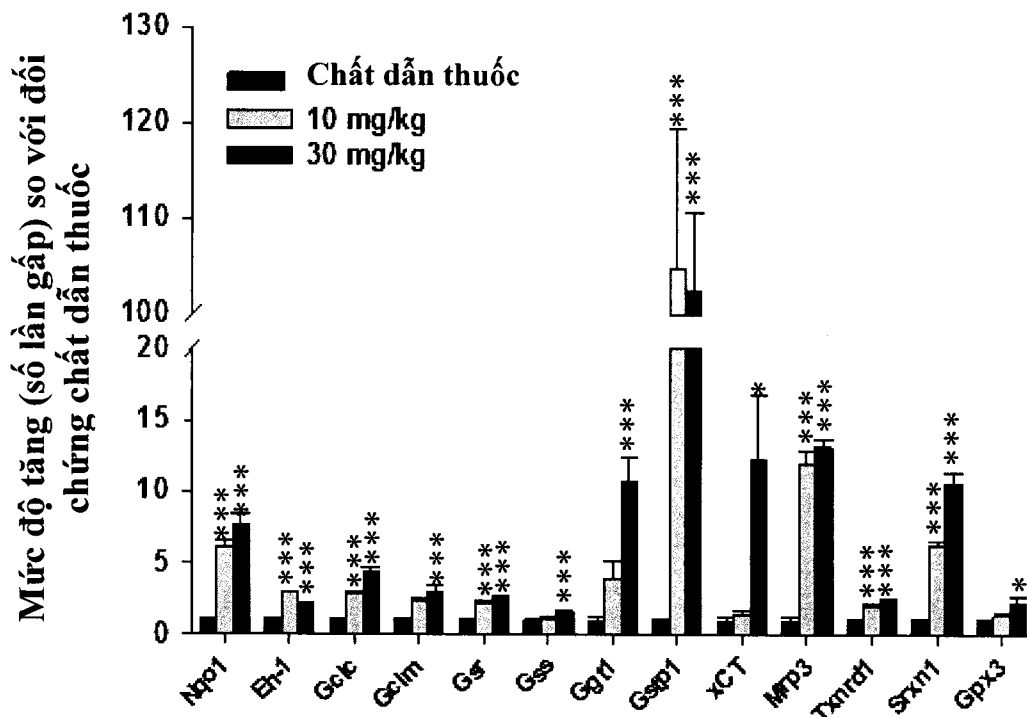
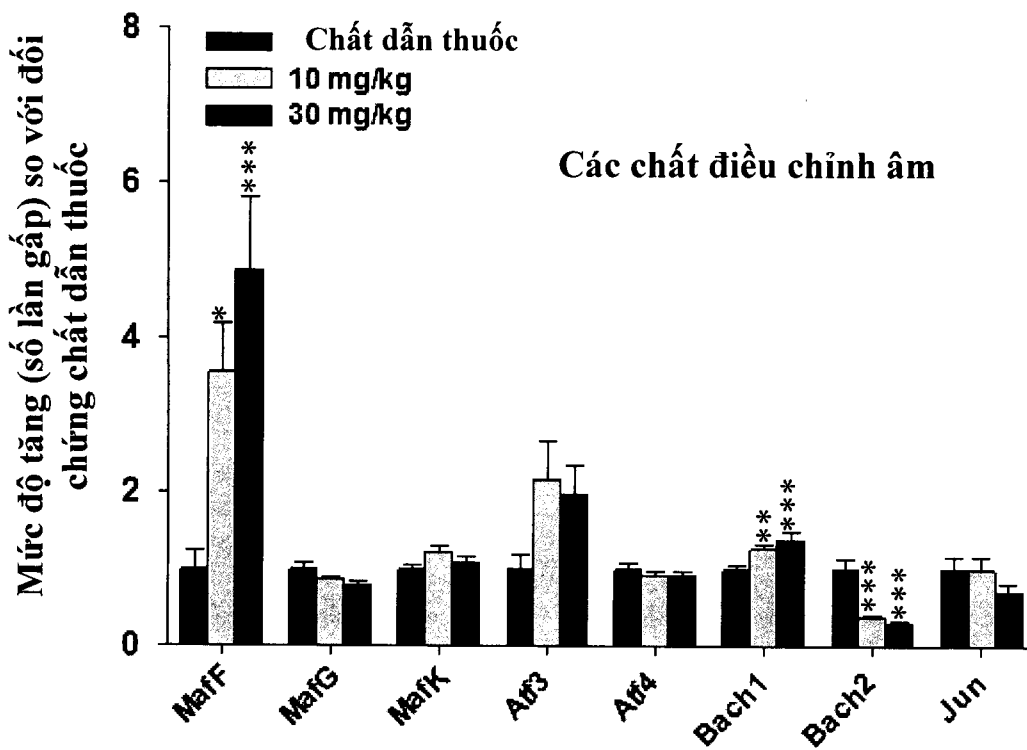


FIG. 26

Các gen đích

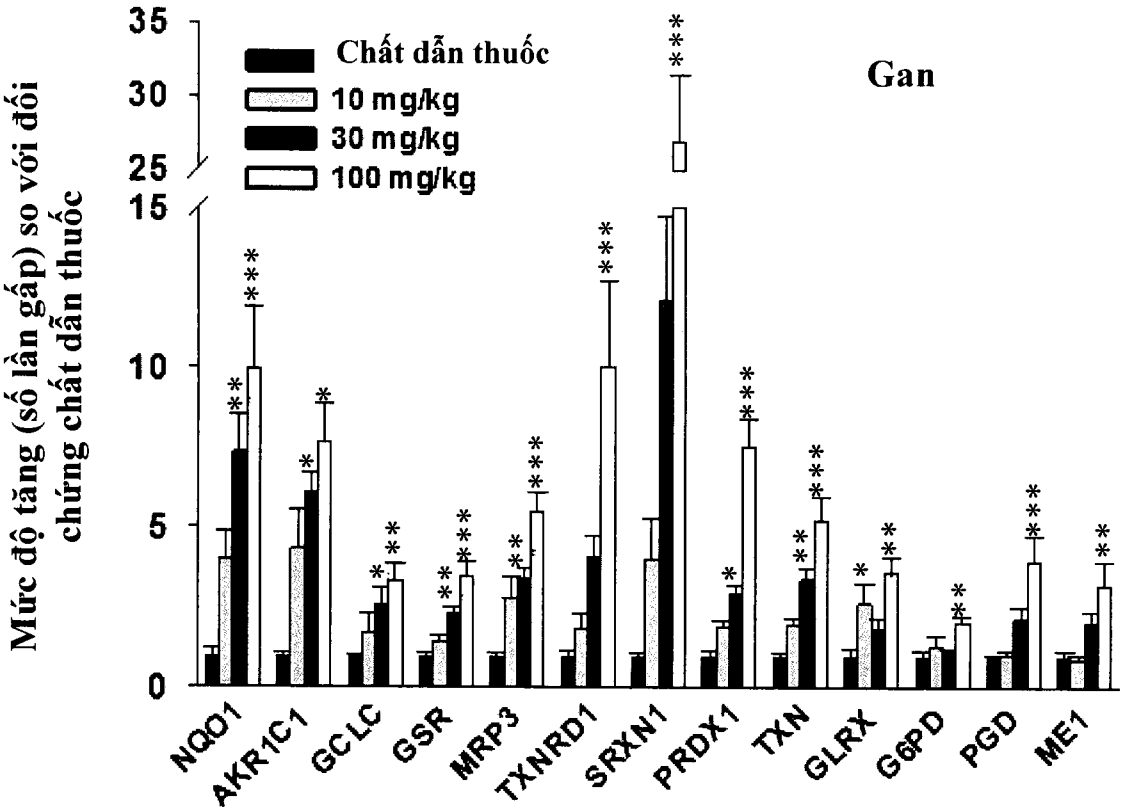


(a)

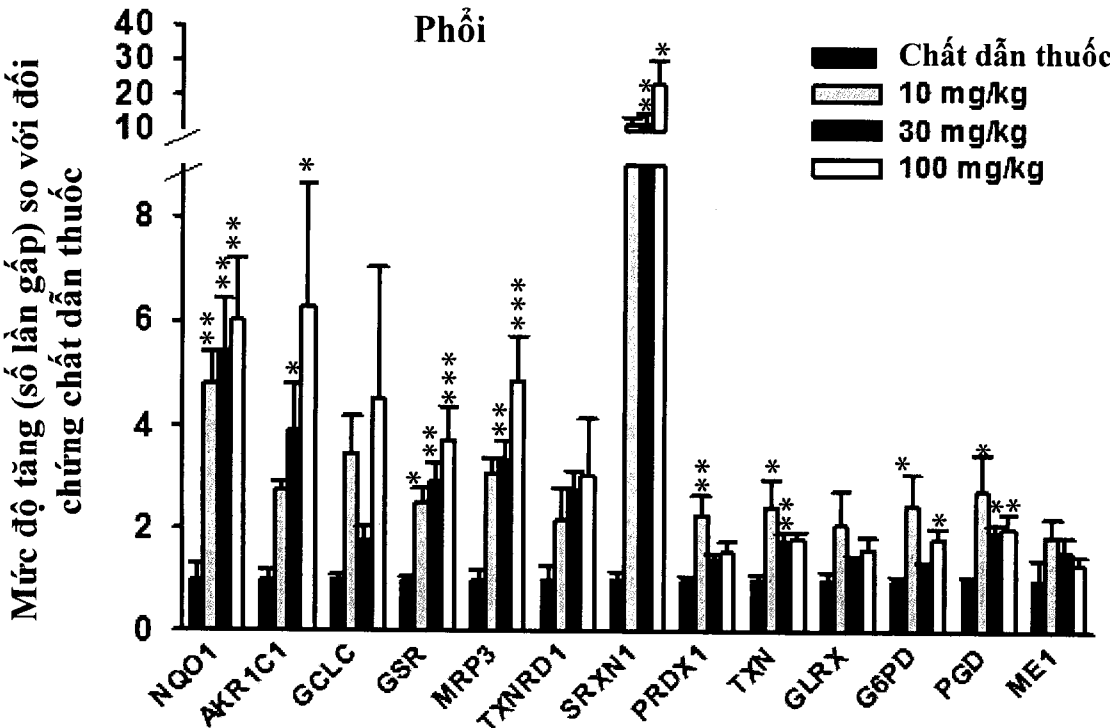


(b)

FIG. 27a & b

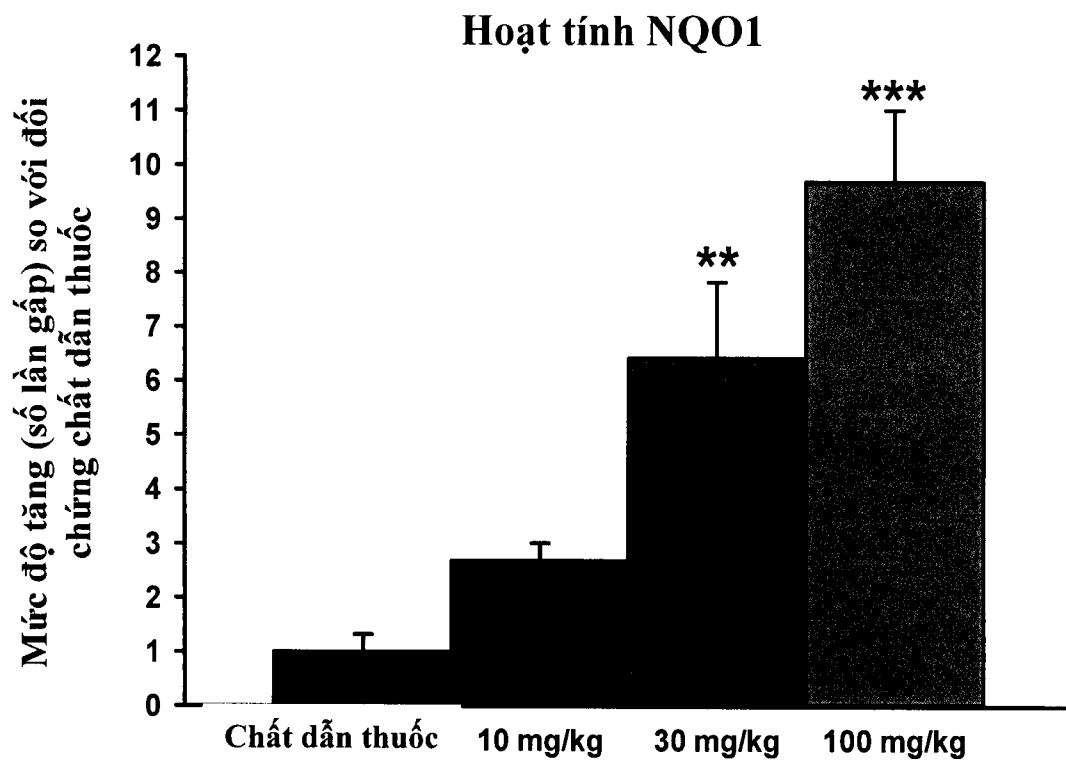


(a)

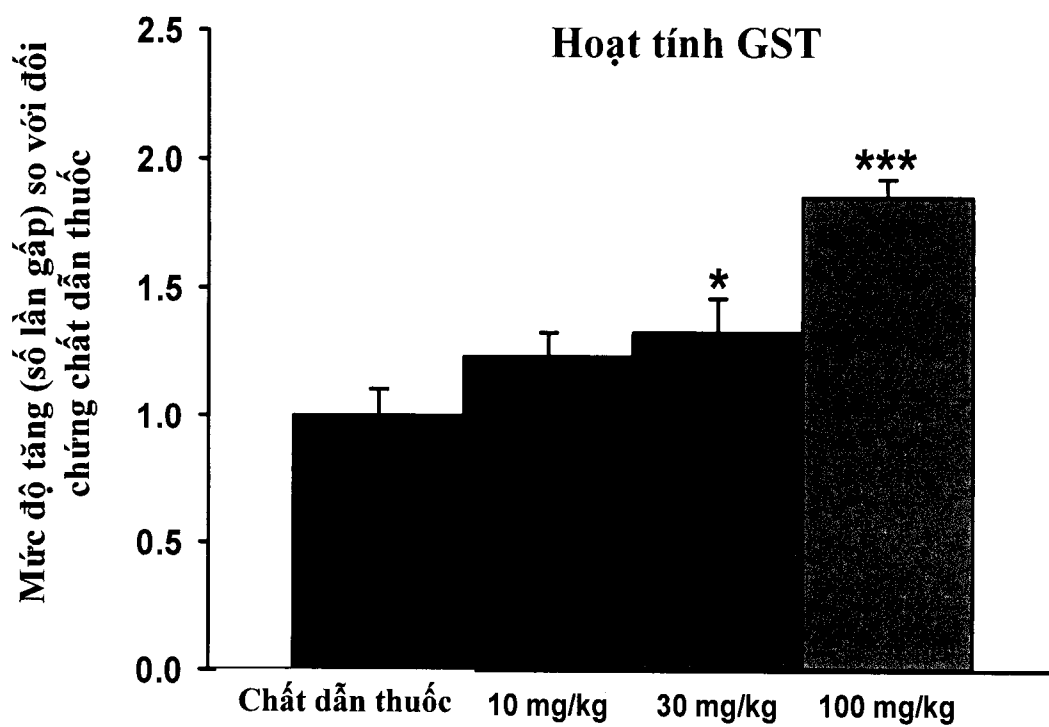


(b)

FIG. 28a & b

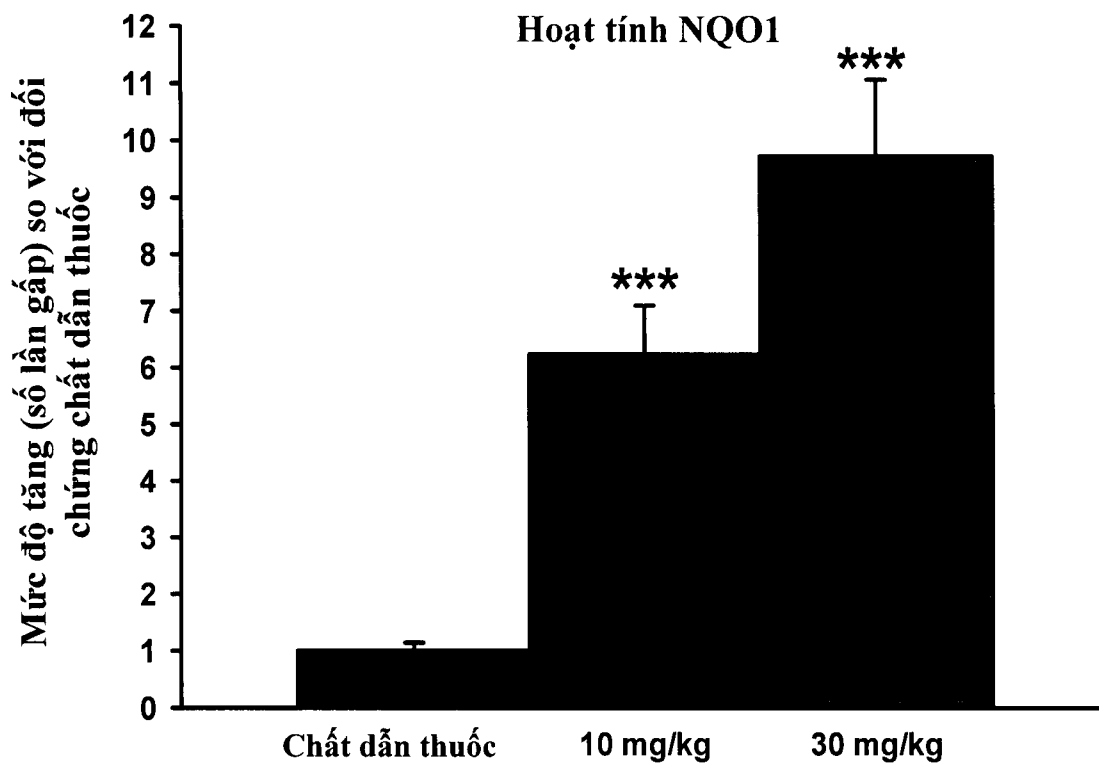


(a)

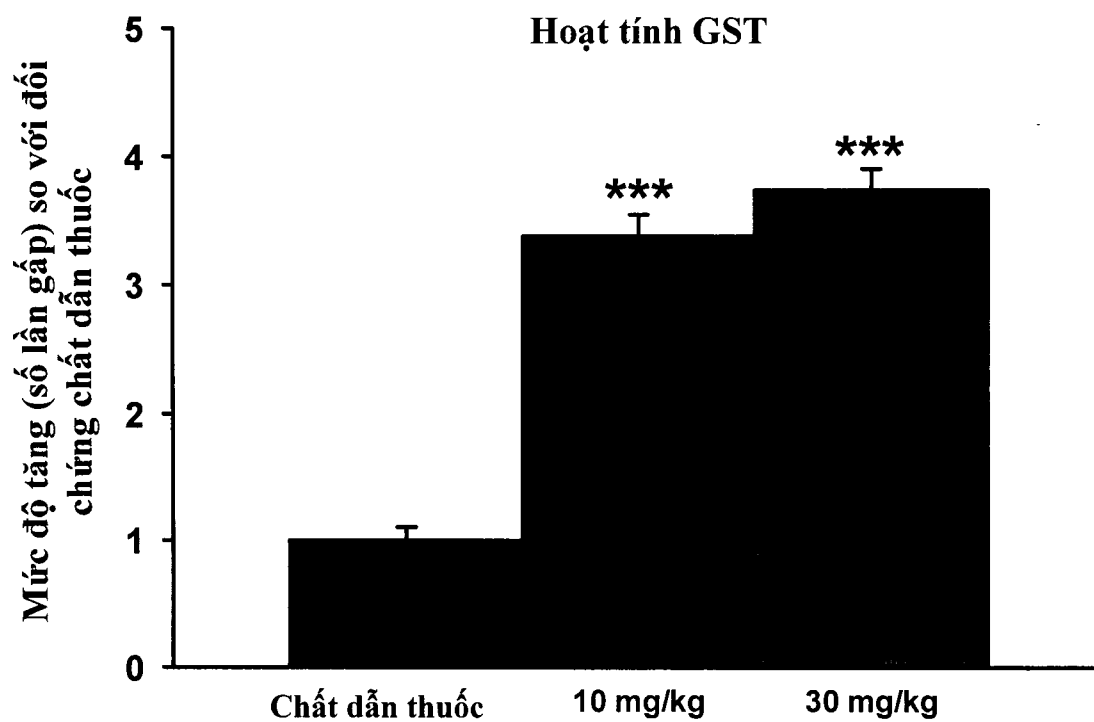


(b)

FIG. 29a & b

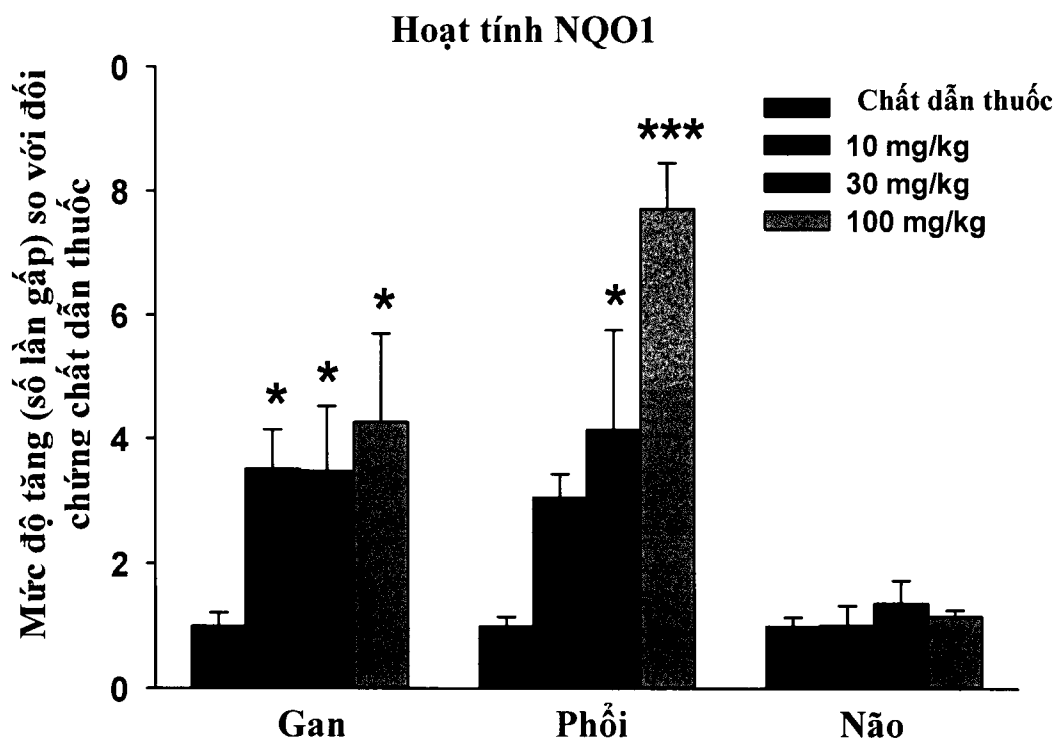


(a)

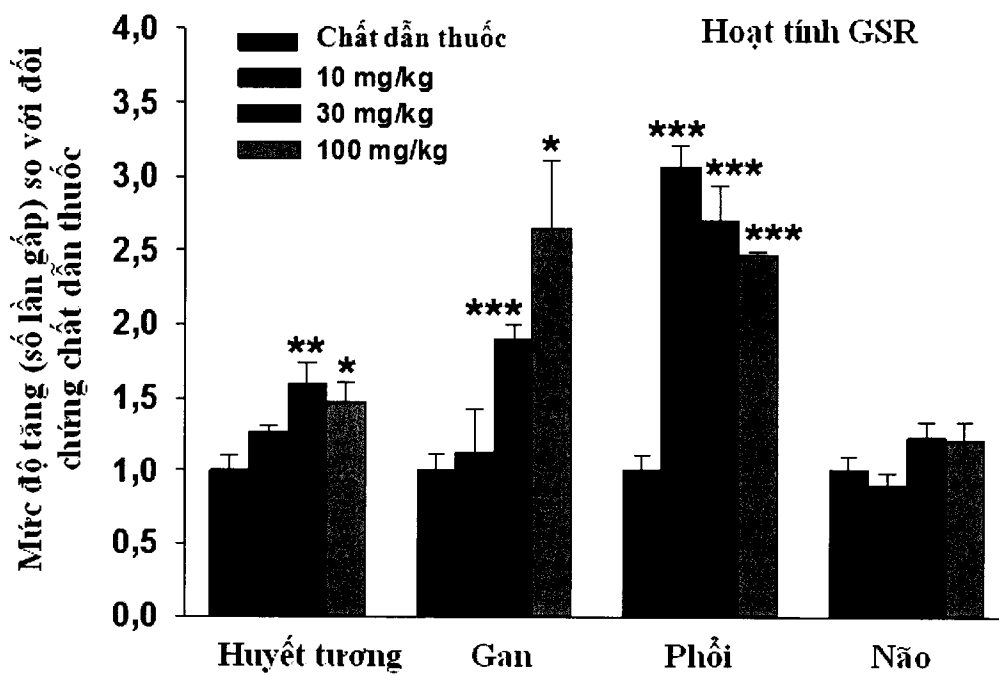


(b)

FIG. 30a & b

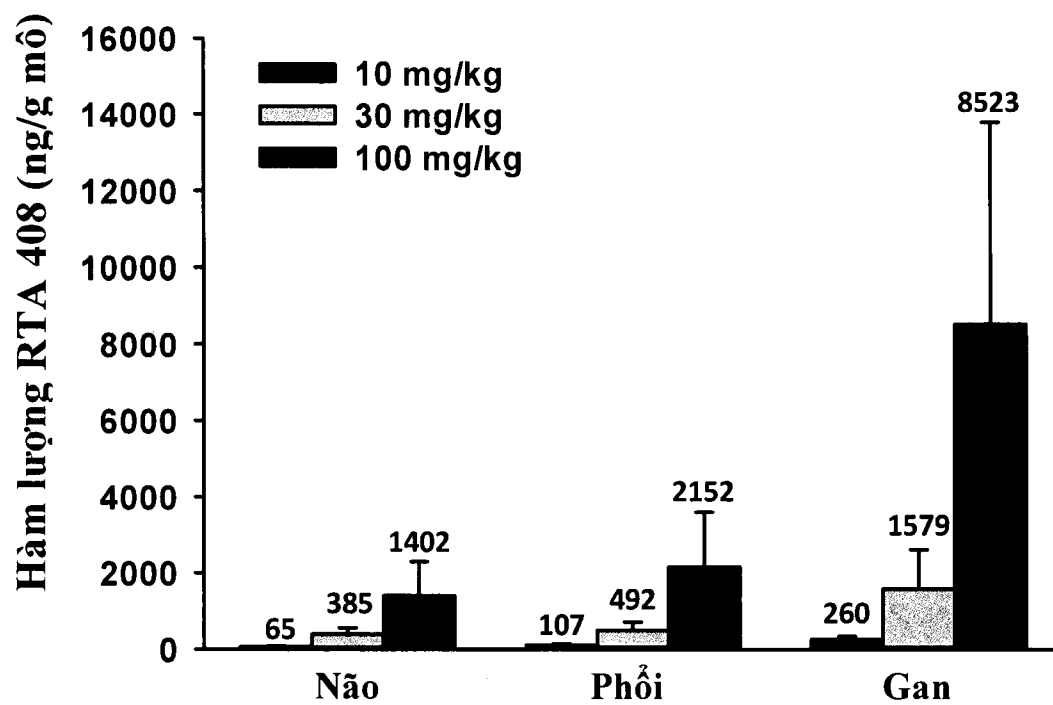


(a)

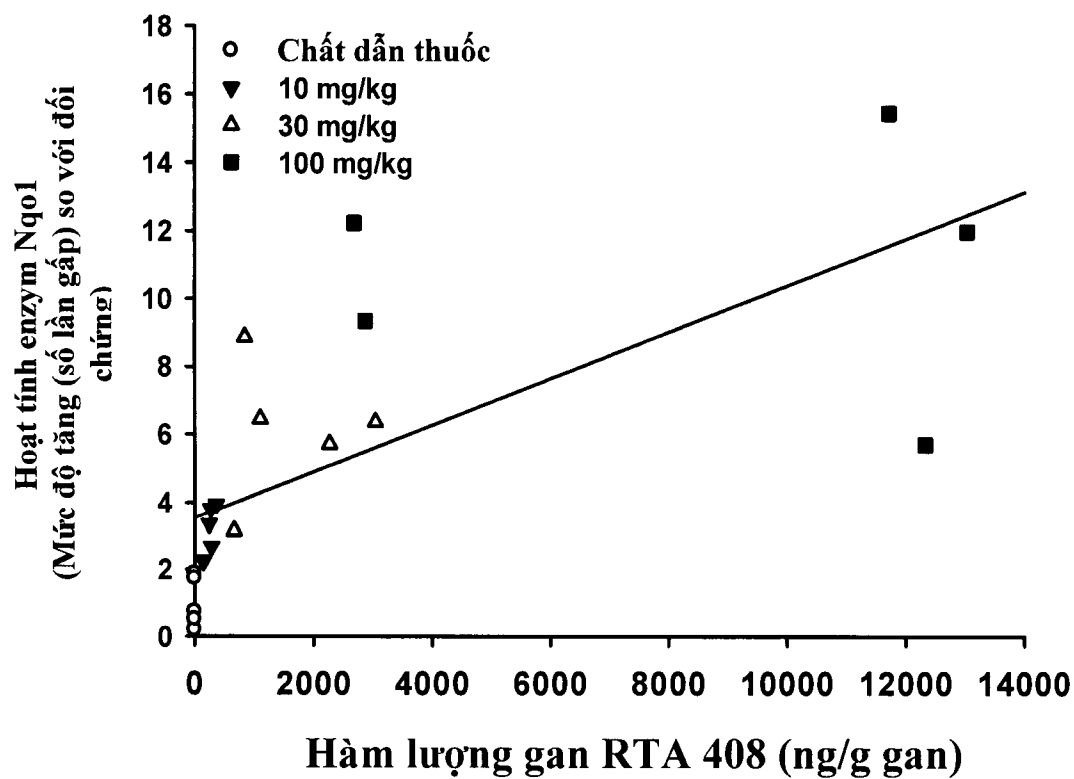


(b)

FIG. 31a & b

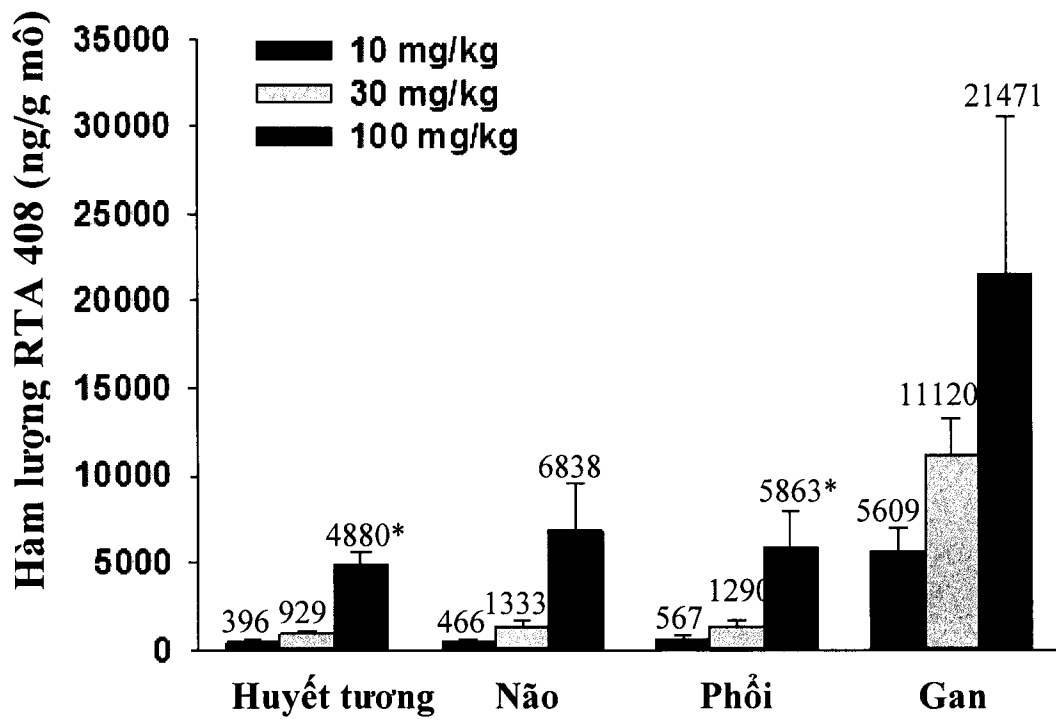


(a)

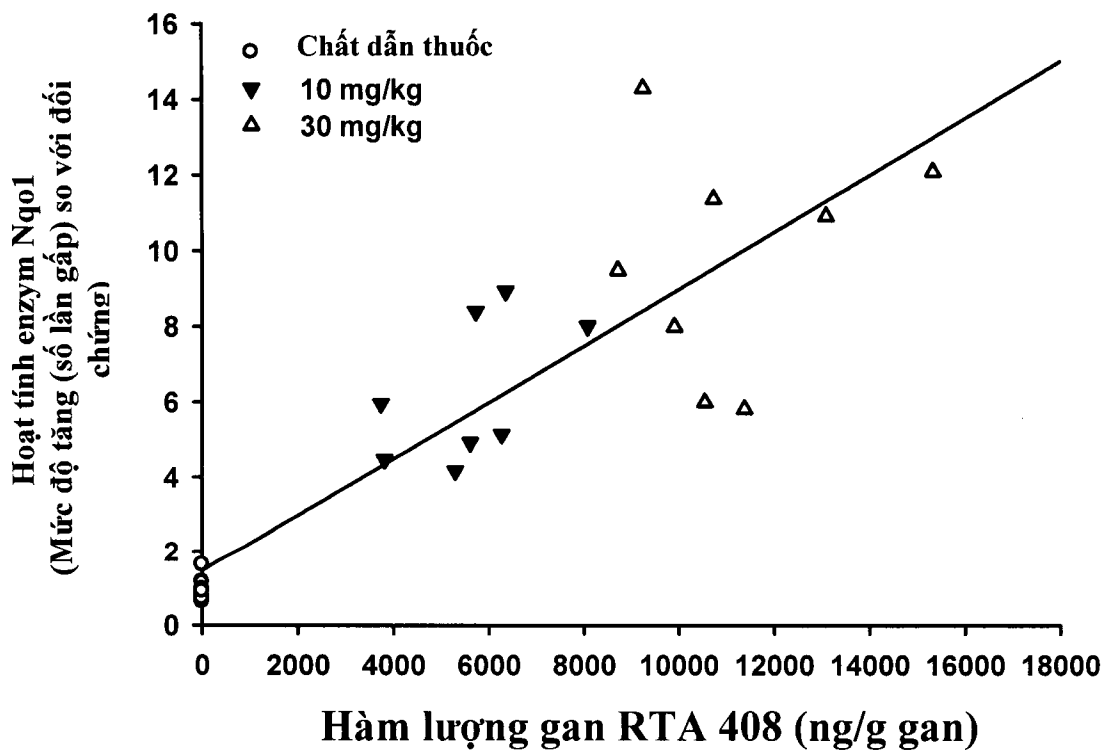


(b)

FIG. 32a & b

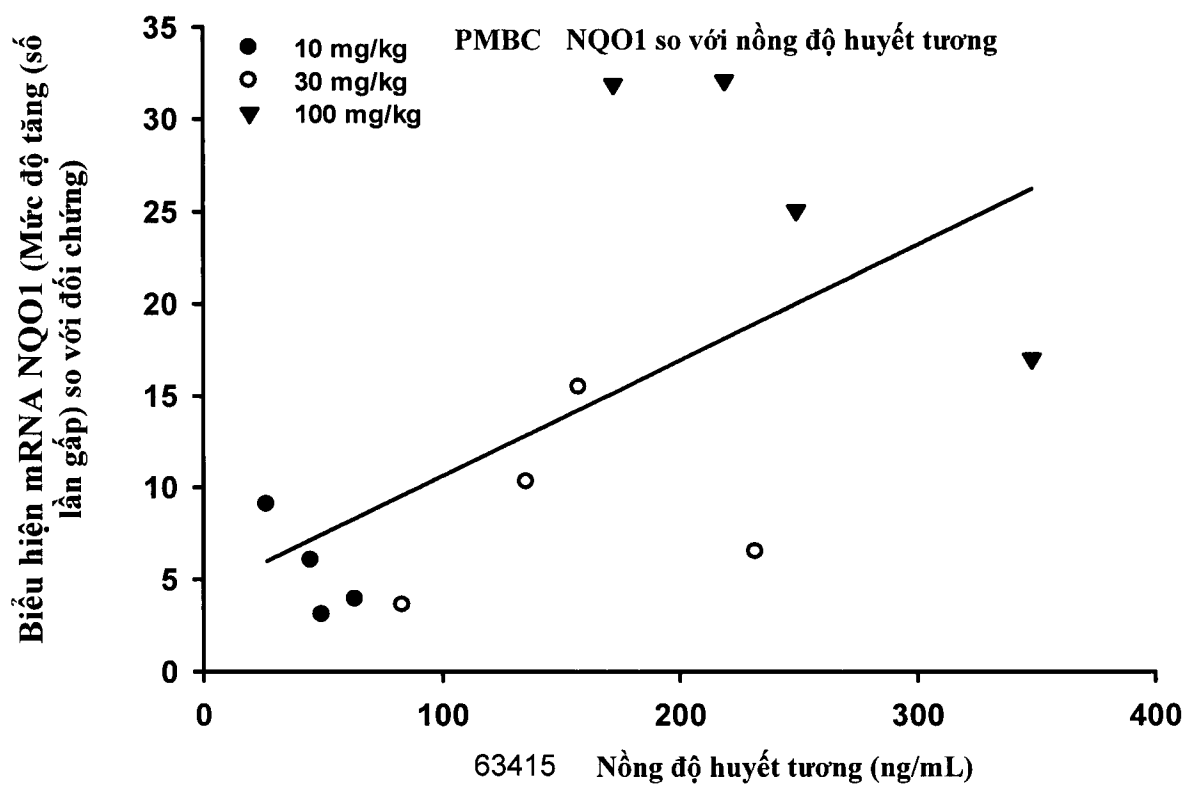


(a)

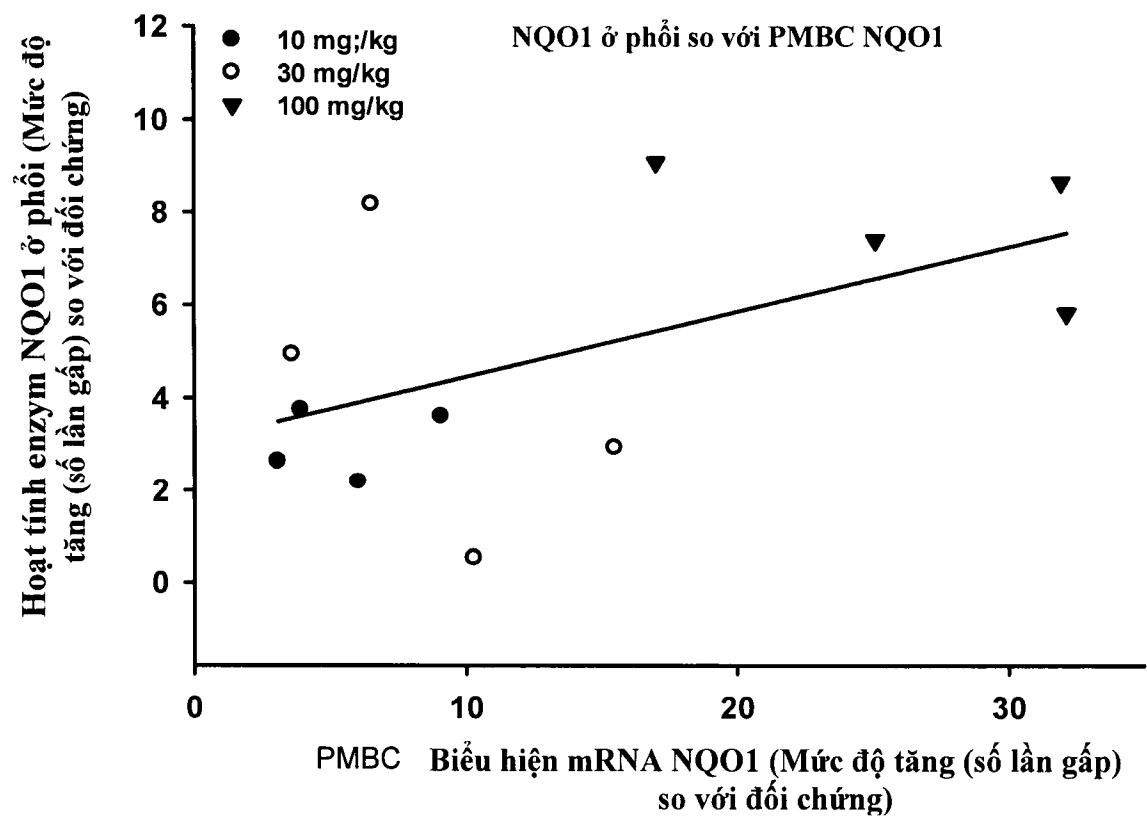


(b)

FIG. 33a & b



(a)



(b)

FIG. 34a & b

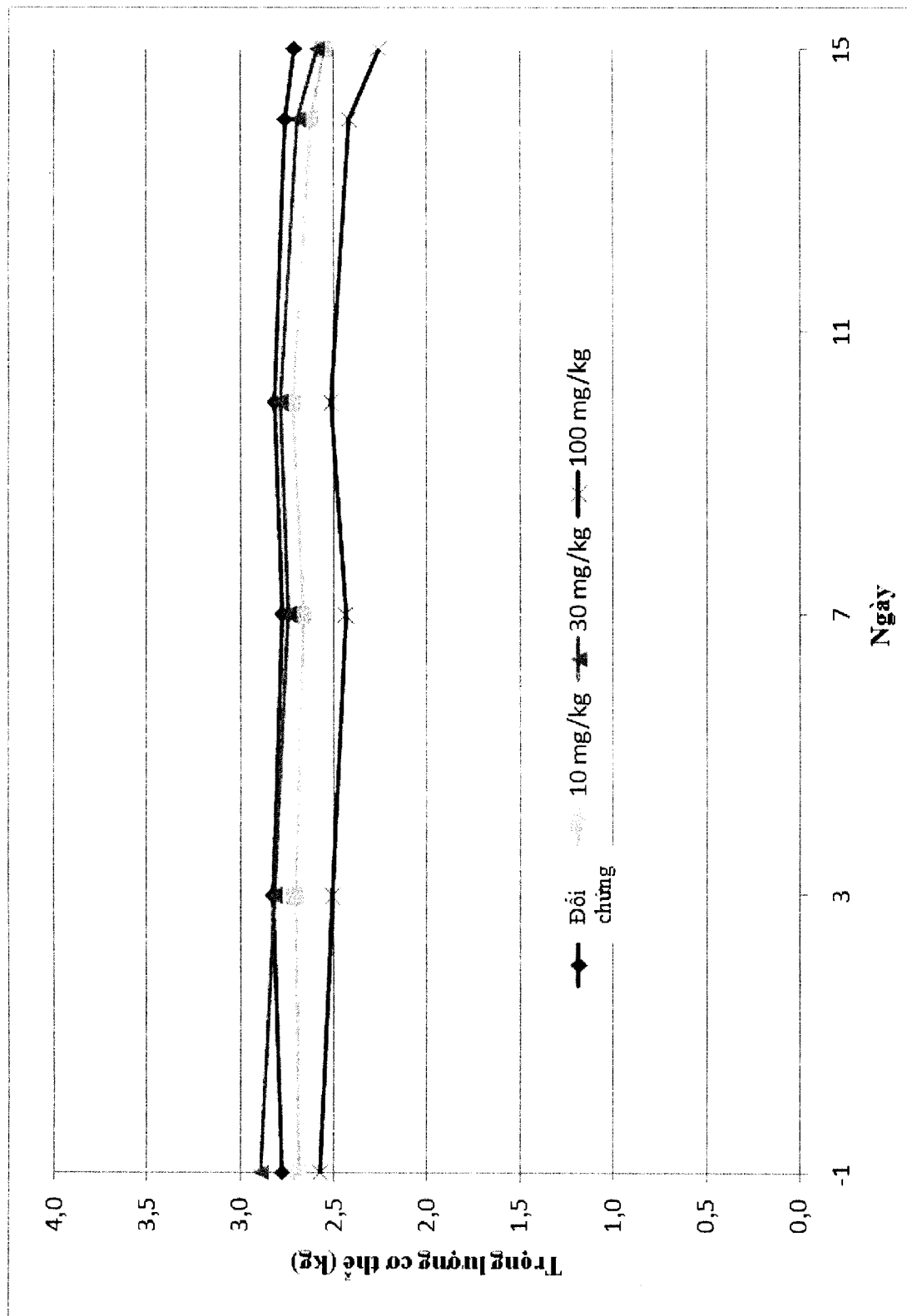


FIG. 35

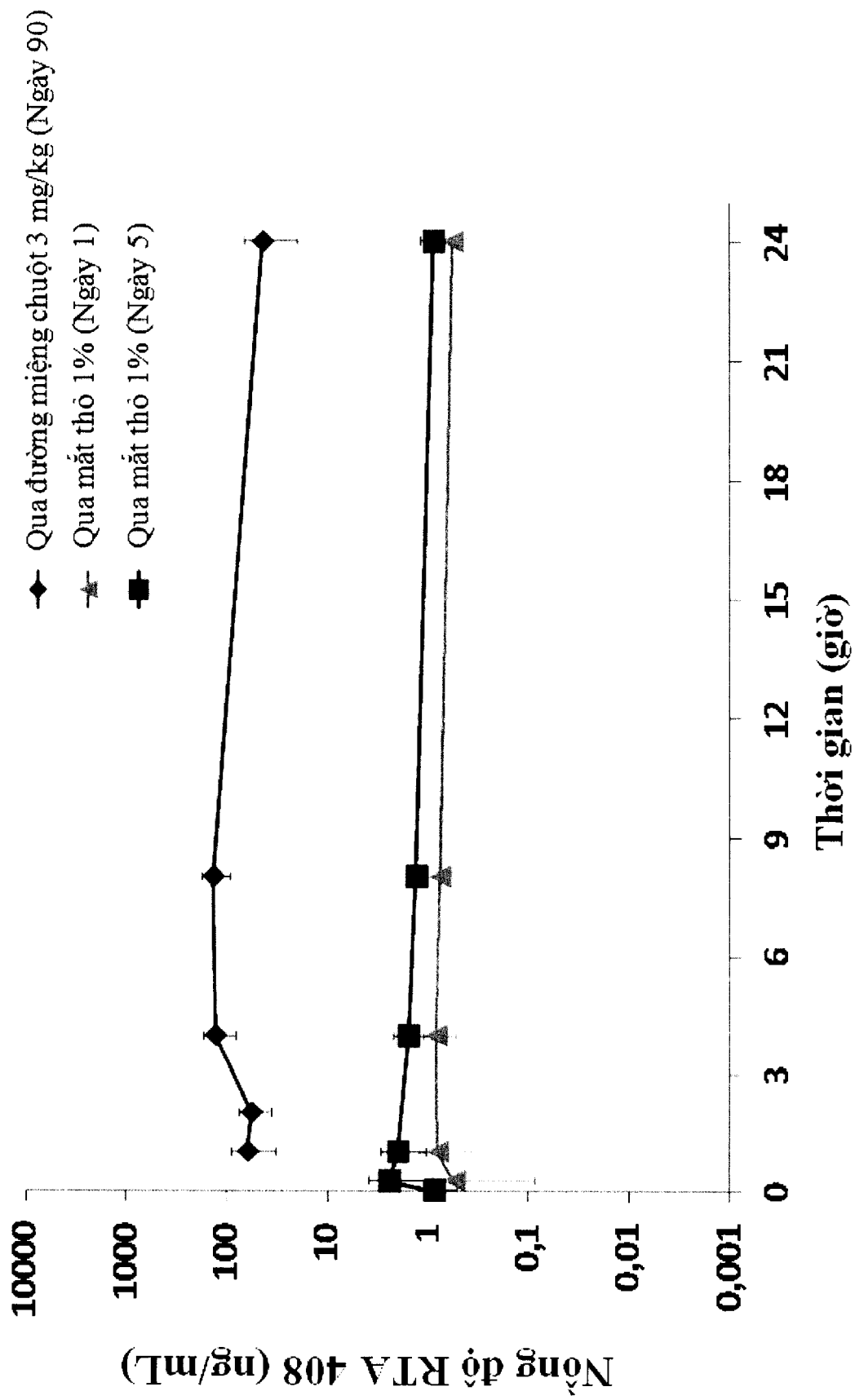
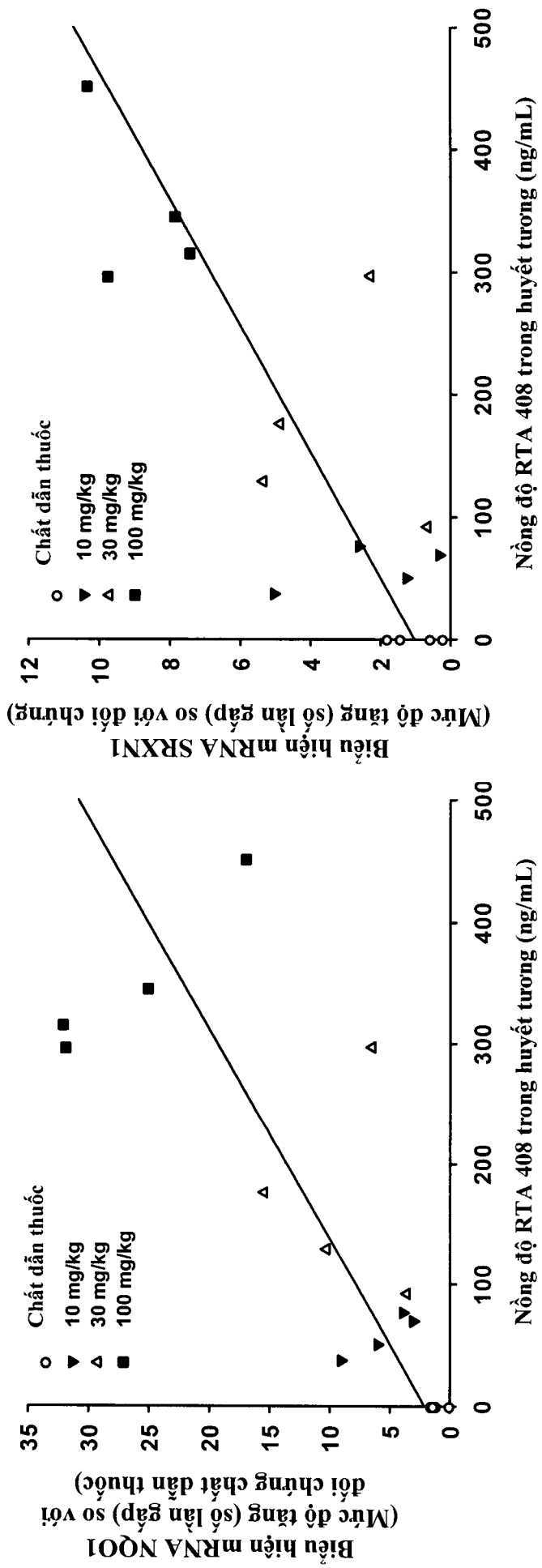


FIG. 36

NQO1

SRXN1



(a) (b)

FIG. 37a & b

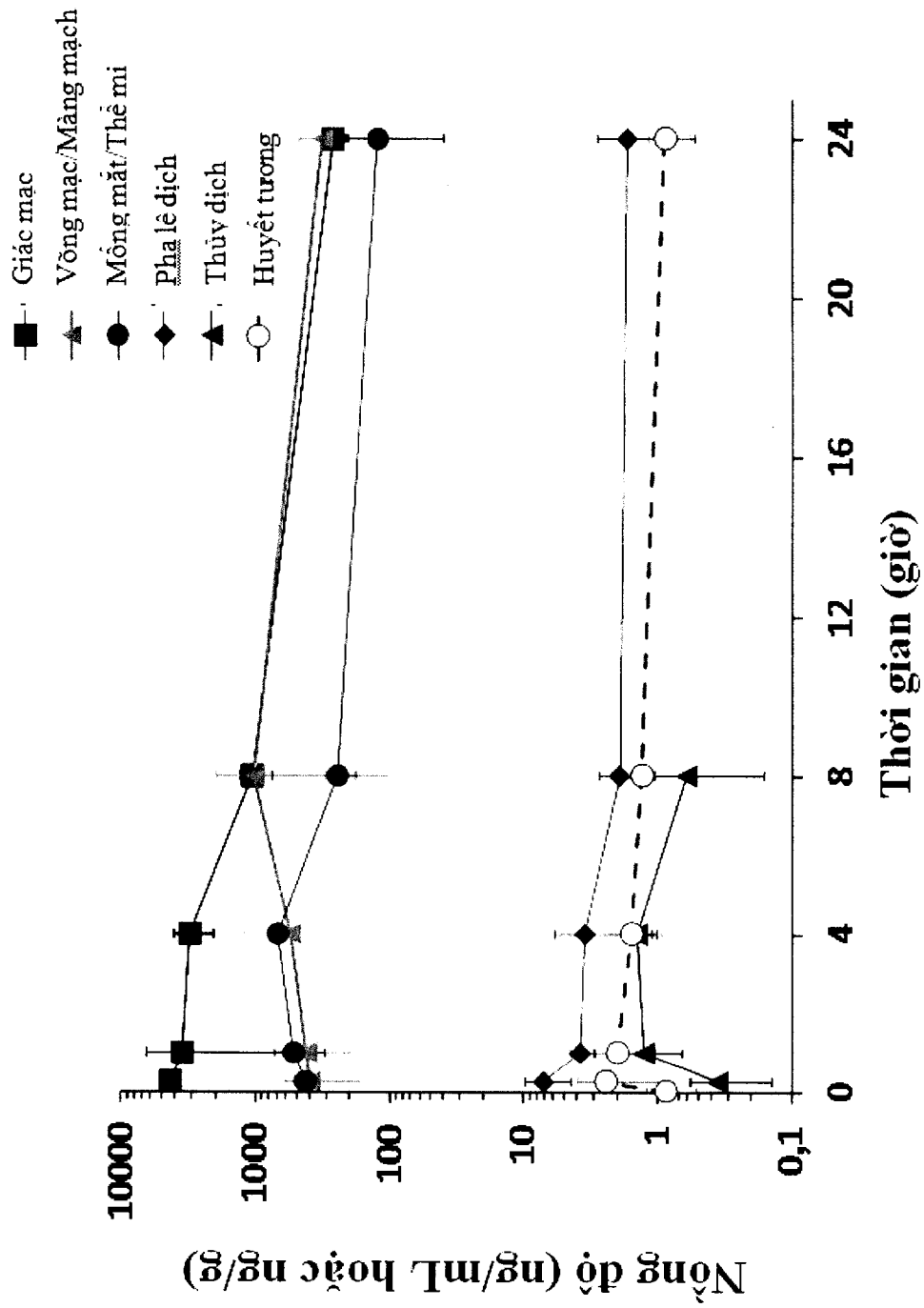


FIG. 38

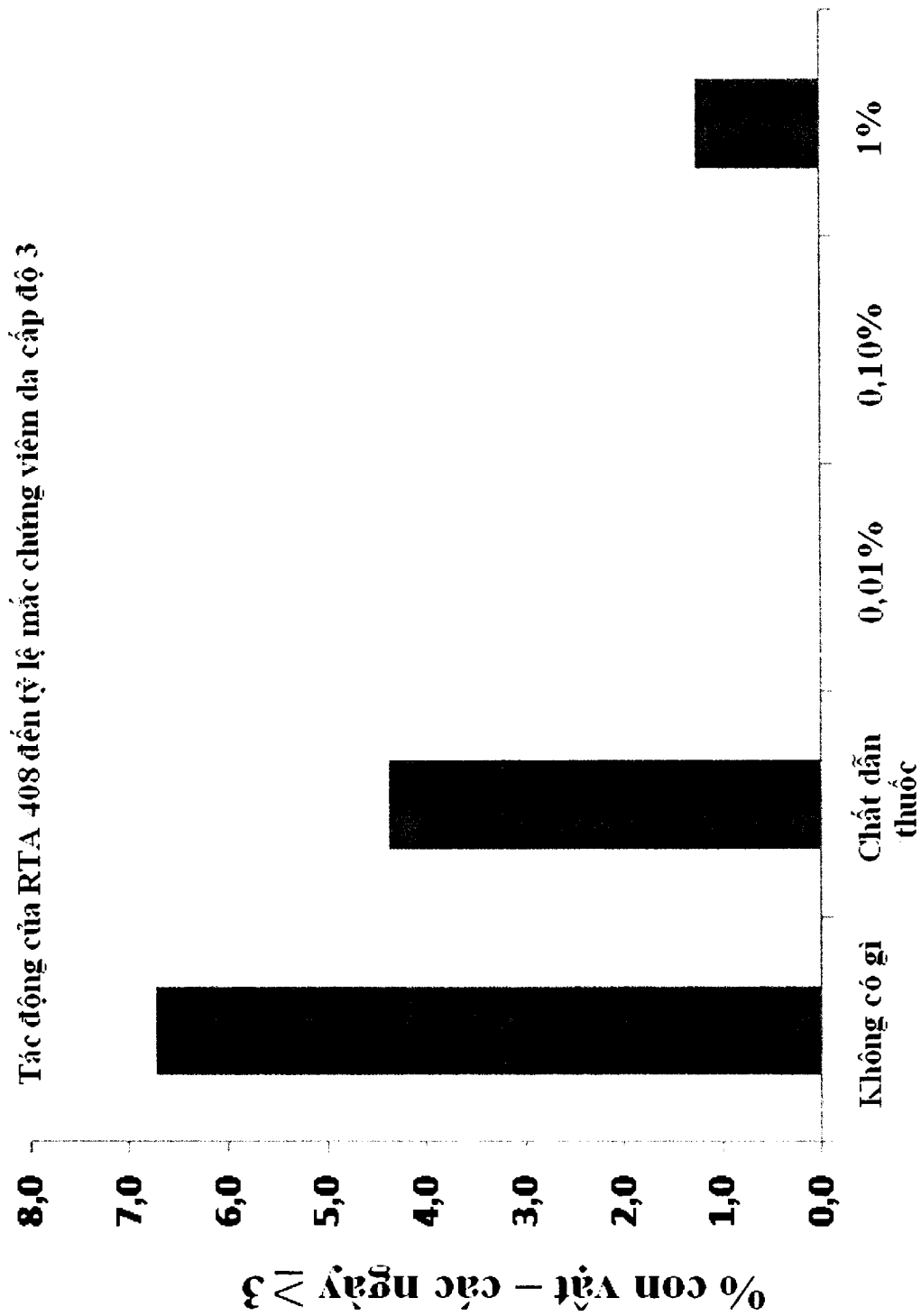


FIG. 39

Tác động của RTA 408 đến tỷ lệ mắc chứng viêm da cấp độ 2 qua ngày 30

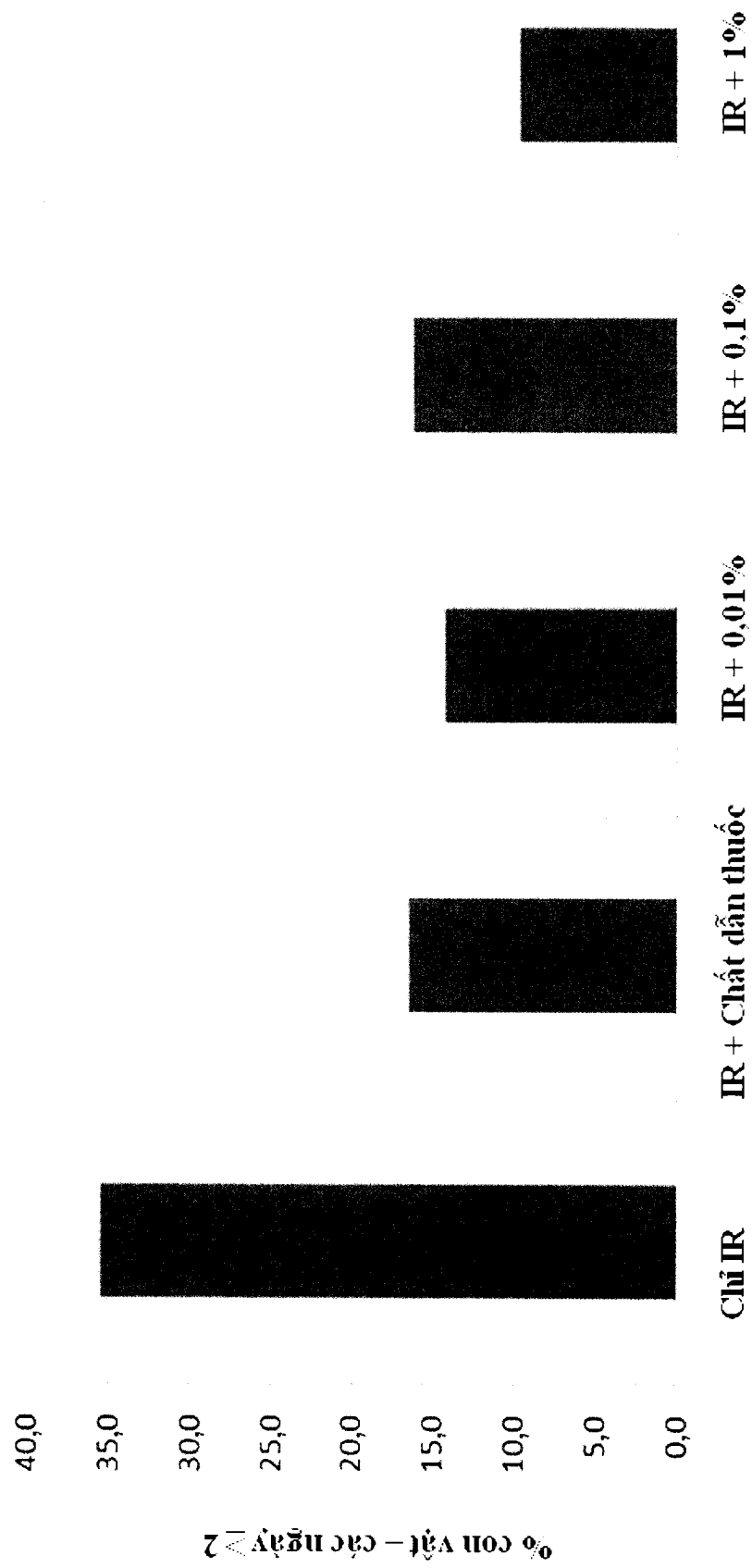


FIG. 40

Tác động của RTA 408 đến tỷ lệ mắc chứng viêm da cấp độ 3 cho đến ngày 28

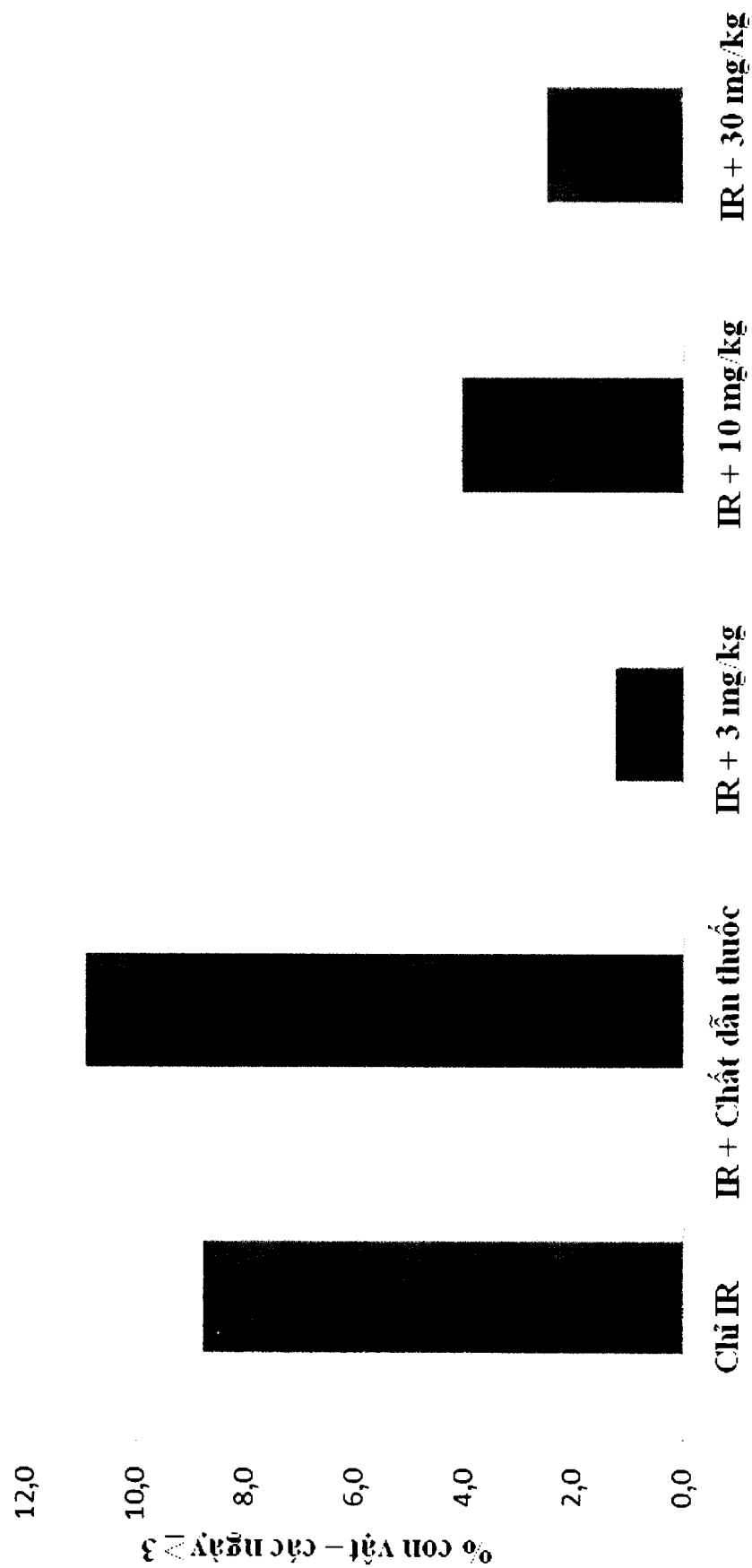
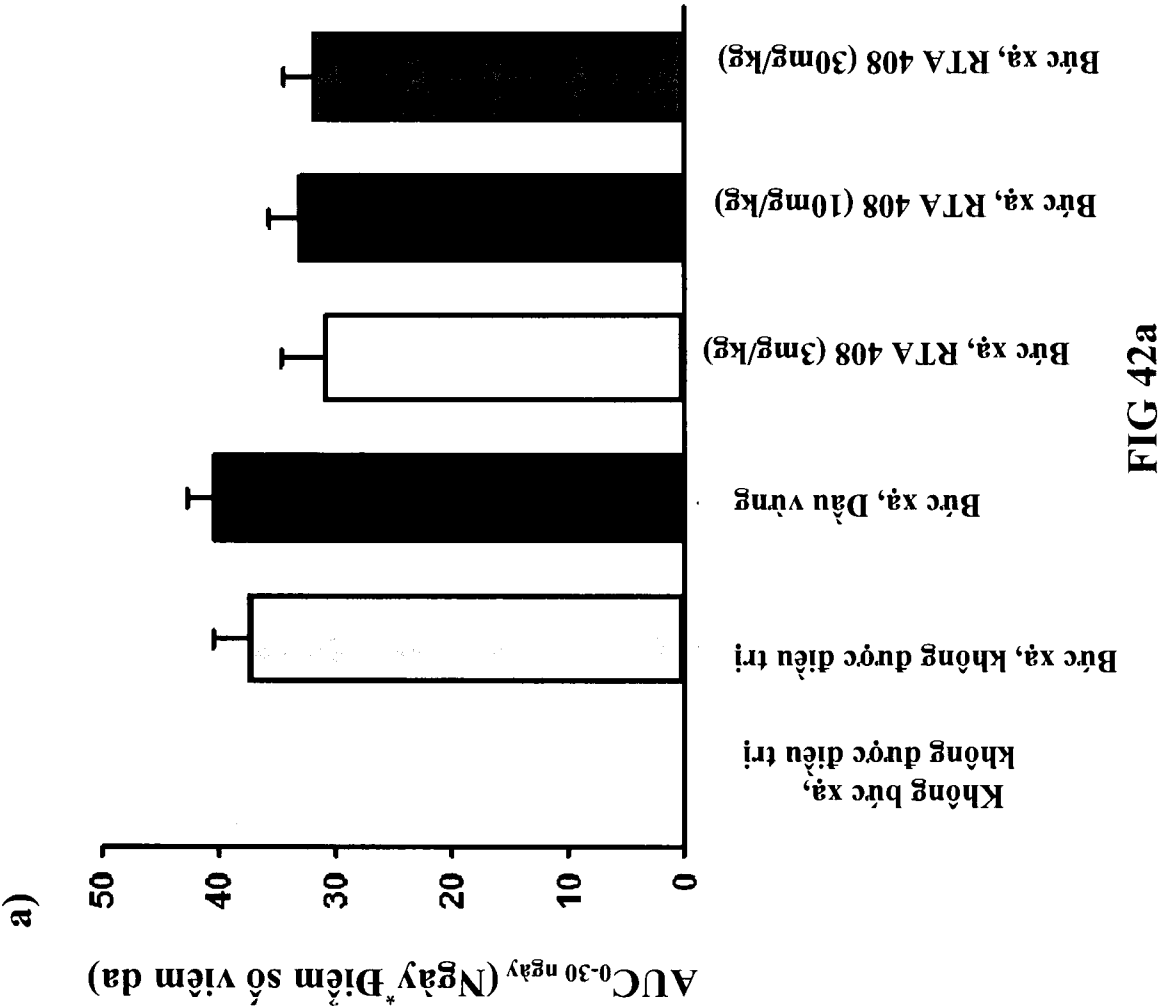


FIG. 41



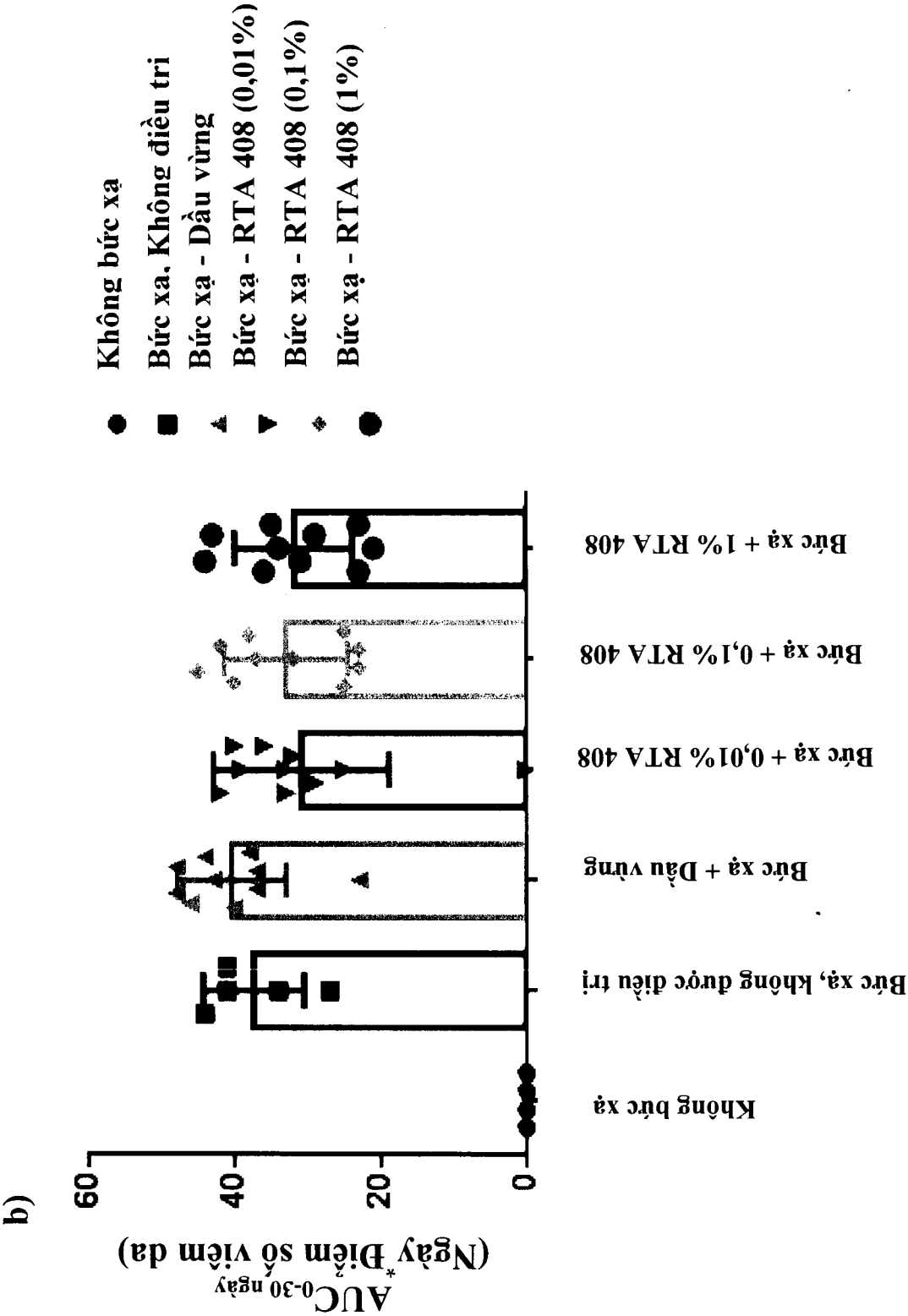


FIG.42b

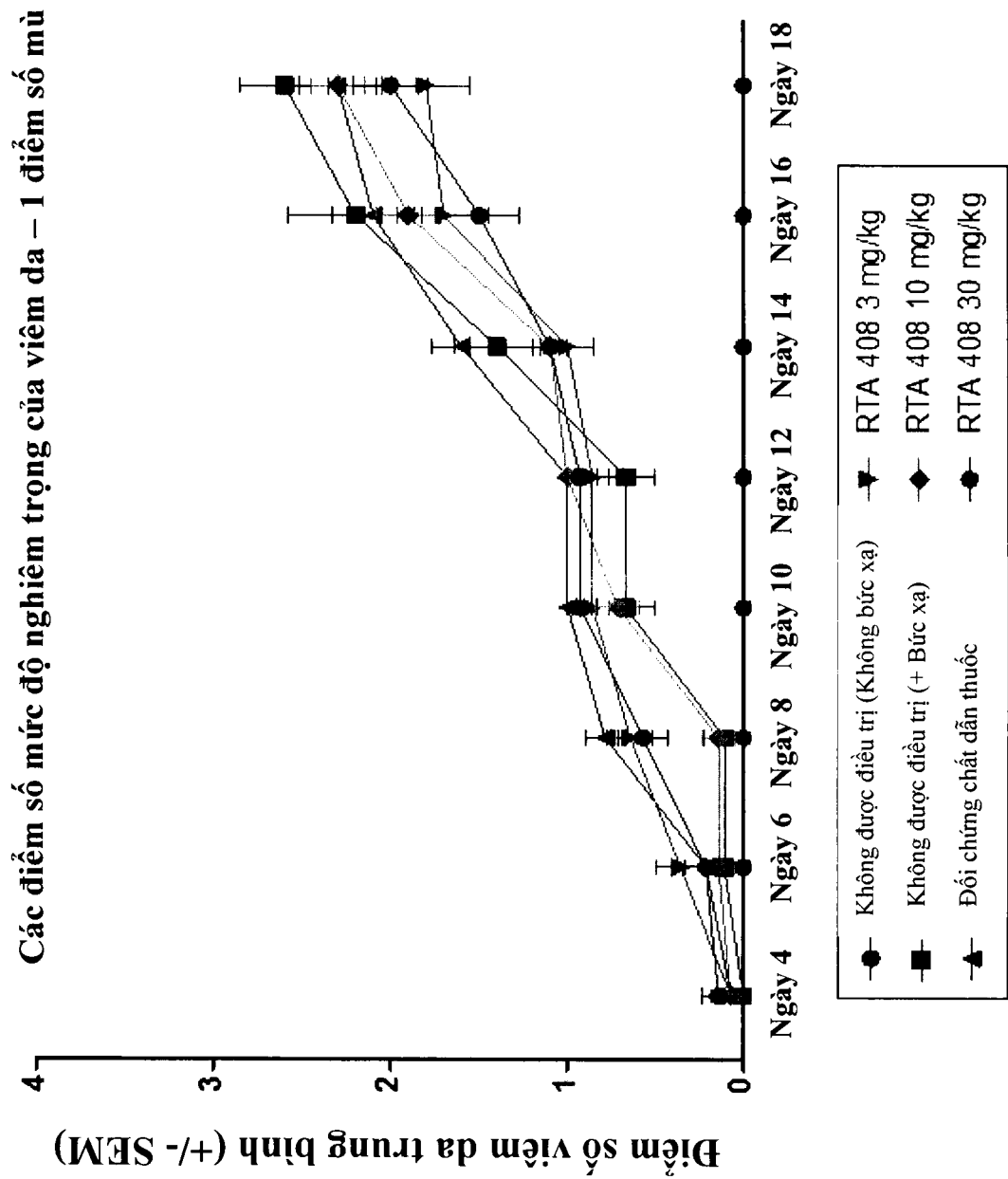


FIG. 43

Các điểm số viêm da bức xạ cấp tính qua đường miệng

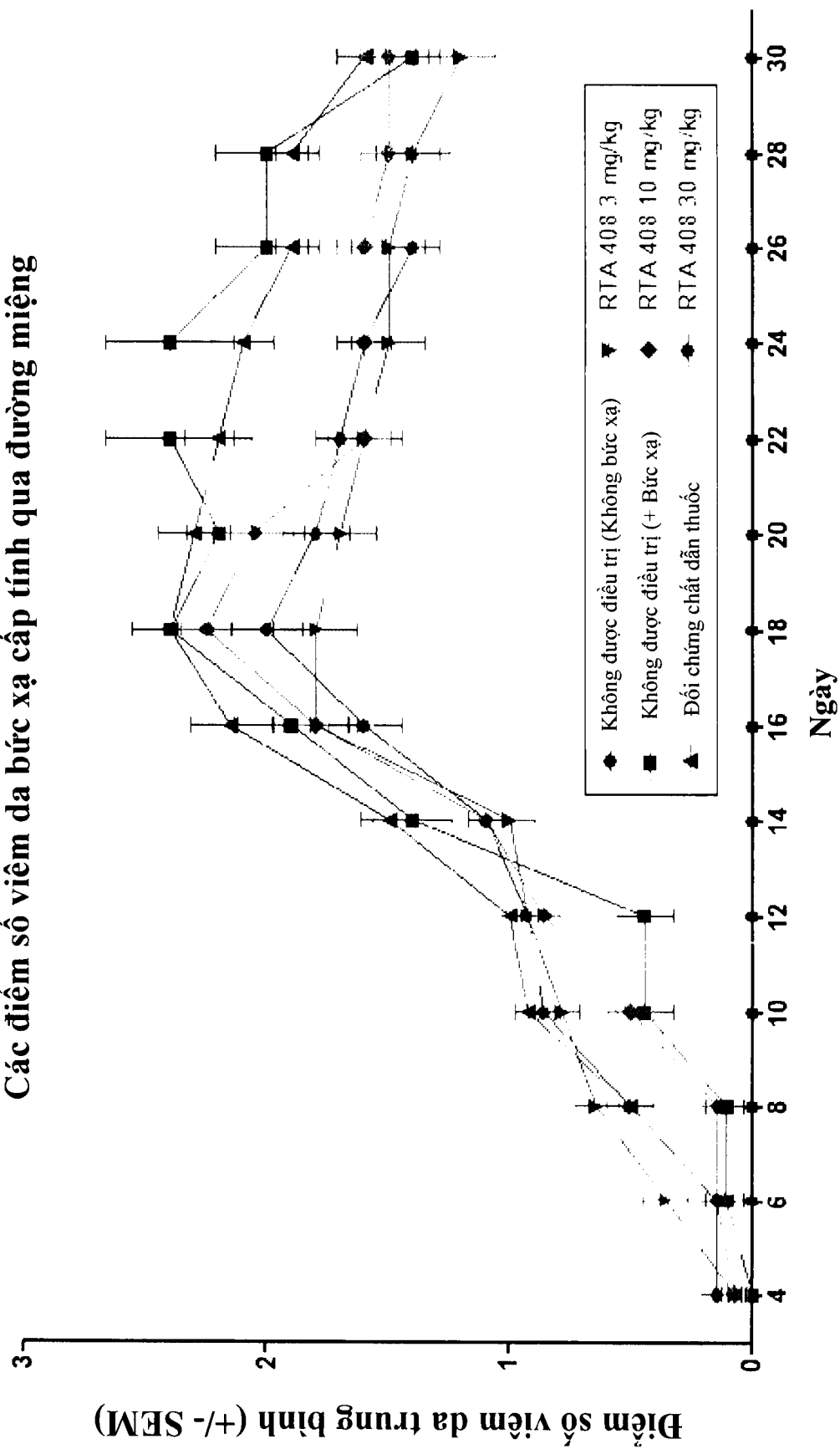


FIG 44

Các điểm số viêm da bức xạ cấp tính khu trú

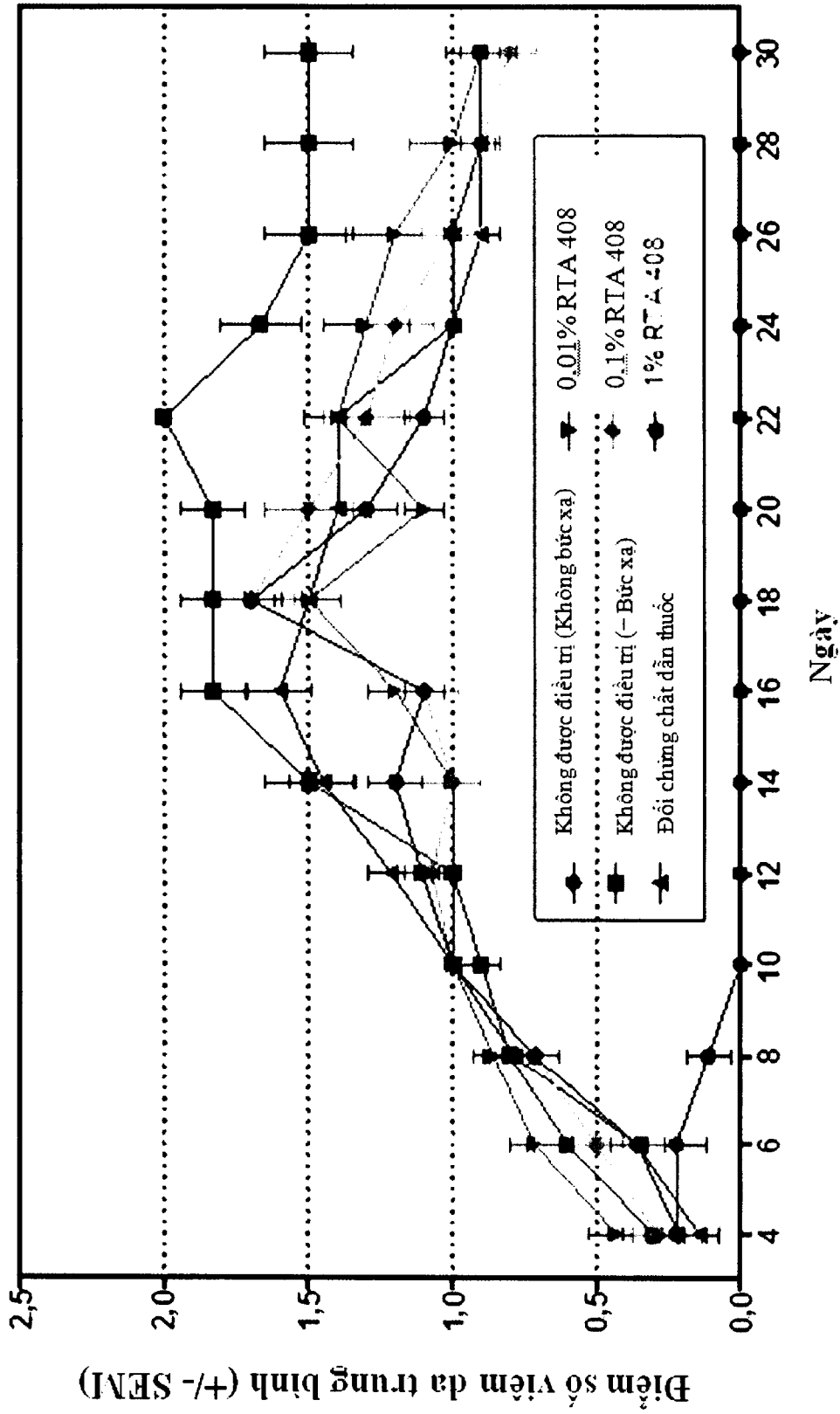


FIG. 45

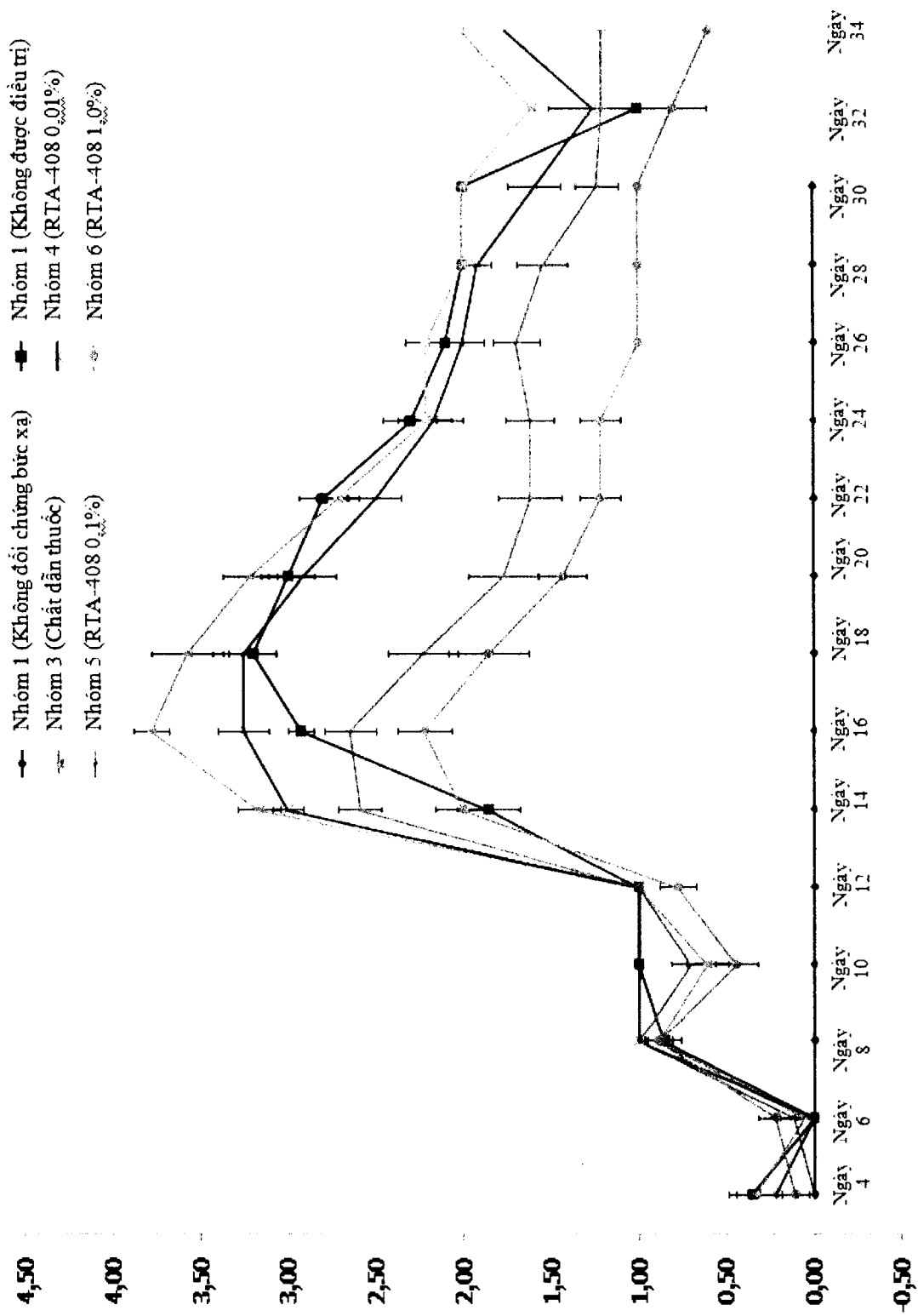


FIG. 46

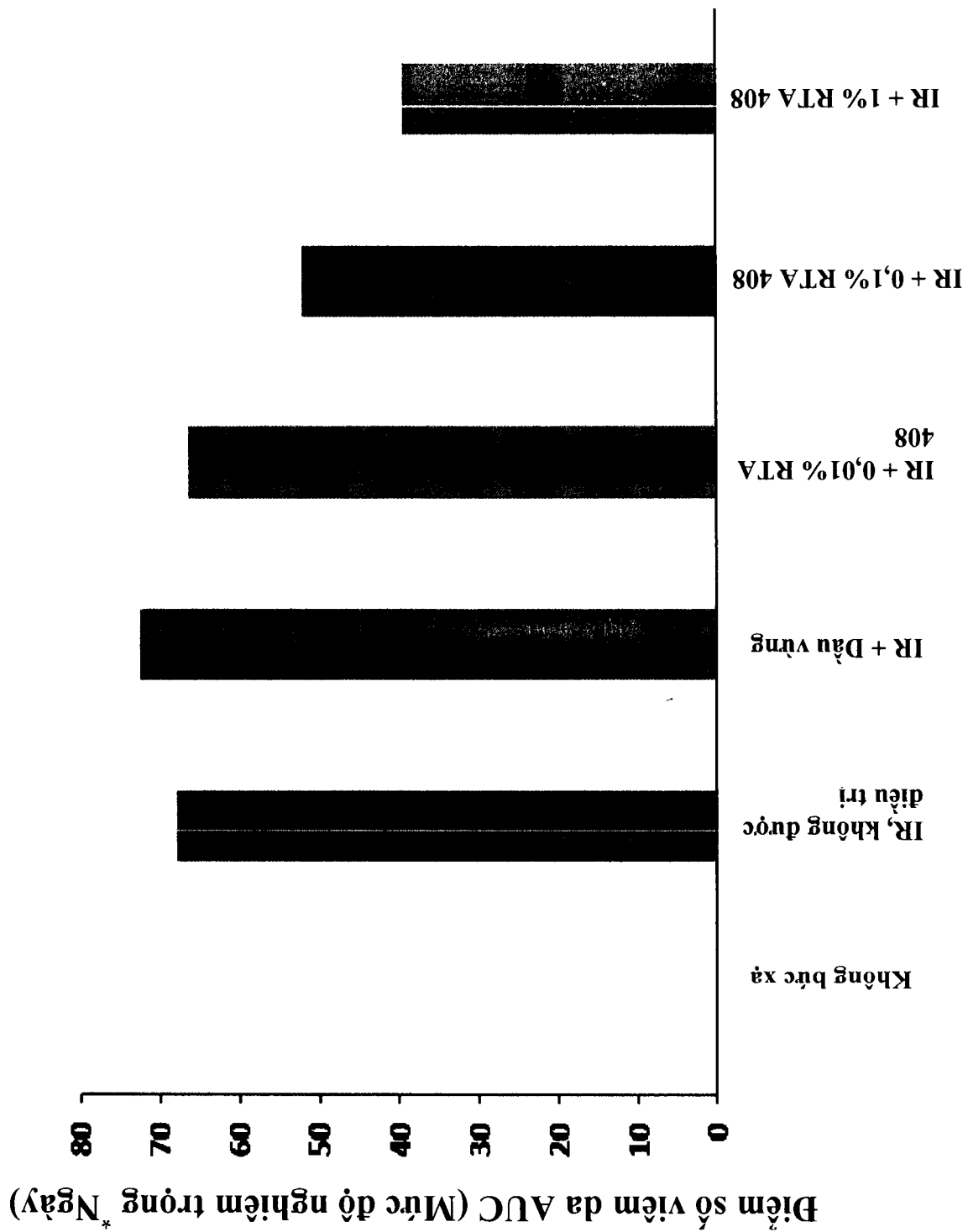


FIG. 47

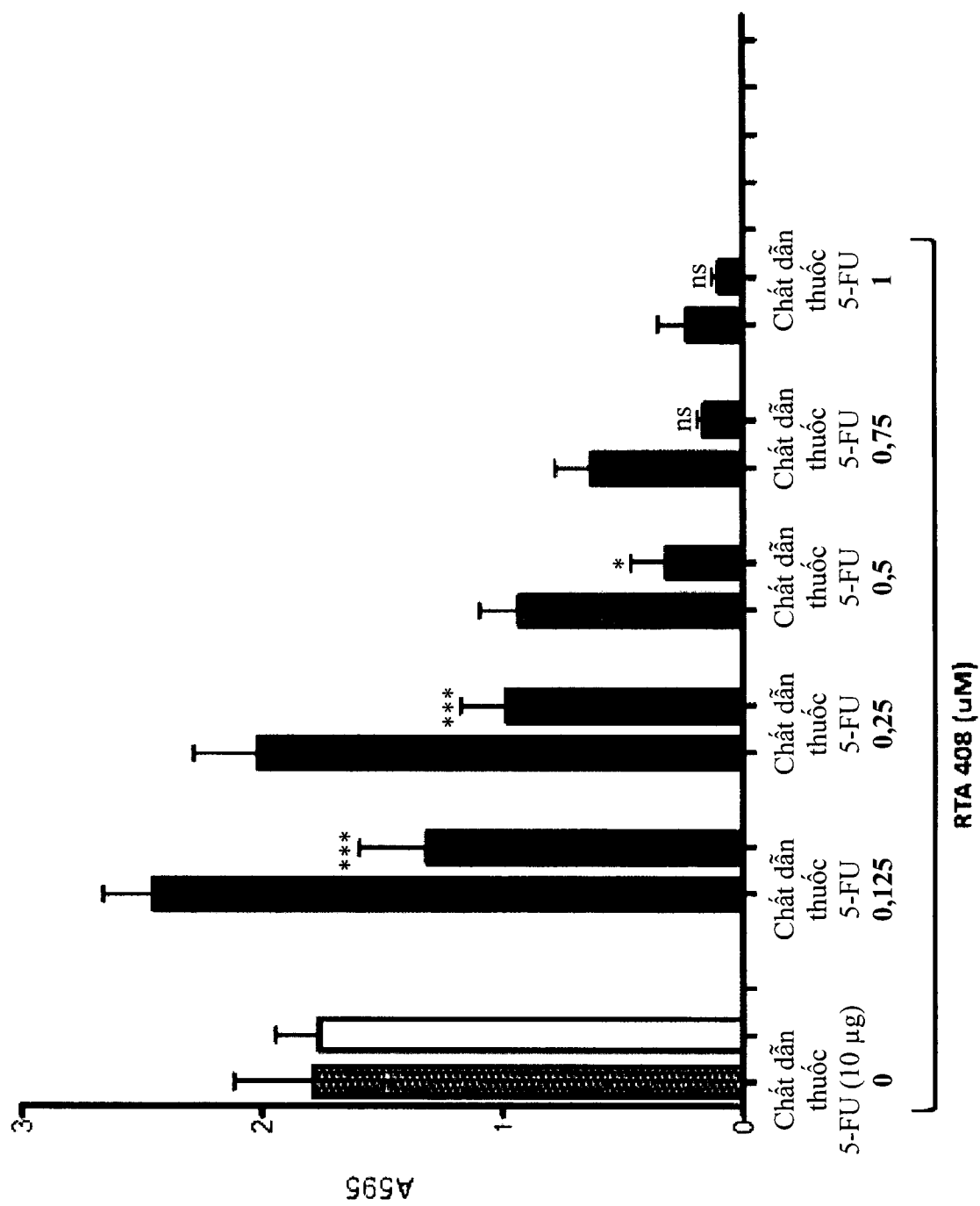


FIG. 48a

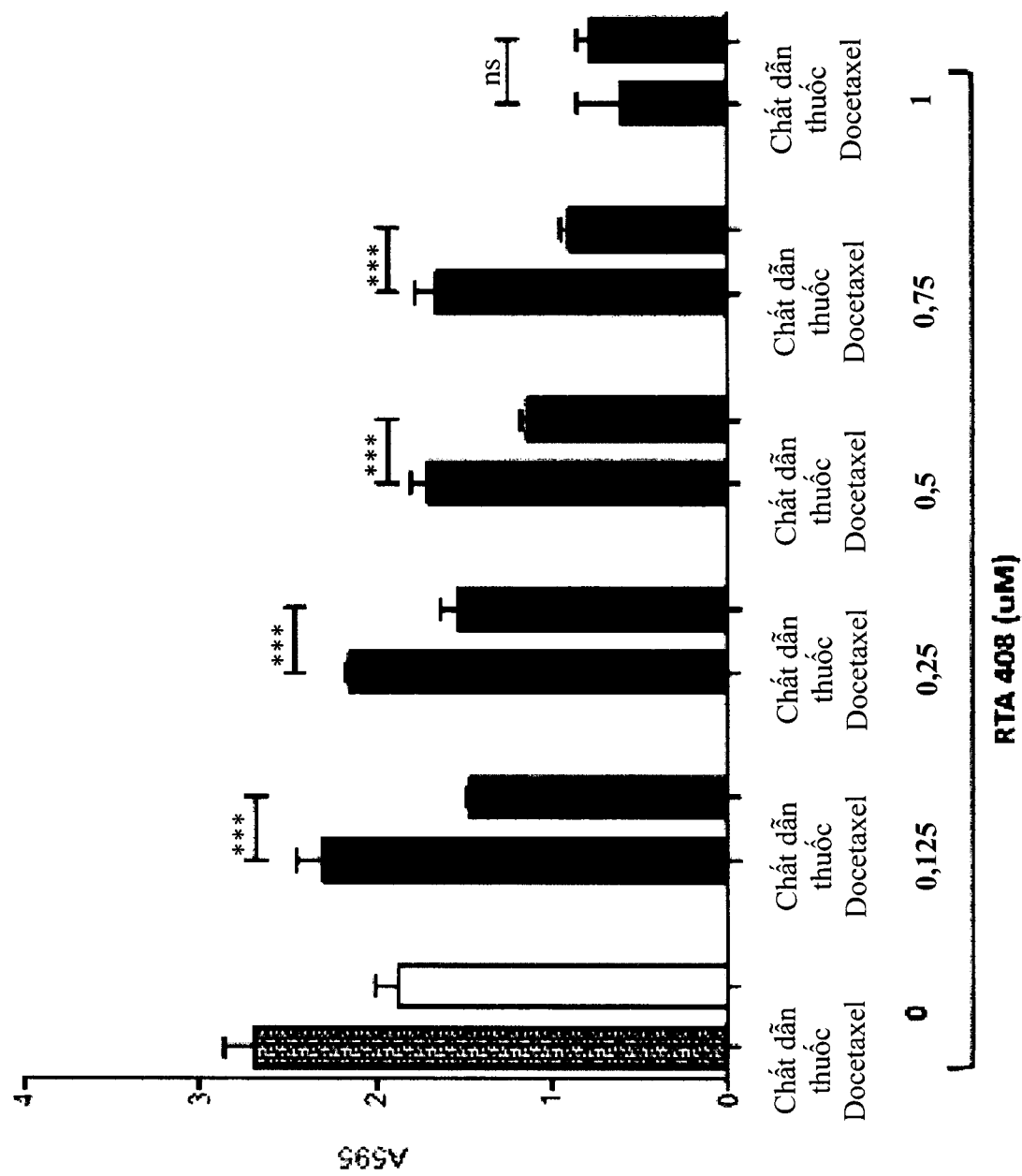
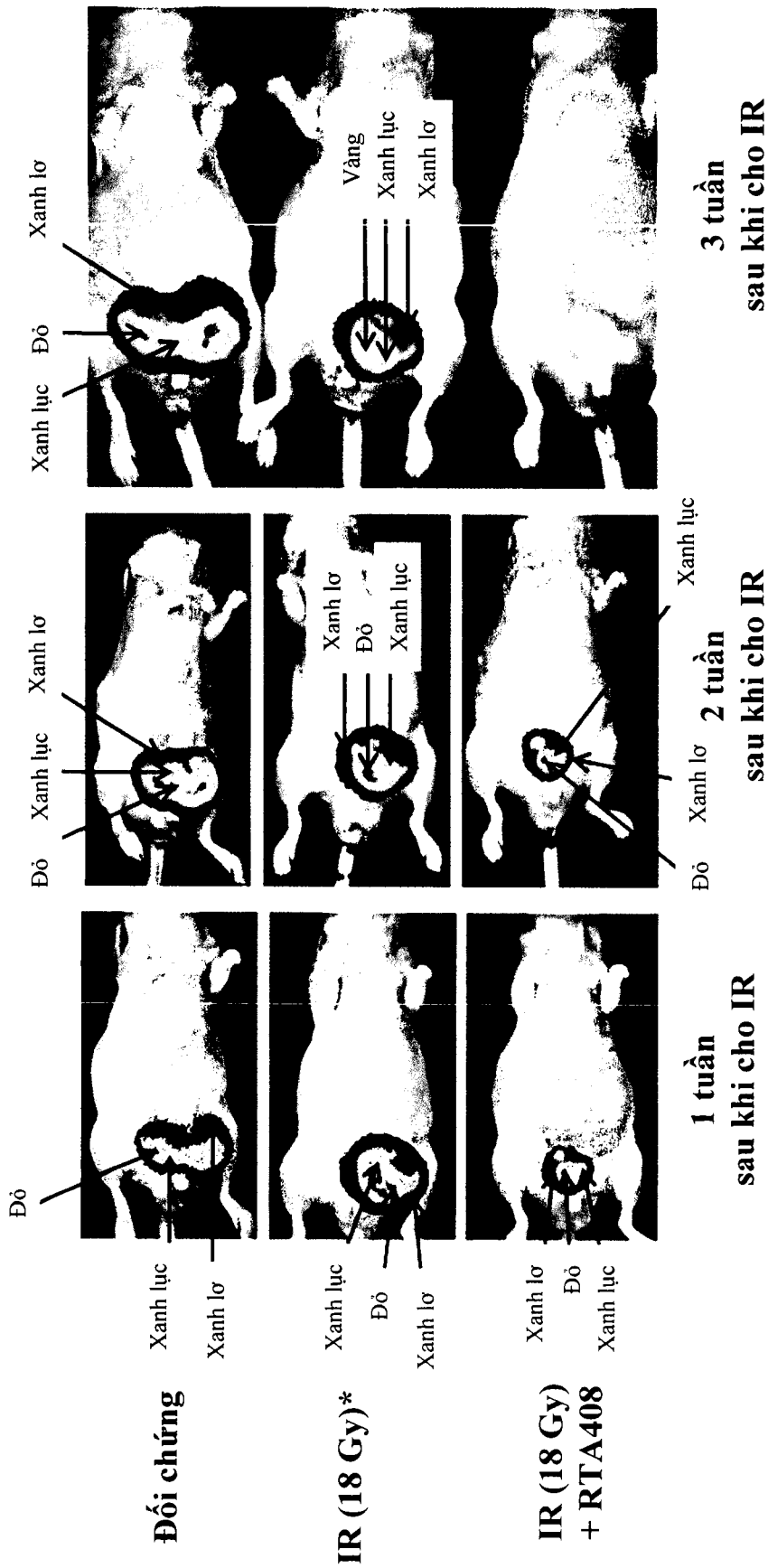


FIG. 48b



* IR liều đơn được cho vào vùng chậu hông của các con vật mang khối u

FIG. 49

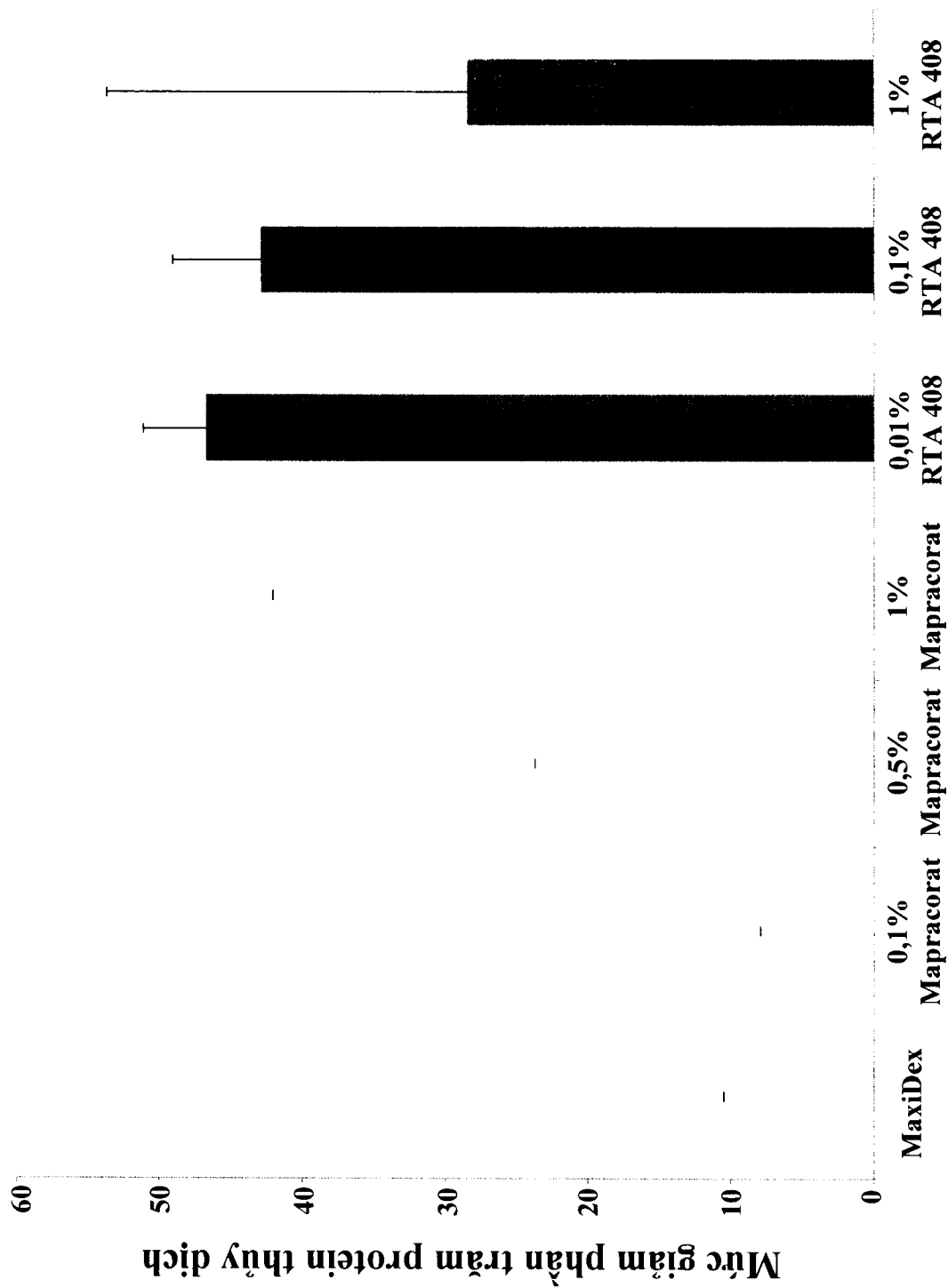


FIG. 50

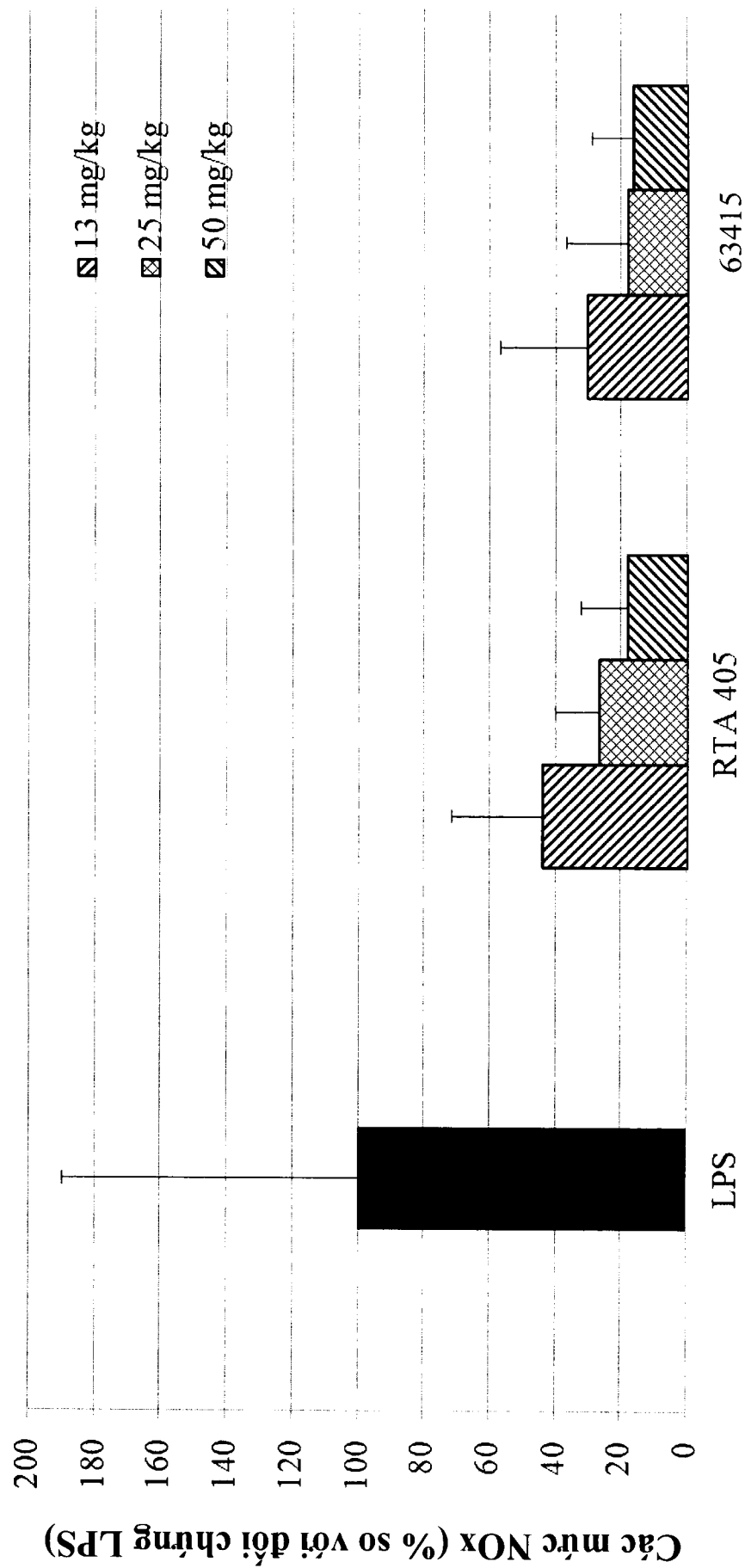


FIG. 51

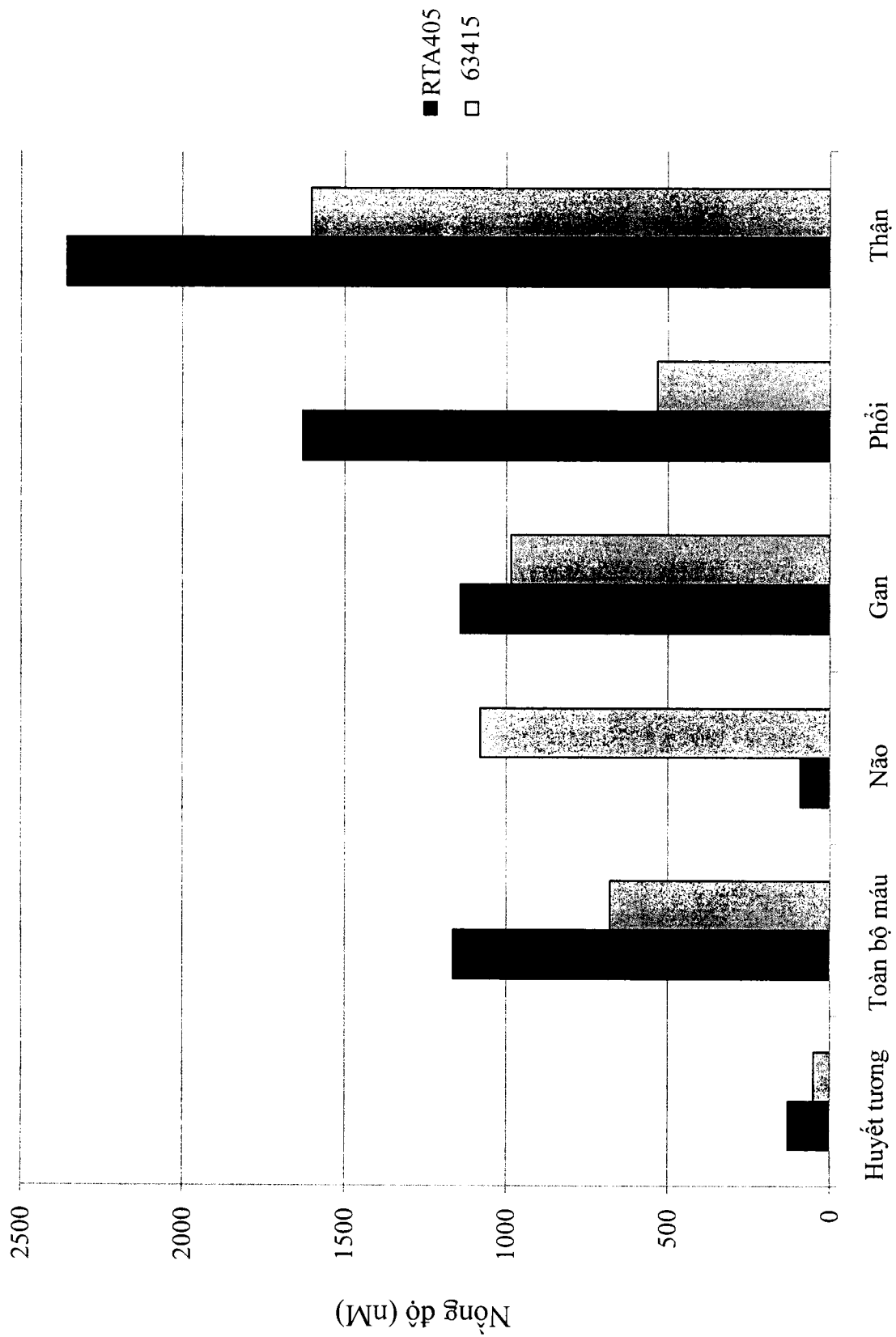
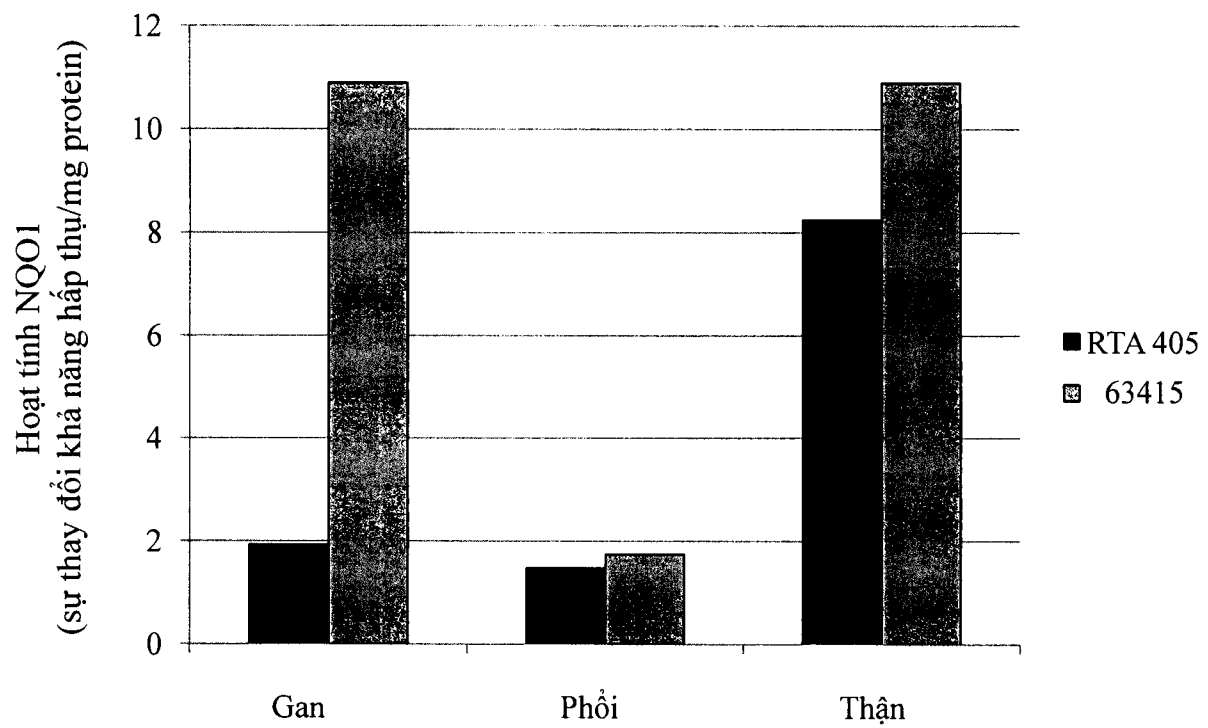


FIG. 52

**FIG. 53**

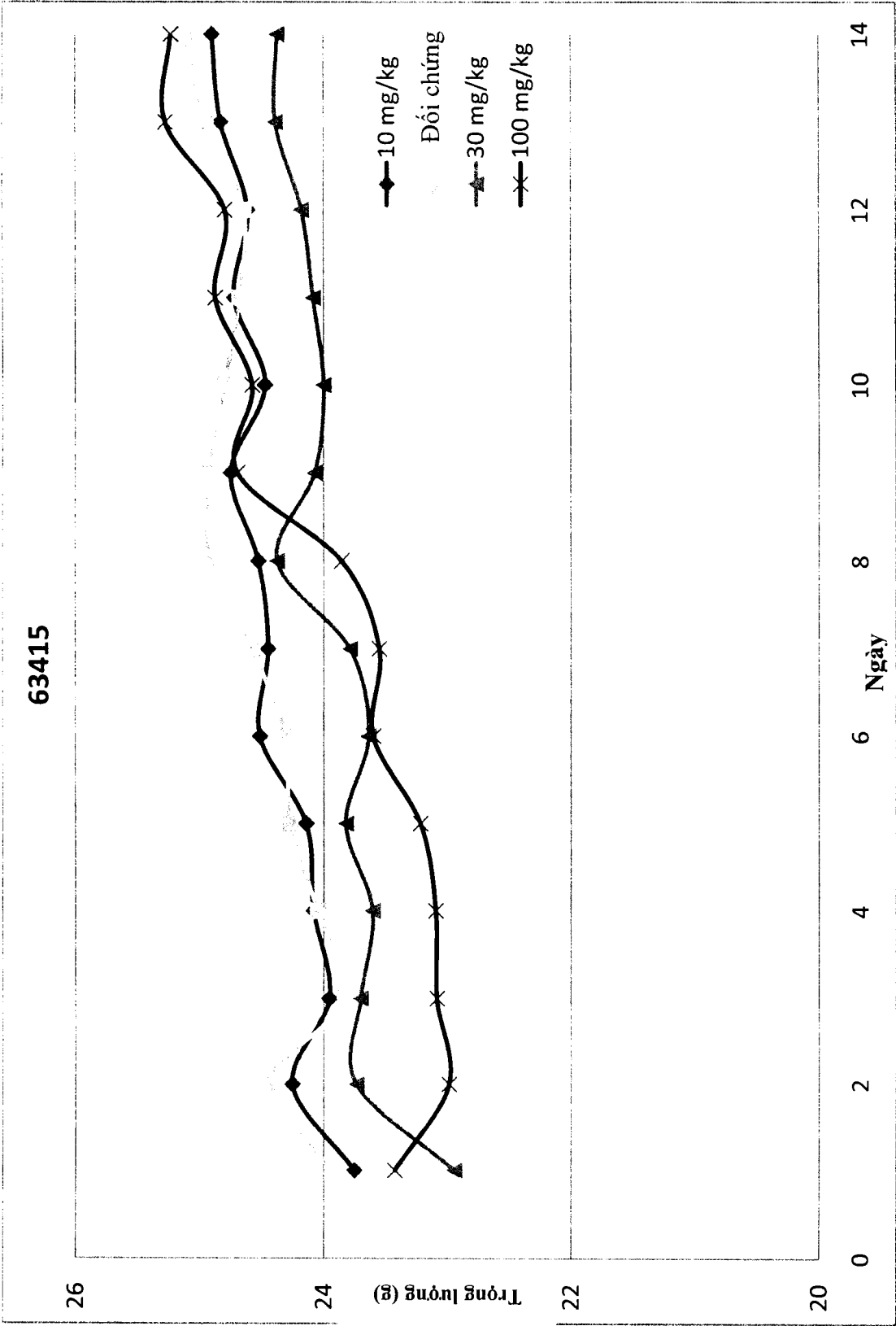


FIG. 54

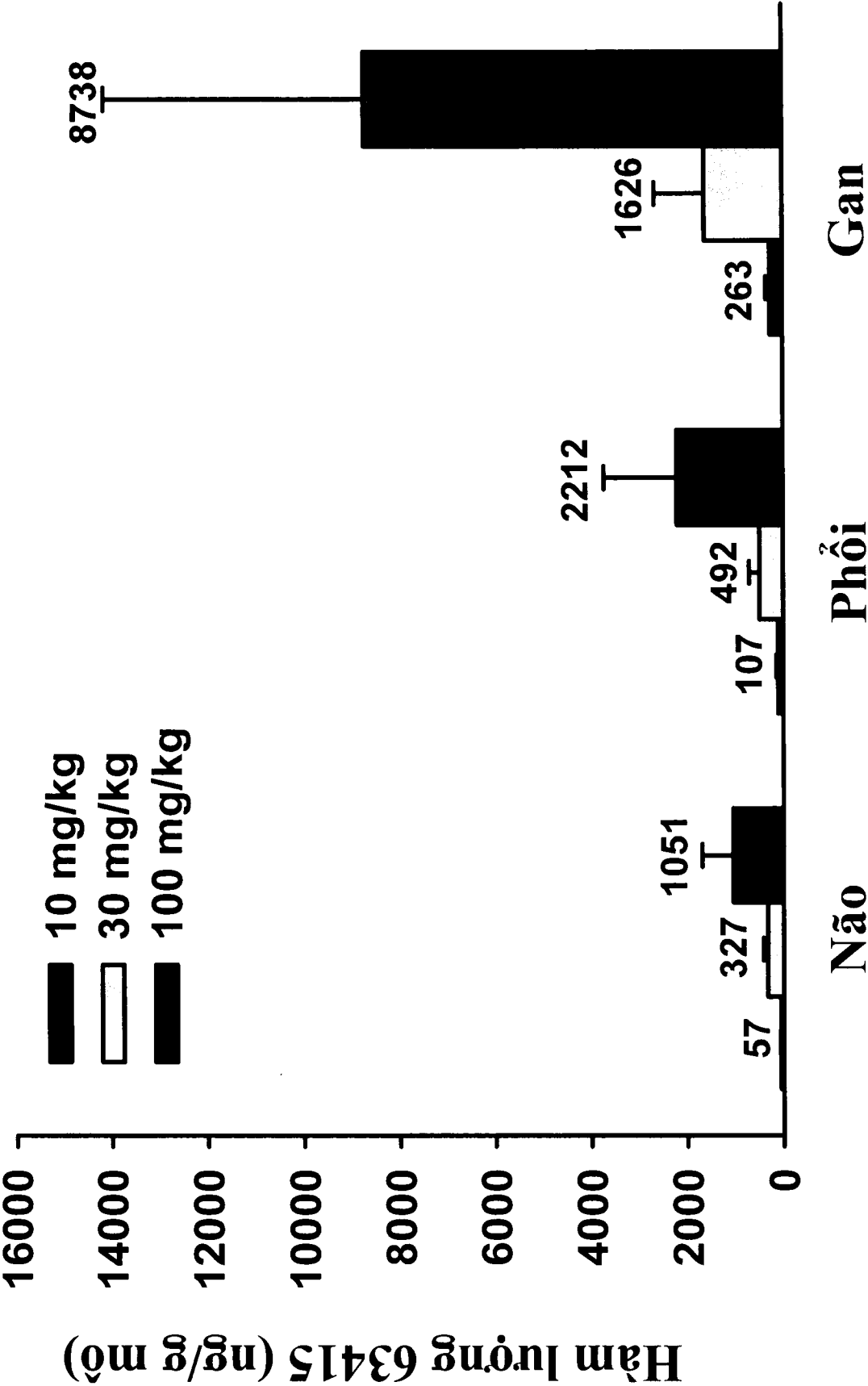


FIG. 55

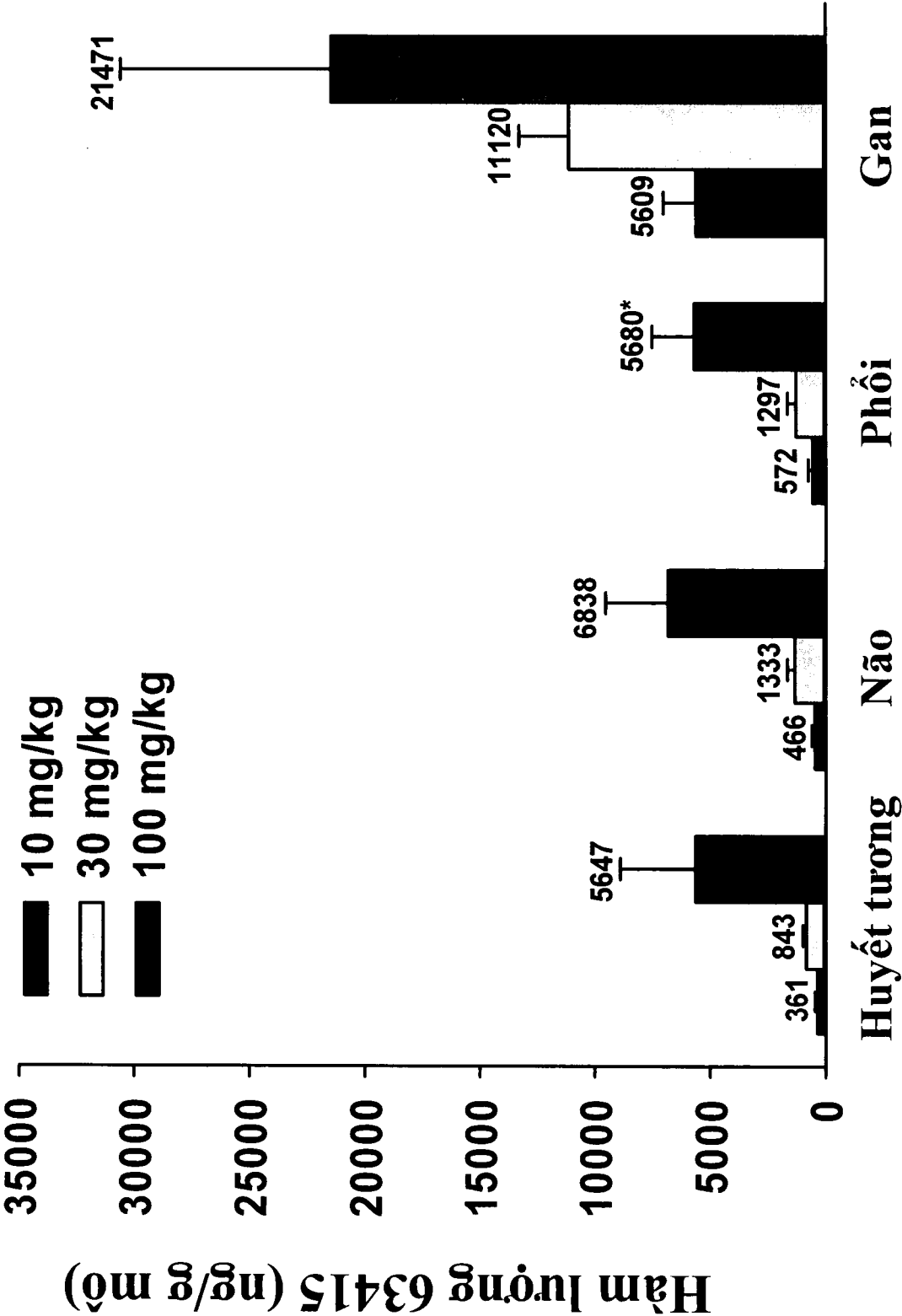


FIG. 56

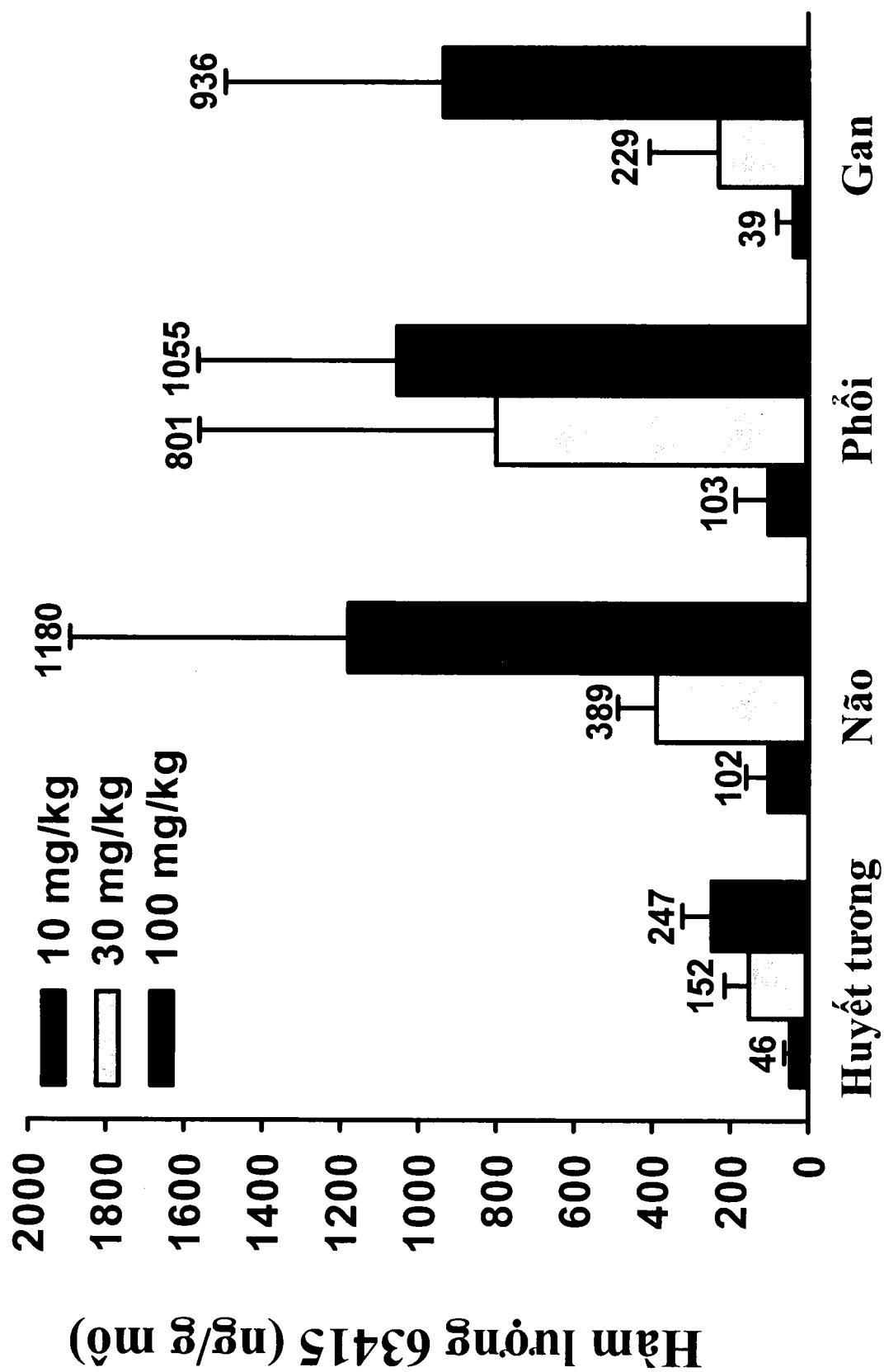


FIG. 57

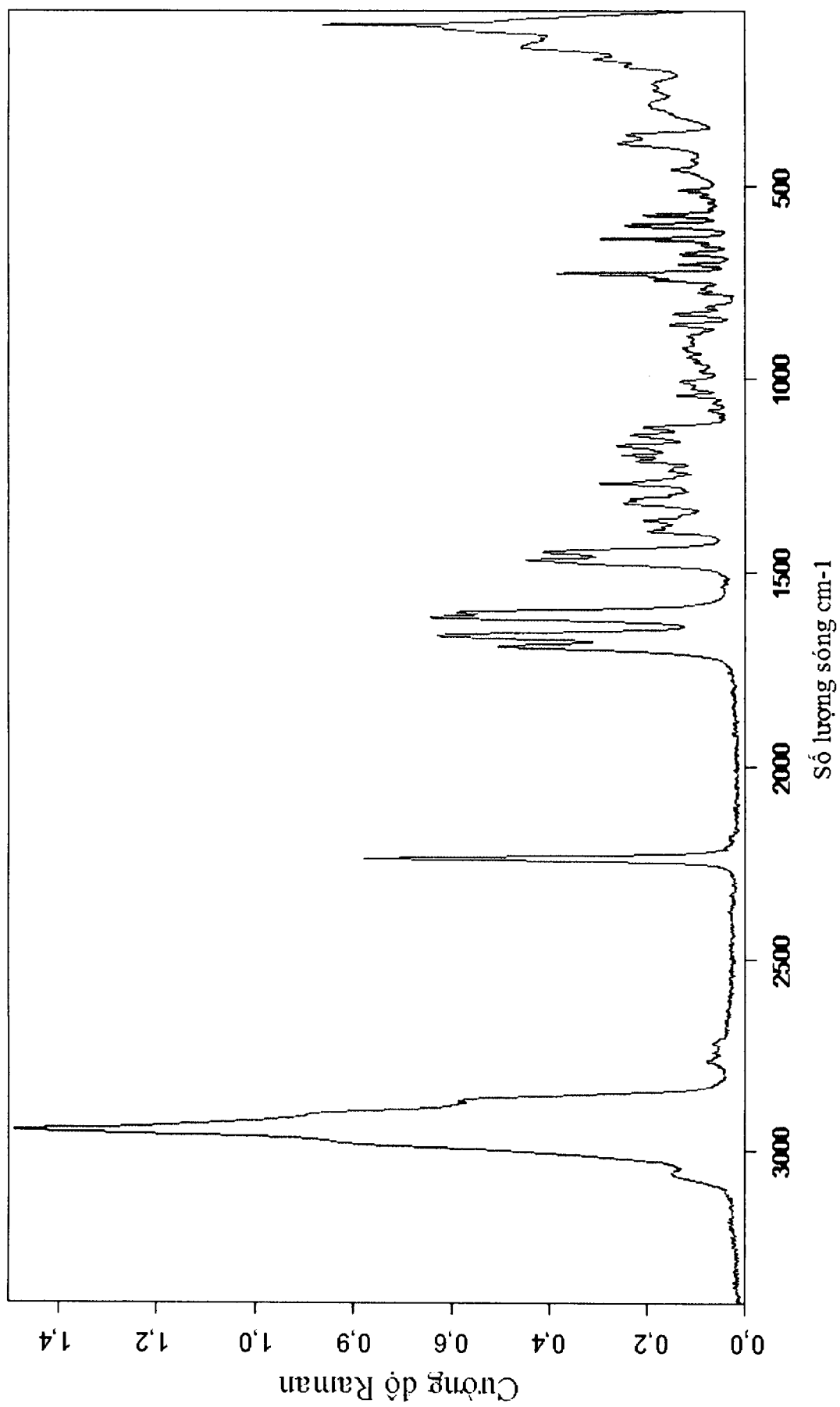


FIG. 58

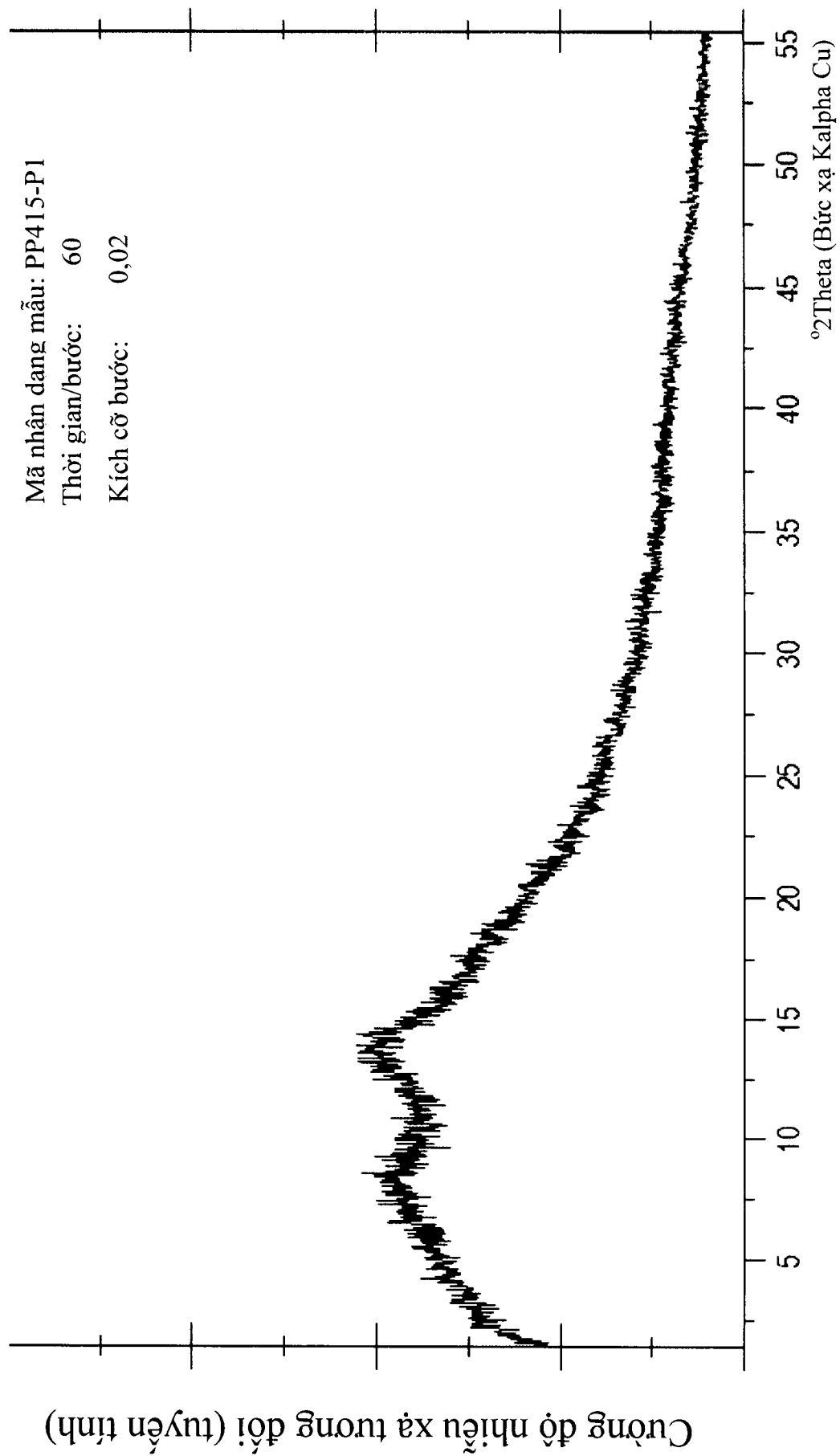


FIG. 59

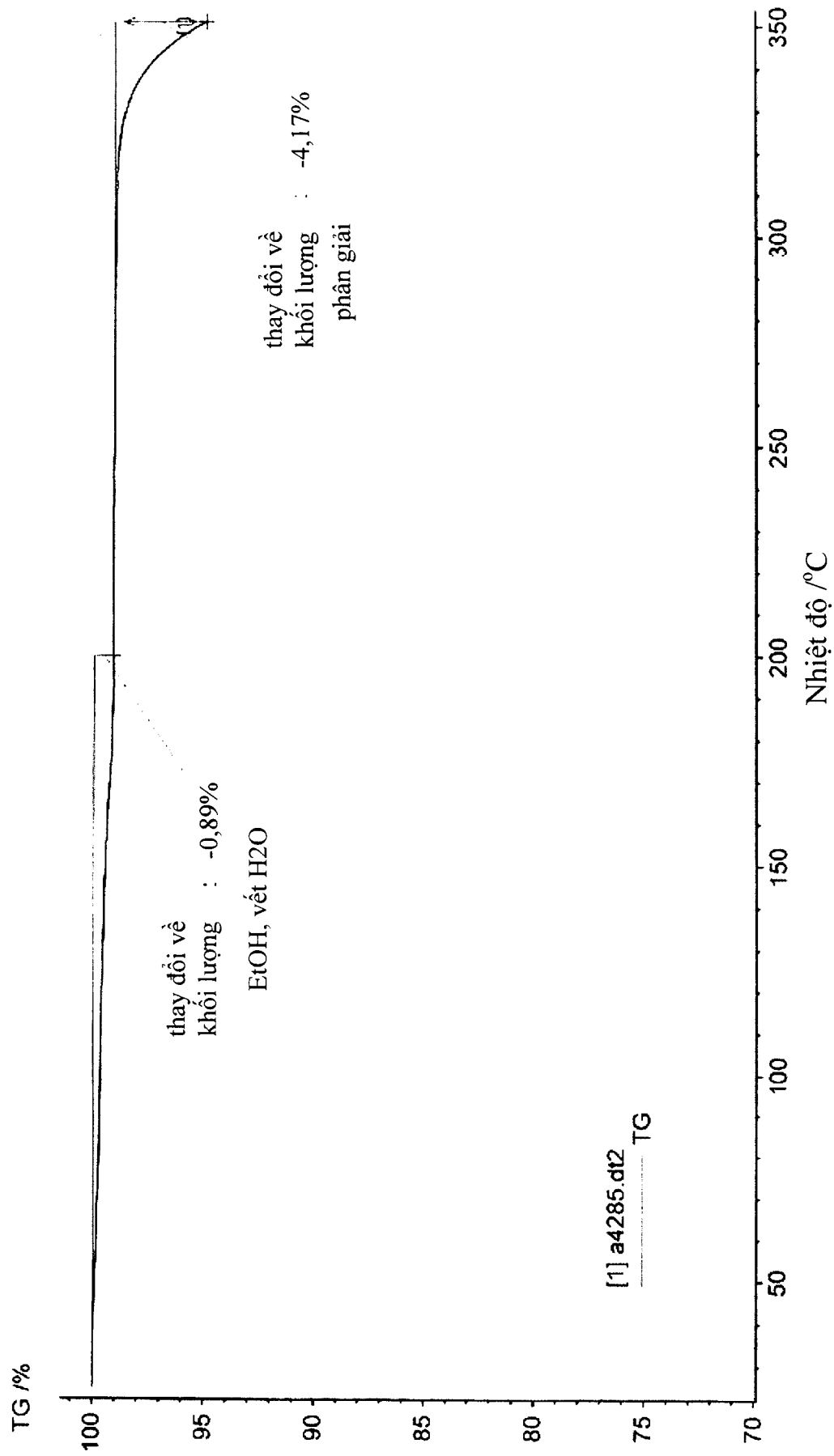


FIG. 60

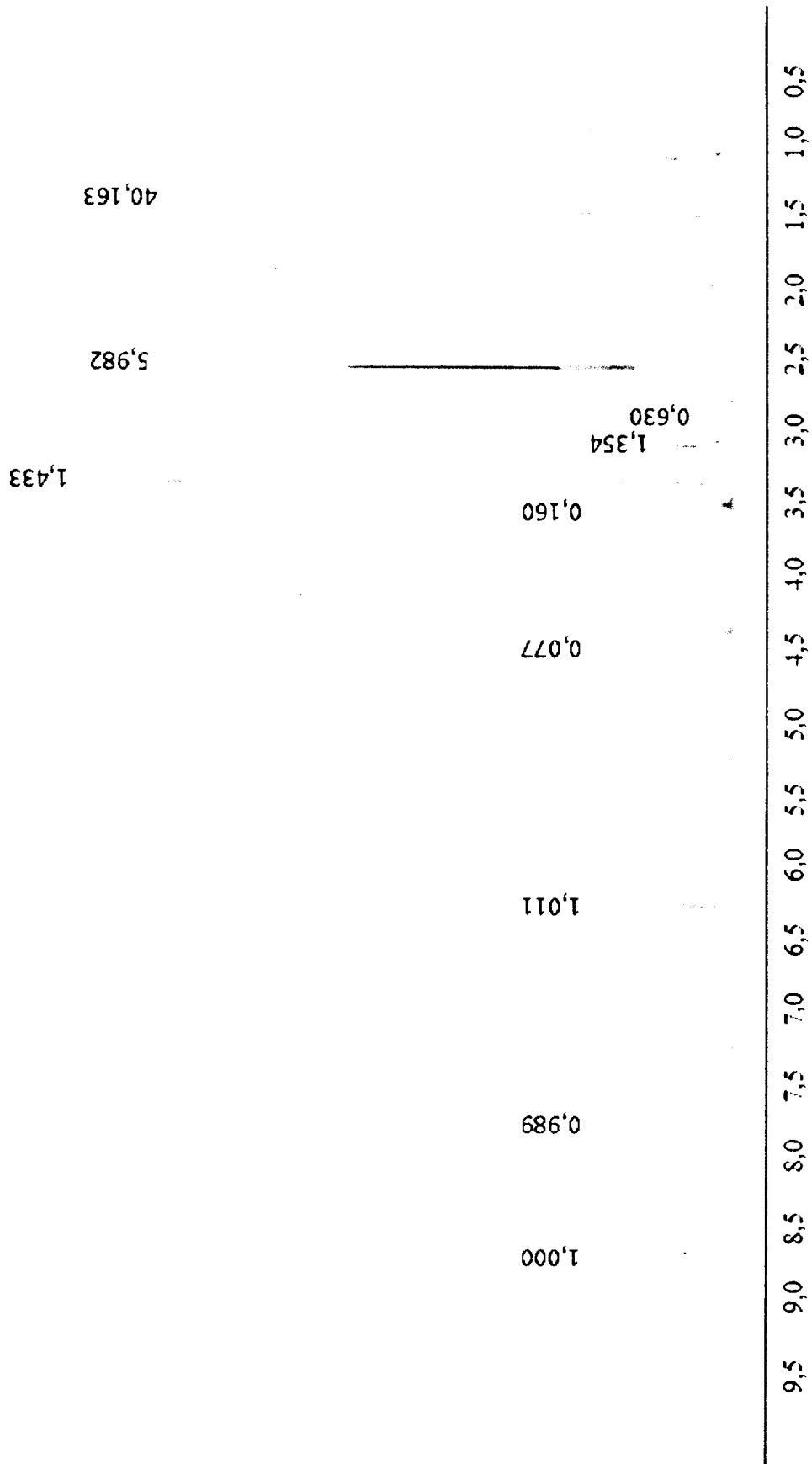


FIG. 61

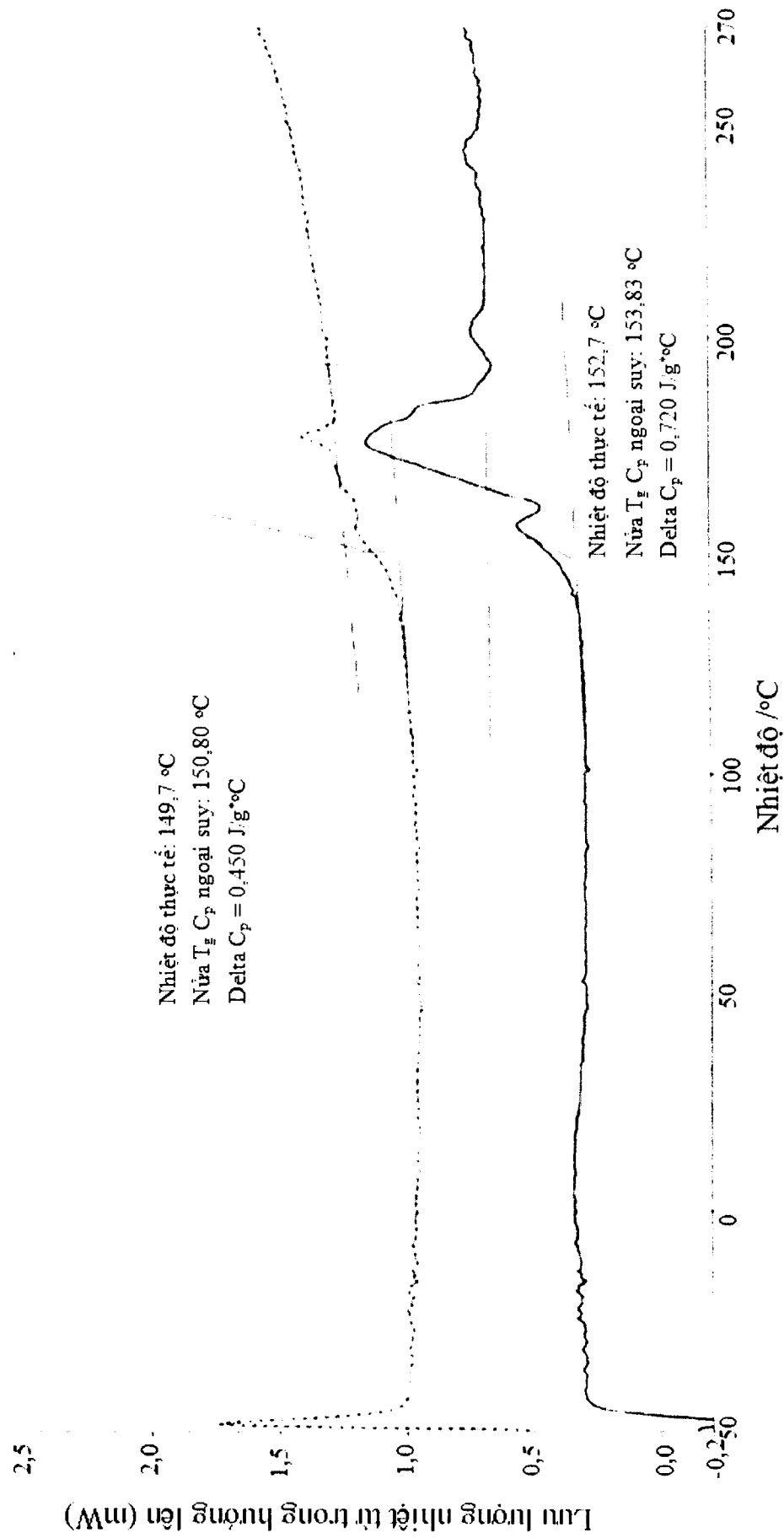


FIG. 62

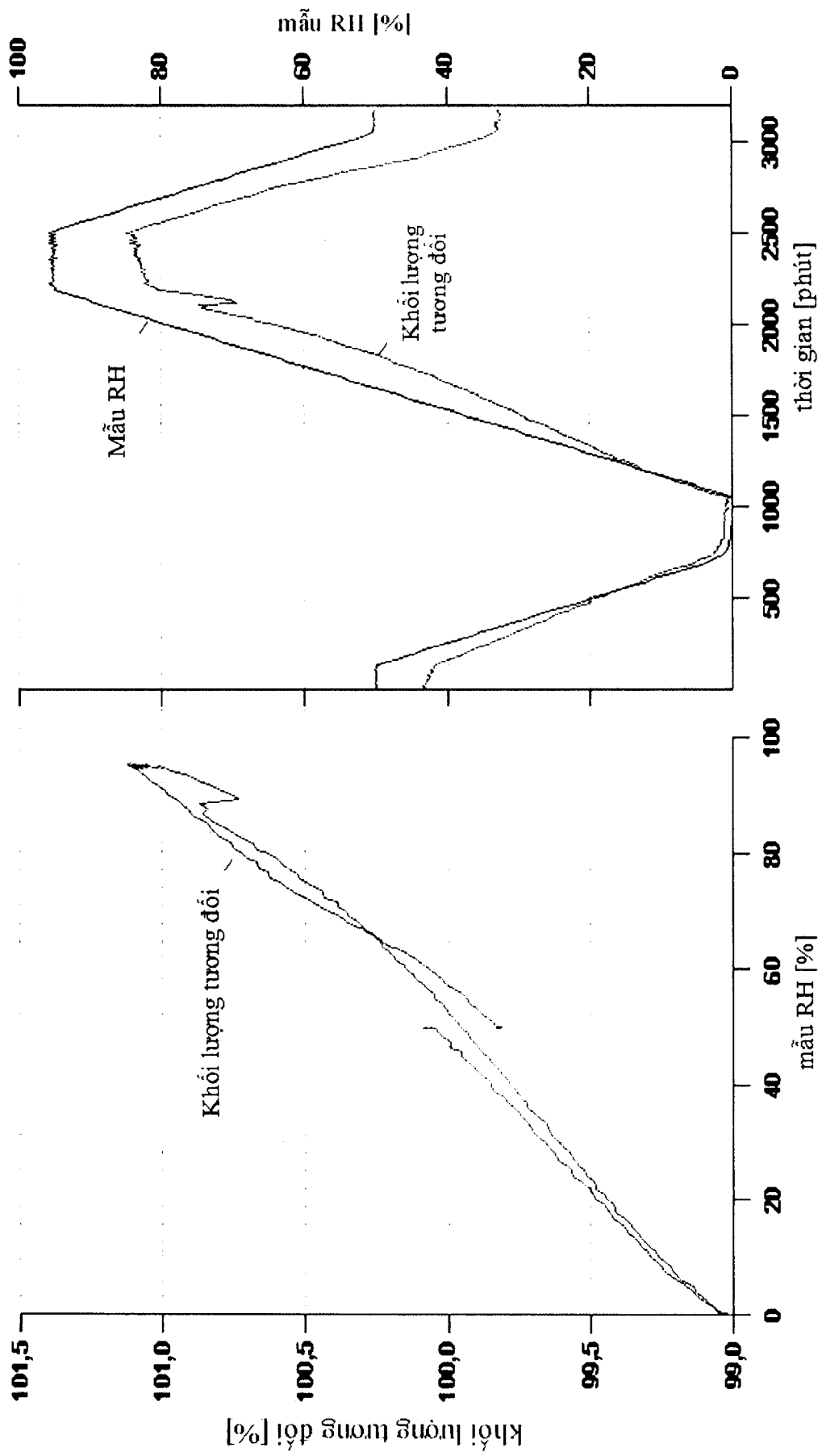


FIG. 63

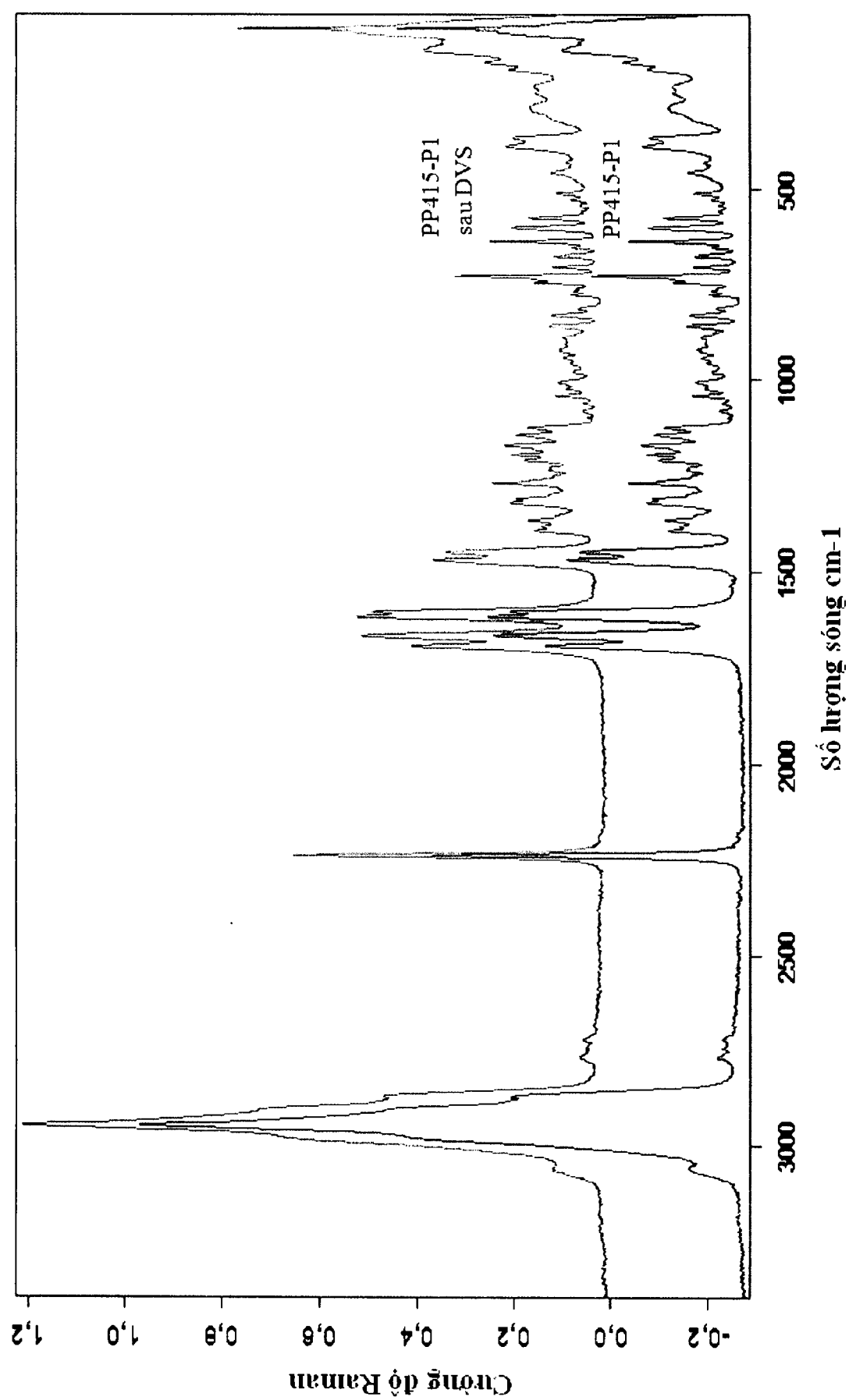


FIG. 64

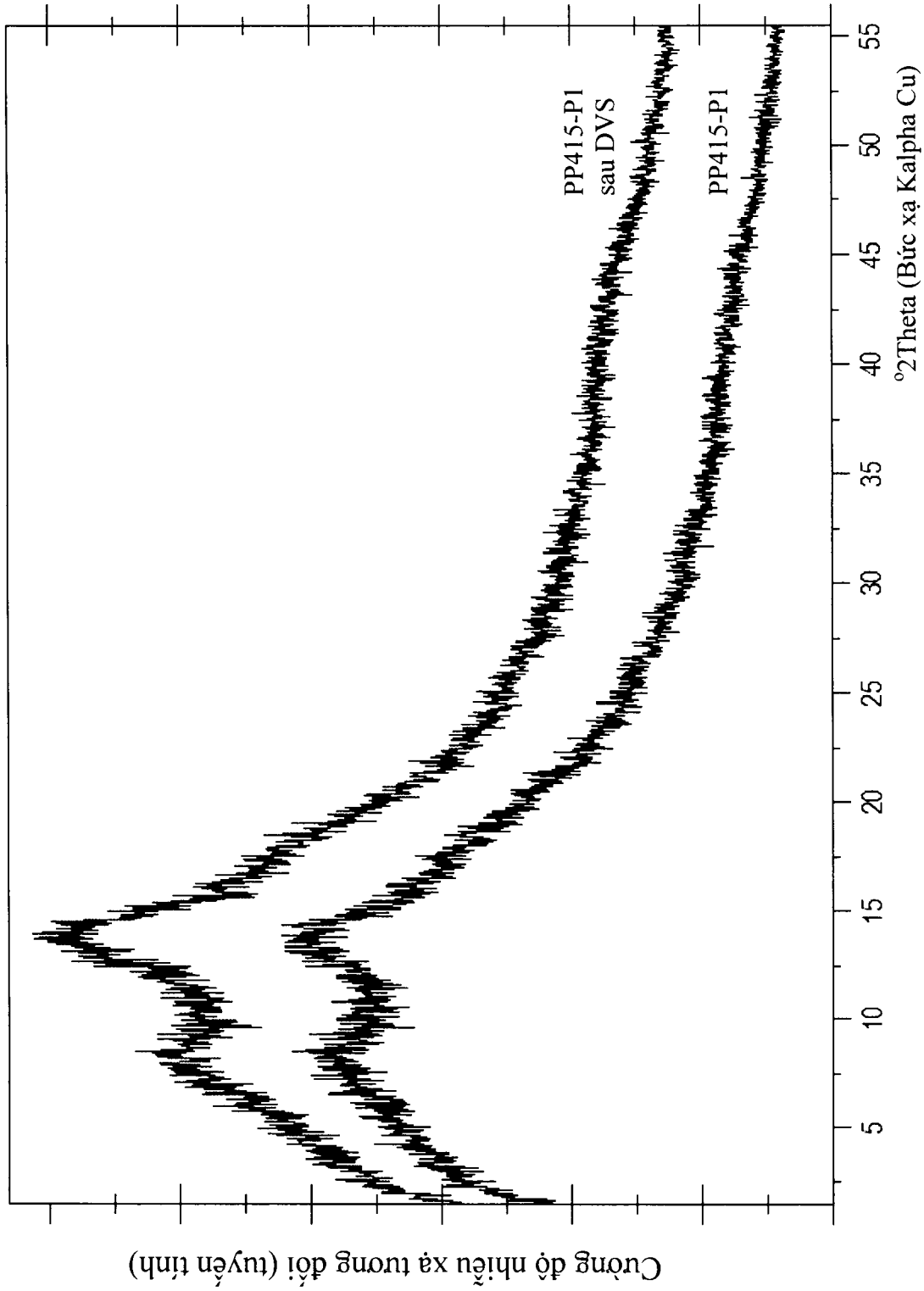
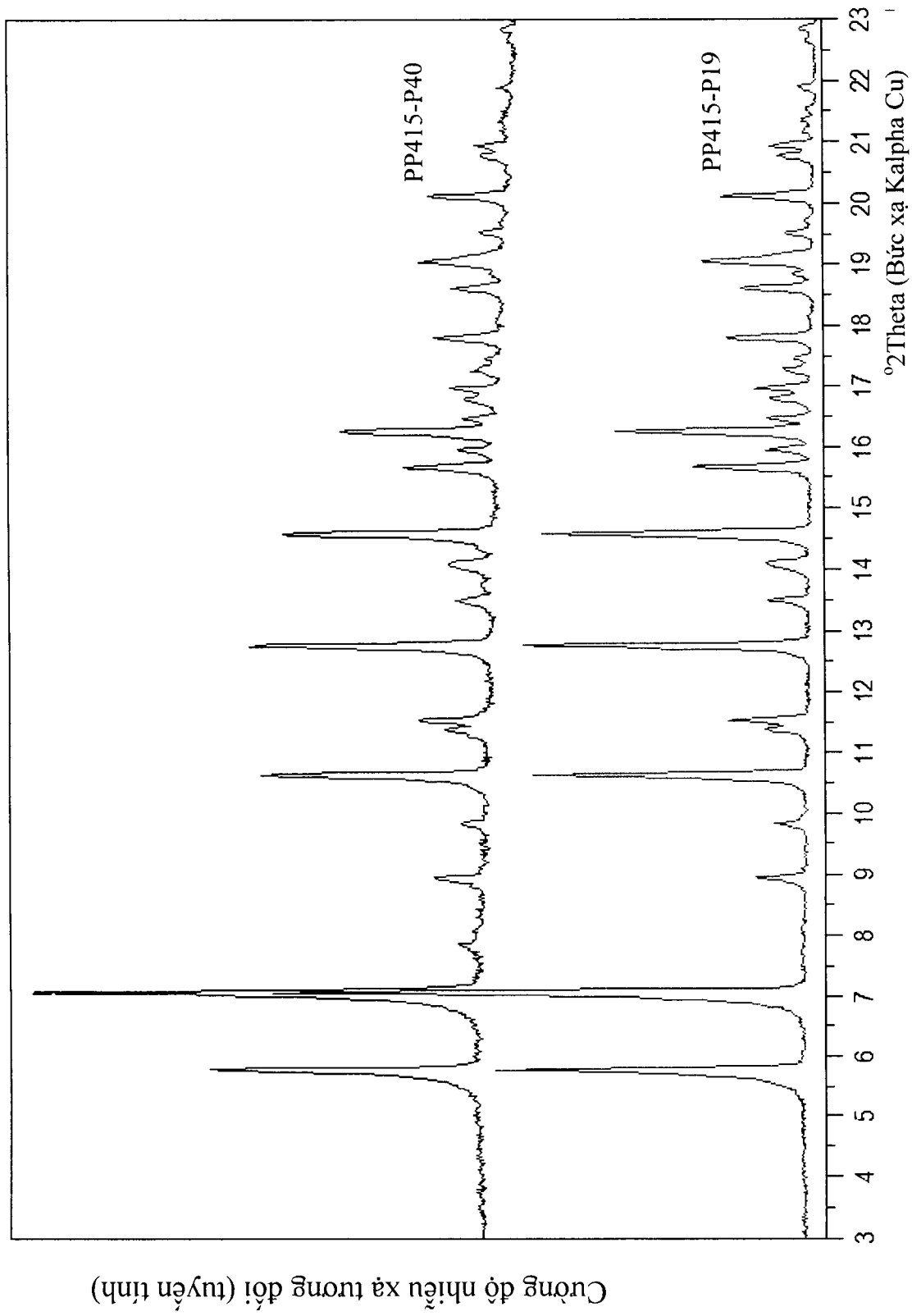


FIG. 65

**FIG. 66**

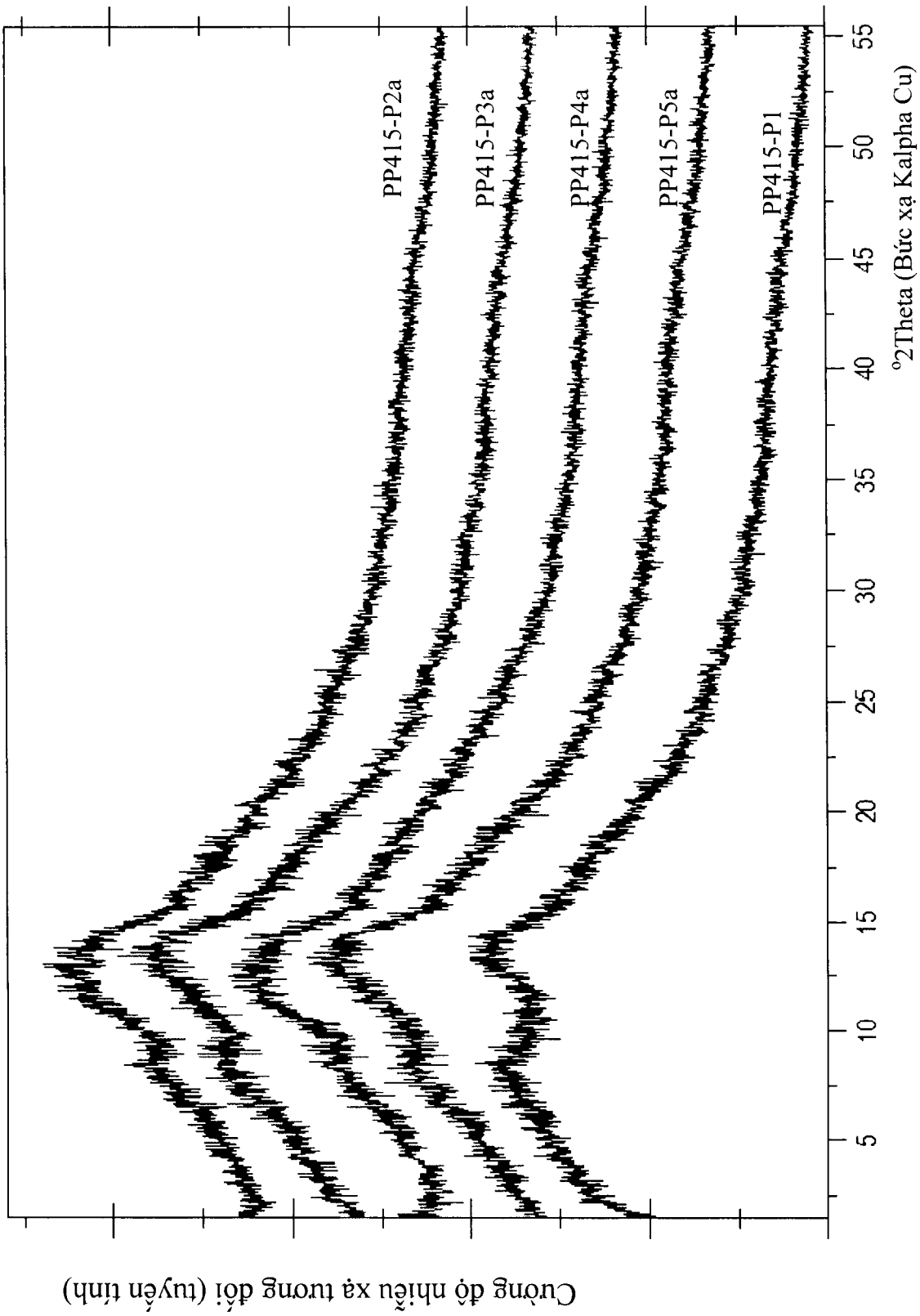


FIG. 67

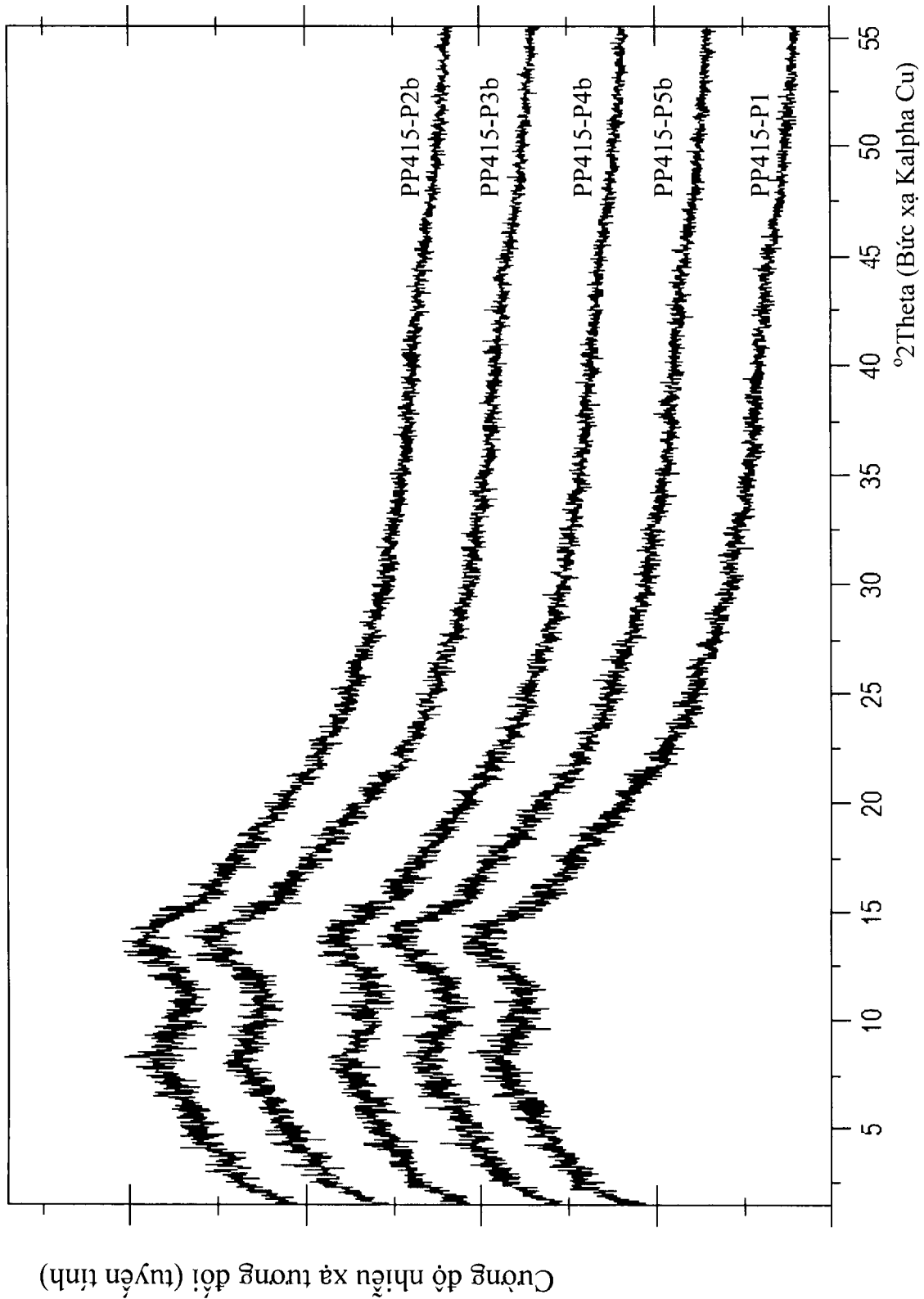


FIG. 68

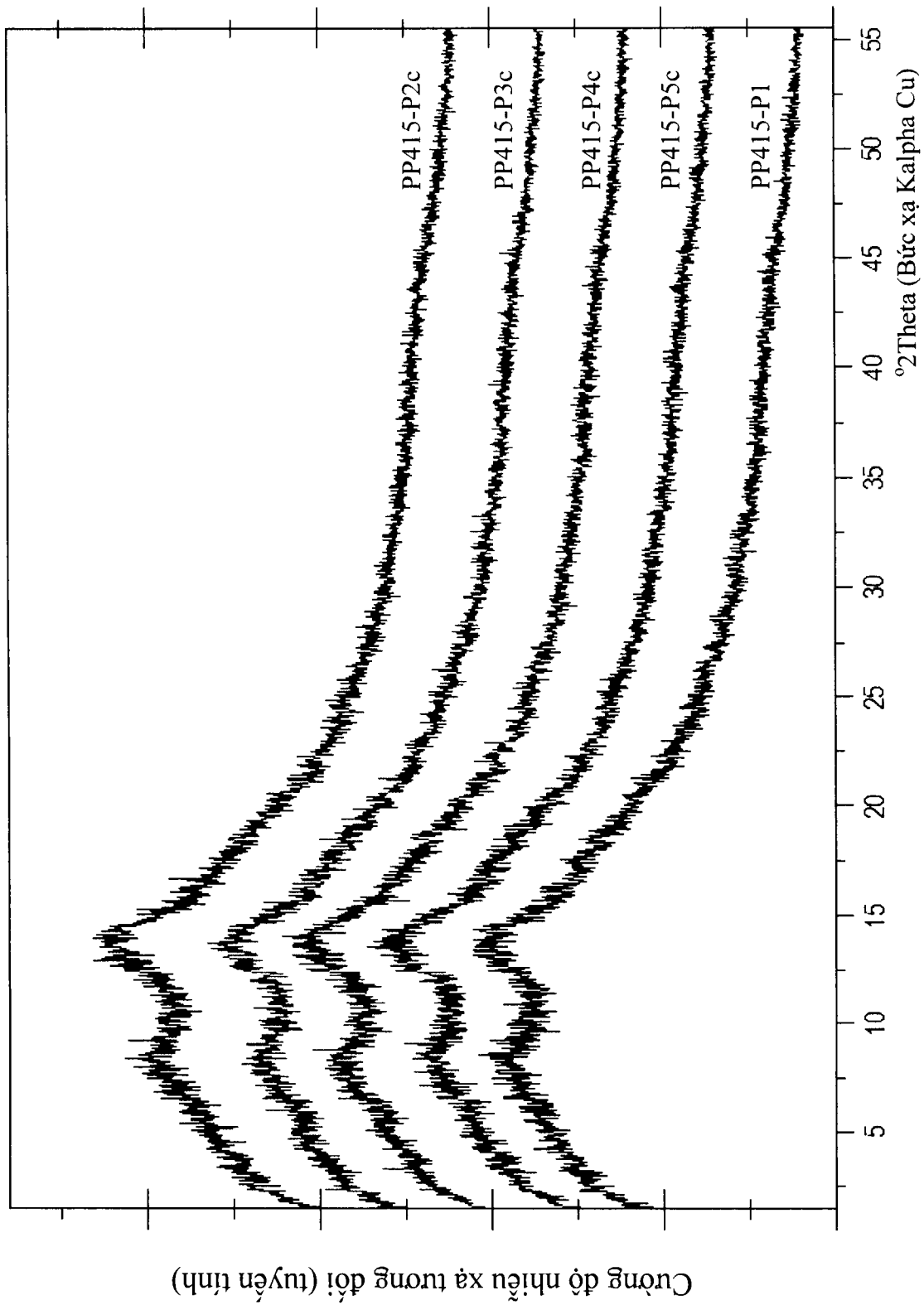


FIG. 69

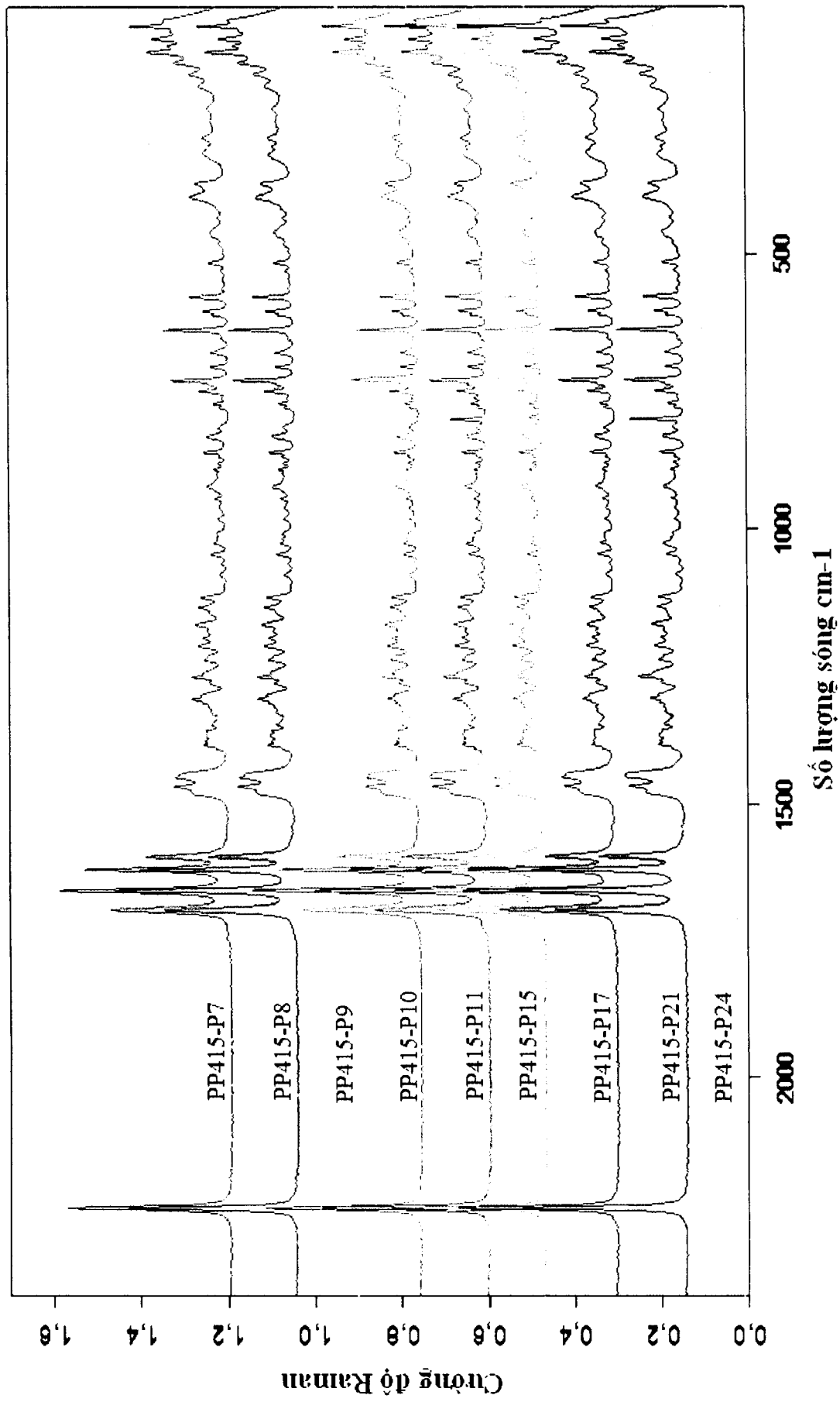


FIG. 70

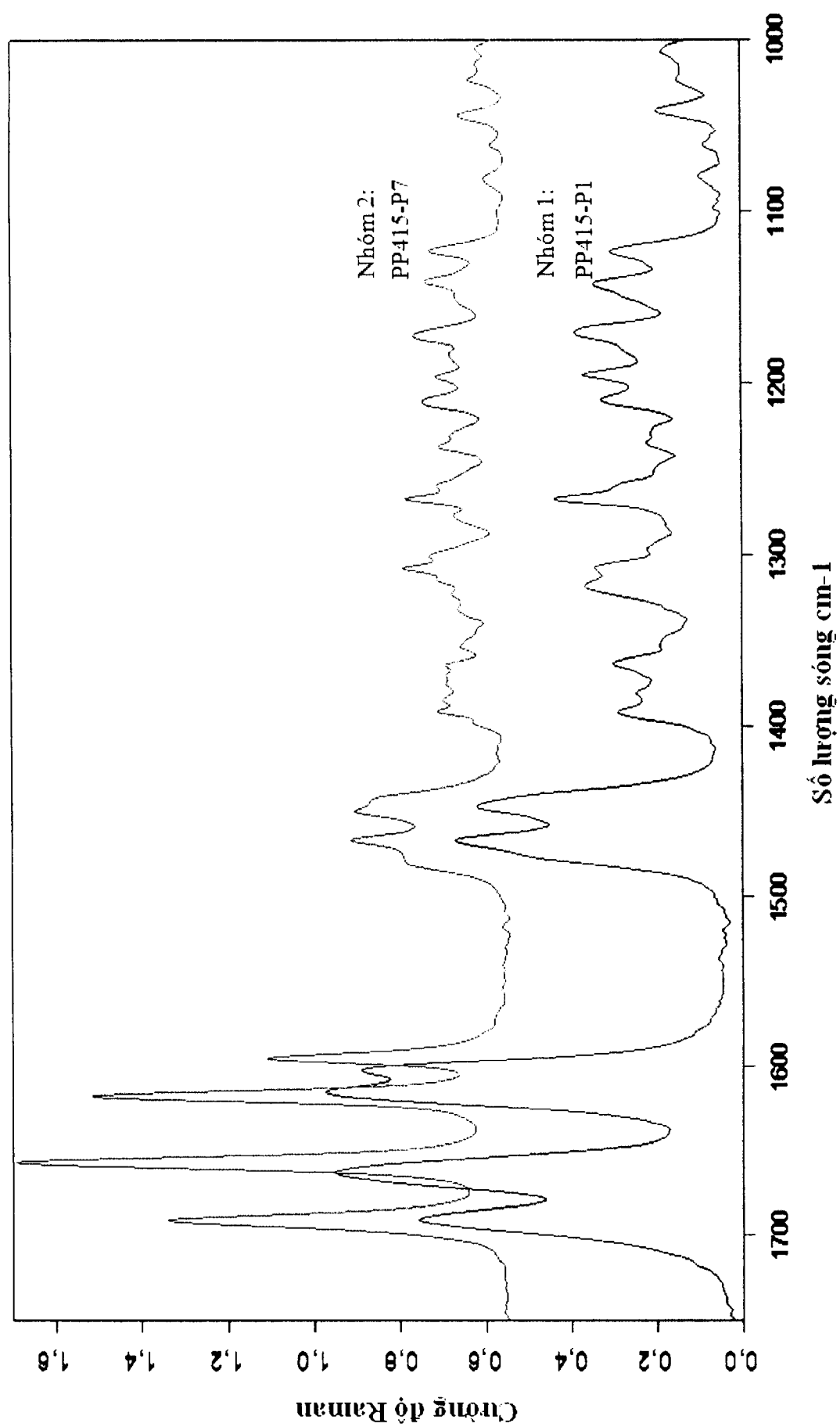


FIG. 71

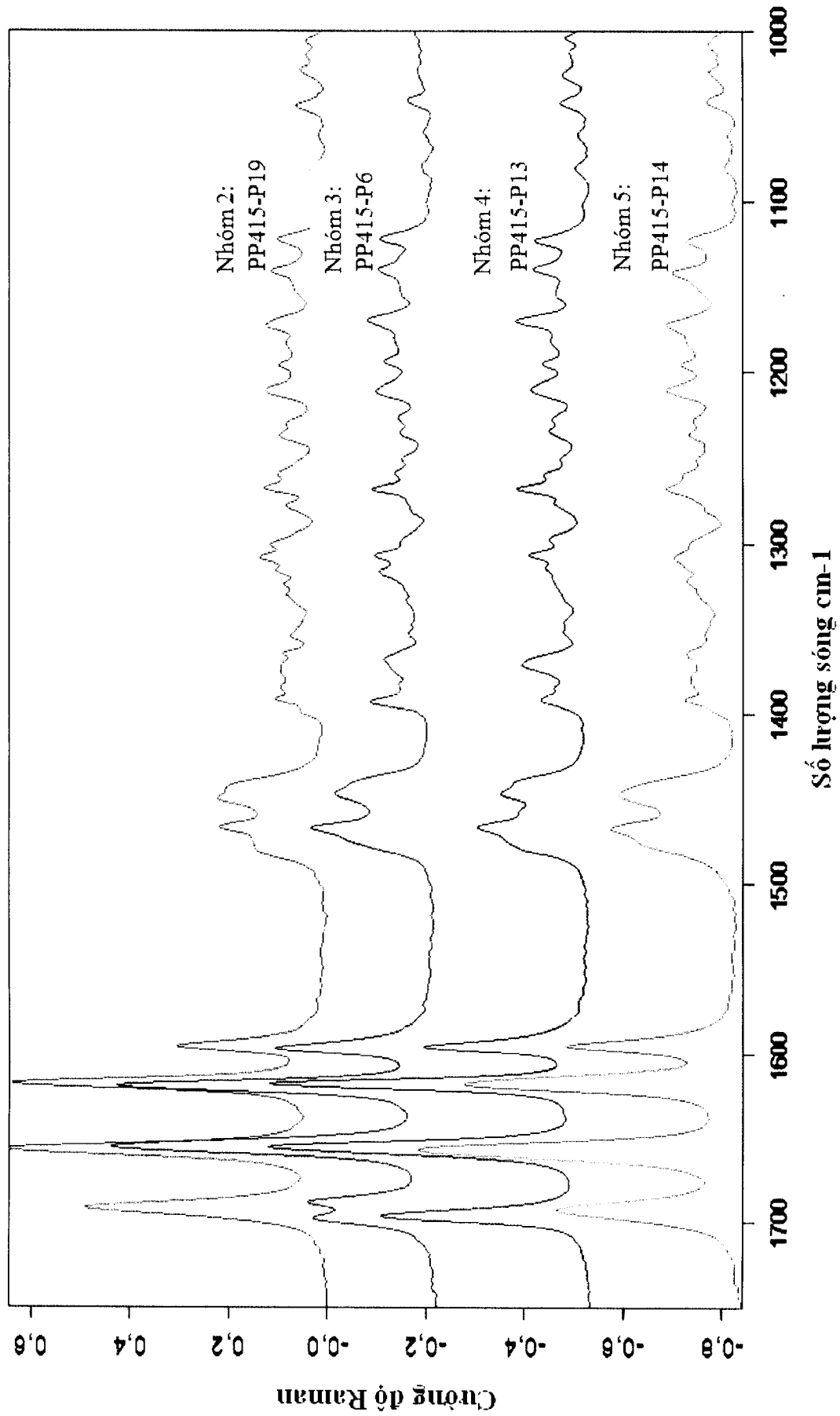


FIG. 72

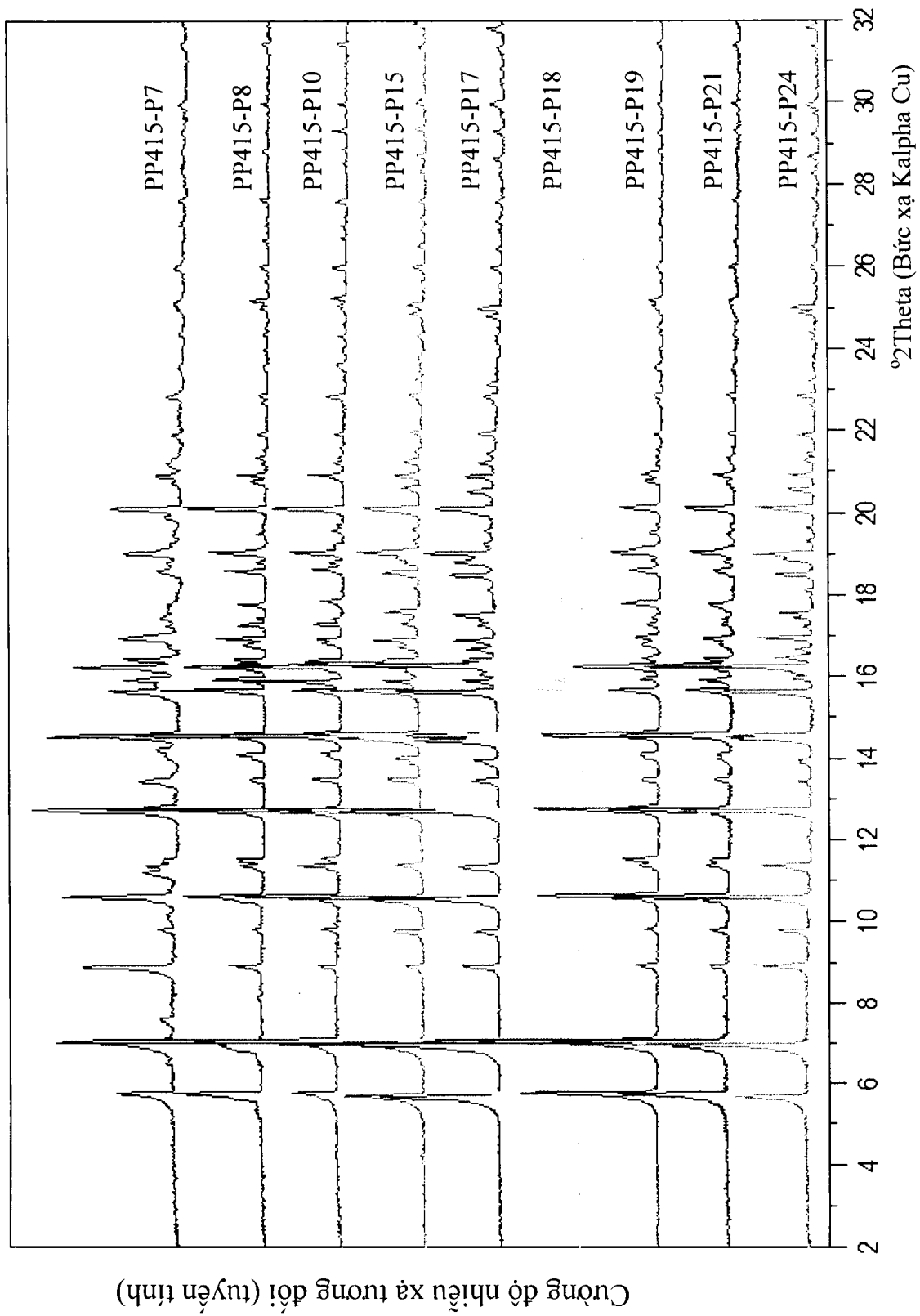


FIG. 73

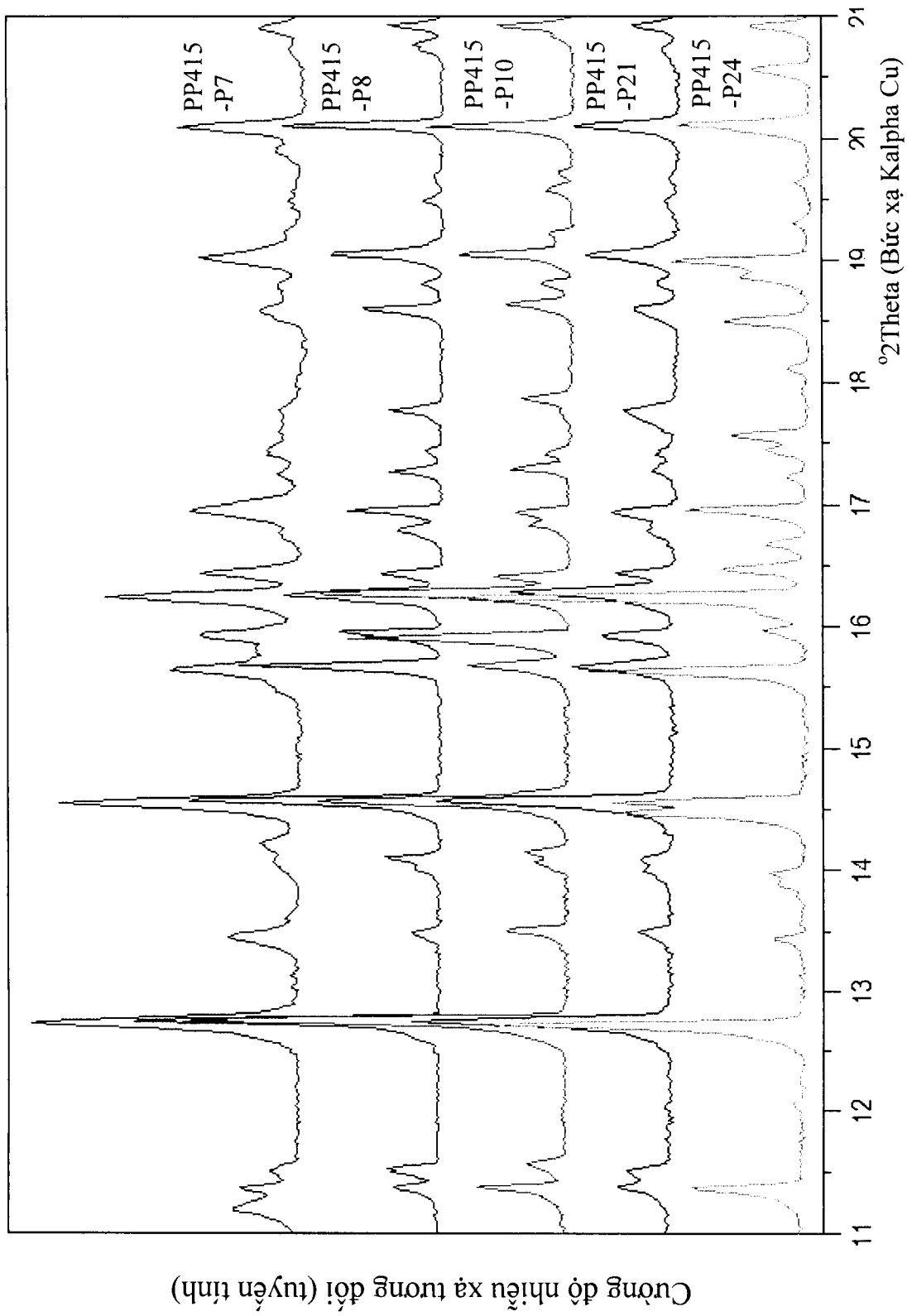


FIG. 74

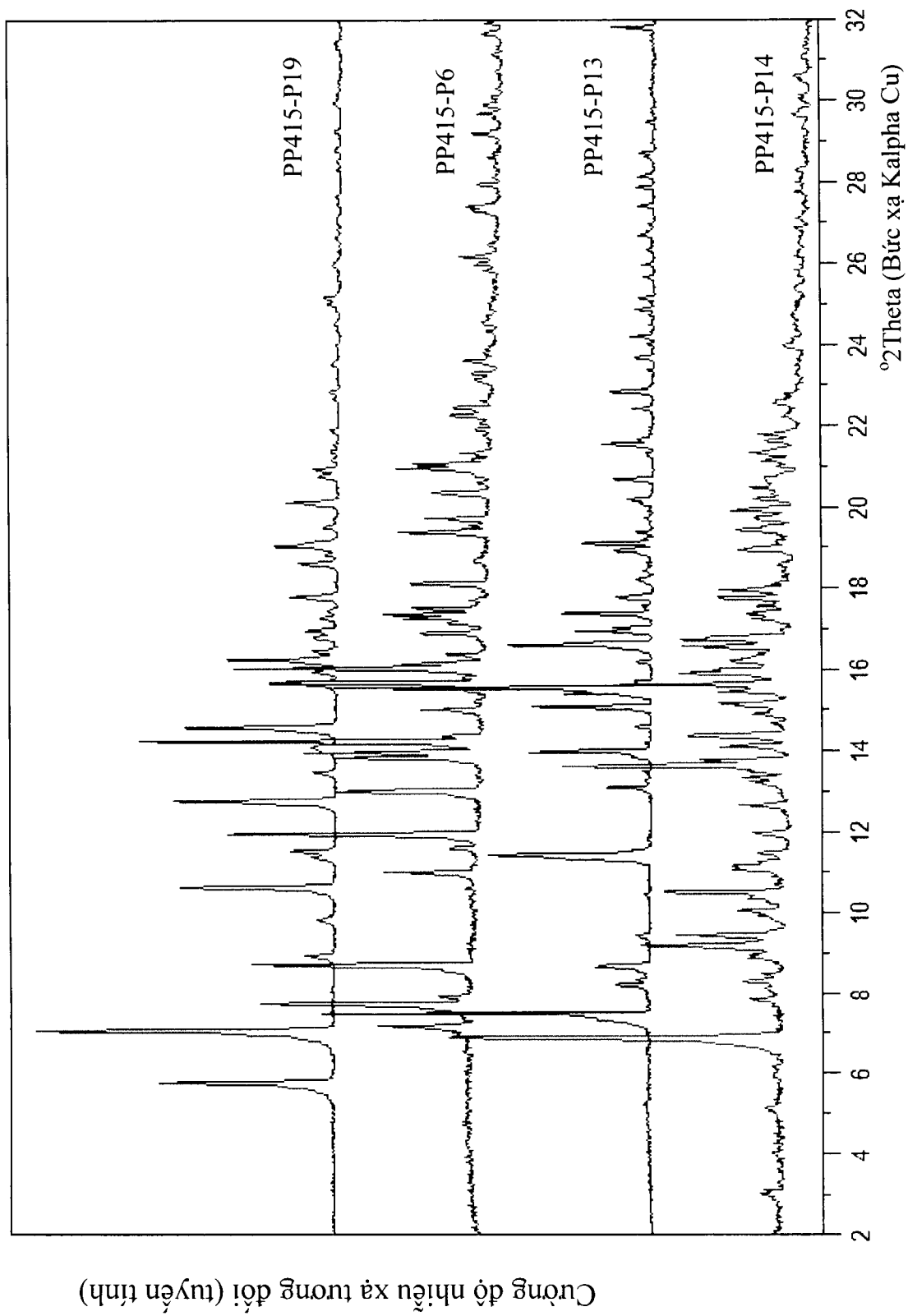


FIG. 75

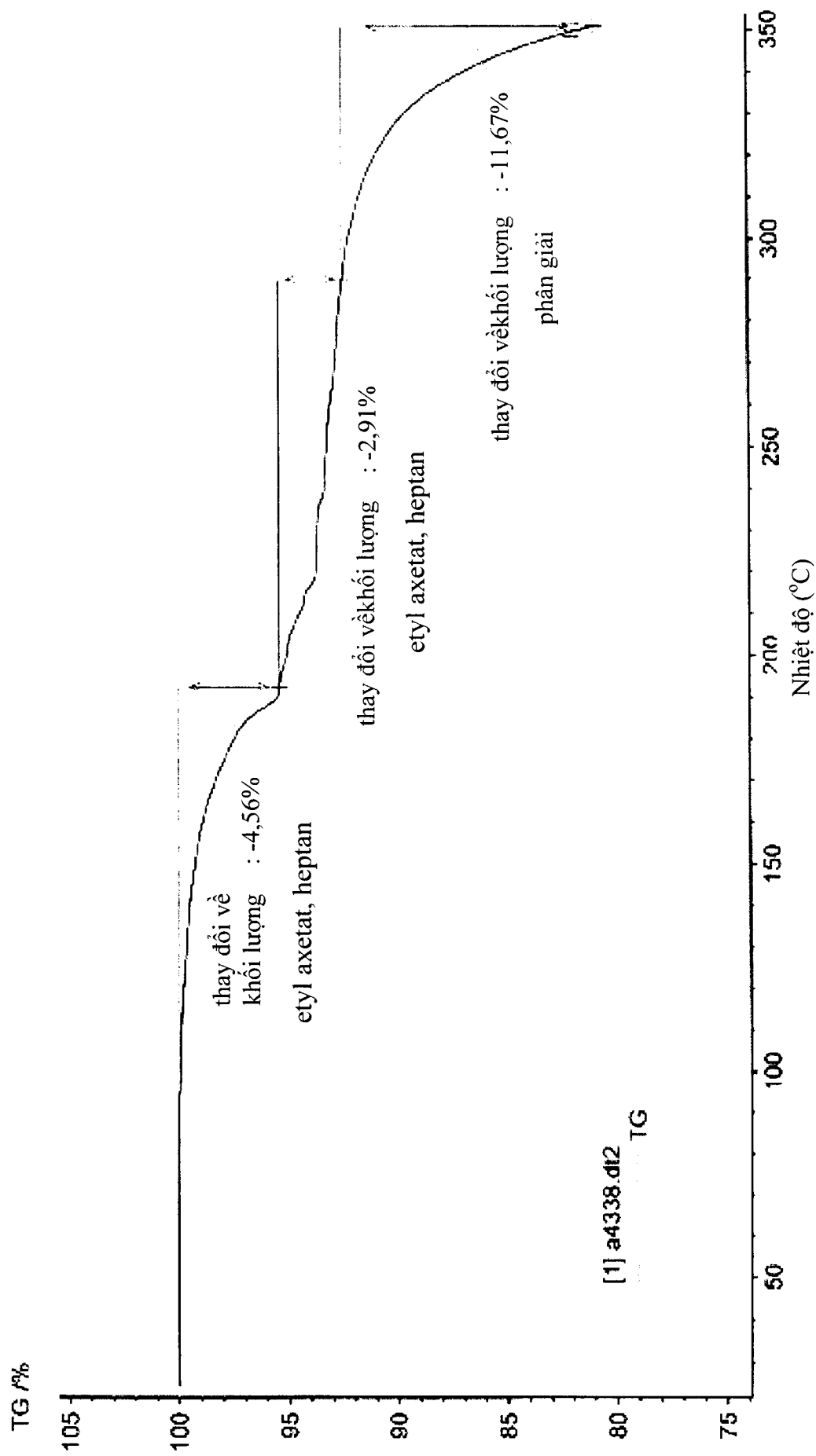


FIG. 76

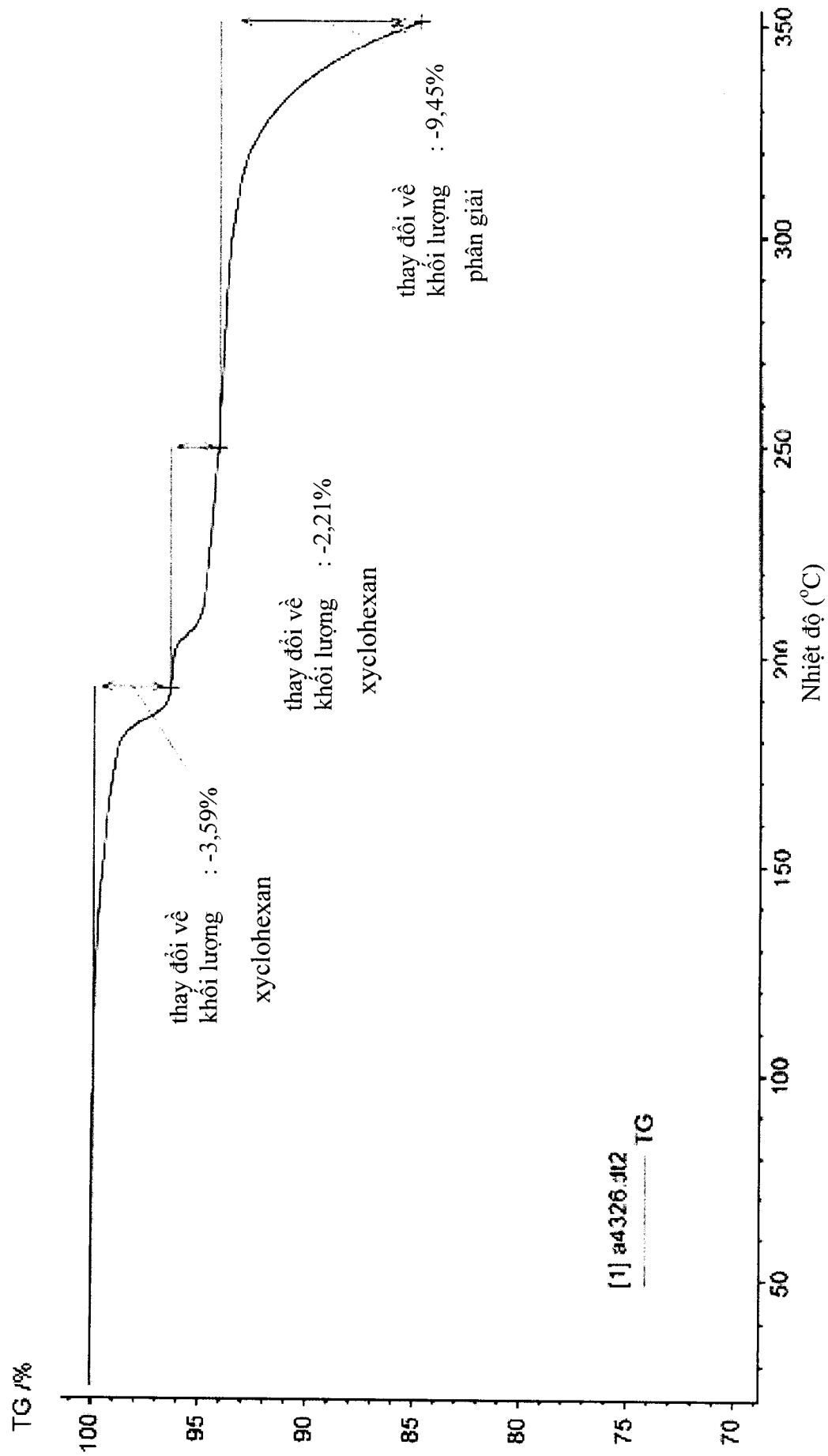


FIG. 77

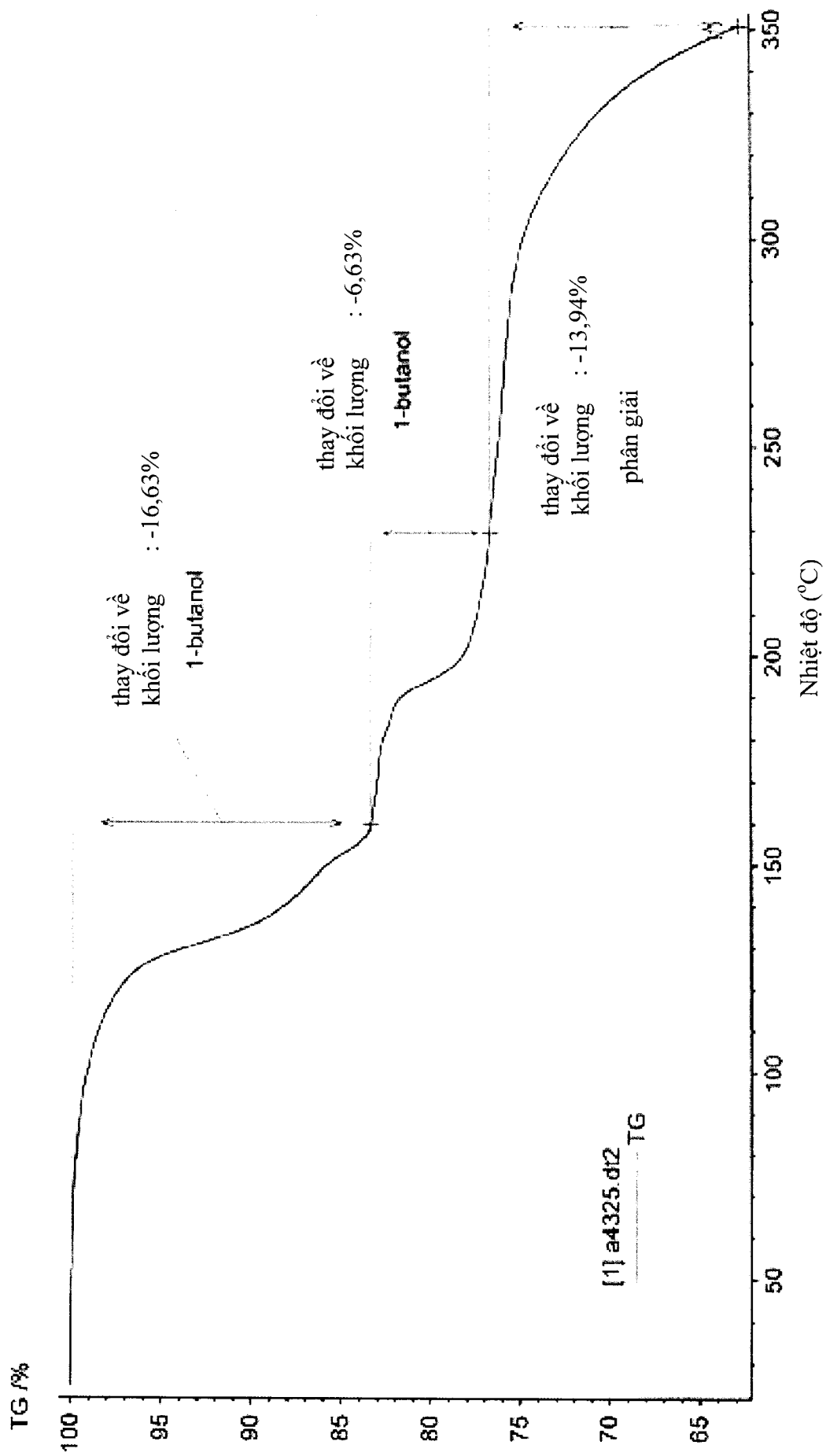


FIG. 78

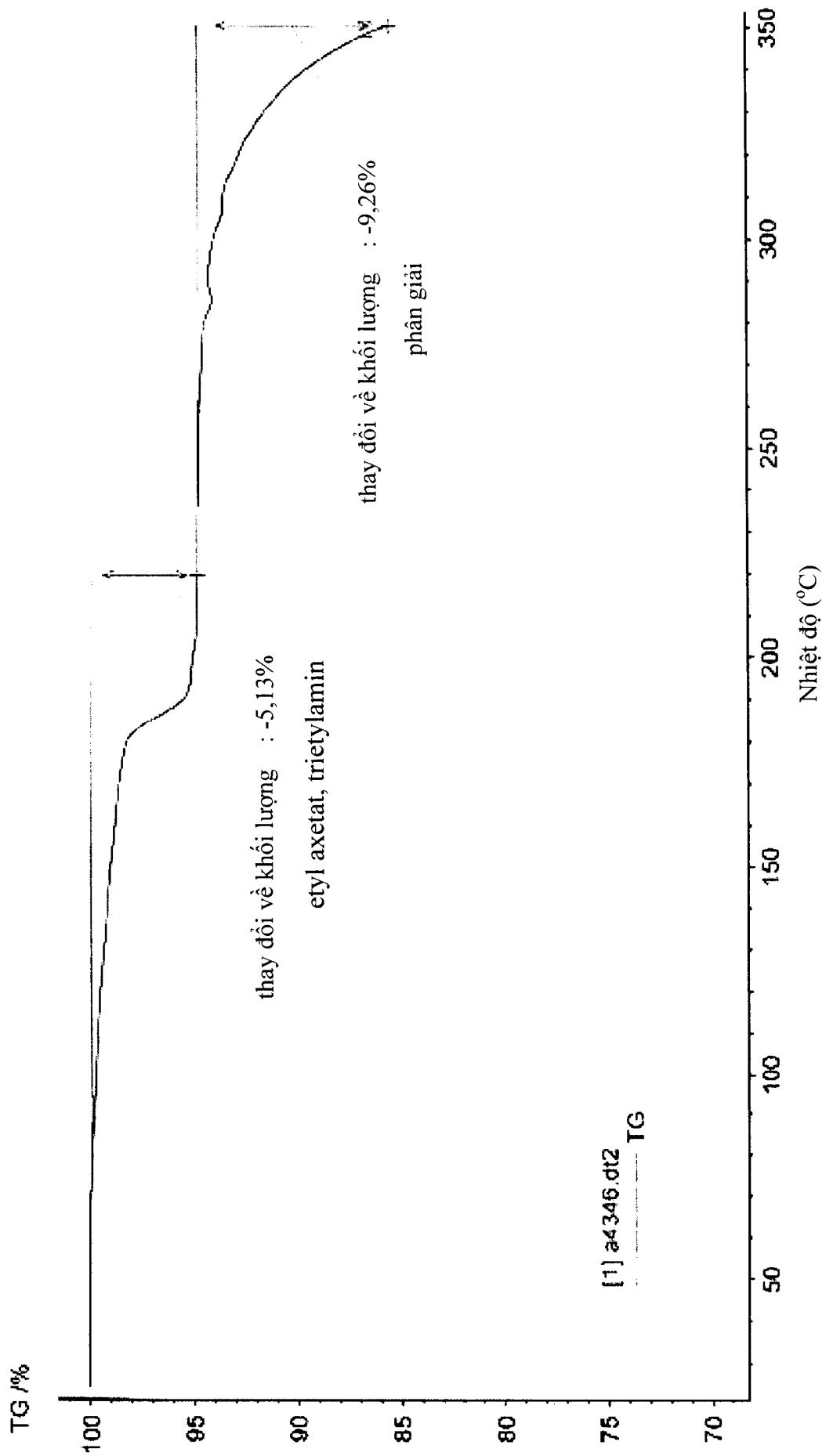


FIG. 79

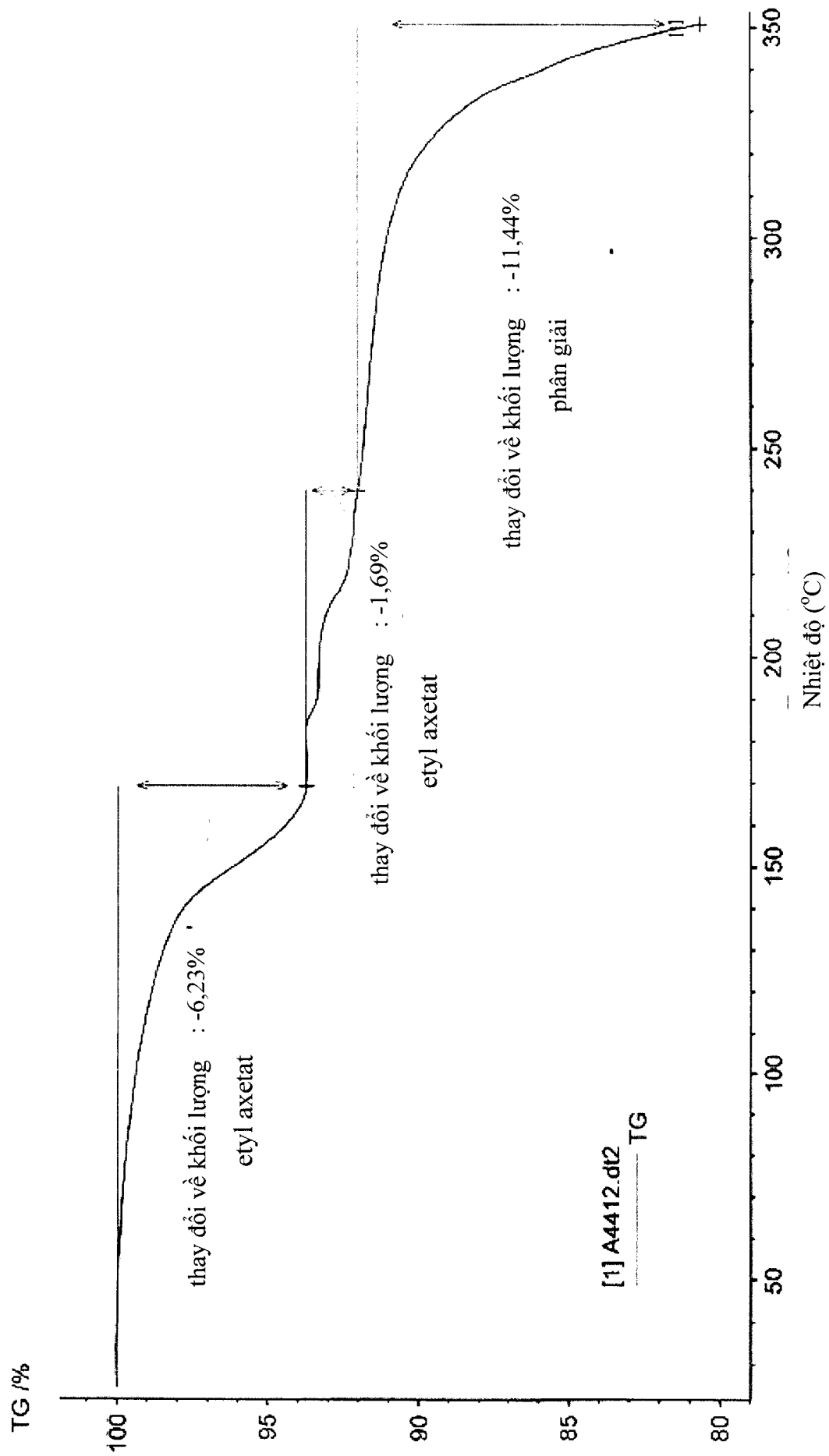


FIG. 80

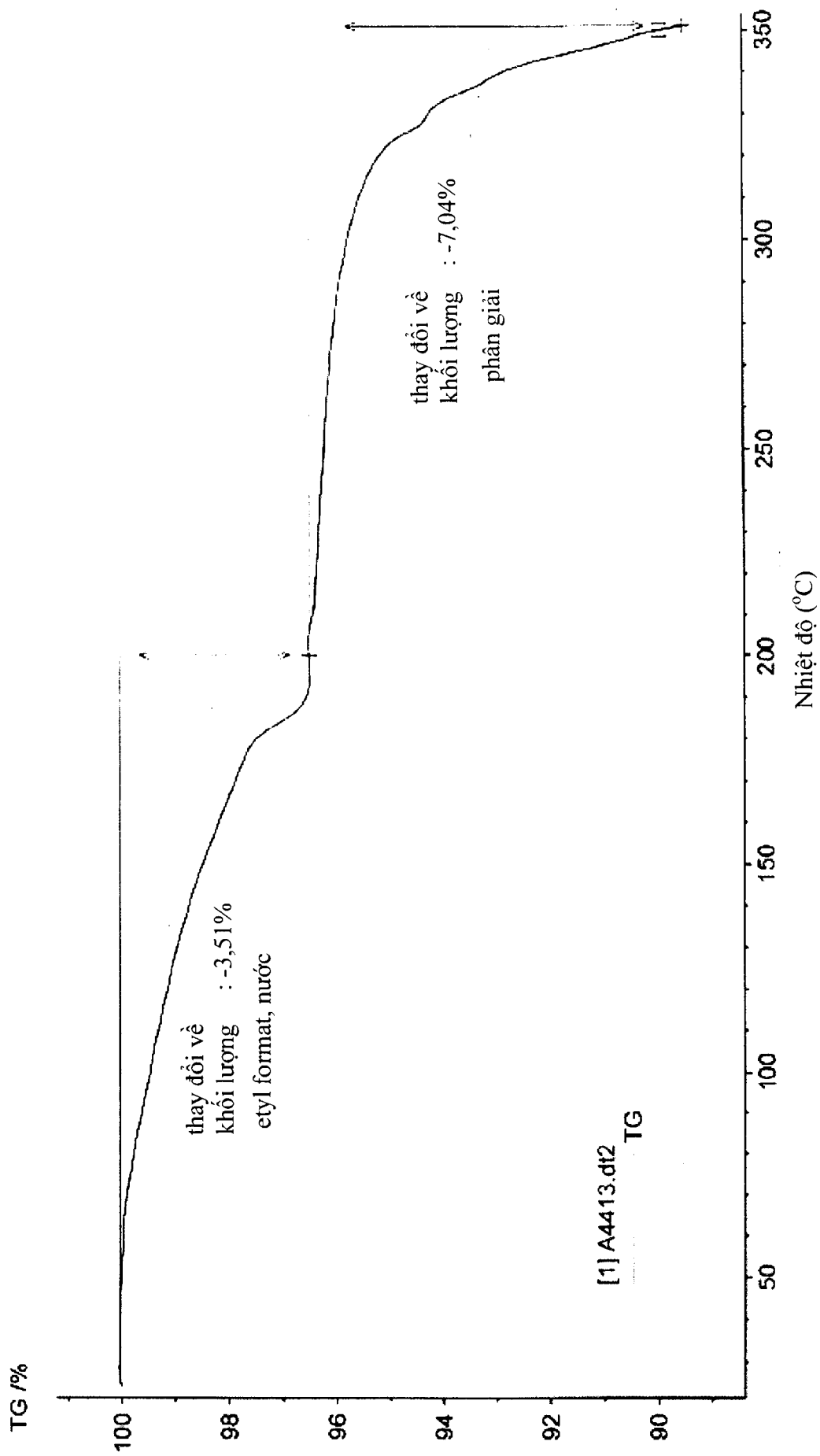


FIG. 81

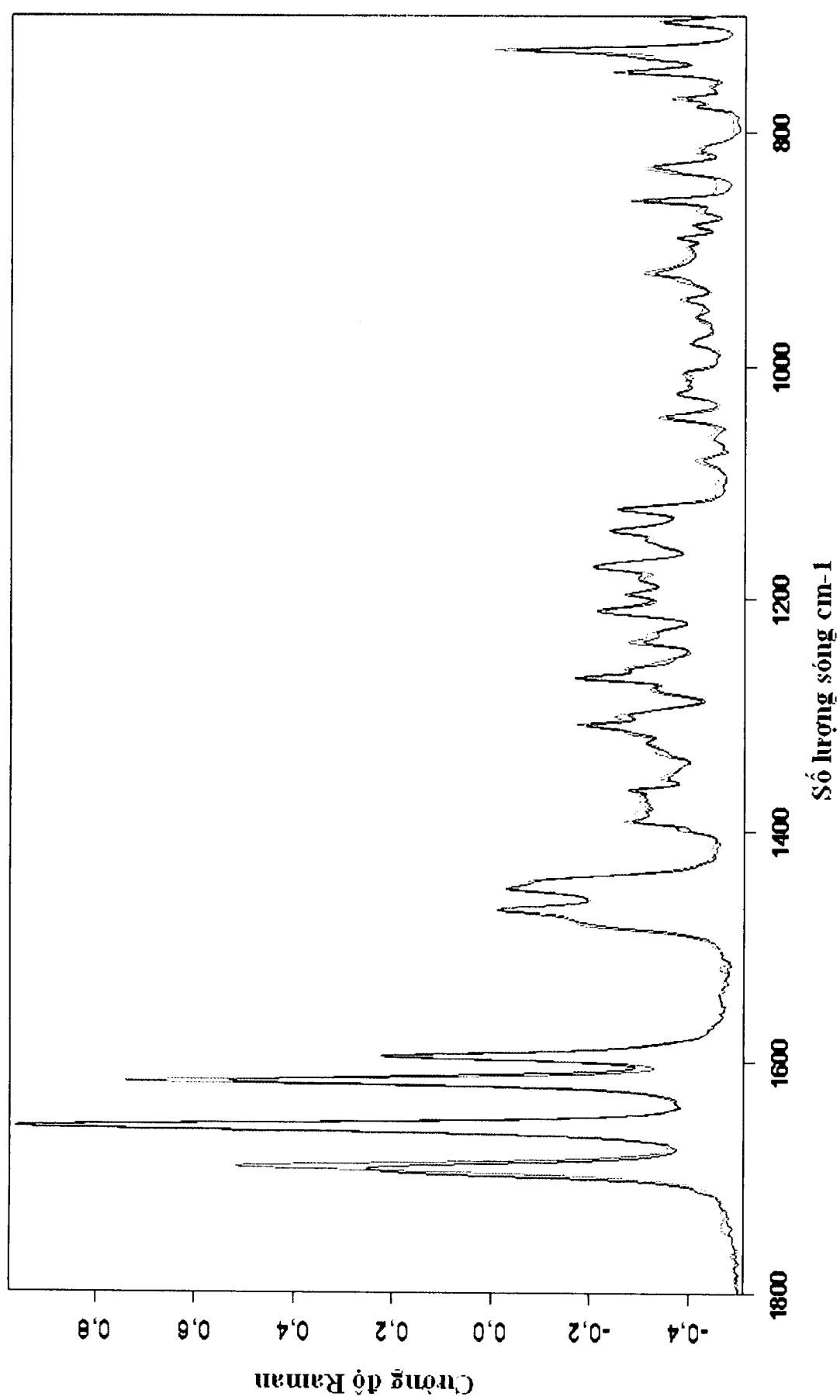


FIG. 82

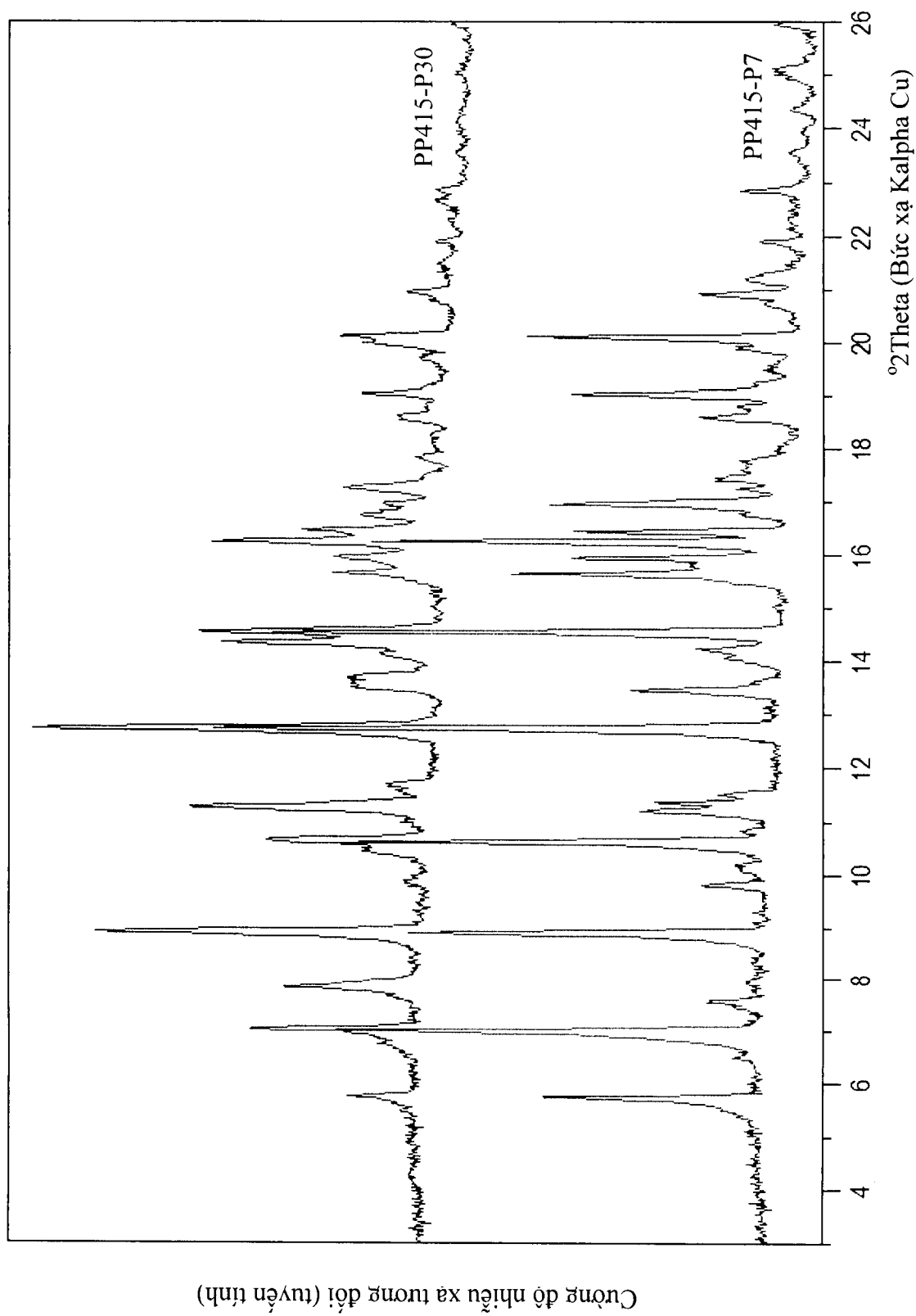


FIG. 83

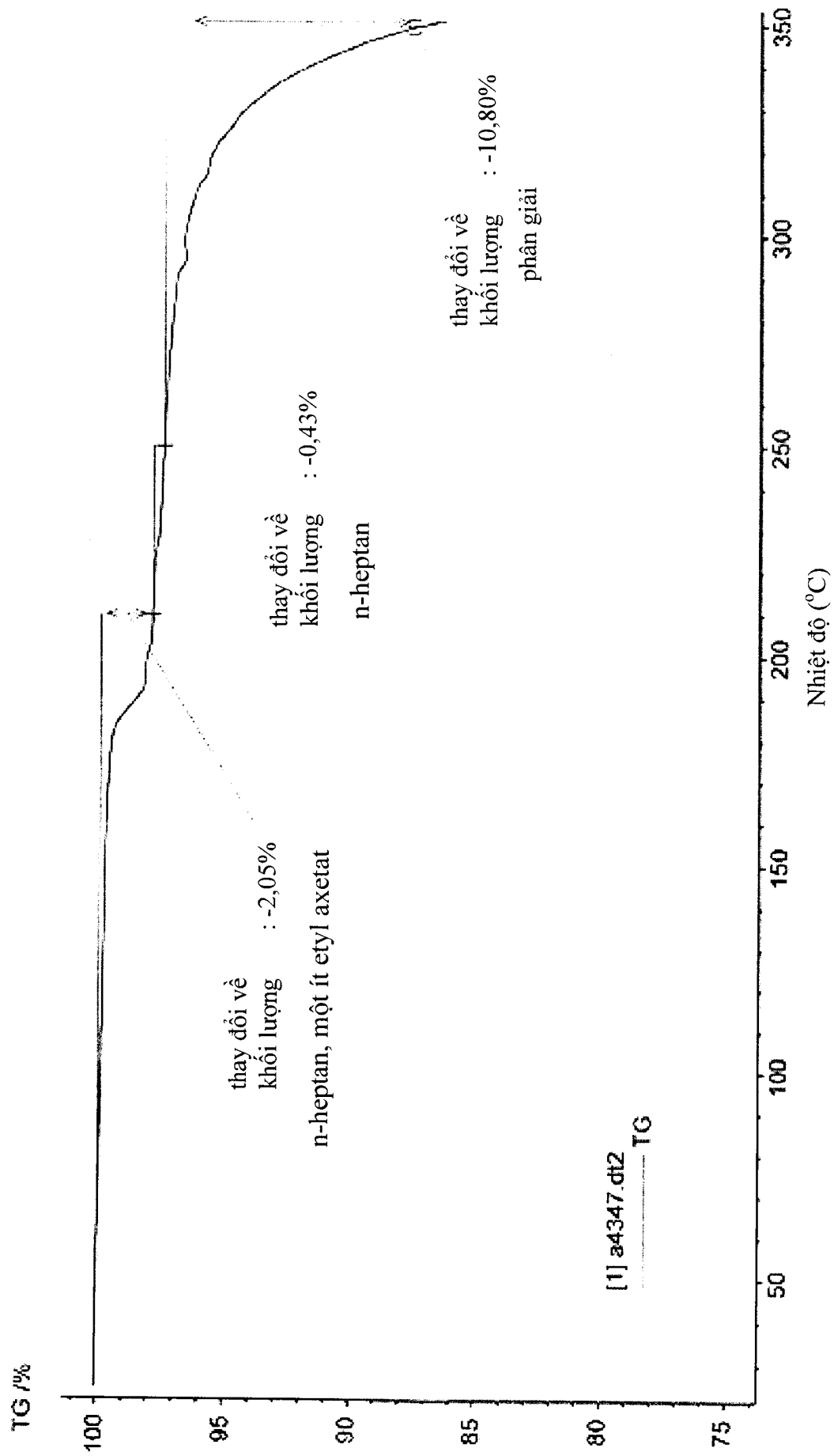


FIG. 84

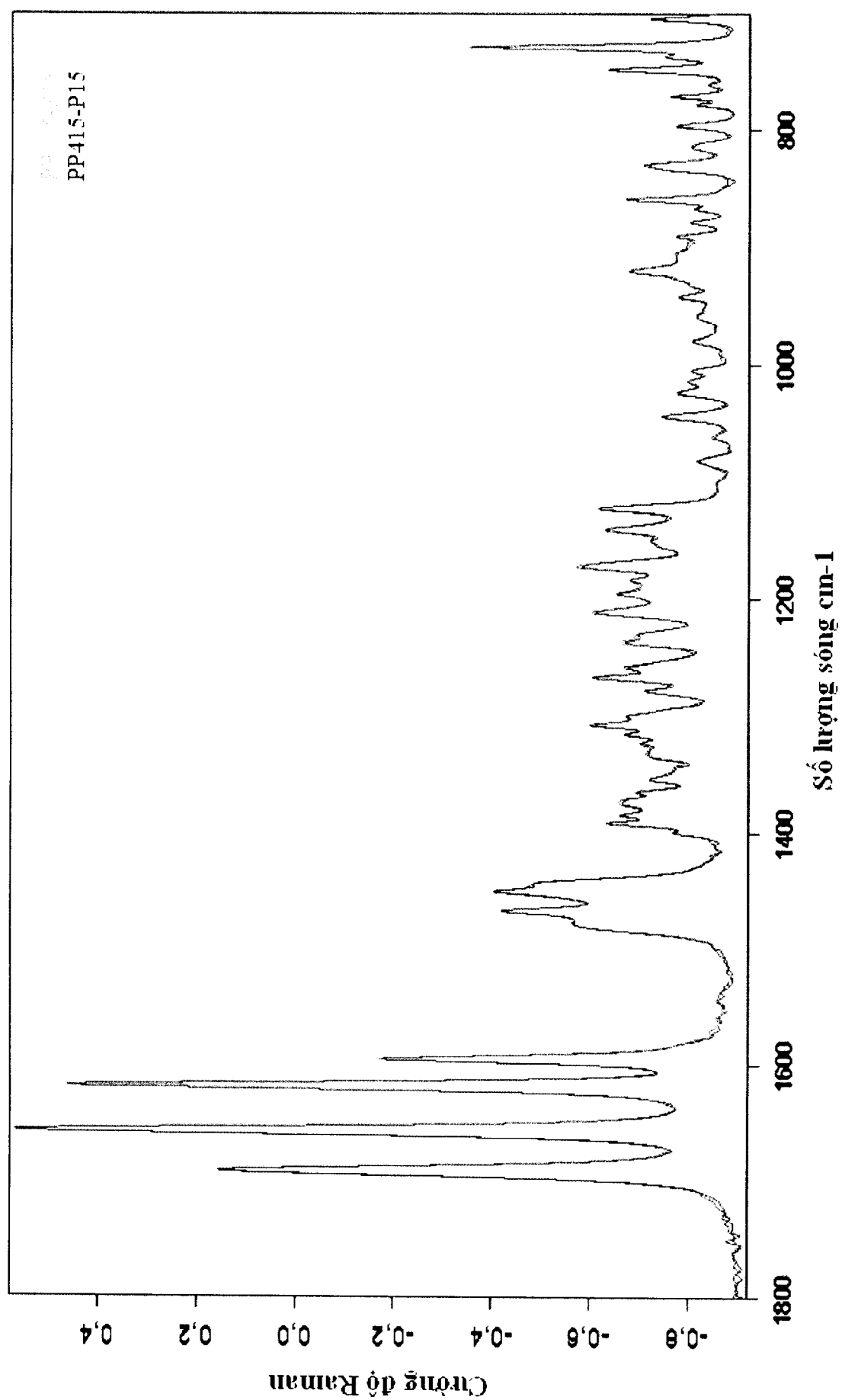


FIG. 85

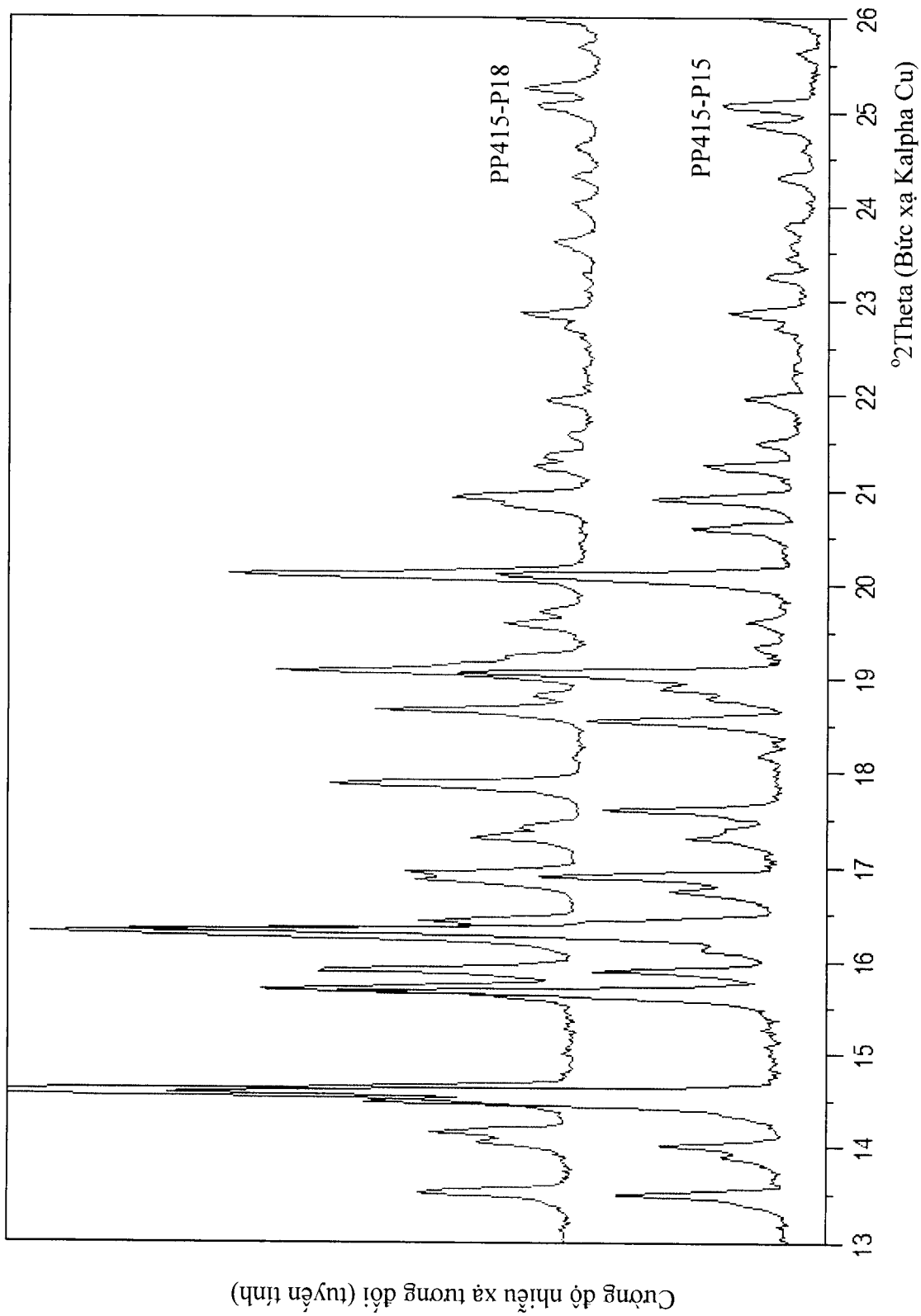


FIG. 86

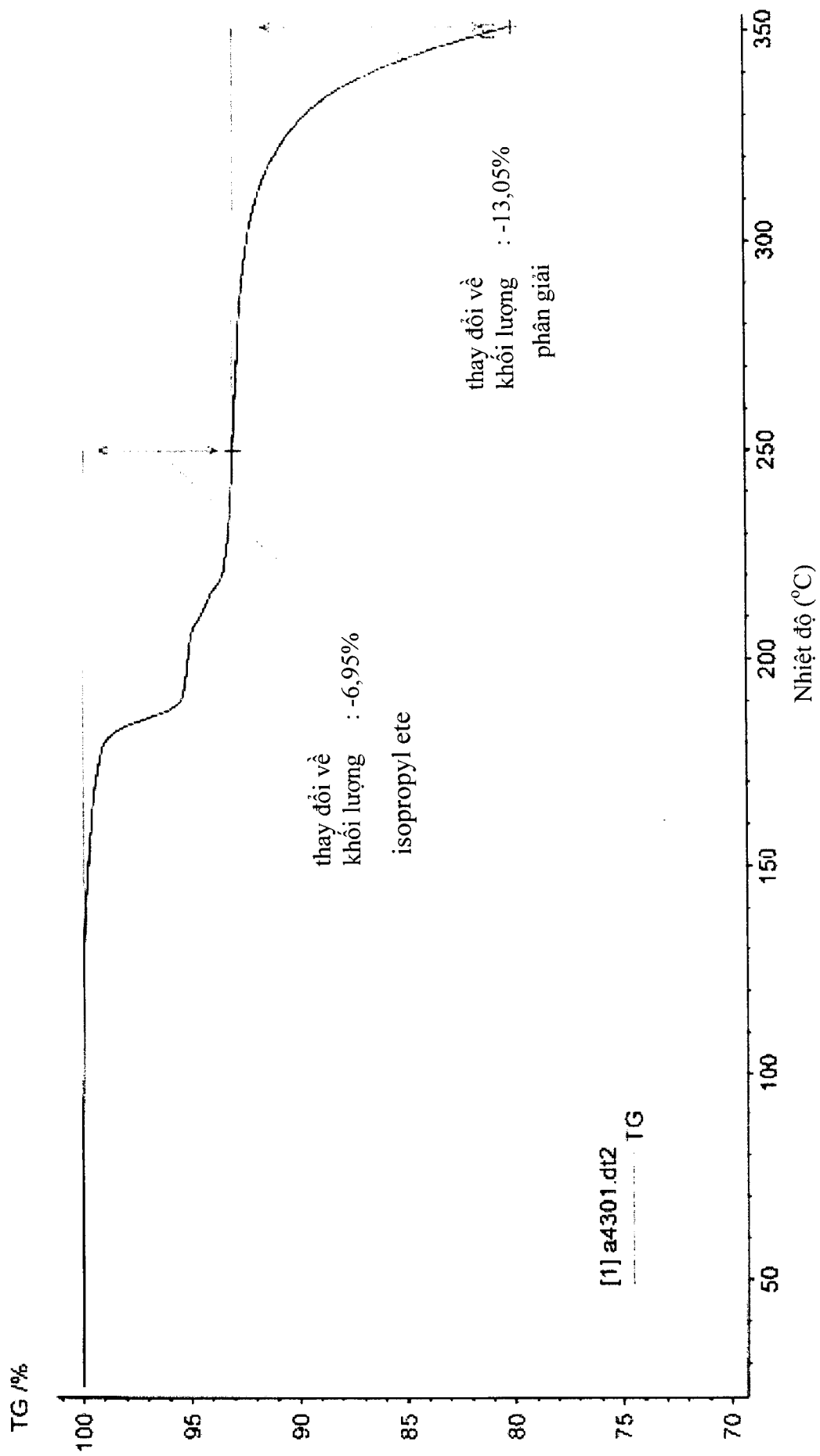


FIG. 87

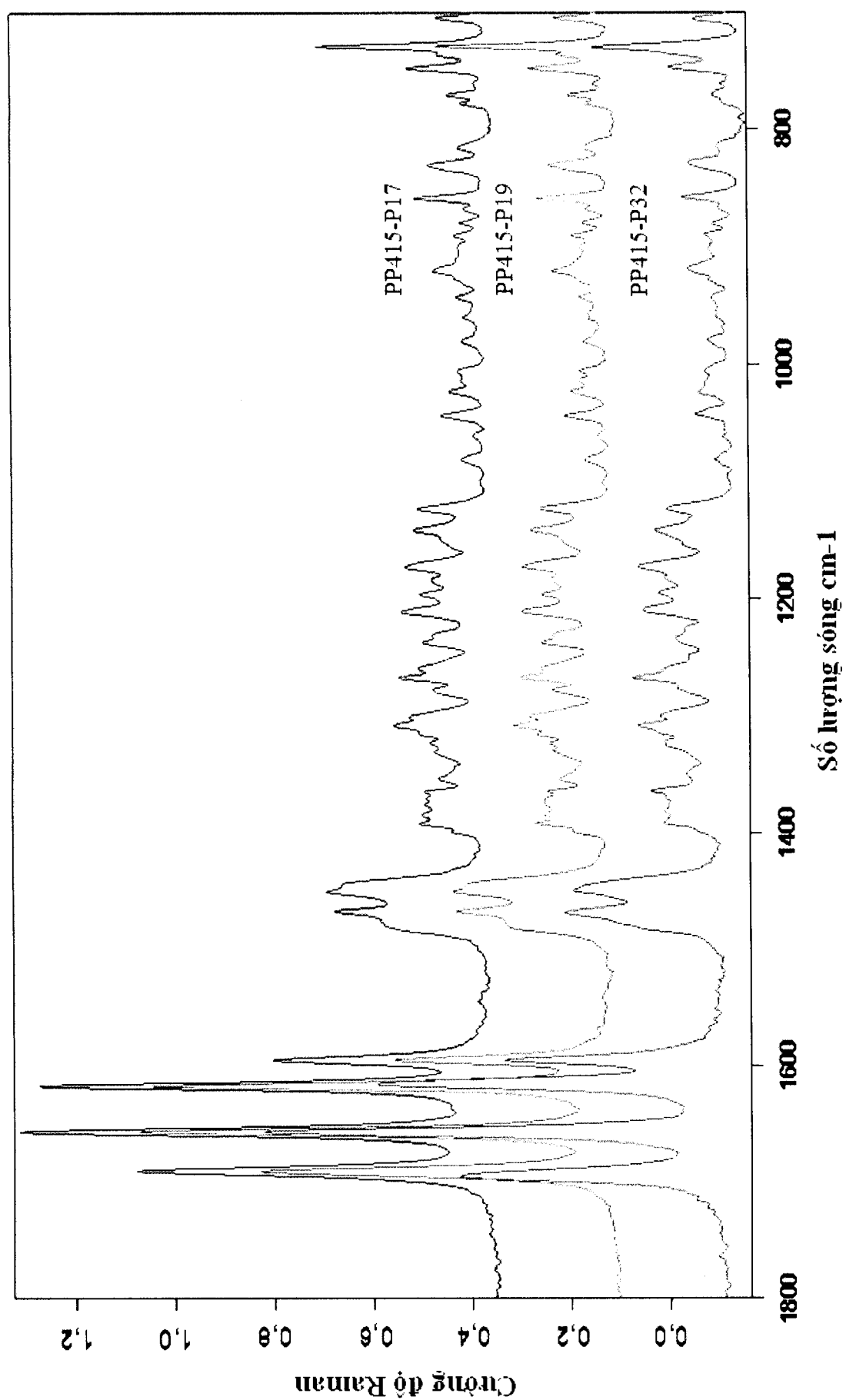


FIG. 88

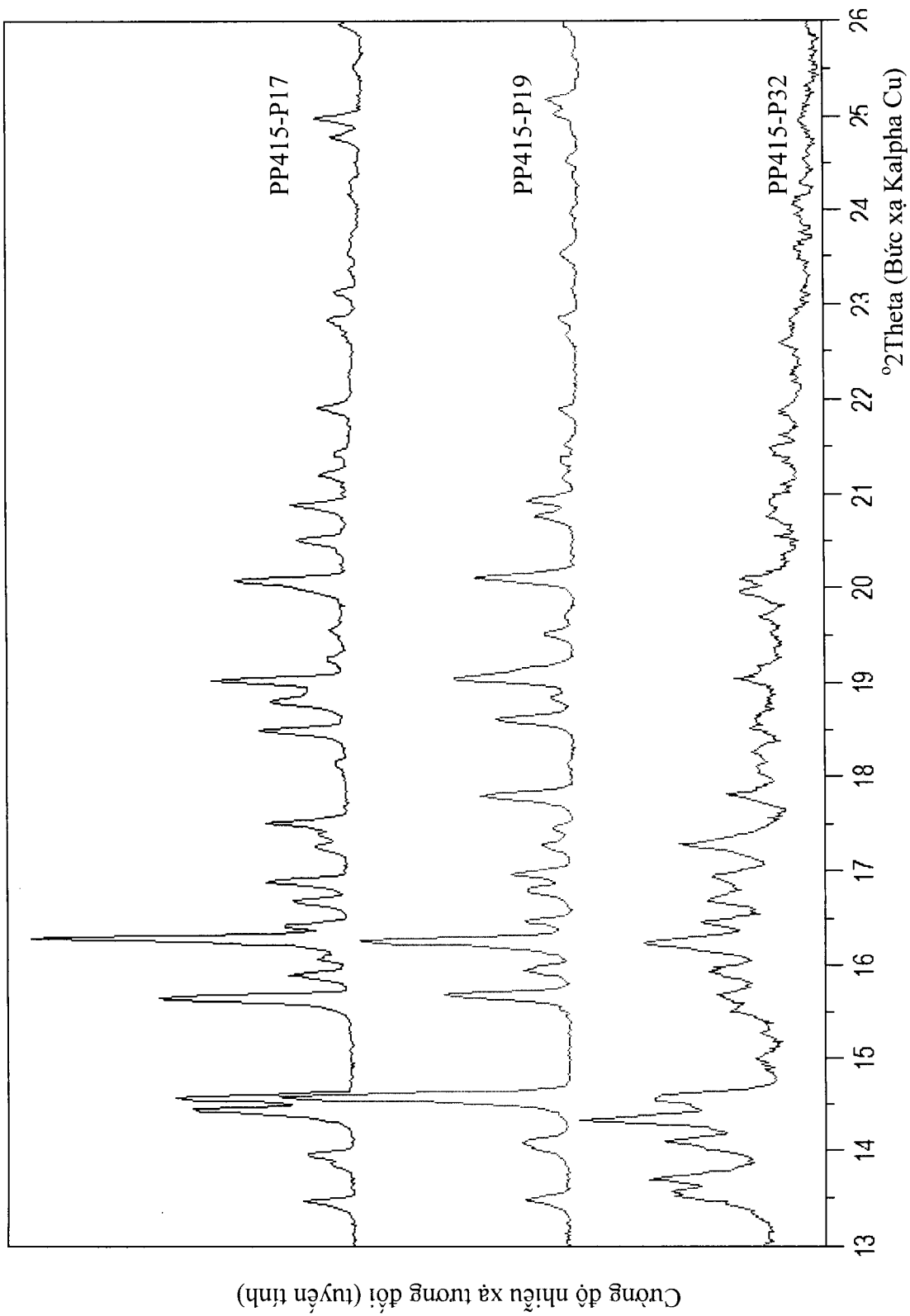


FIG. 89

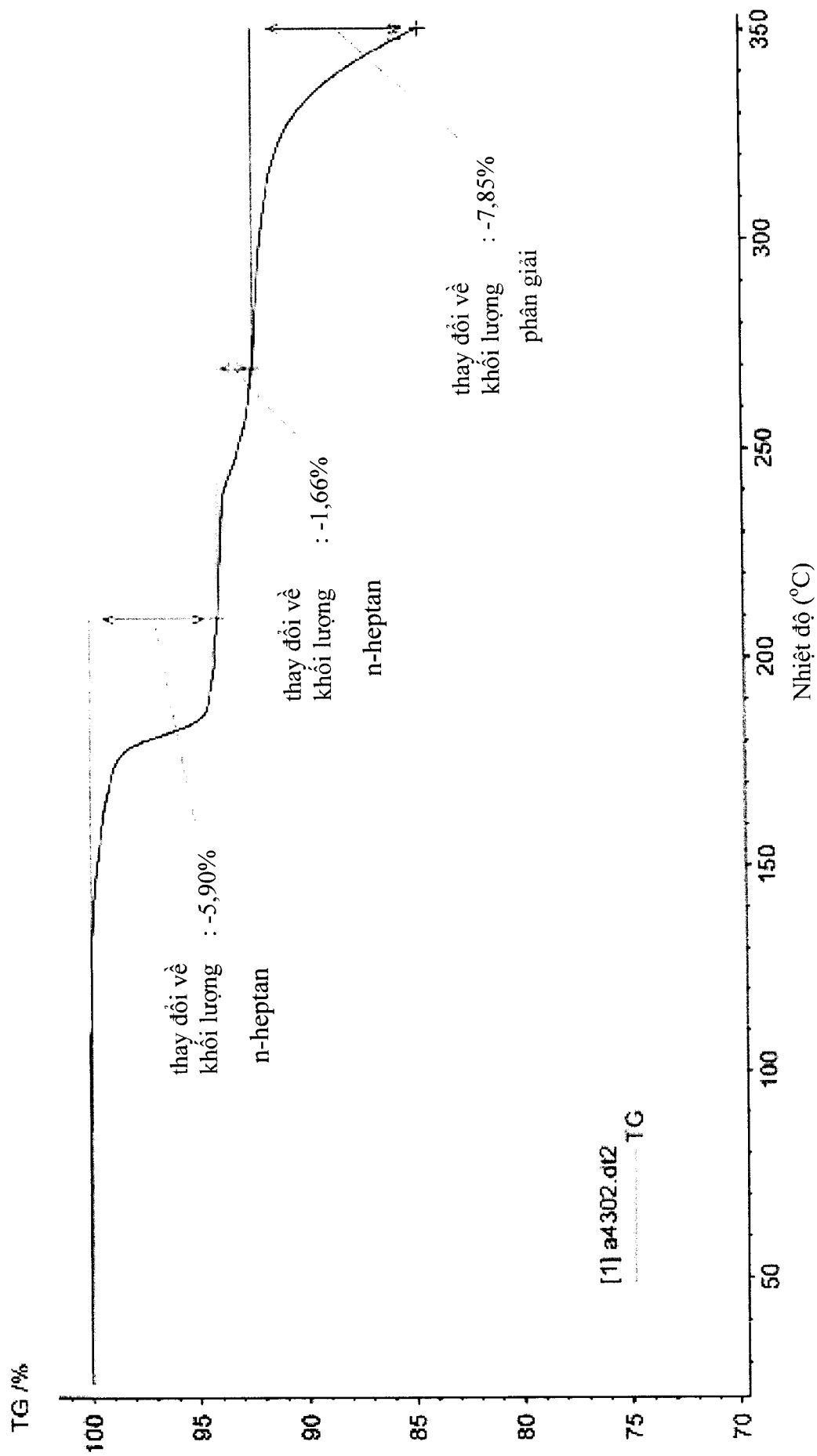


FIG. 90

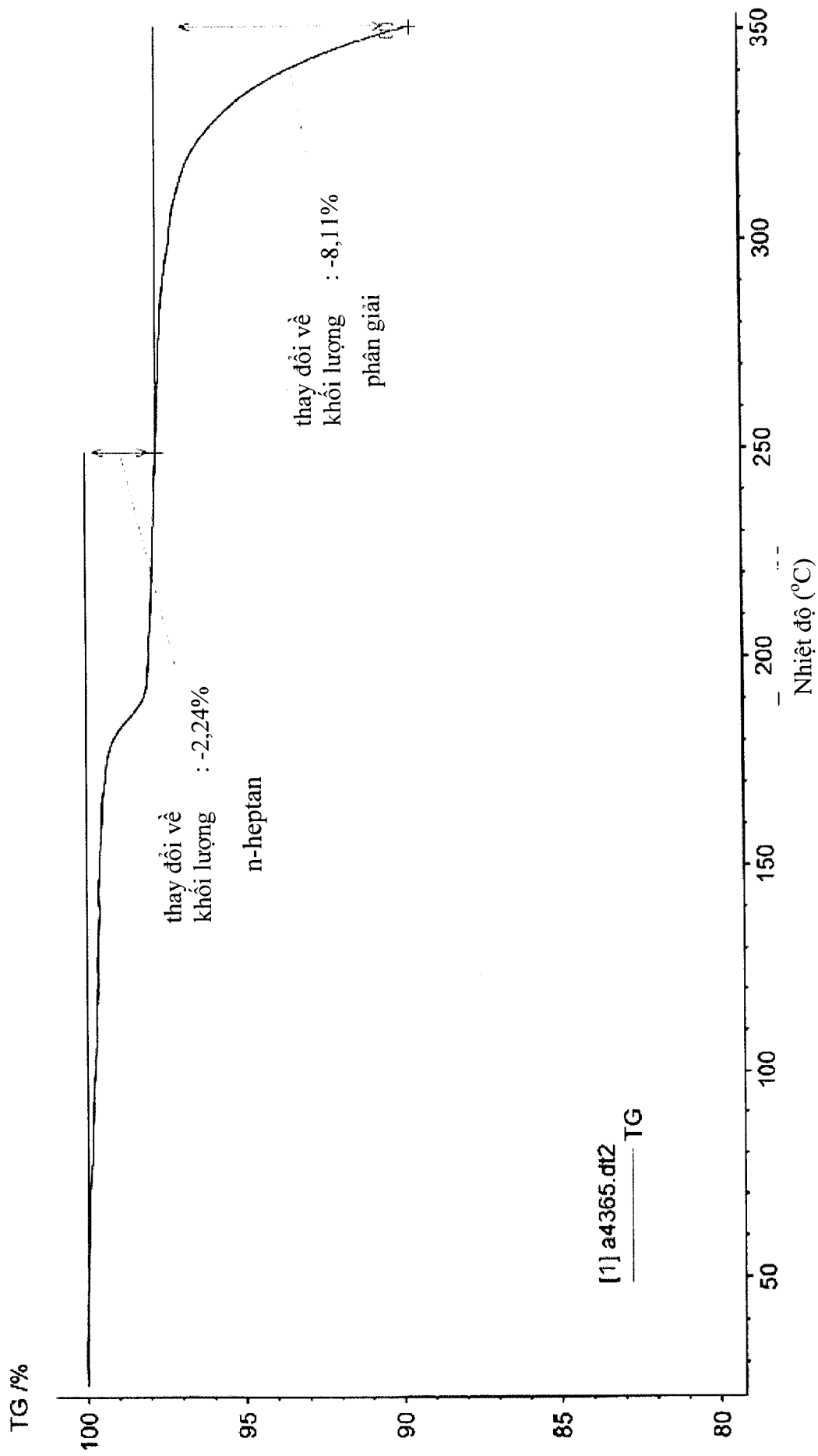


FIG. 91

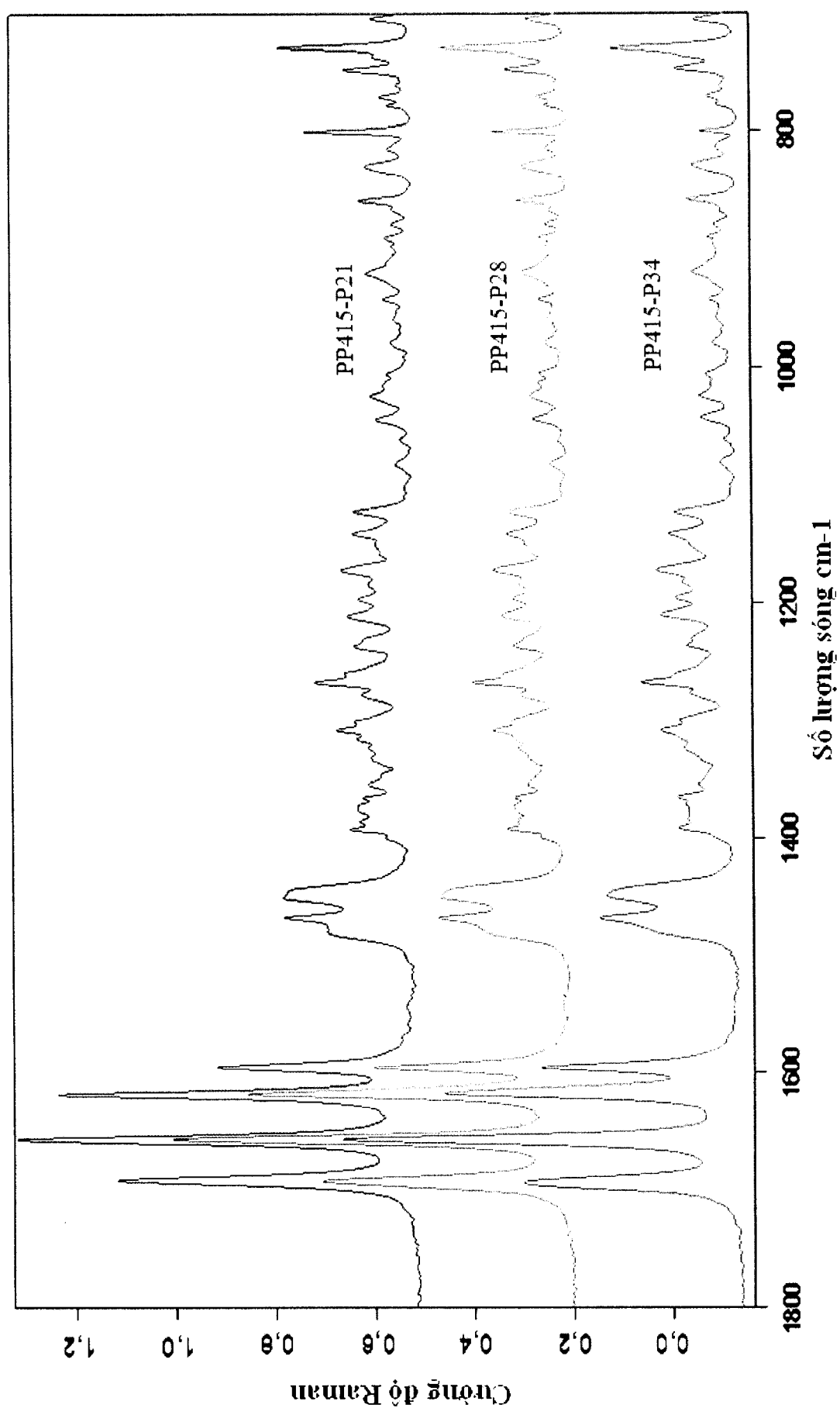
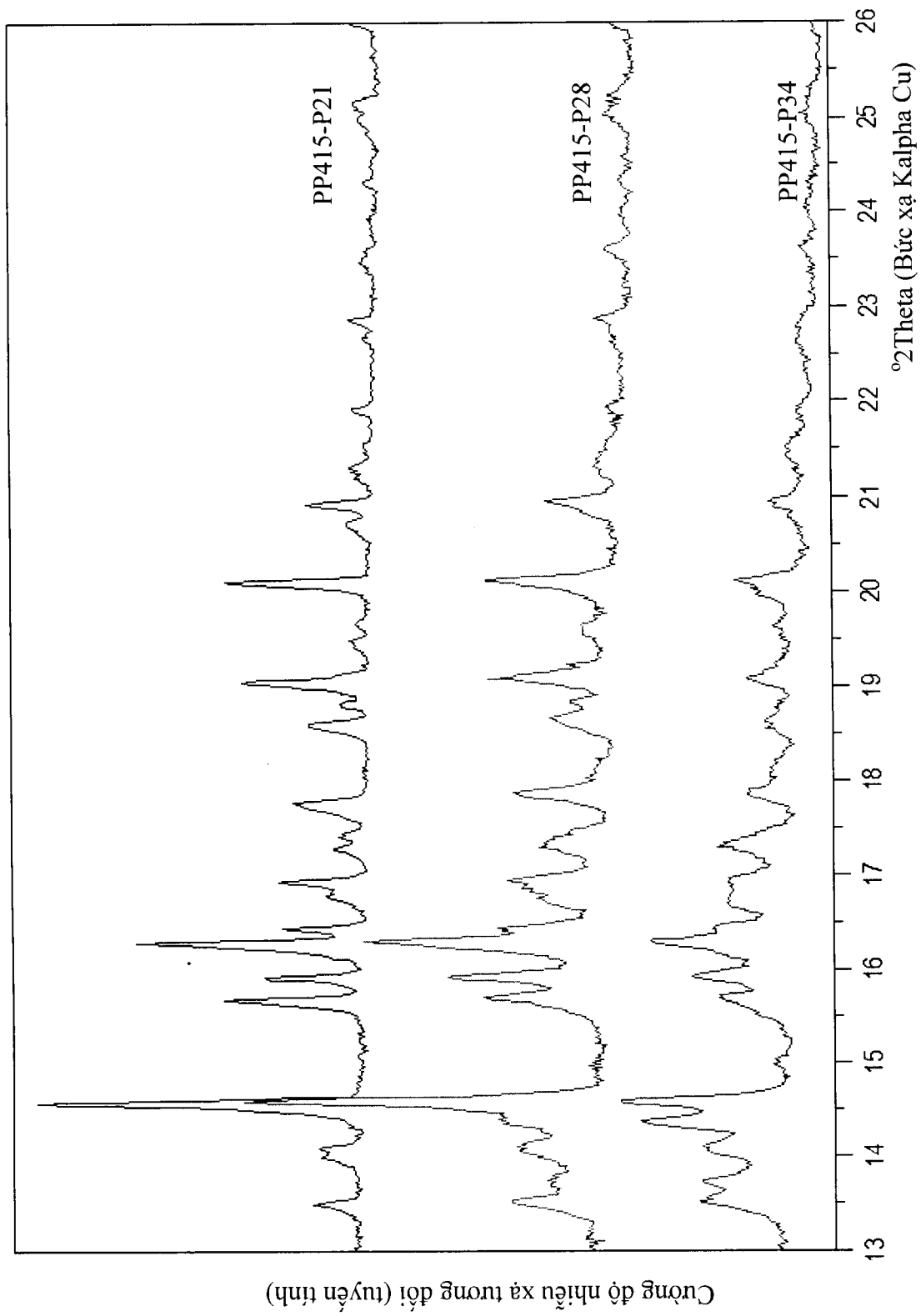


FIG. 92

**FIG. 93**

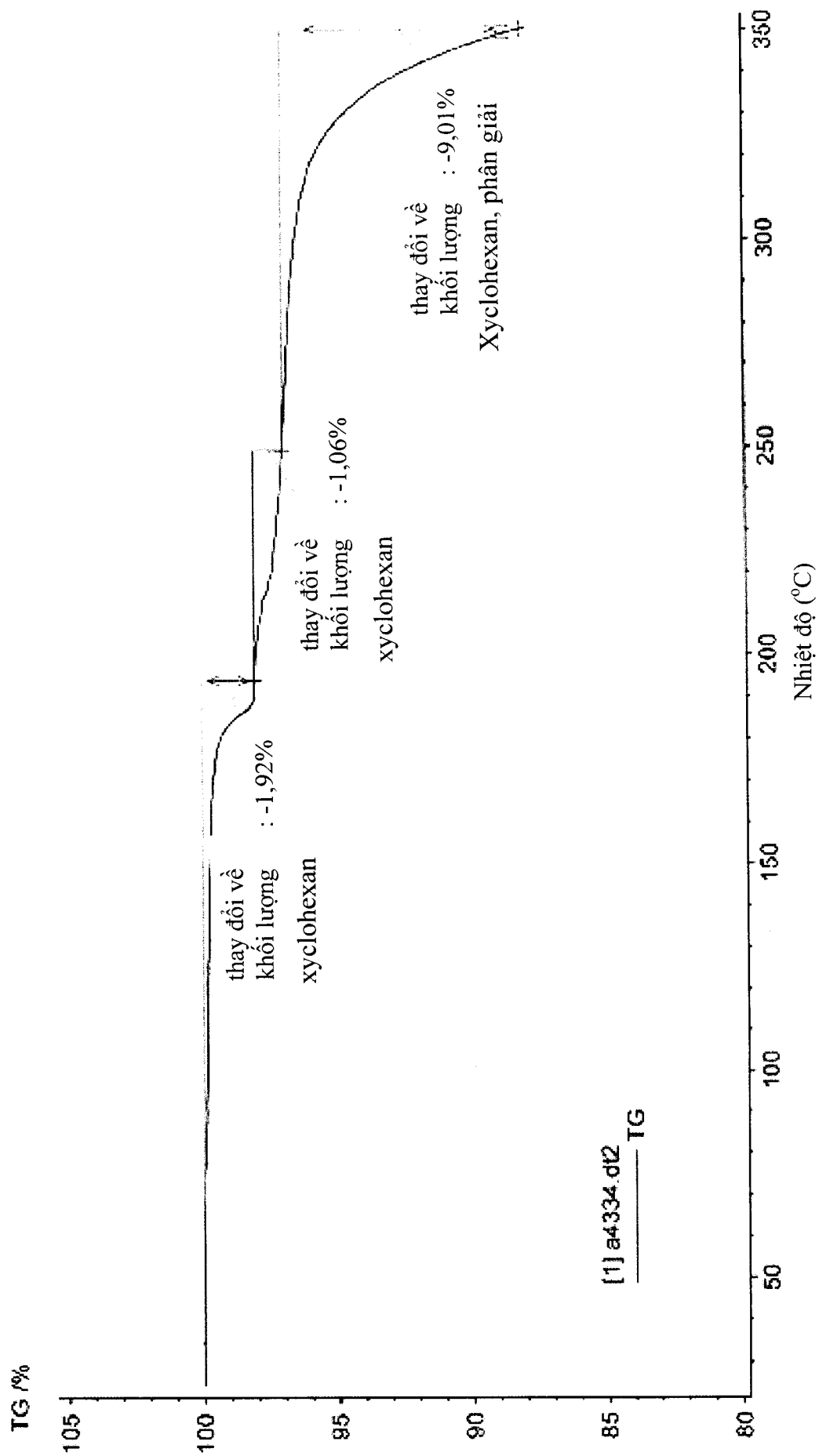


FIG. 94

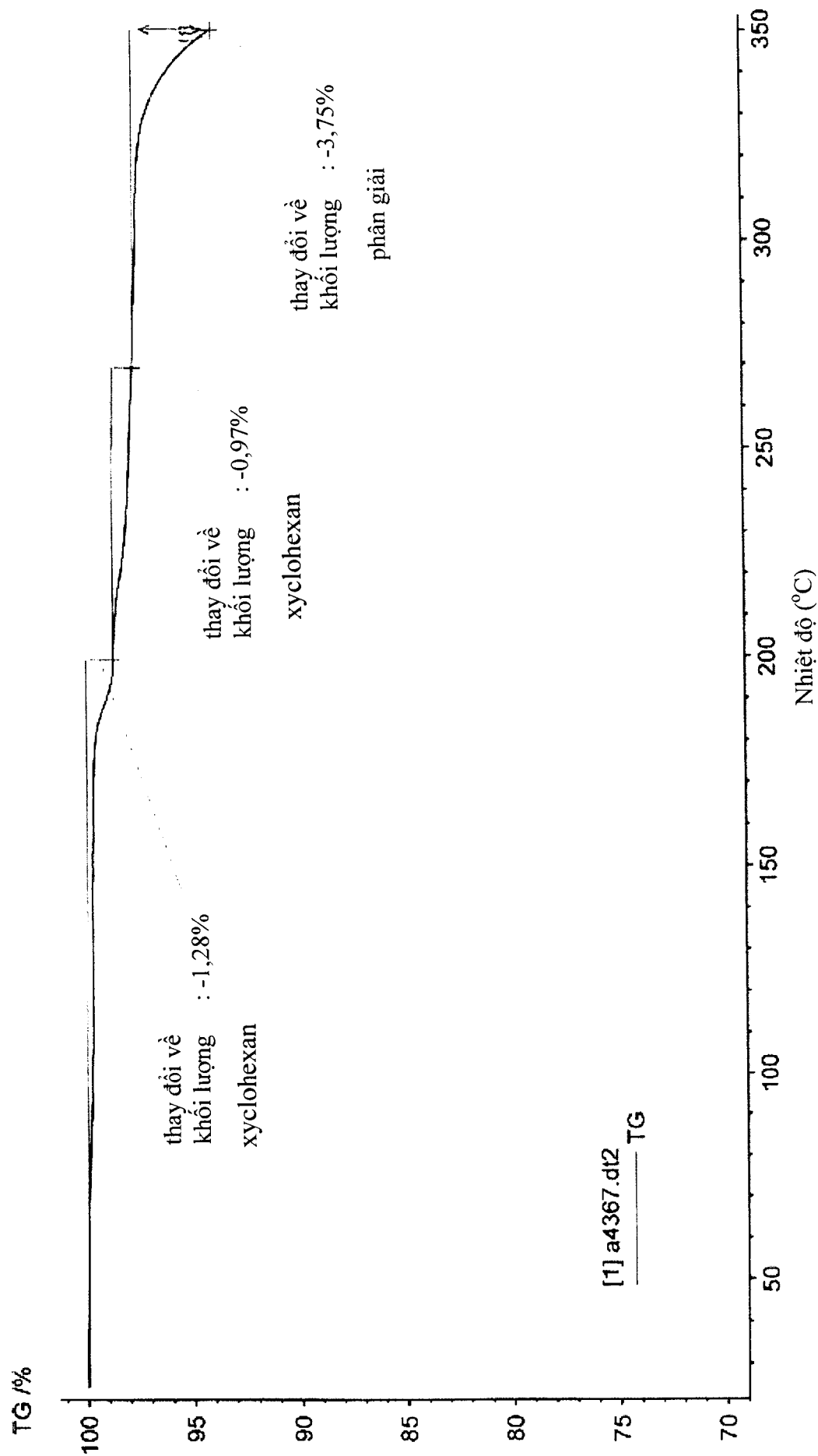


FIG. 95

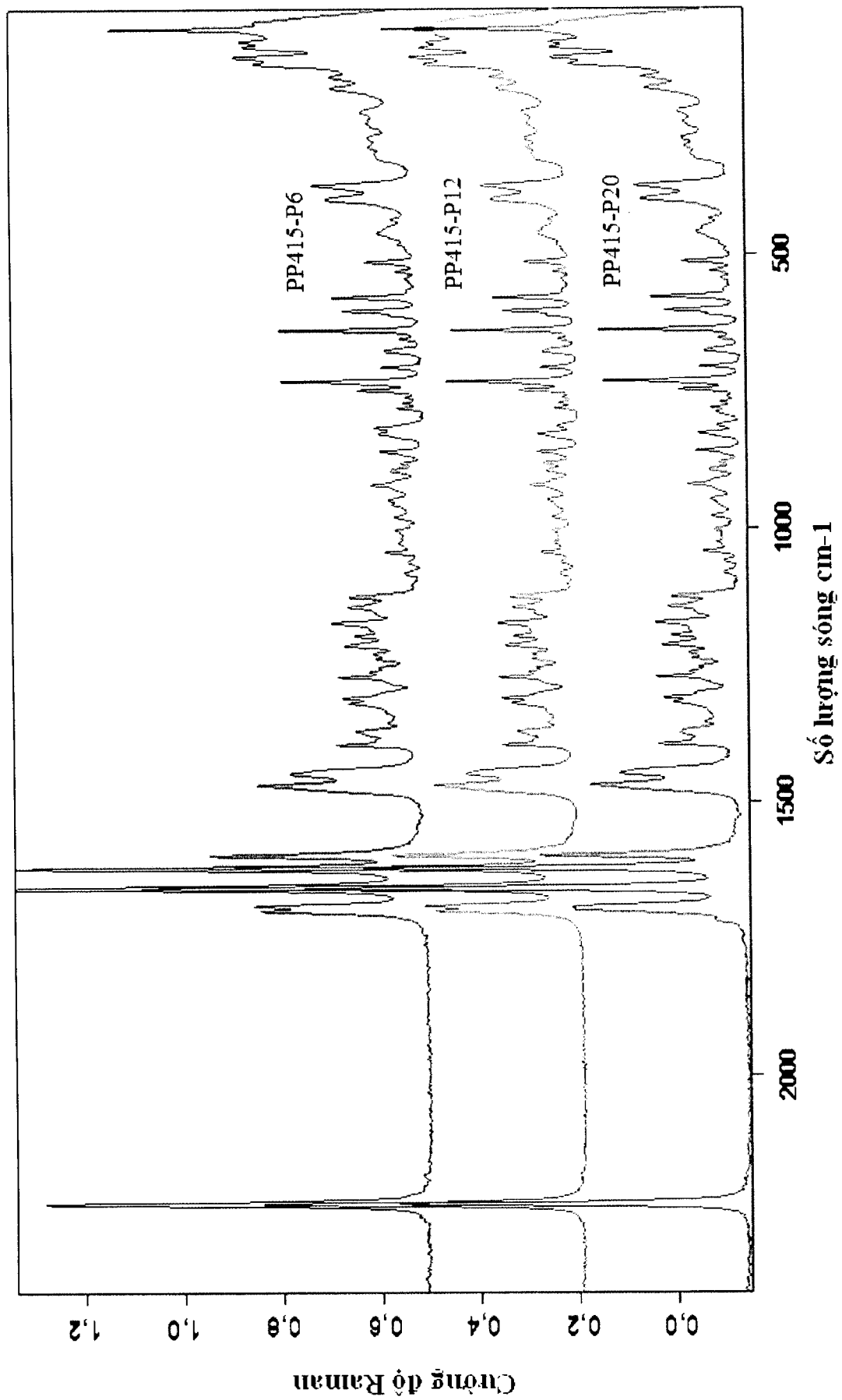


FIG. 96

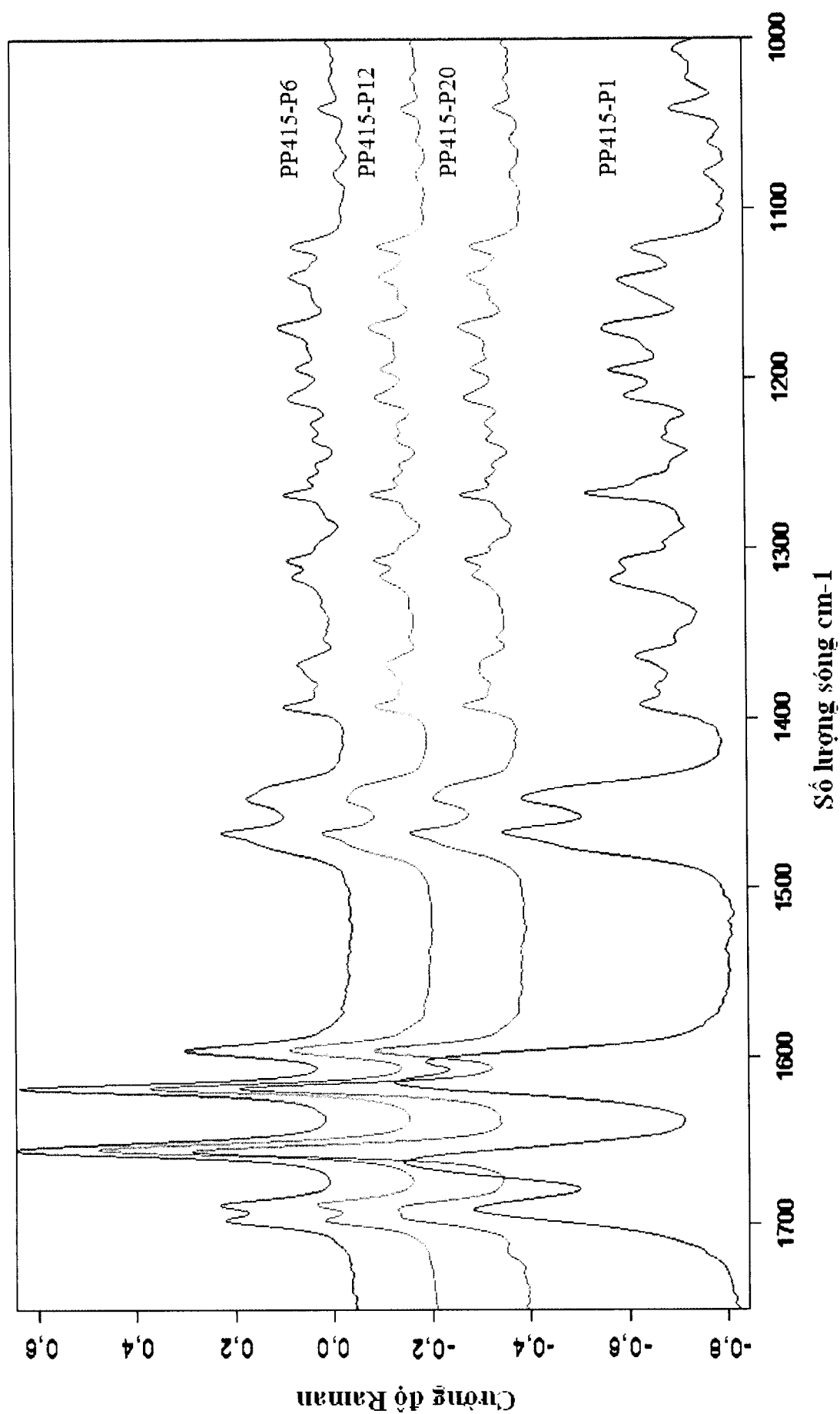
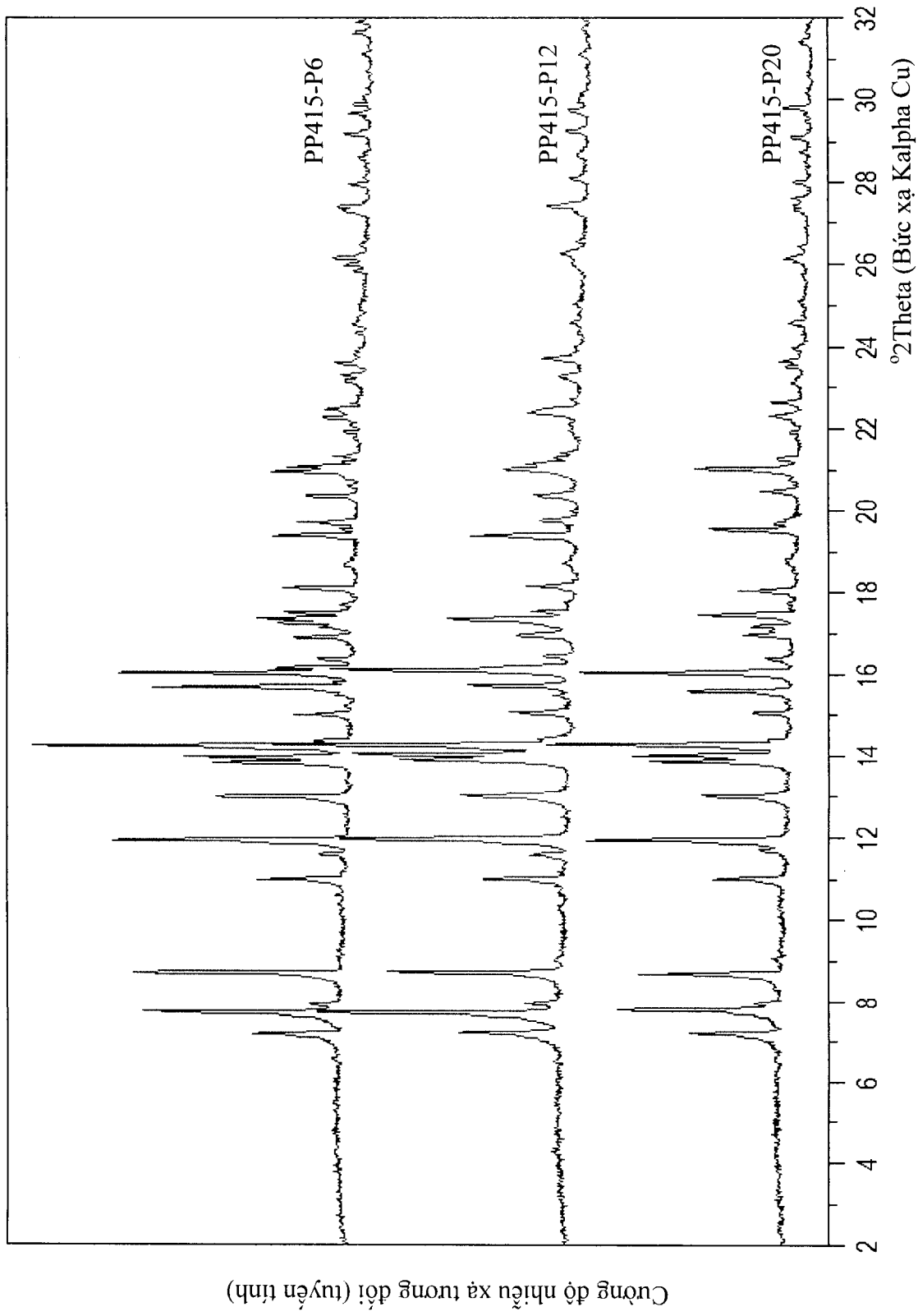


FIG. 97

**FIG. 98**

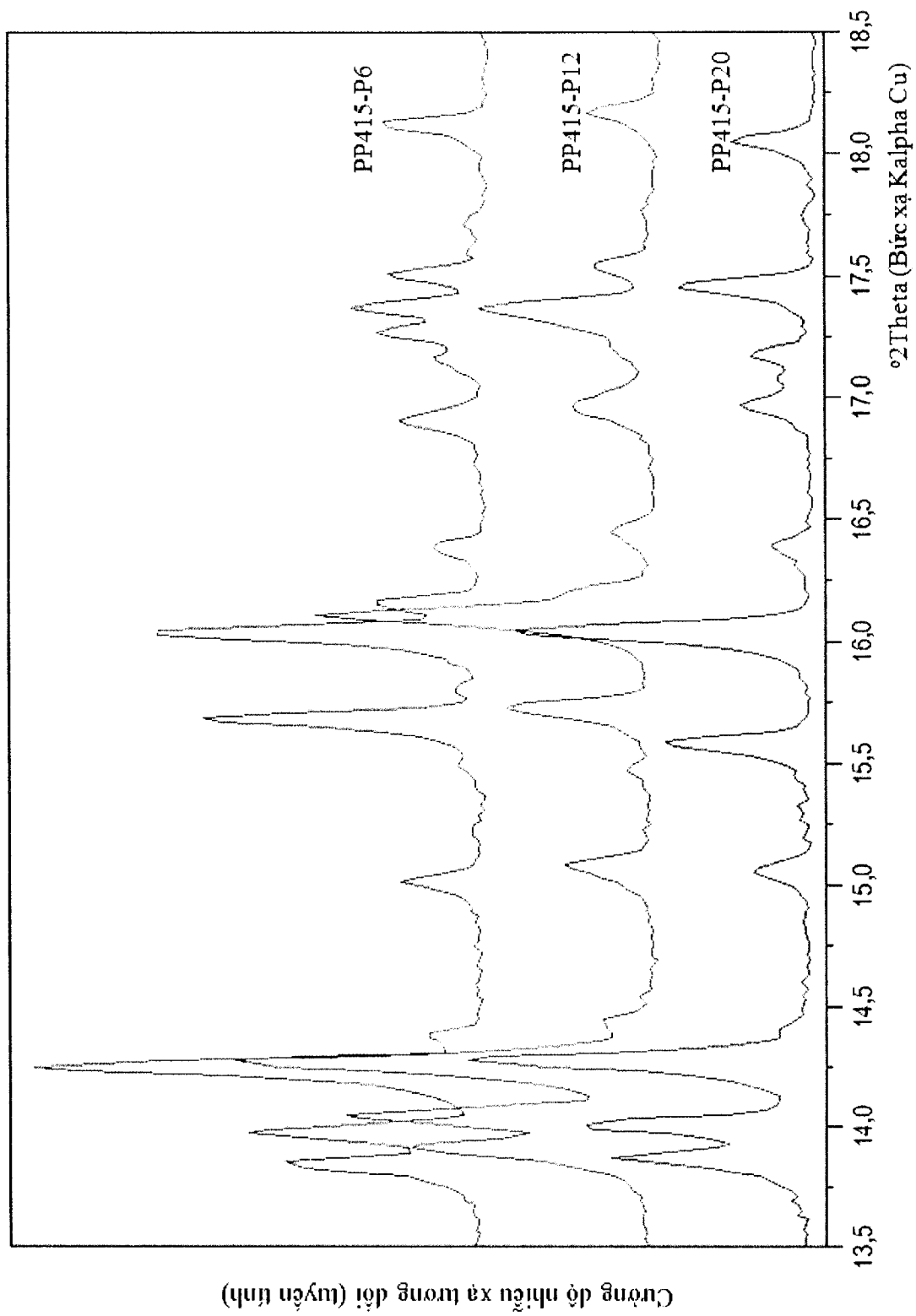


FIG. 99

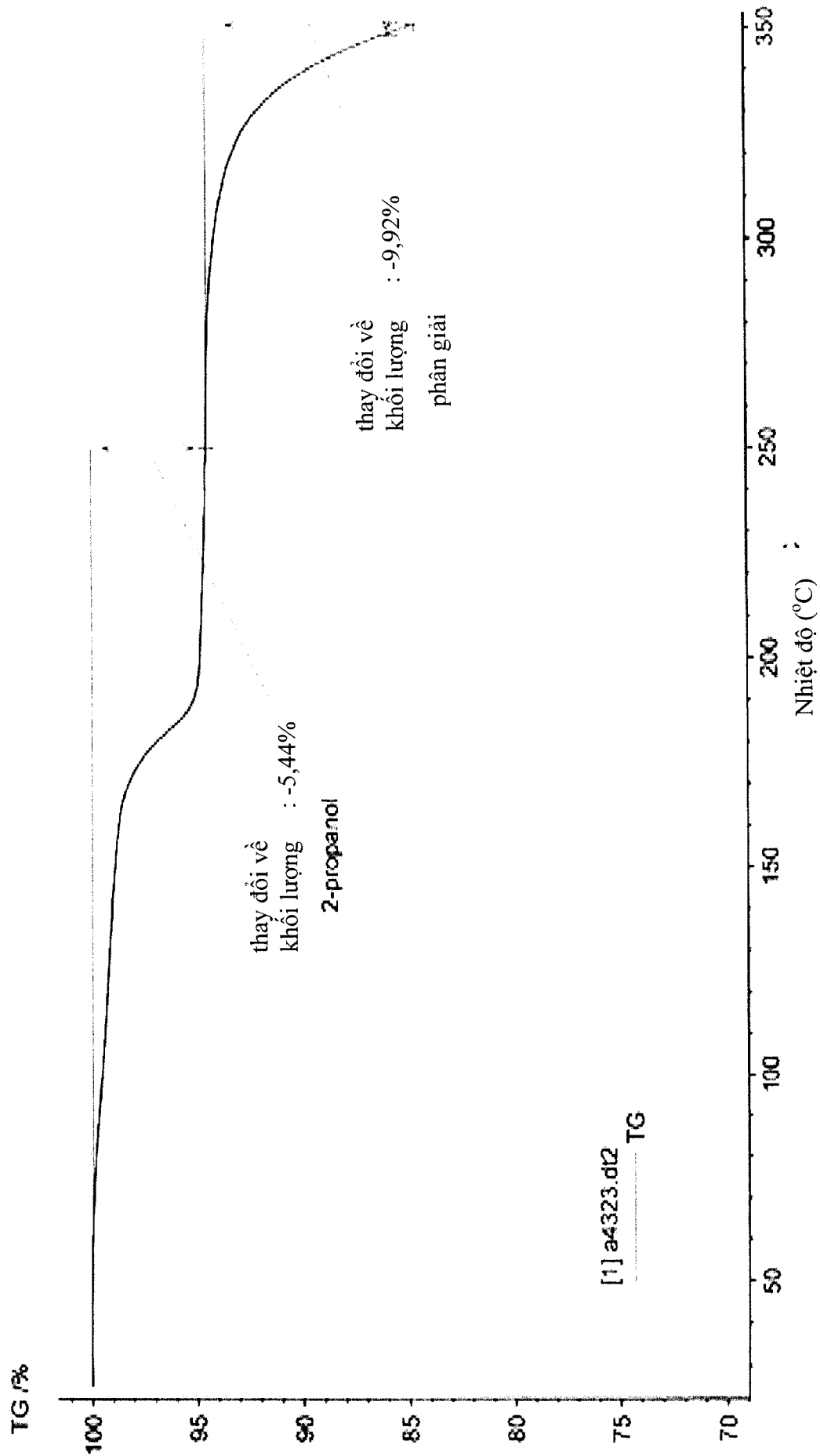


FIG. 100

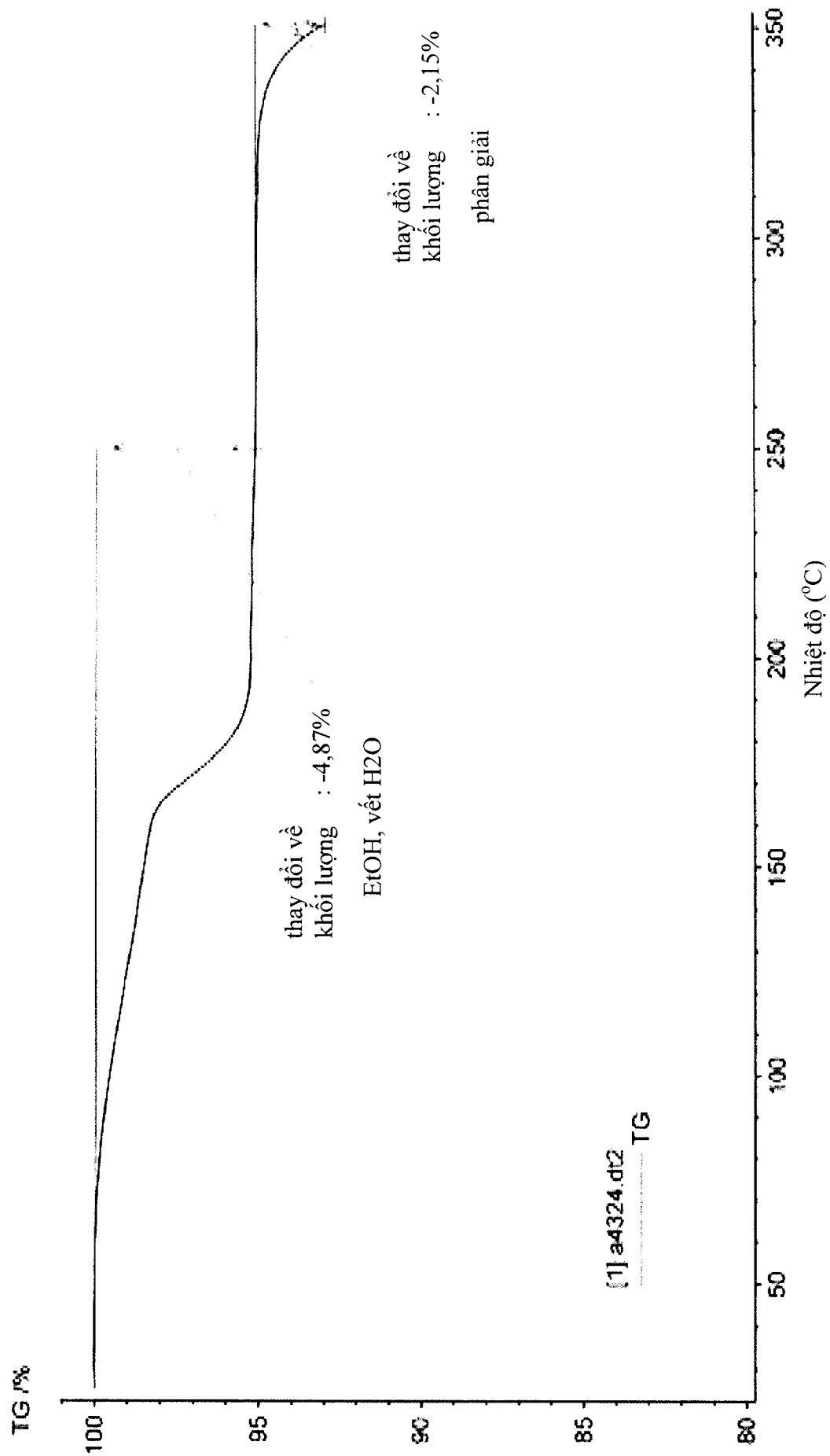


FIG. 101

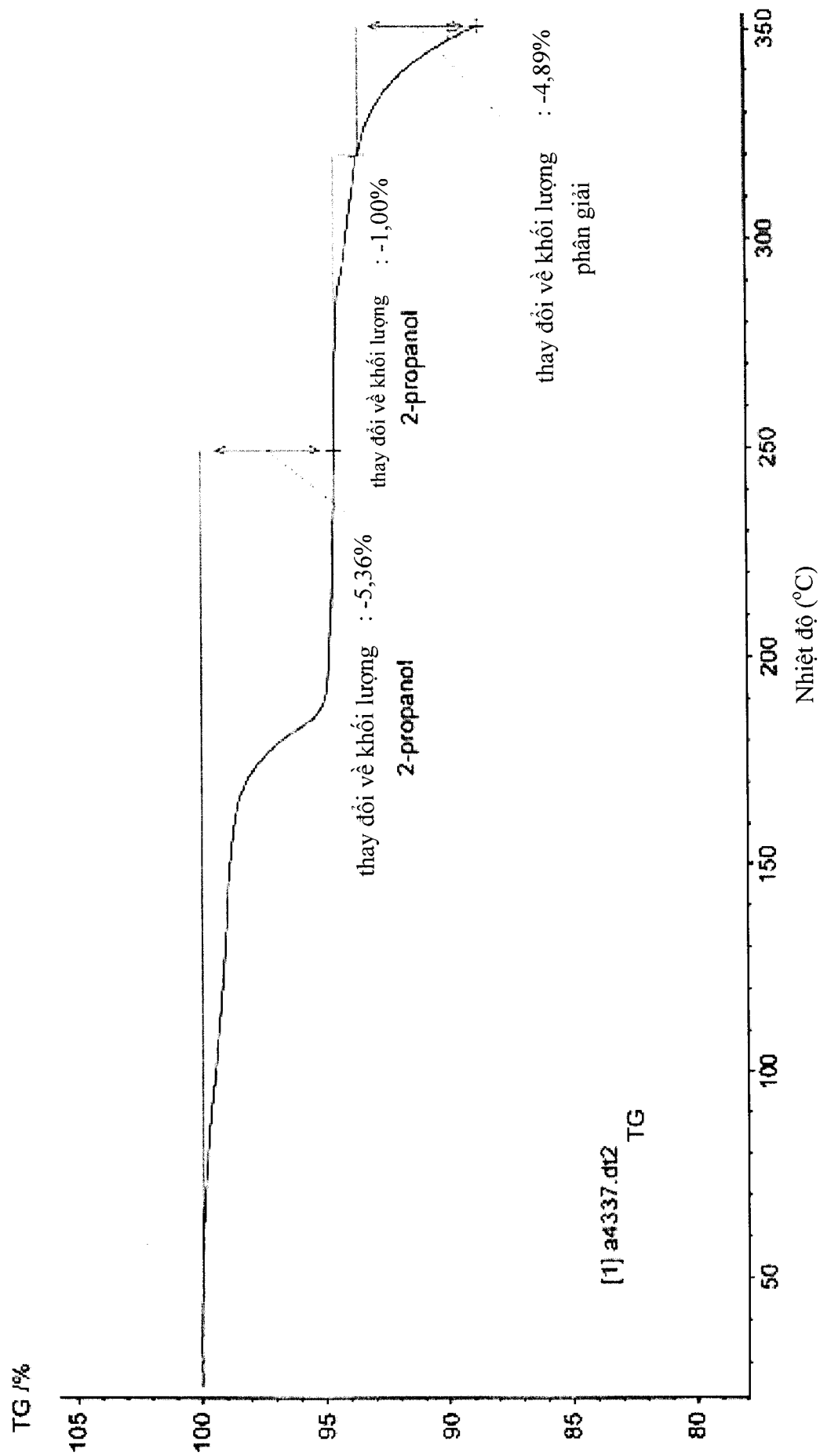


FIG. 102

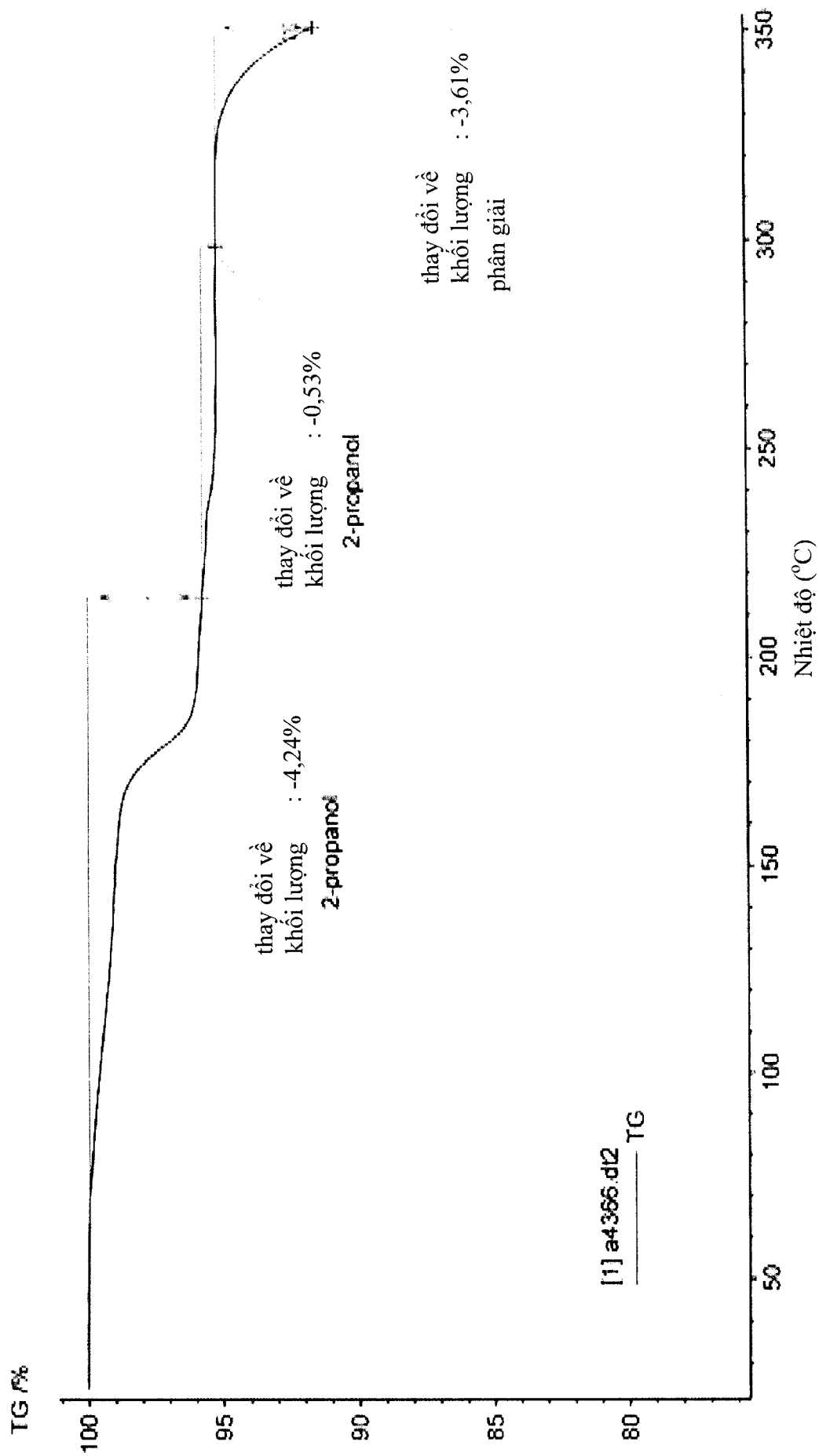


FIG. 103

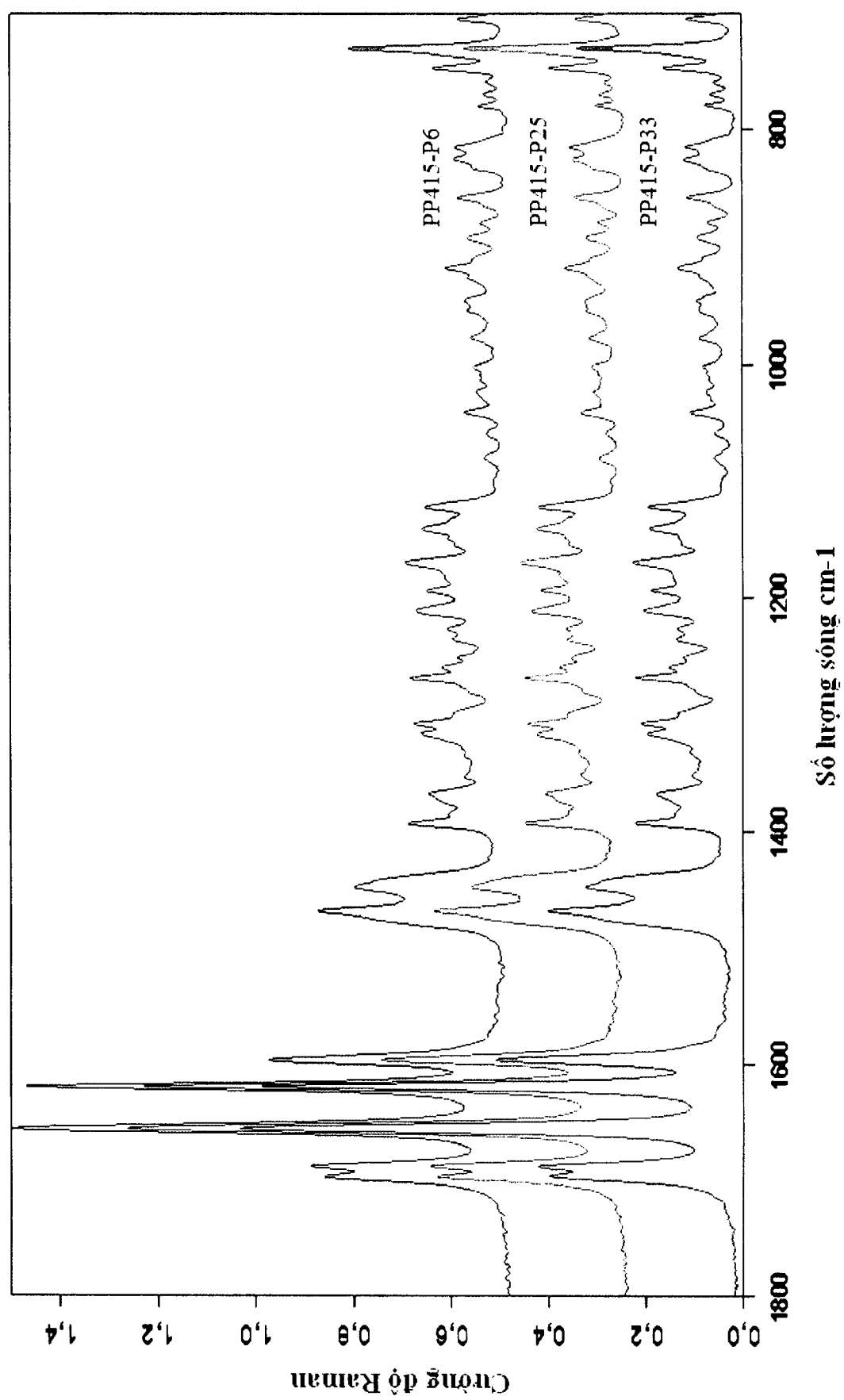
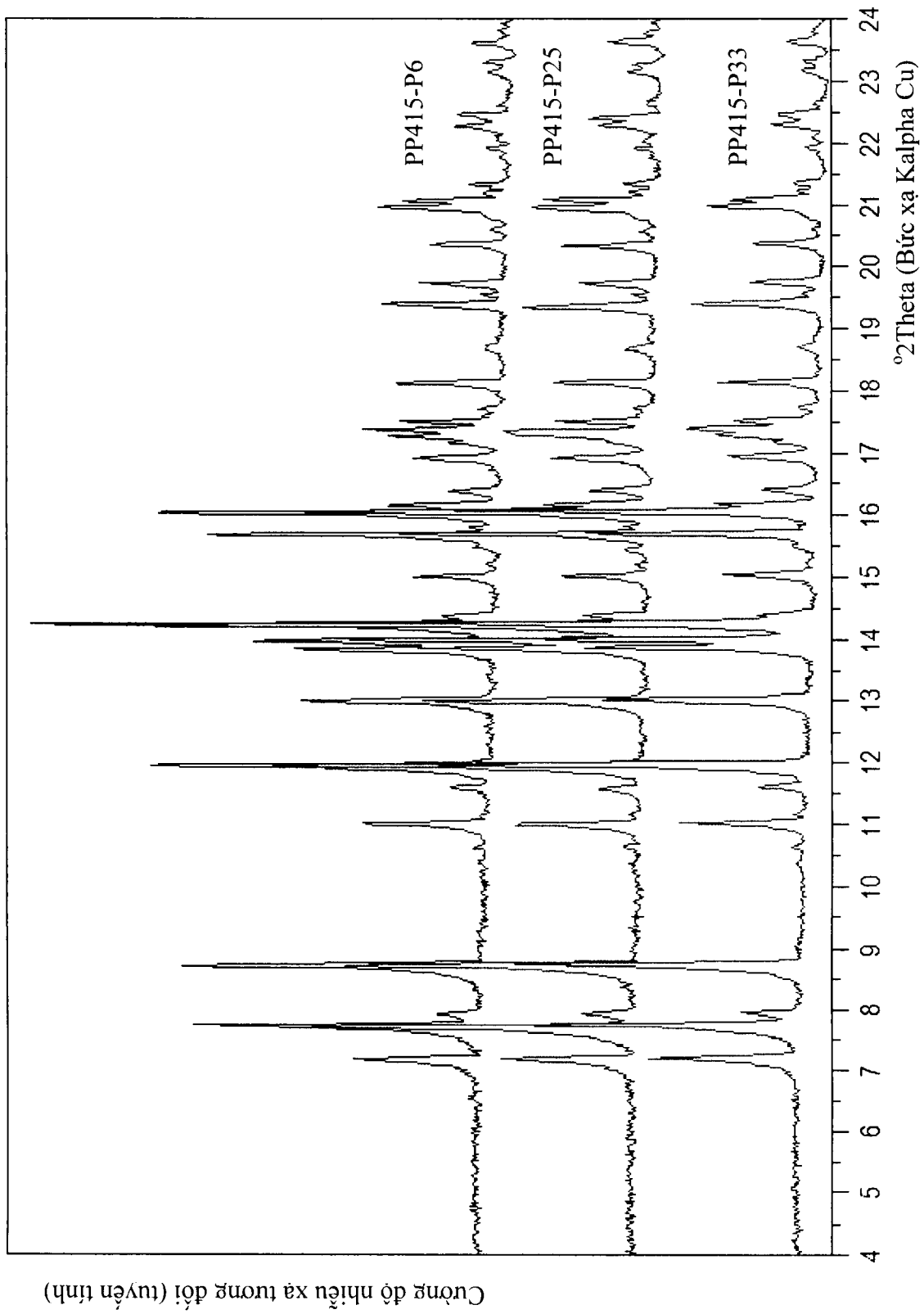


FIG. 104

**FIG. 105**

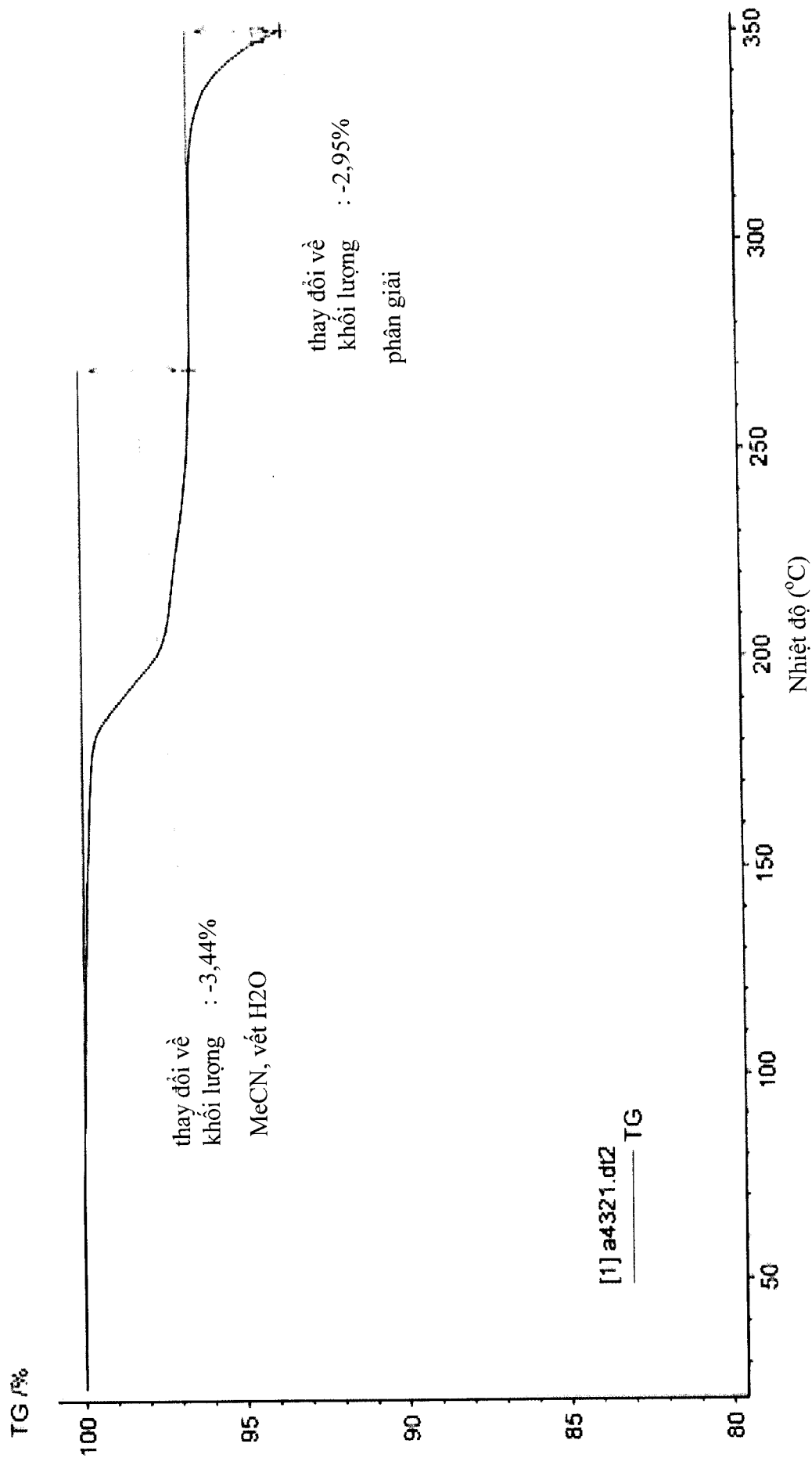


FIG. 106

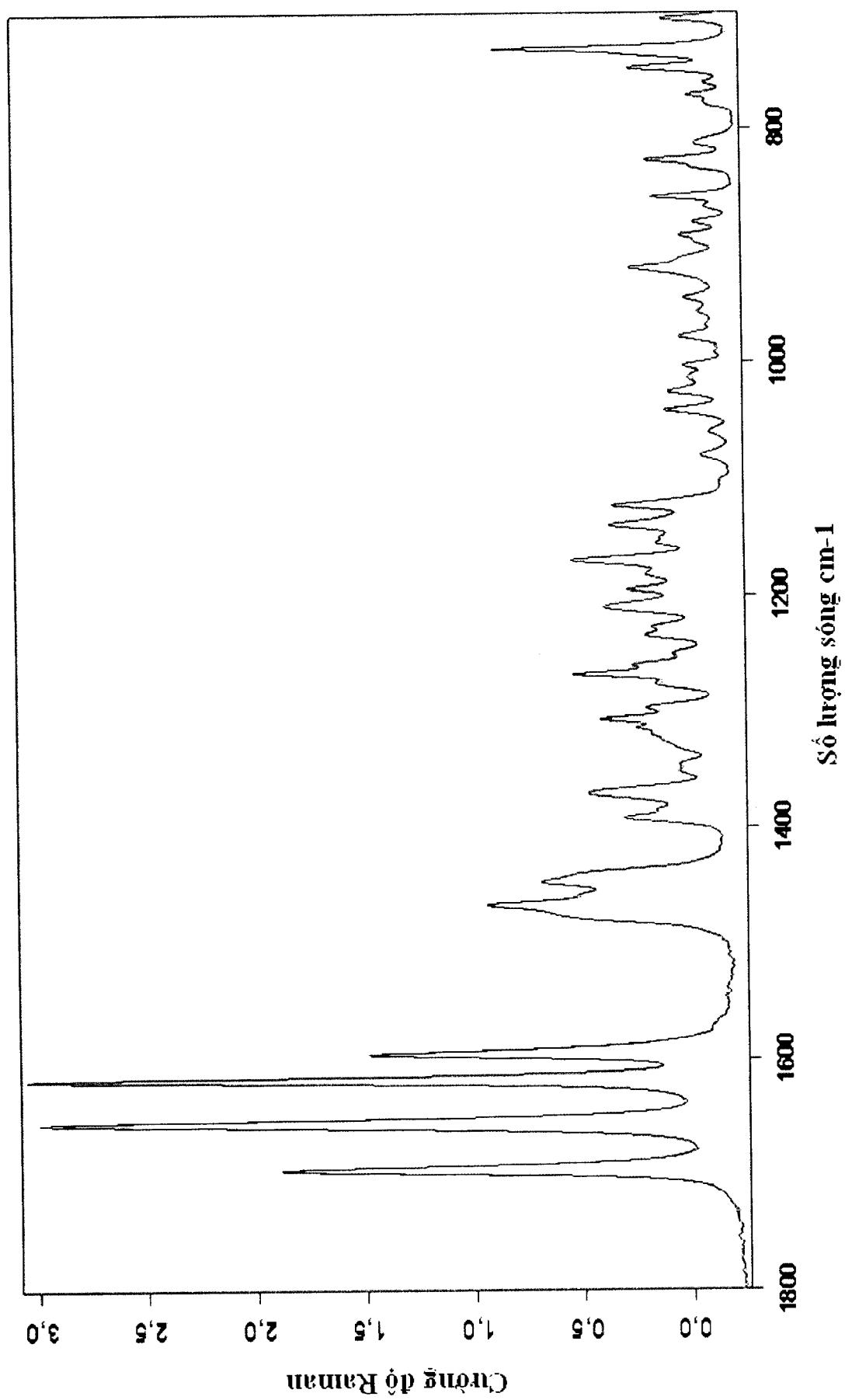
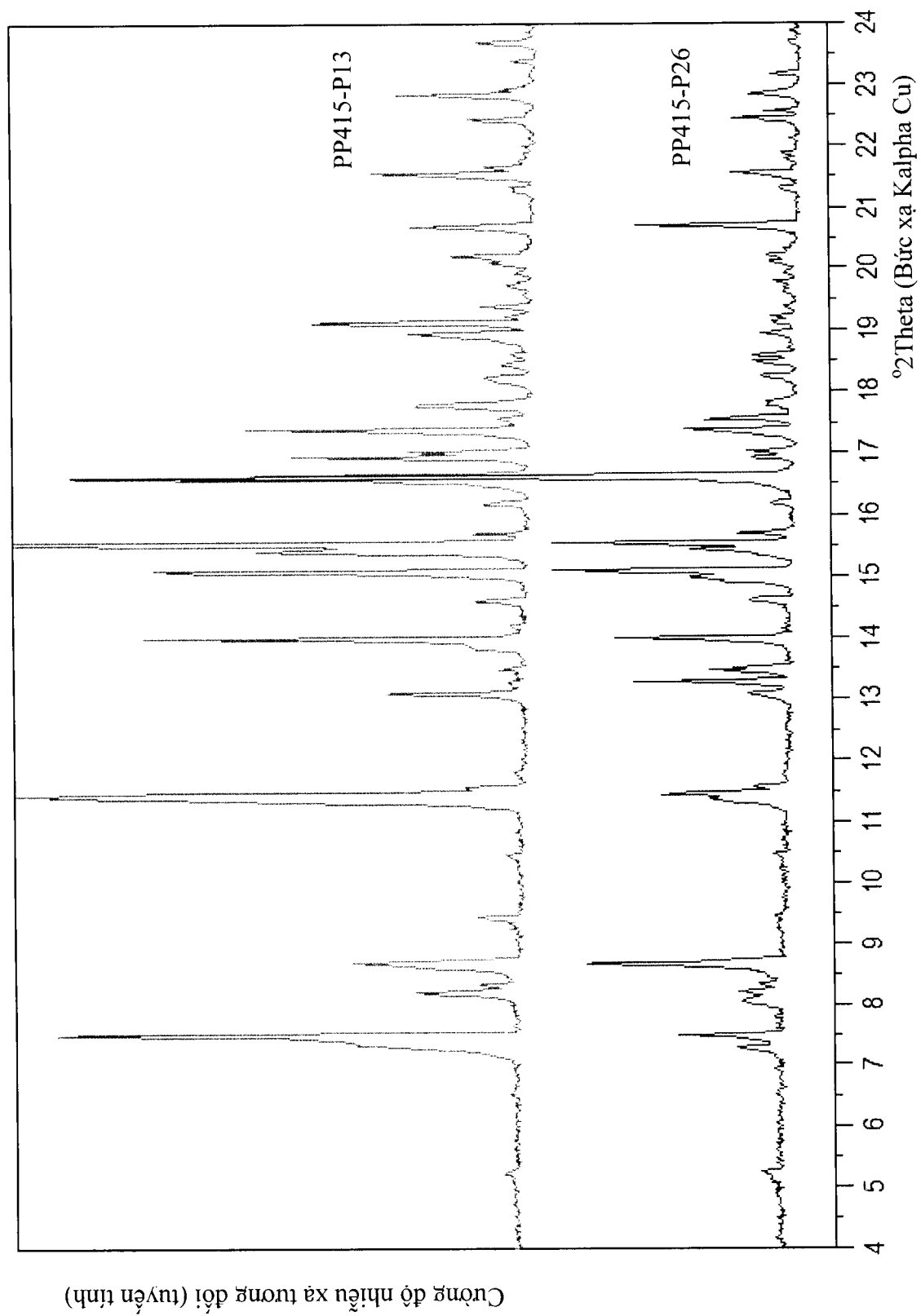


FIG. 107

**FIG. 108**

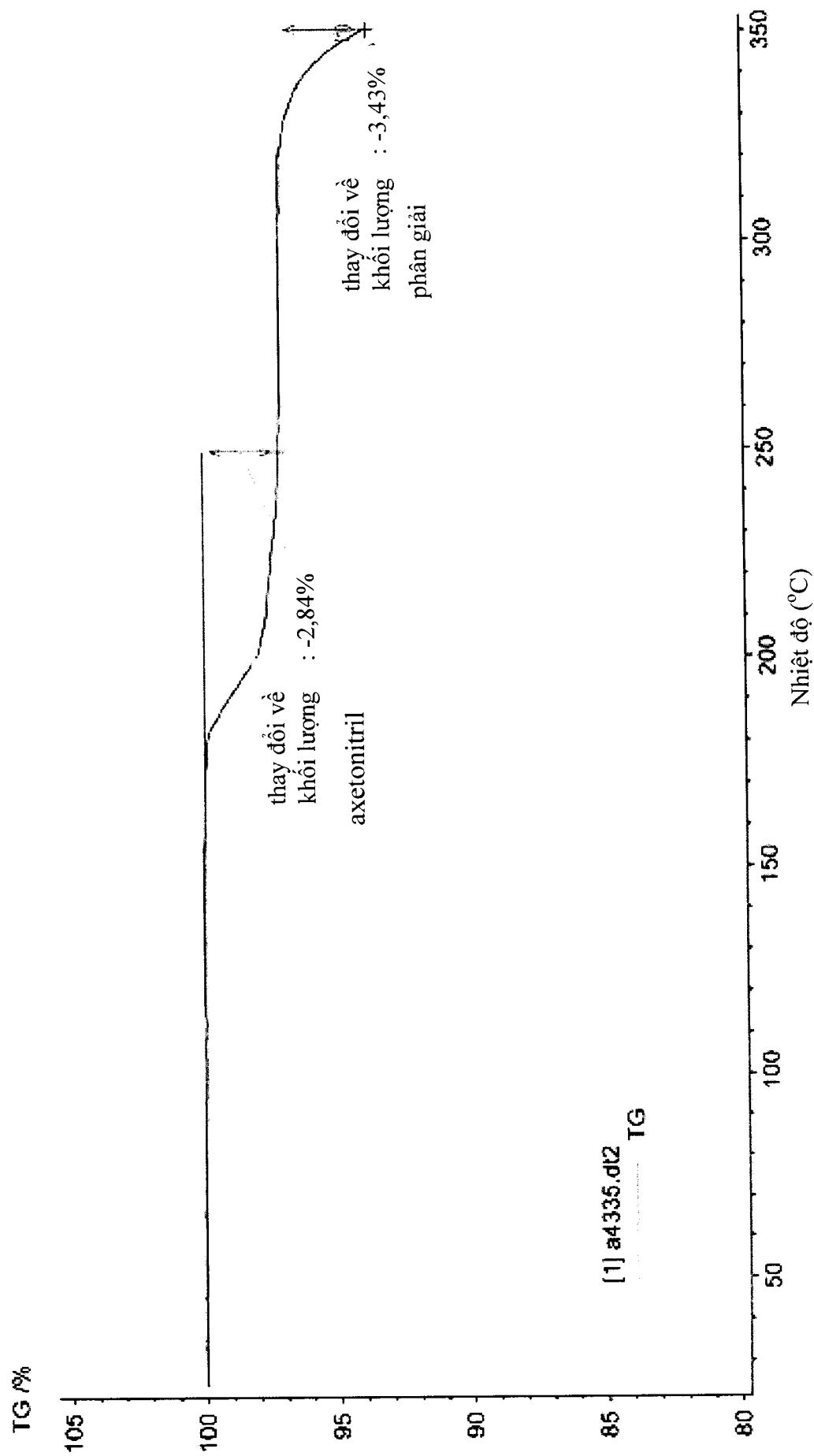


FIG. 109

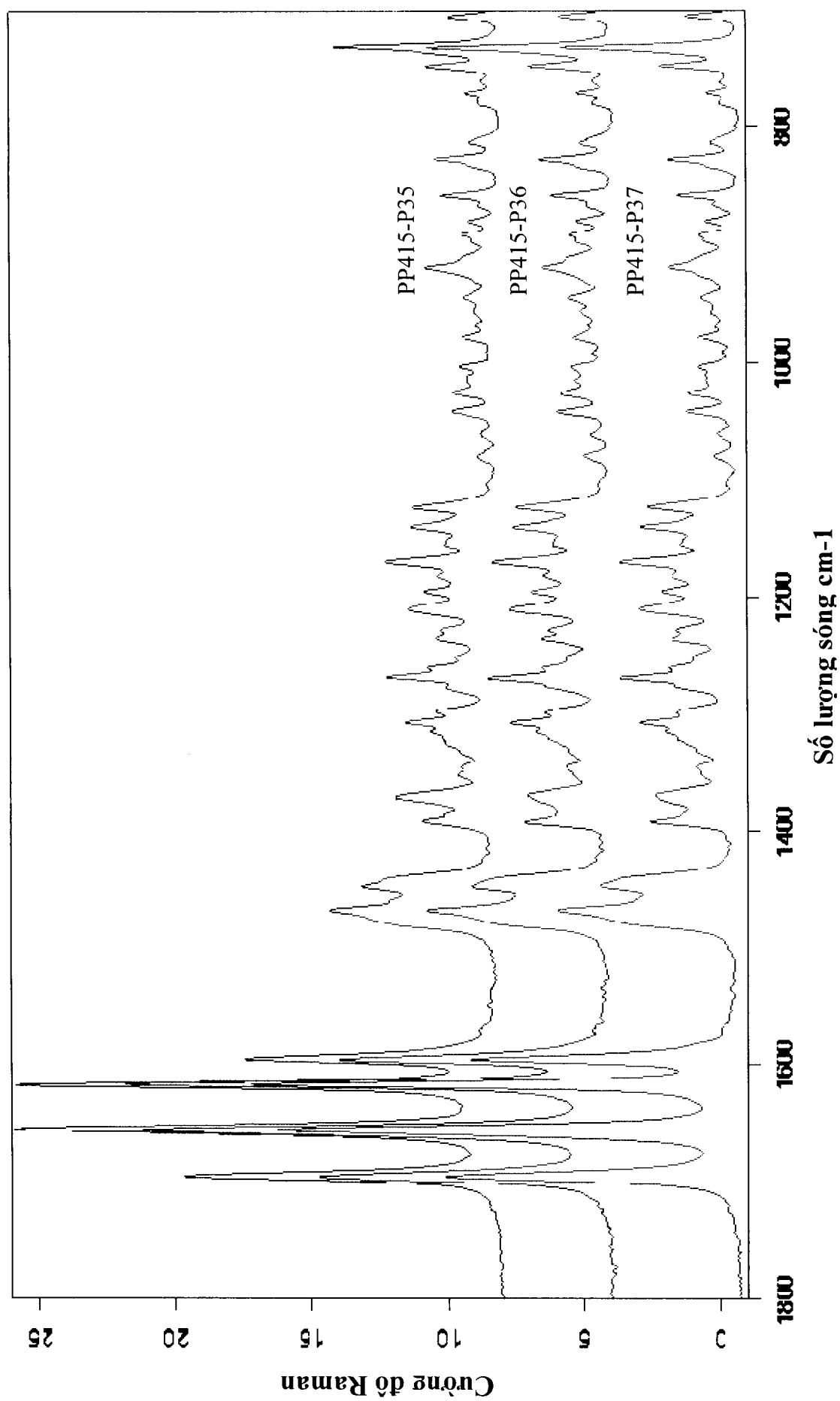
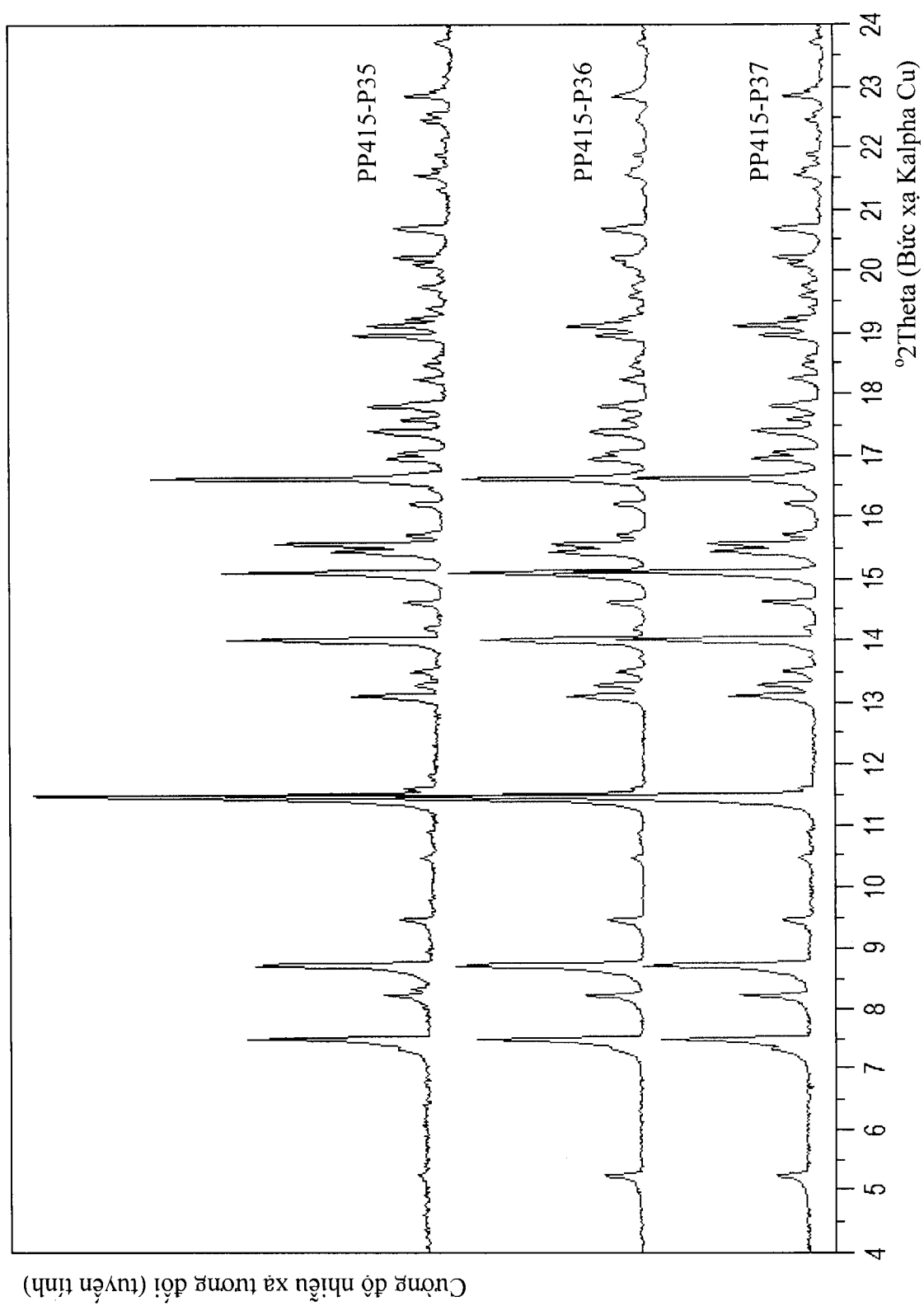


FIG. 110

**FIG. 111**

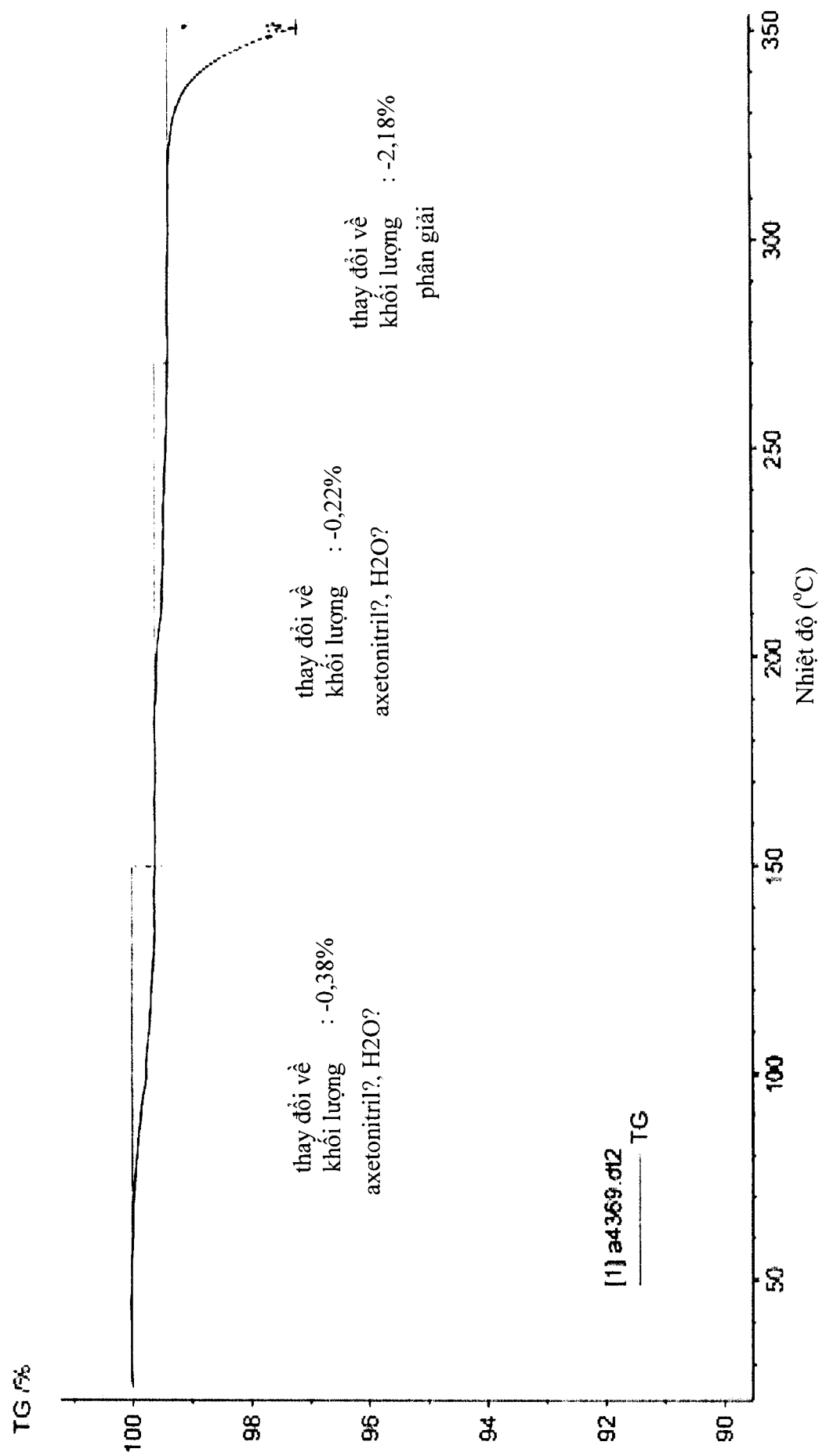


FIG. 112

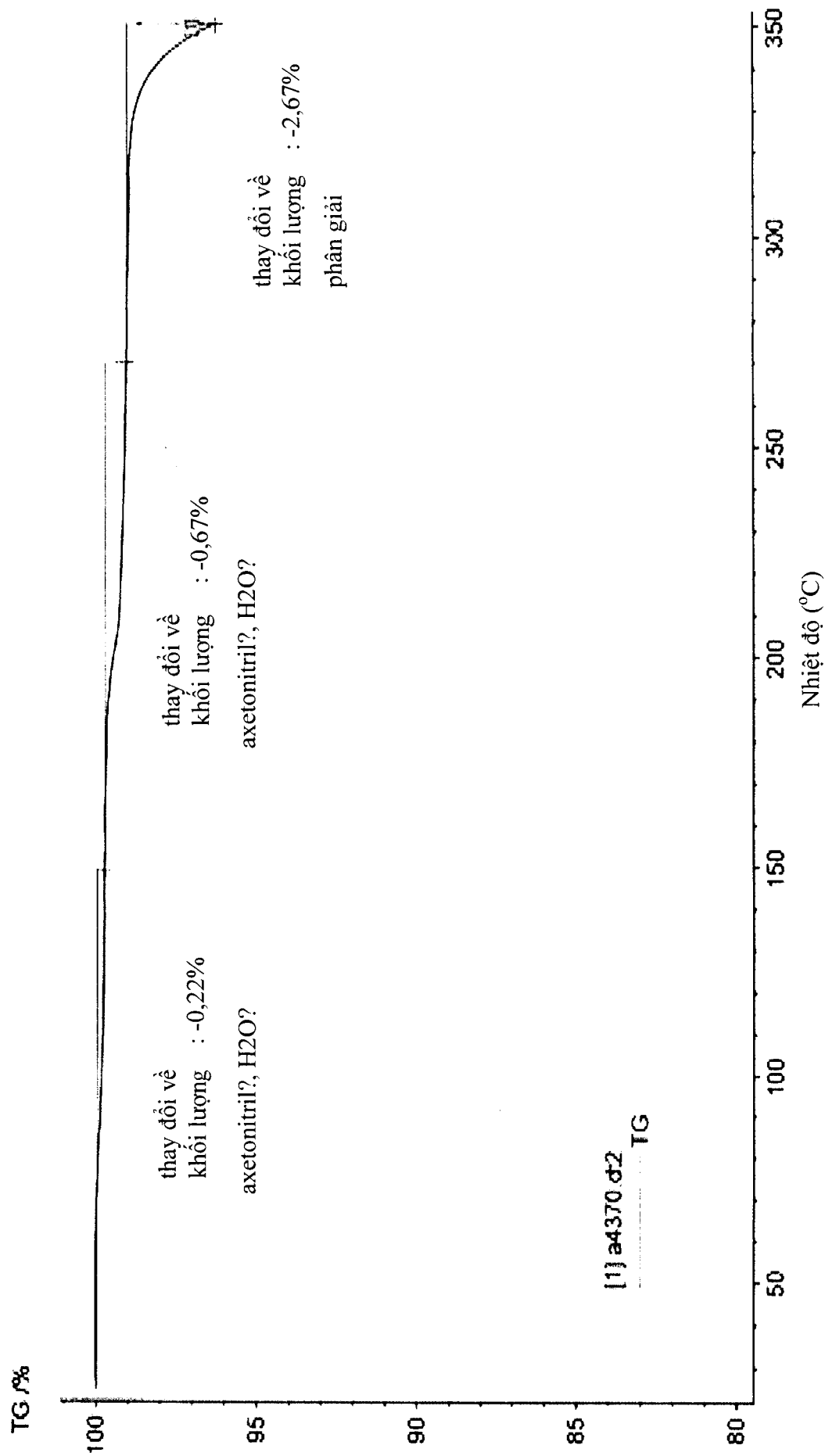


FIG. 113

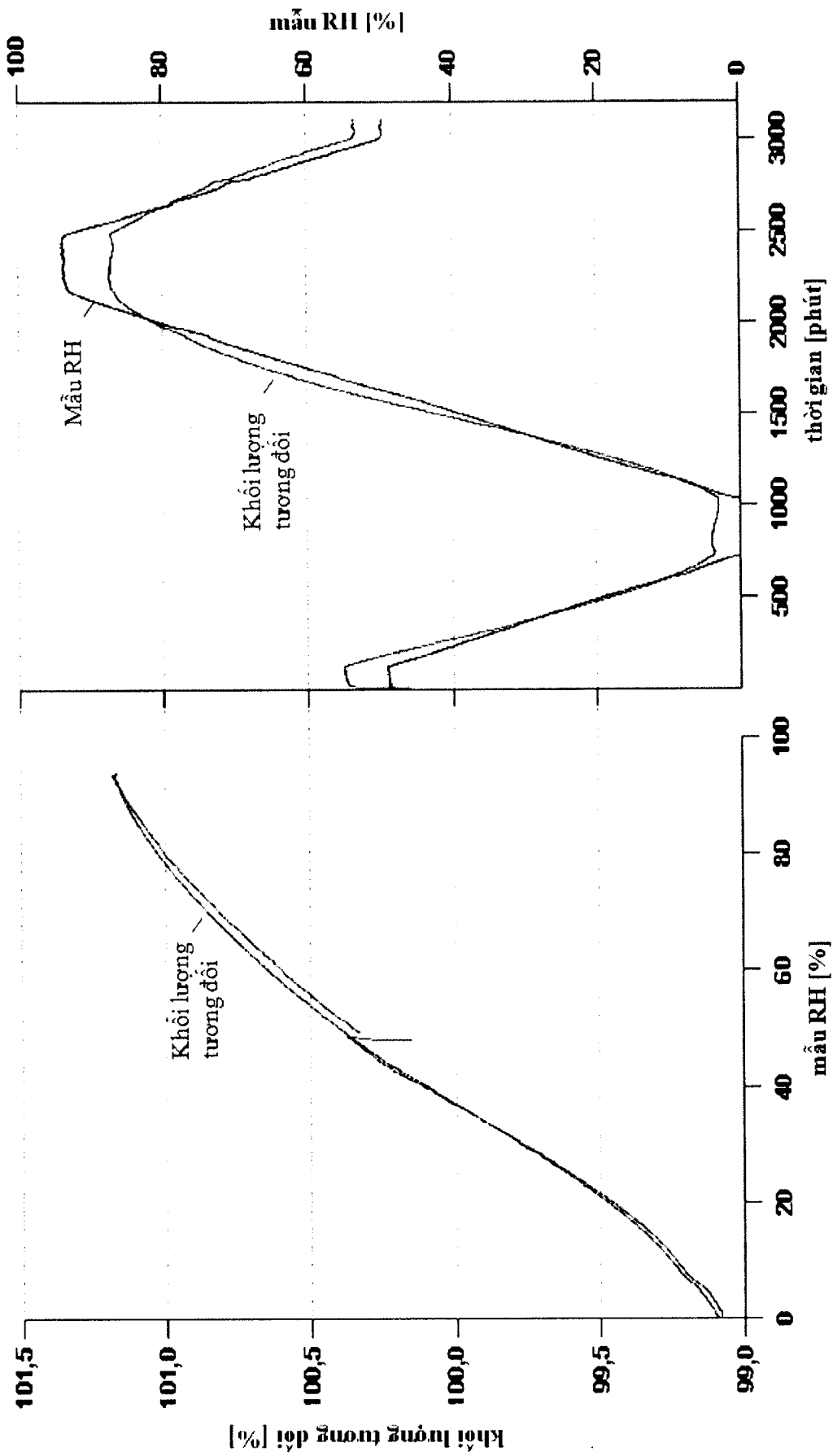


FIG. 114

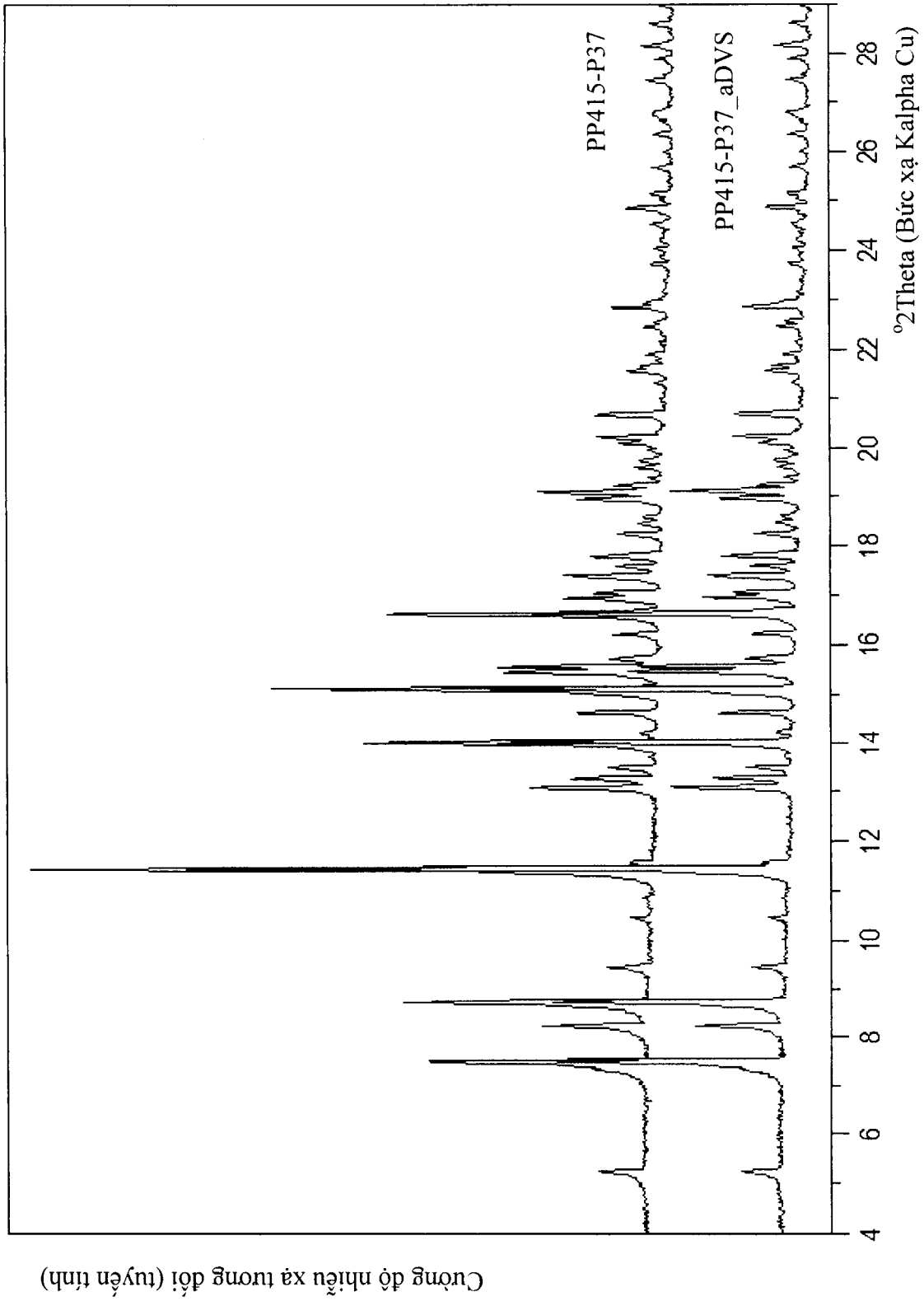
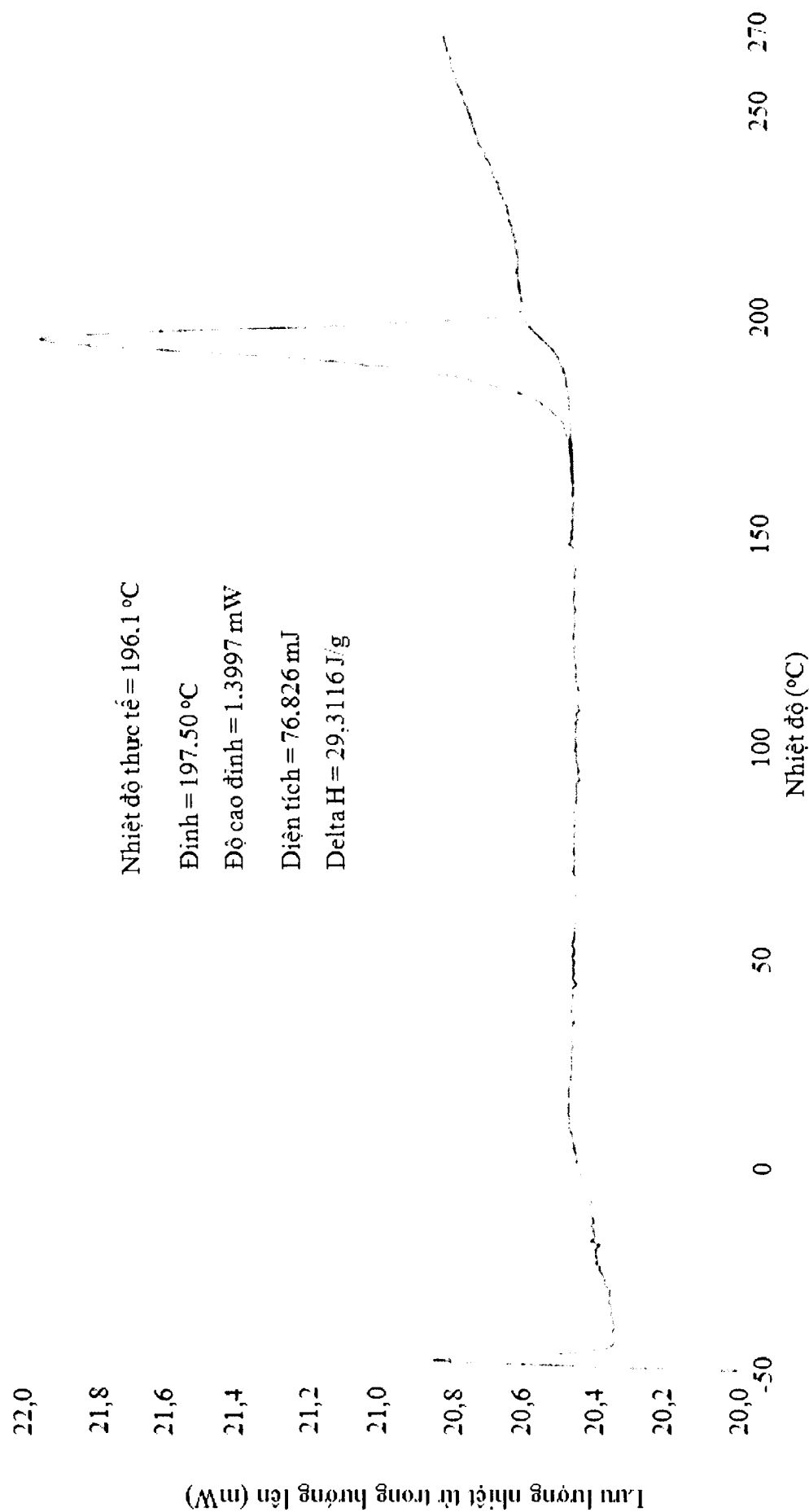


FIG. 115



Nhiệt từ -50.00 °C đến 270.00 °C ở 10.00 °C/phút

FIG. 116

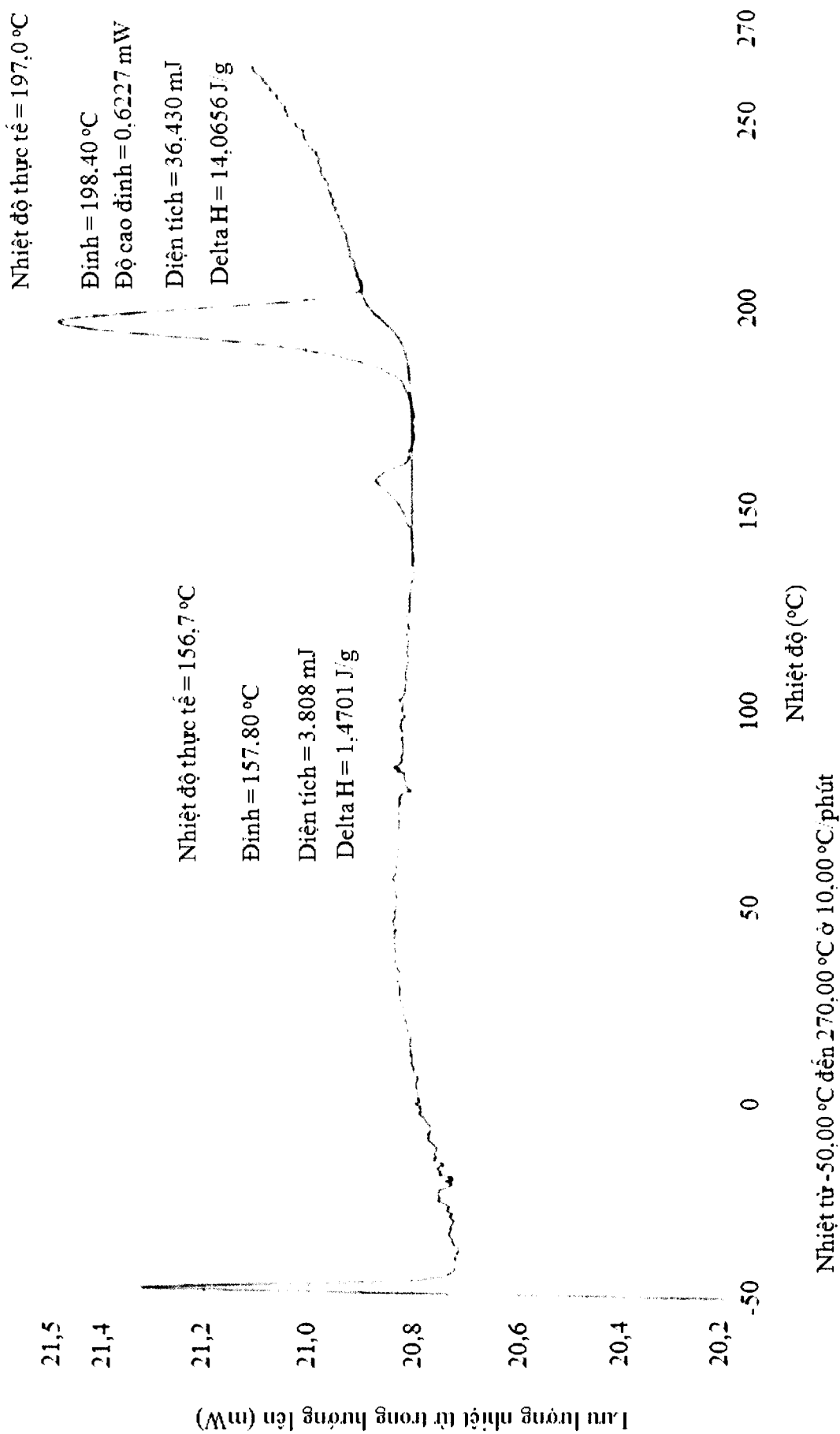


FIG. 117

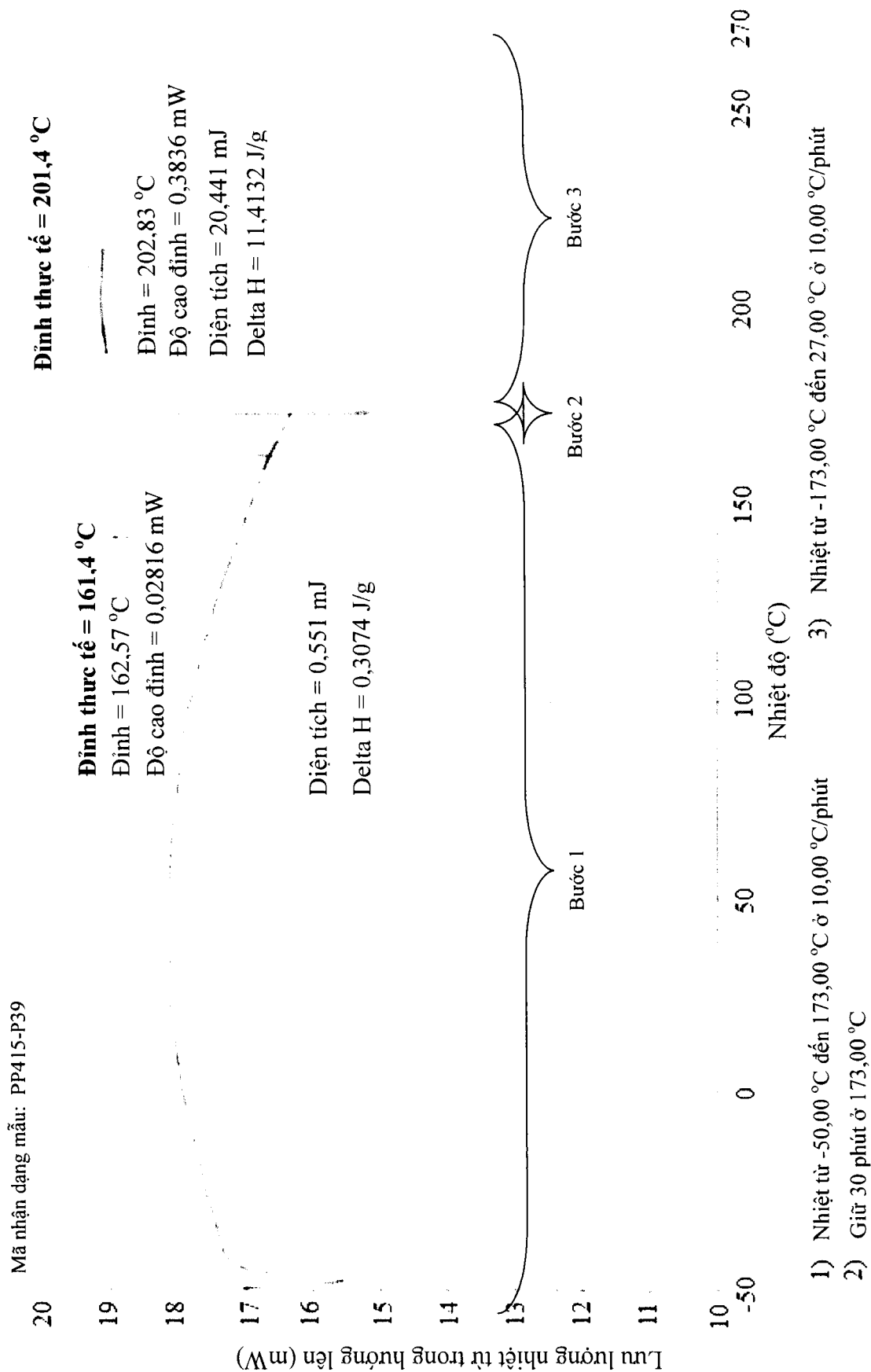


FIG. 118

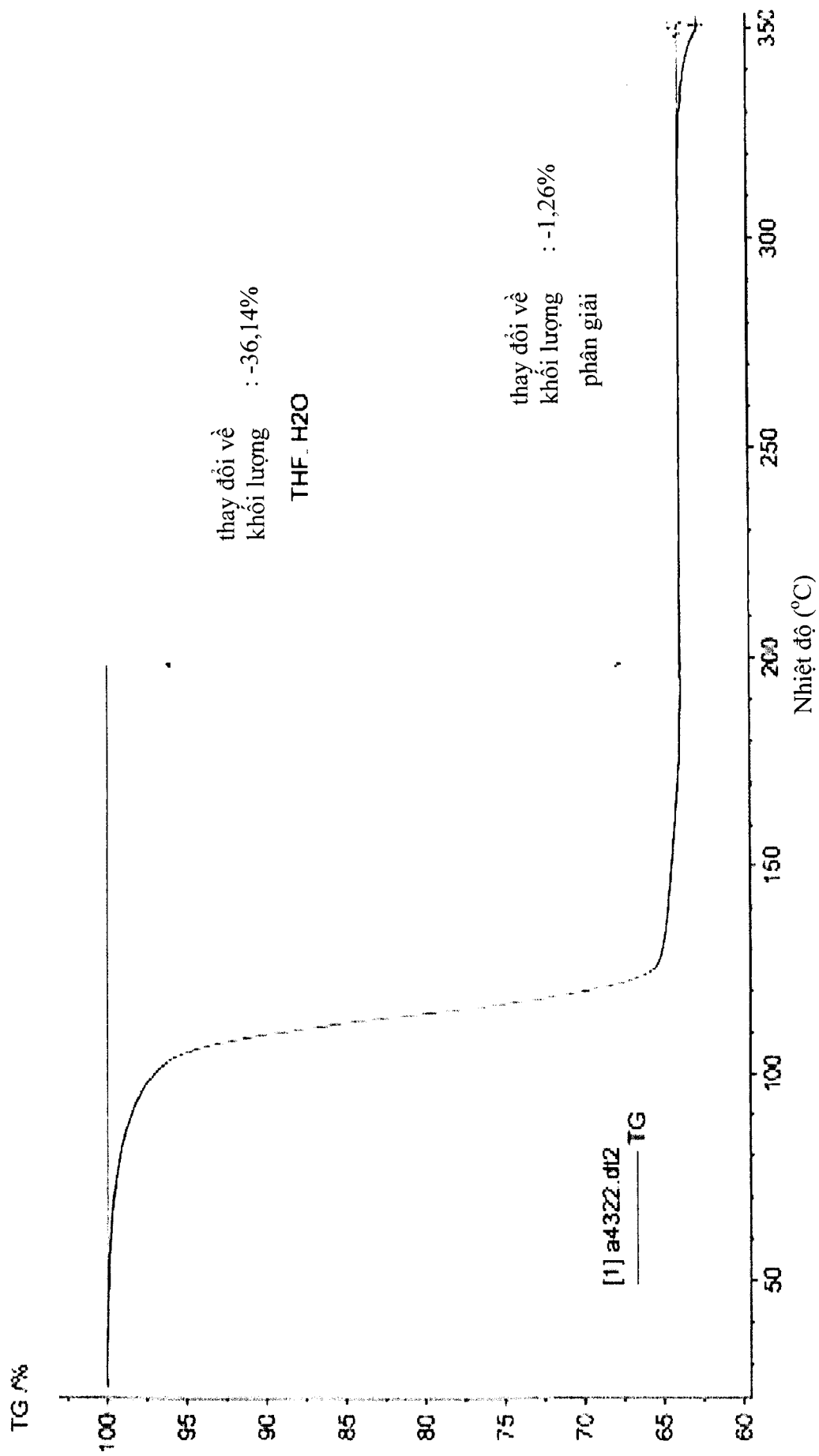


FIG. 119

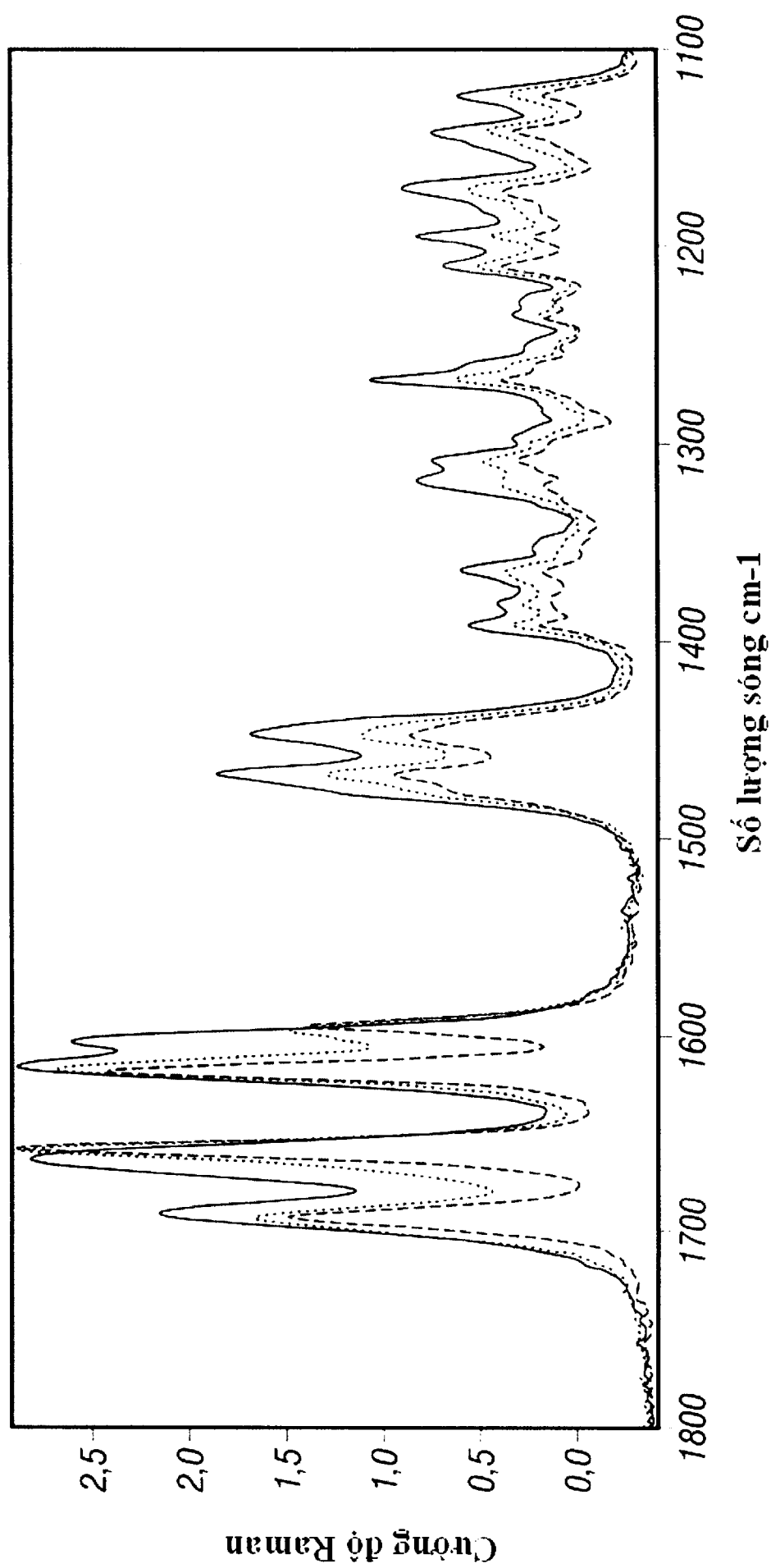
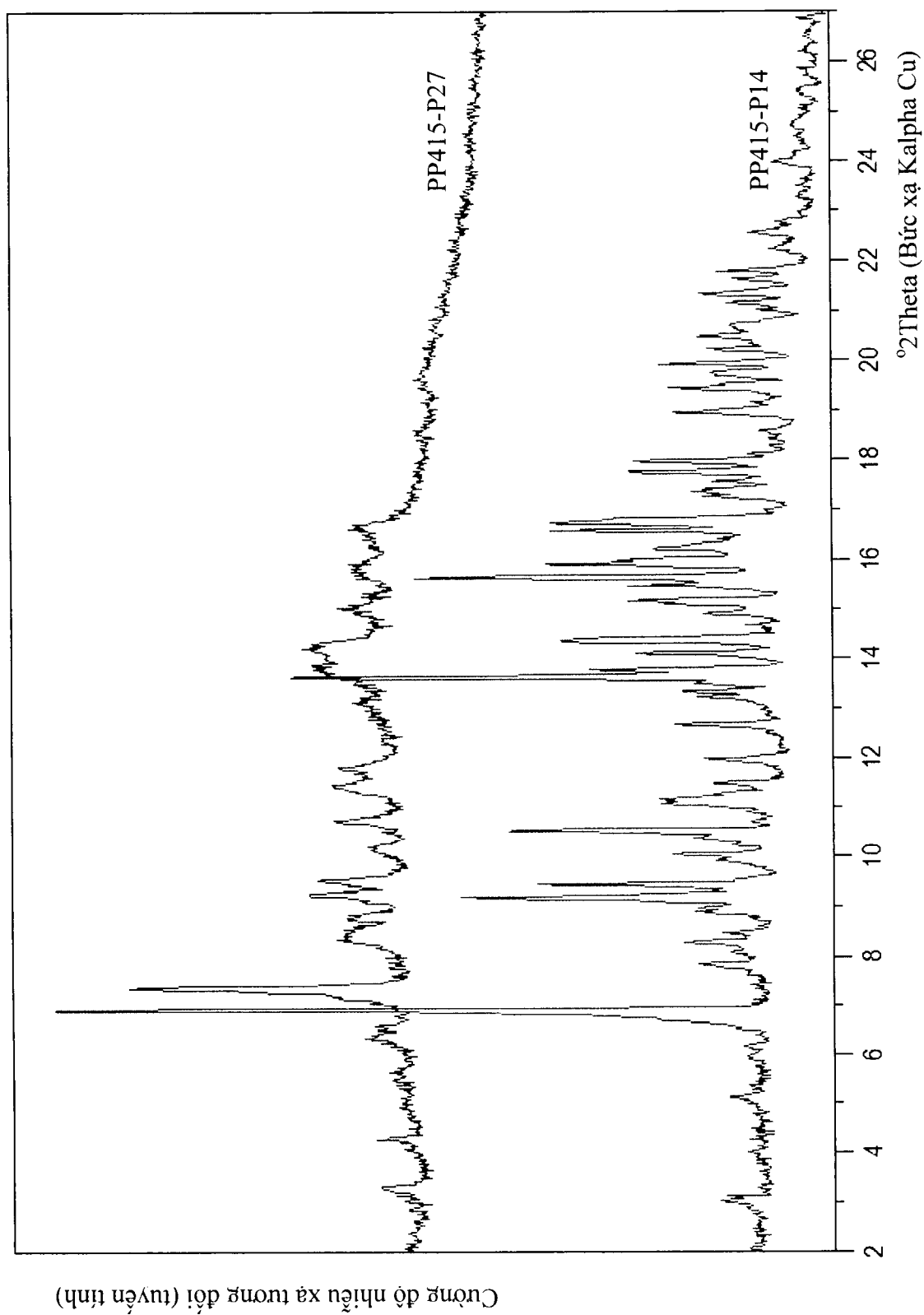


FIG. 120

**FIG. 121**

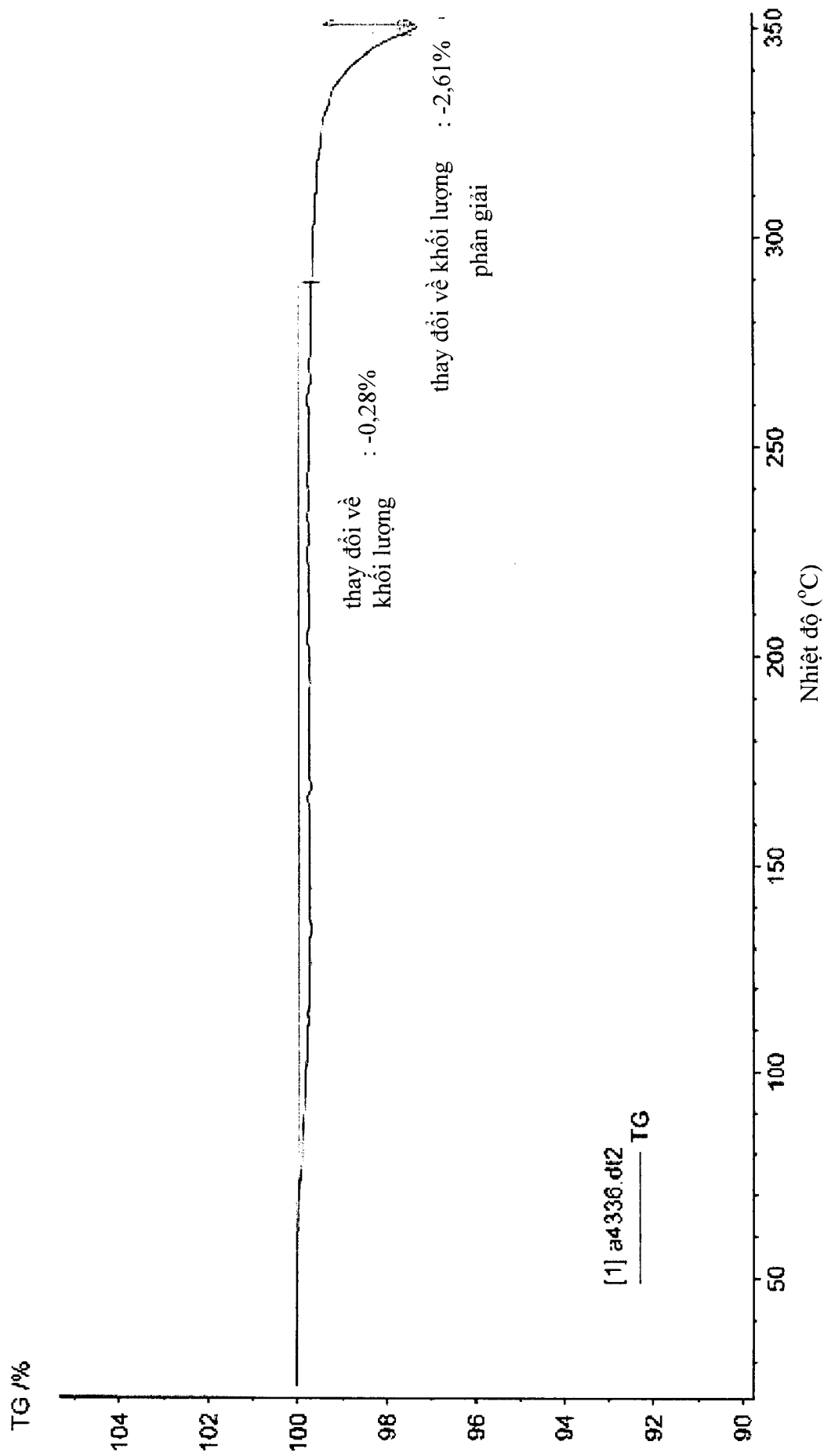
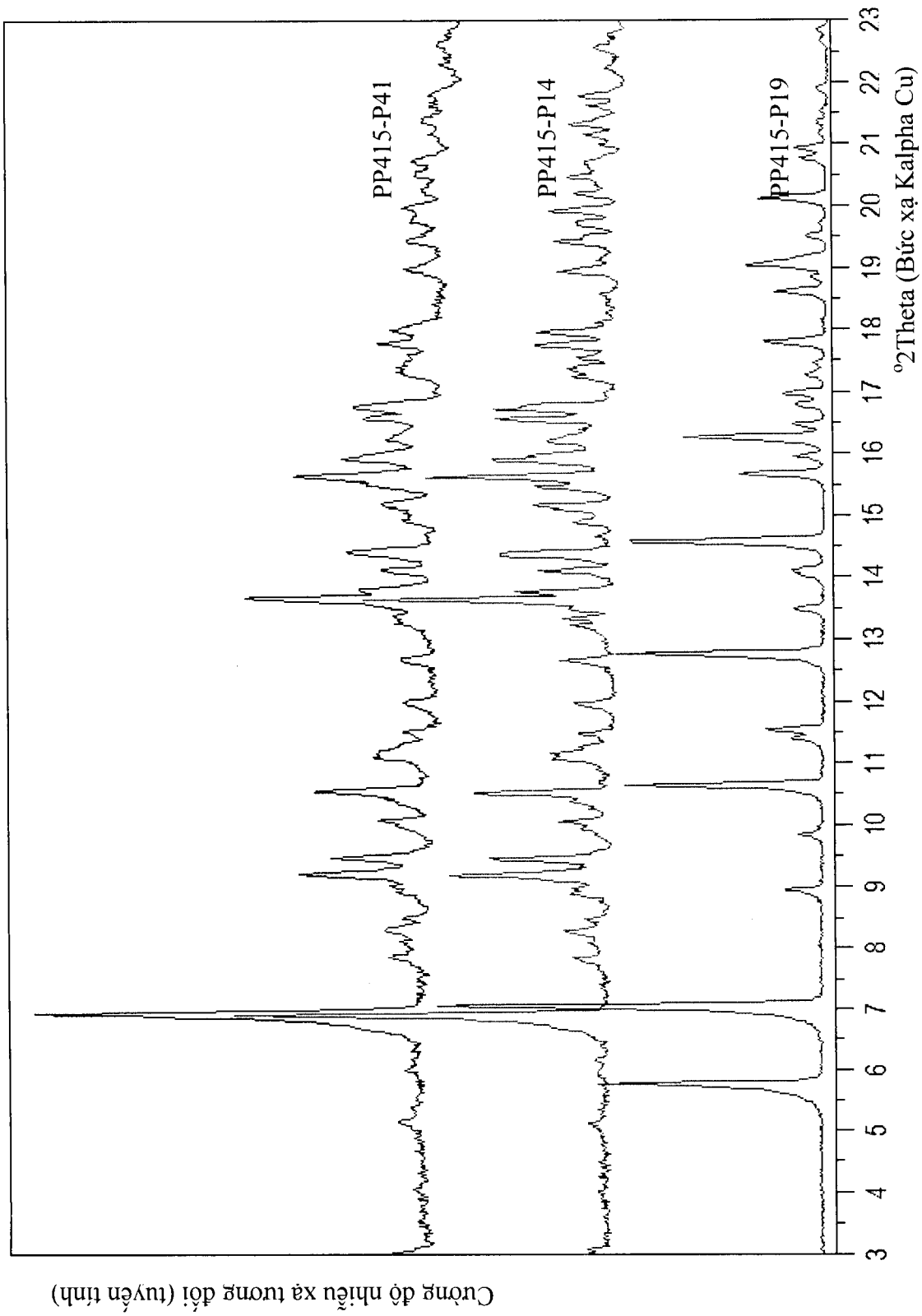


FIG. 122

**FIG. 123**

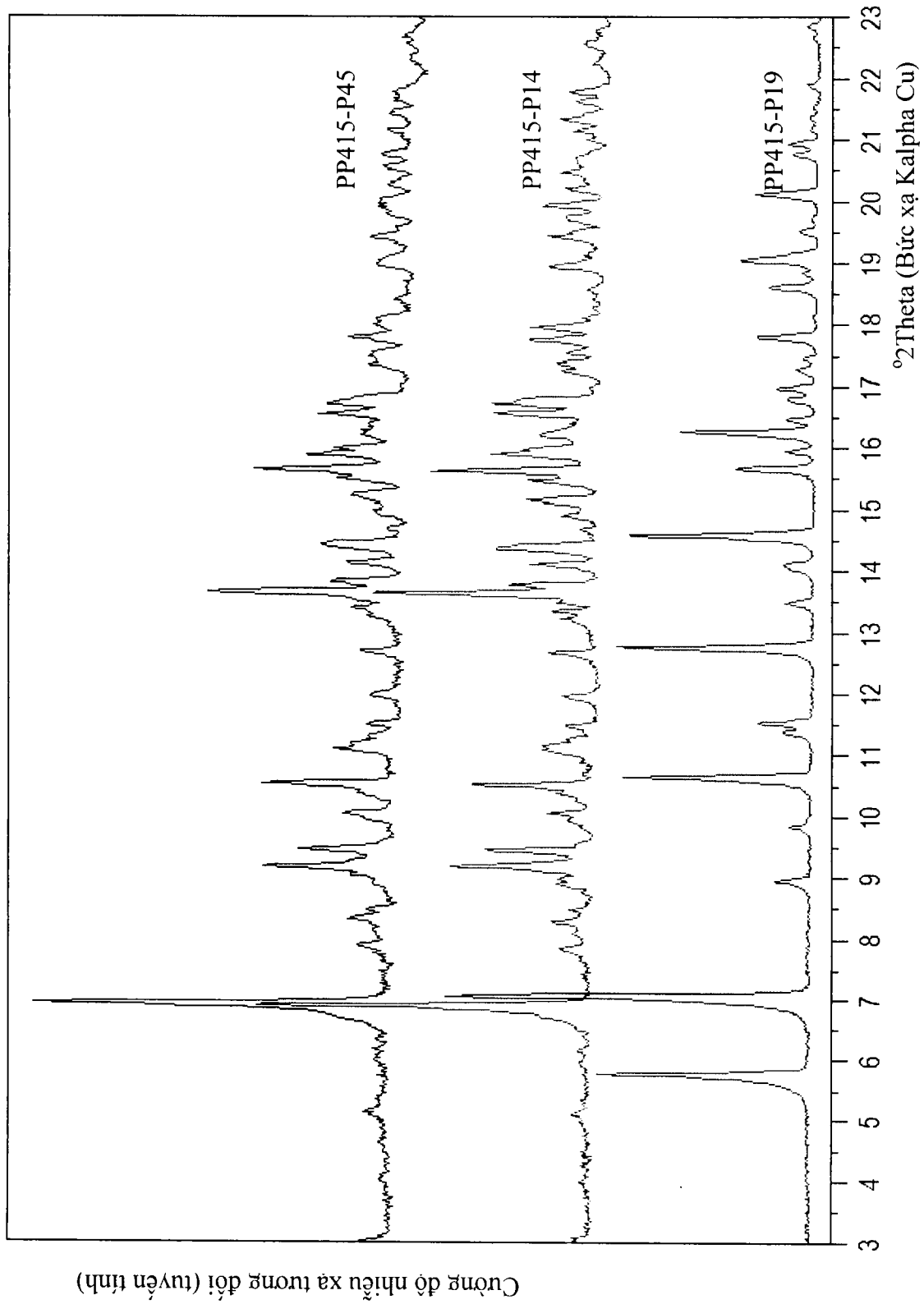


FIG. 124

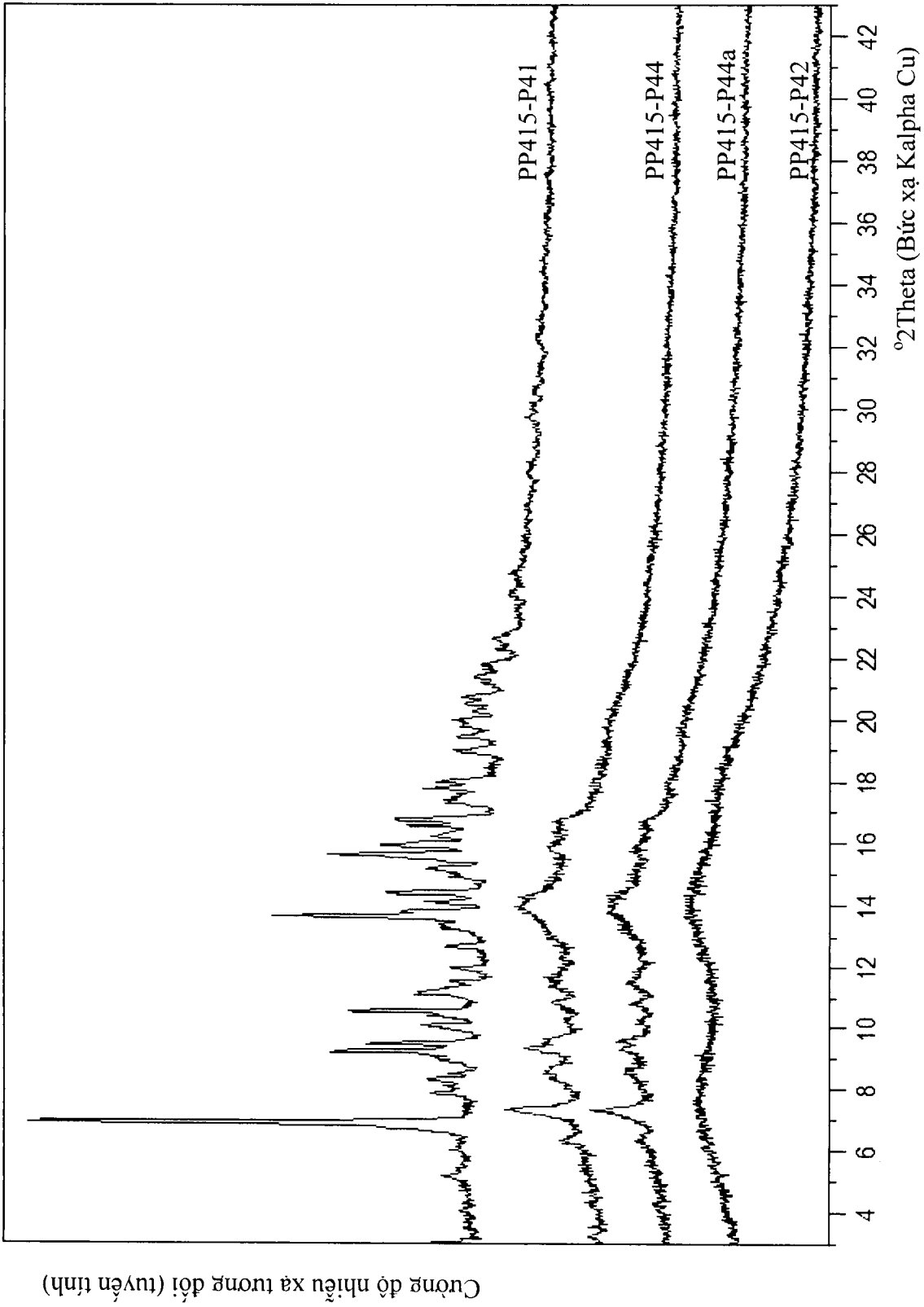


FIG. 125

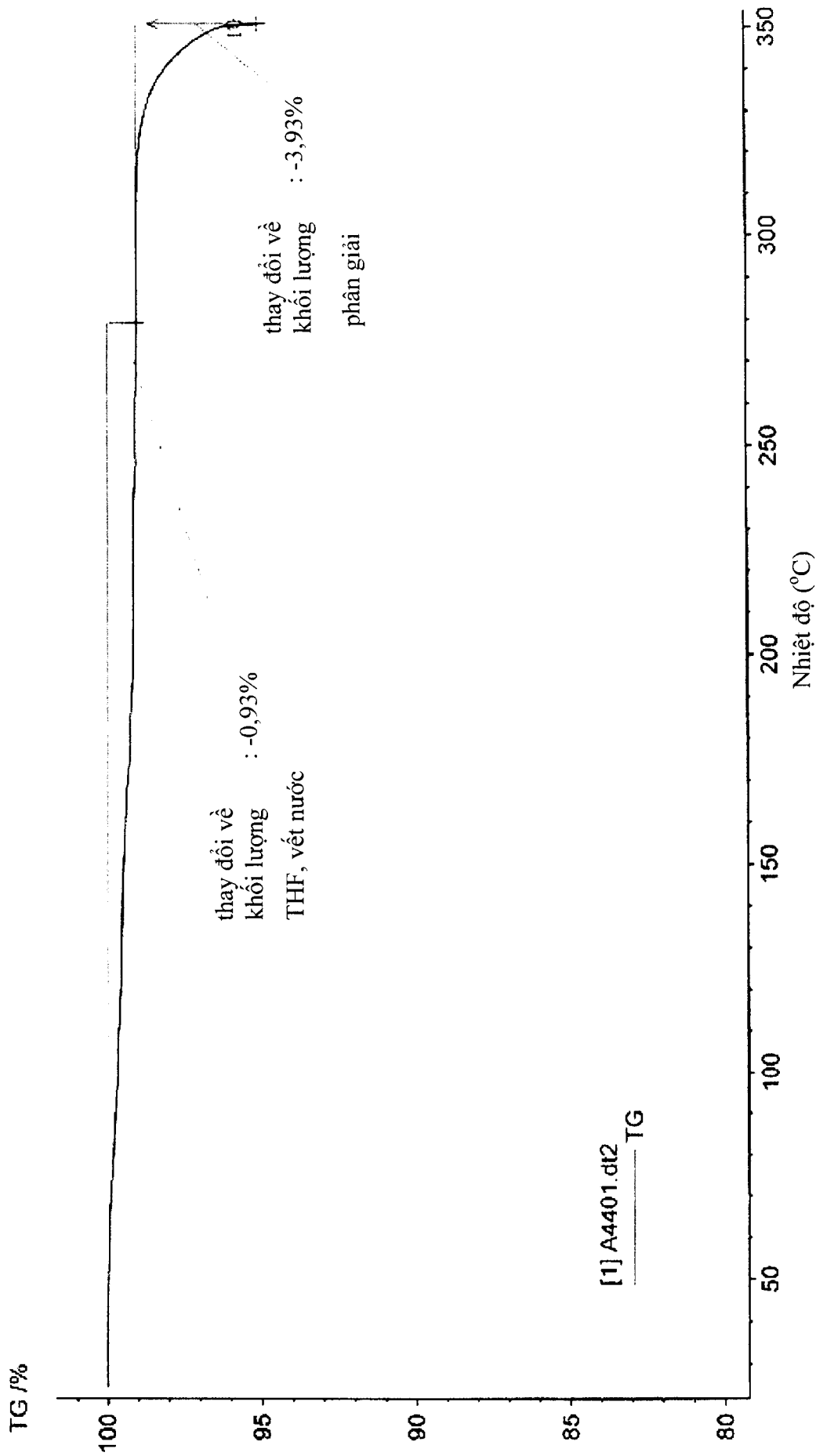


FIG. 126

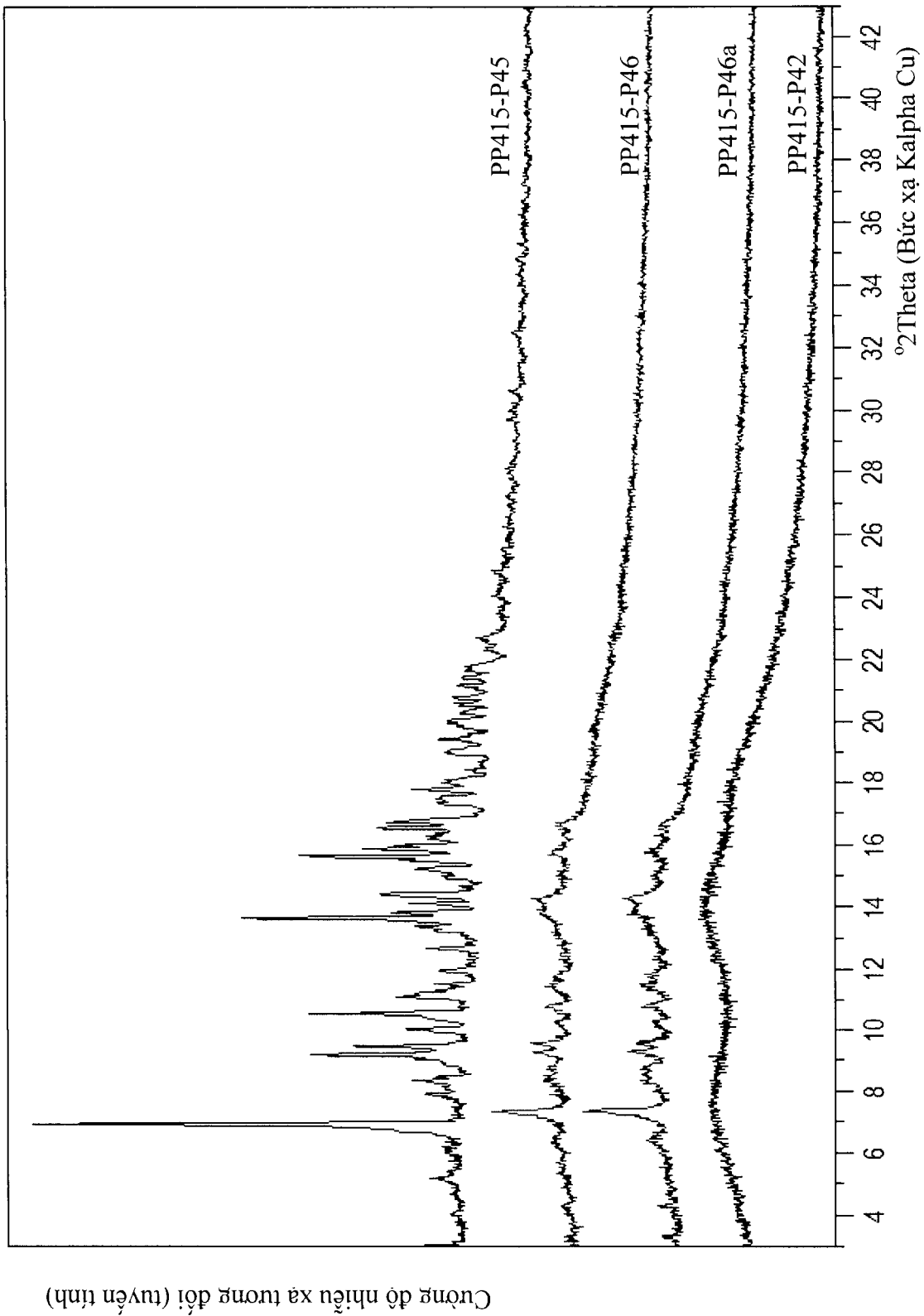


FIG. 127

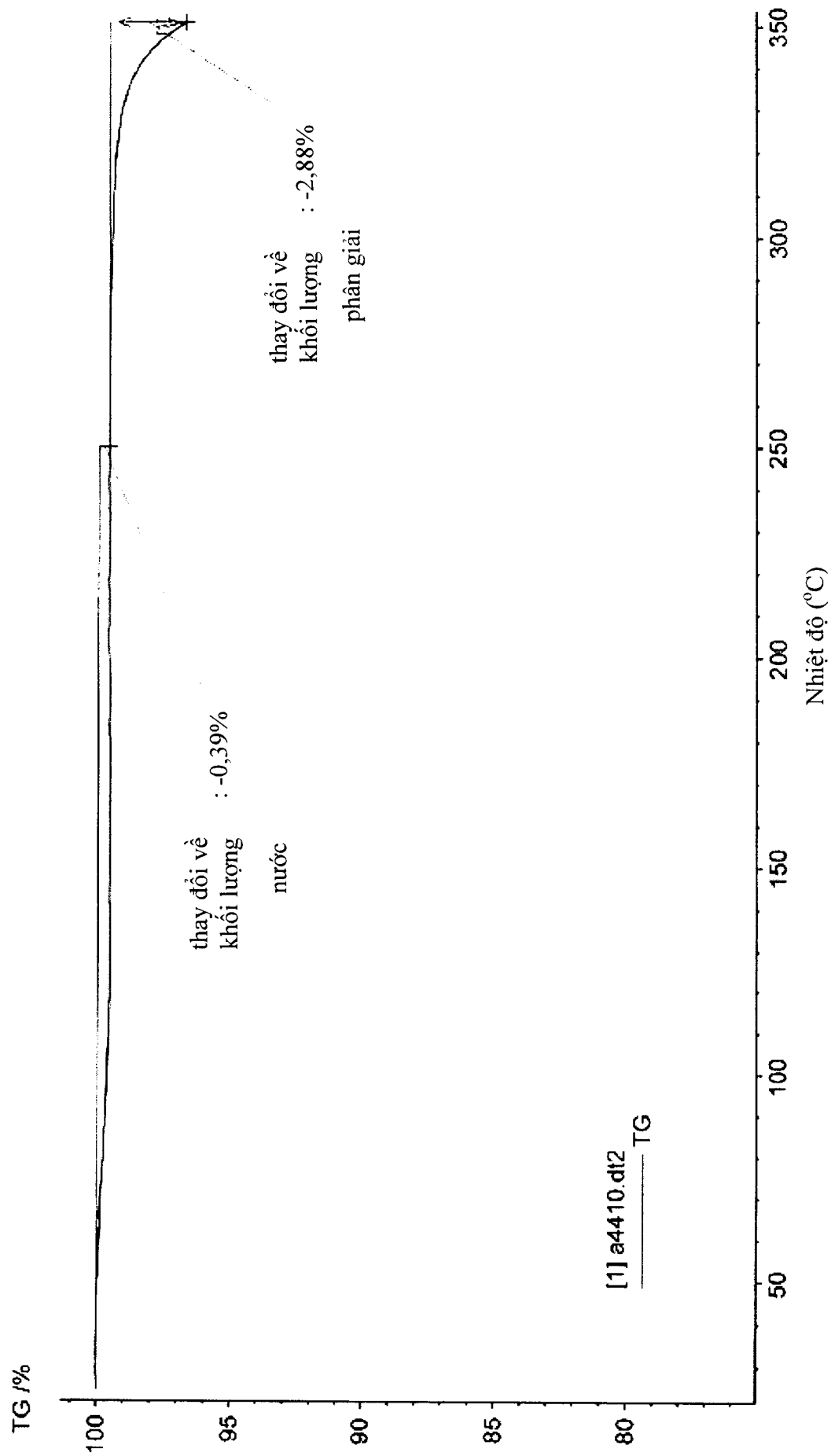


FIG. 128

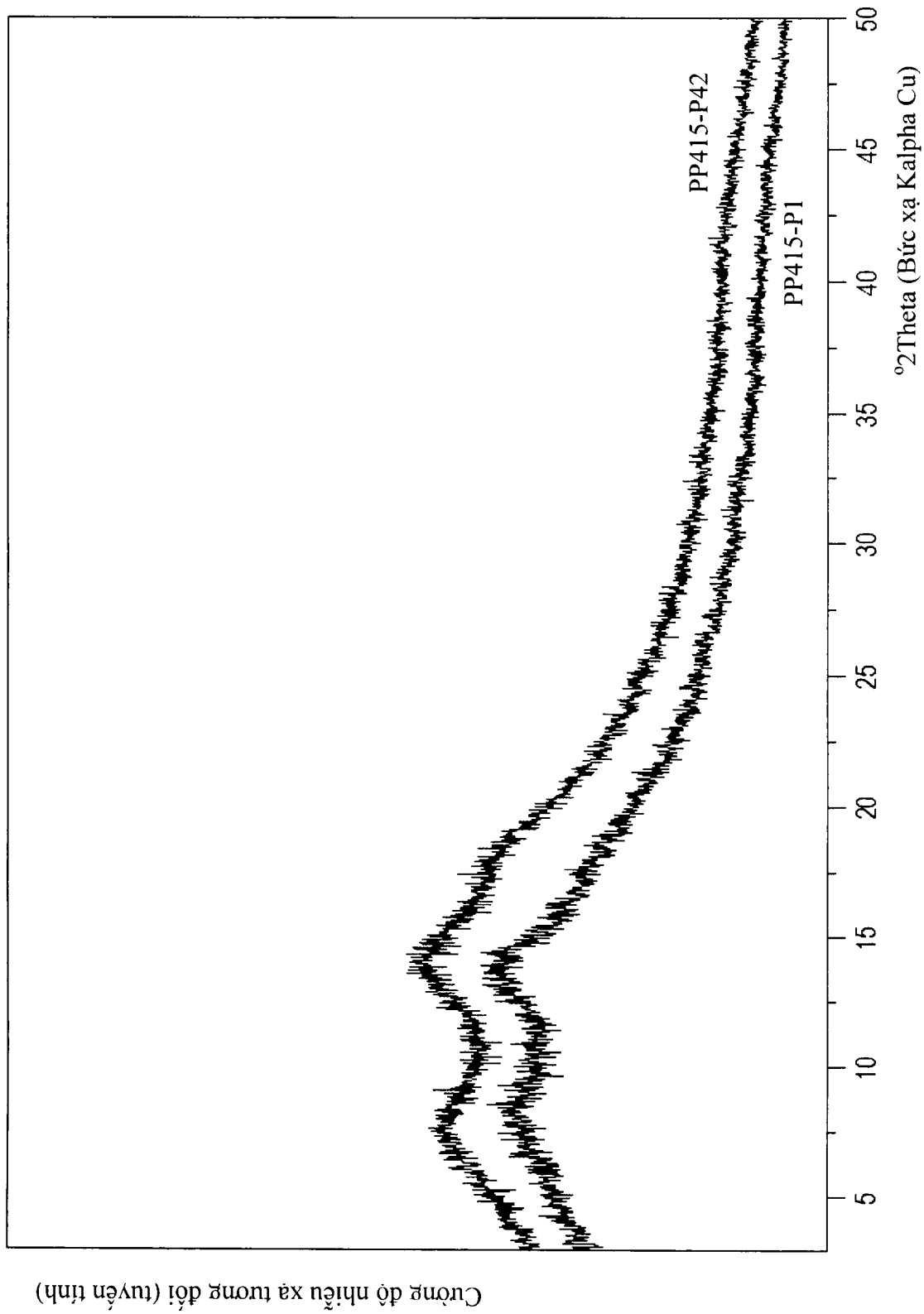


FIG. 129

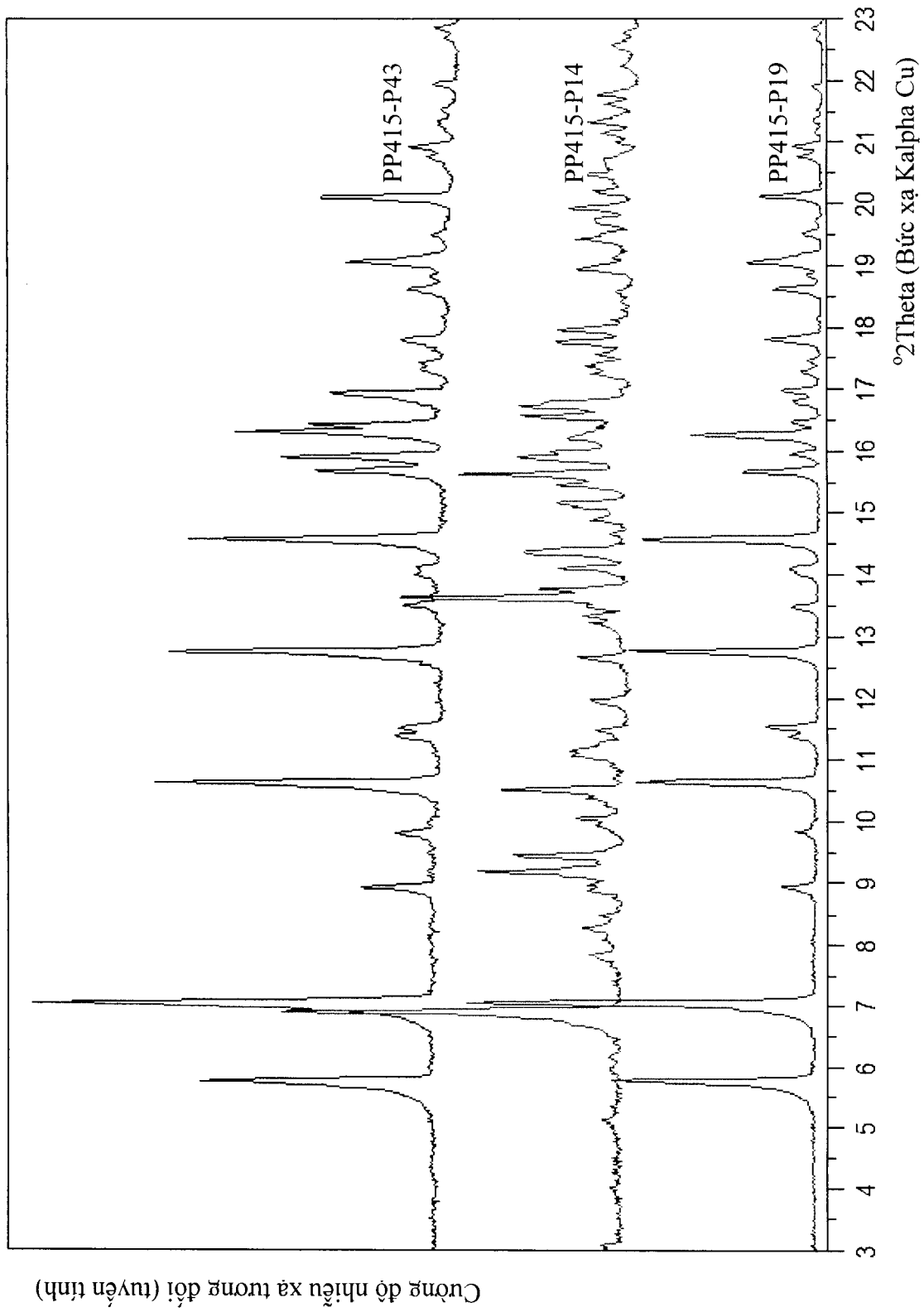
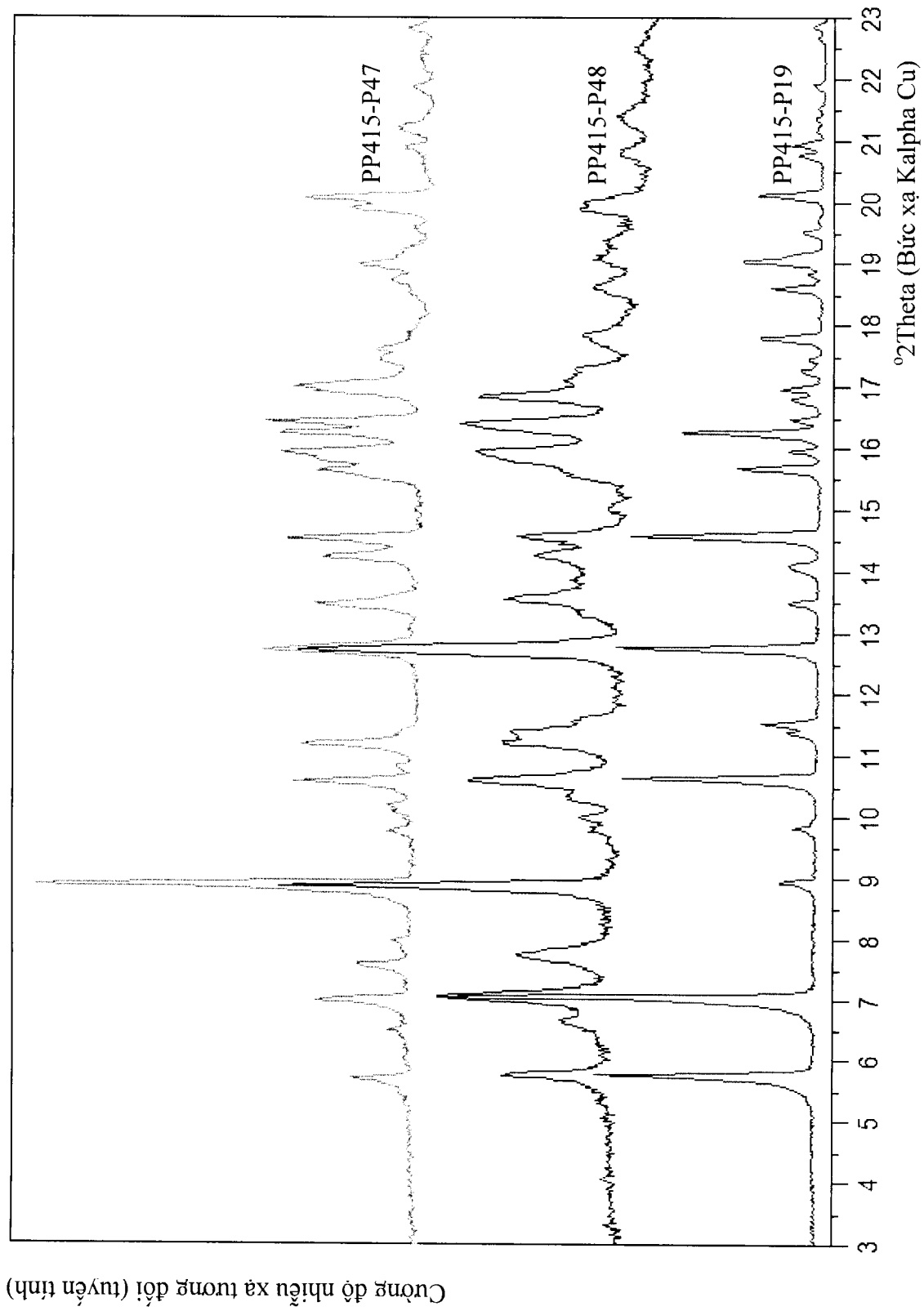


FIG. 130

**FIG. 131**

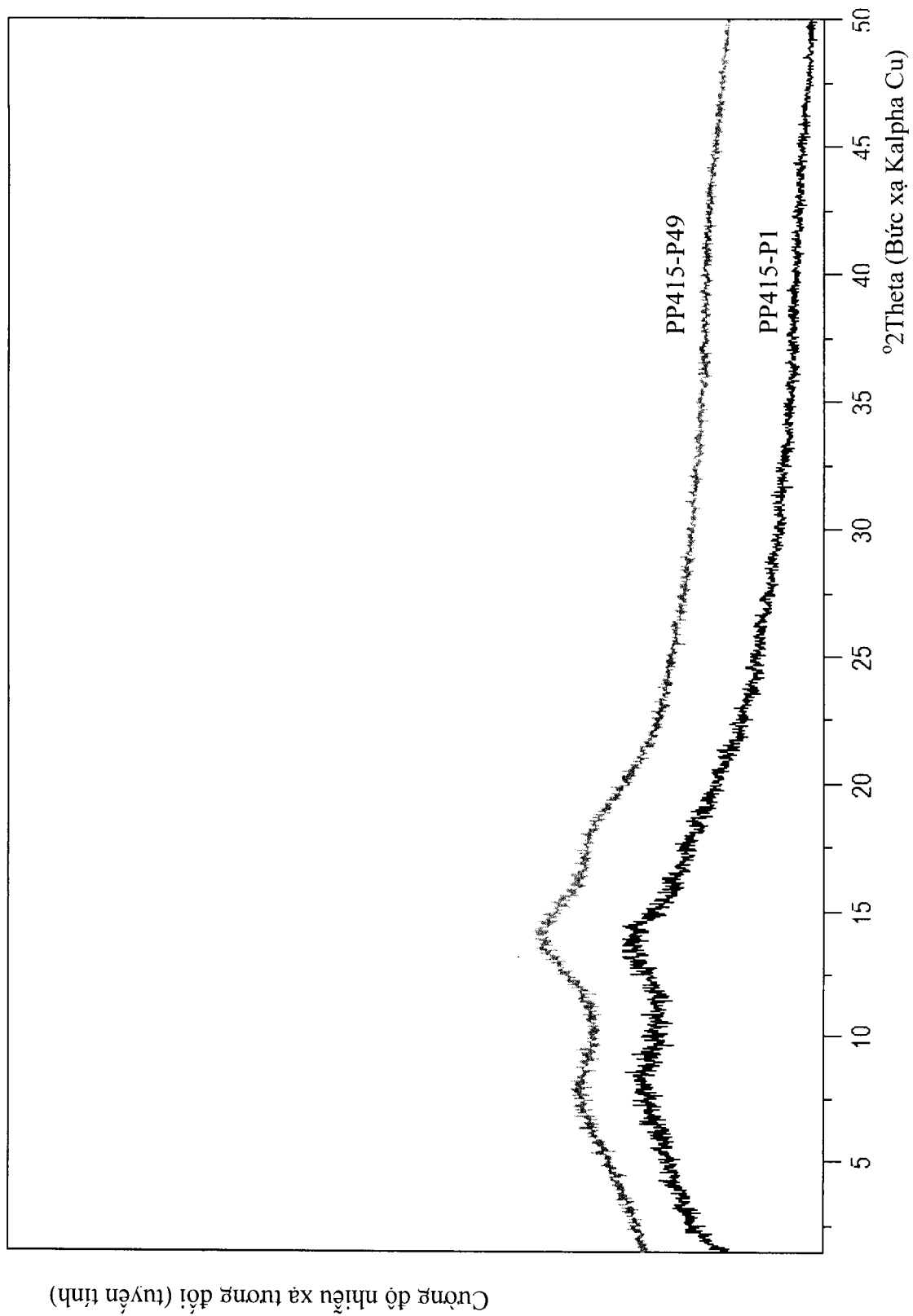


FIG. 132