



(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) 
1-0021356

(51)⁷ **C07D 213/61, C07C 311/20, A61K**
31/18, 31/4418, A61P 29/00

(13) **B**

(21) 1-2016-00298

(22) 24.06.2014

(86) PCT/GB2014/051921 24.06.2014

(87) WO2014/207445 31.12.2014

(30) 1311361.8 26.06.2013 GB

(45) 25.07.2019 376

(43) 25.04.2016 337

(73) PIMCO 2664 LIMITED (GB)

24 Cornhill, London, Greater London, EC3V 3ND, United Kingdom

(72) PATEL, Lisa (GB), SMITH, Stephen Allan (GB), GREIG, Iain Robert (GB),
WILLIAMS, Samuel Cameron (GB)

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) **HỢP CHẤT N-(4-HYĐROXY-4-METYL-XYCLOHEXYL)-4-PHENYL-
BENZENSULFONAMIT VÀ N-(4-HYĐROXY-4-METYL-XYCLOHEXYL)-4-(2-
PYRIDYL)BENZENSULFONAMIT, CHẾ PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY VÀ
PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ CHẾ PHẨM NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất N-(4-hydroxy-4-metyl-xyclohexyl)-4-phenyl-
benzensulfonamit và N-(4-hydroxy-4-metyl-xyclohexyl)-4-(2-
pyridyl)benzensulfonamit, chế phẩm chứa hợp chất này và phương pháp bào chế
chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất N-(4-hydroxy-4-metyl-xyclohexyl)-4-phenyl-benzensulfonamit và N-(4-hydroxy-4-metyl-xyclohexyl)-4-(2-pyridyl)benzensulfonamit được thể (sau đây gọi chung là hợp chất HMC) hữu ích trong điều trị rối loạn (ví dụ bệnh) bao gồm, bệnh viêm và/hoặc tình trạng phá hủy khớp và/hoặc chứng mất xương; rối loạn do hệ miễn dịch hoạt động quá mức và/hoặc sai lệch và/hoặc kéo dài; bệnh viêm và tự miễn, ví dụ bệnh viêm khớp dạng thấp; bệnh vẩy nến; bệnh viêm khớp vẩy nến; bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính; bệnh hen suyễn; bệnh xơ vữa động mạch; bệnh viêm ruột; bệnh viêm cột sống dính khớp; bệnh xơ cứng rải rác; bệnh lupus ban đỏ hệ thống; hội chứng Sjogren; rối loạn do chứng mất xương, như chứng mất xương do hoạt tính quá mức của tế bào hủy xương trong bệnh viêm khớp dạng thấp, chứng loãng xương, bệnh về xương do ung thư, hoặc bệnh Paget; bệnh ung thư, như bệnh ung thư máu, như bệnh đa u tủy xương, bệnh bạch cầu, hoặc bệnh u lymphô, hoặc khối u rắn ác tính, như bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú (ở nữ giới và/hoặc nam giới), bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư biểu mô tế bào thận, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư não, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tuyến giáp, u nguyên bào tạo men tế bào đáy, hoặc bệnh ung thư tế bào sắc tố; rối loạn do xơ hóa, như bệnh xơ cứng toàn thân hoặc bệnh xơ cứng bì; hoặc bệnh viêm mạch hiếm gặp, như bệnh Behçet. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này, và mô tả việc sử dụng hợp chất và dược phẩm này trong điều trị bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một số tài liệu công bố được viện dẫn trong bản mô tả này để mô tả chi tiết hơn sáng chế và tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Mỗi tài liệu công bố này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, với cùng nội dung khi mỗi tài liệu công bố được trích dẫn cụ thể và kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Trong bản mô tả này, bao gồm cả bộ yêu cầu bảo hộ, trừ khi có quy định khác, cần hiểu rằng thuật ngữ “chứa”, “có chứa” và “gồm” bao gồm quy trình đầy đủ hoặc bước cụ

thể hoặc nhóm quy trình đầy đủ hoặc bước nhưng không loại trừ quy trình đầy đủ hoặc bước khác bất kỳ hoặc nhóm quy trình đầy đủ hoặc bước khác bất kỳ.

Cần lưu ý rằng, như được sử dụng trong bản mô tả và bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo, mạo từ số ít tiếng Anh “a,” “an,” và “the” cũng bao gồm số nhiều trừ khi có quy định khác. Do đó, ví dụ thuật ngữ “chất mang được dụng” tức là bao gồm hỗn hợp hai hoặc nhiều chất mang, và chất tương tự.

Khoảng thường được thể hiện trong bản mô tả là từ “khoảng” một trị số cụ thể, và/hoặc đến “khoảng” một trị số cụ thể khác. Khi khoảng như vậy được thể hiện, một phương án khác bao gồm từ một trị số cụ thể và/hoặc đến một trị số cụ thể khác. Tương tự, cần hiểu rằng khi các trị số được thể hiện dưới dạng trị số gần đúng, bằng cách sử dụng số hạng đứng trước “khoảng”, thì trị số cụ thể này tạo ra một phương án khác.

Bản mô tả này bao gồm thông tin có thể hữu hiệu để hiệu được sáng chế. Cần lưu ý rằng thông tin bất kỳ được thể hiện trong bản mô tả không nhất thiết là thông tin về tình trạng kỹ thuật của sáng chế hoặc thông tin liên quan đến sáng chế, hoặc tài liệu công bố cụ thể hoặc tài liệu tham khảo bất kỳ không nhất thiết là tài liệu về tình trạng kỹ thuật của sáng chế.

Bệnh viêm mãn tính

Bệnh viêm là đáp ứng miễn dịch của mô do tổn thương cơ thể. Bệnh viêm cấp tính là phản ứng thông thường bảo vệ và phục hồi cơ thể sau tổn thương thể chất hoặc nhiễm trùng, đặc trưng bởi các triệu chứng sưng, nóng, và đỏ đau ở vị trí tổn thương. Tuy nhiên, khi bệnh viêm diễn ra trong thời gian dài, sẽ tiến triển thành mãn tính. Bệnh viêm mãn tính là dấu hiệu và yếu tố góp phần tạo ra nhiều tình trạng bệnh lý bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm ruột, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh xơ cứng rải rác và bệnh vẩy nến.

Quá trình viêm là quá trình phức tạp có sự tham gia của một loạt các tín hiệu phân tử và tế bào làm thay đổi các phản ứng sinh lý. Ở vị trí tổn thương, tế bào giải phóng các tín hiệu phân tử như xytokin và interleukin gây ra một số biến đổi ở vùng tổn thương bao gồm giãn mạch máu, tăng lưu lượng máu, tăng tính thấm thành mạch, thâm nhập bởi bạch cầu (tế bào bạch cầu), và tăng tiết dịch chứa protein tương tự globulin miễn dịch (kháng thể). Một số loại bạch cầu khác nhau, bao gồm bạch cầu hạt, bạch cầu đơn nhân, và lymphô bào tham gia vào một loạt phản ứng viêm. Tuy nhiên, bệnh viêm mãn tính

được điều hòa chủ yếu bởi bạch cầu đơn nhân và đại thực bào sống lâu; bạch cầu đơn nhân biệt hóa hoàn toàn thành đại thực bào khi chúng di chuyển khỏi dòng máu và thâm nhập vào mô. Đại thực bào ăn và phân giải vi sinh vật, chất lạ, và tế bào lão hóa và đại thực bào giải phóng nhiều chất điều hòa hóa học, bao gồm yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF α), interleukin (ví dụ IL-1, IL-6, IL-12 và IL-23) và prostaglandin duy trì phản ứng viêm. Ở các giai đoạn muộn, các tế bào khác, bao gồm lymphô bào, thâm nhập vào mô bị tổn thương.

Do đó, có bệnh lý trải qua nhiều tình trạng viêm mãn tính. Ngoài ra, các triệu chứng của bệnh viêm mãn tính cũng quan sát được ở các bệnh khác bao gồm bệnh ung thư và bệnh chuyển hóa như bệnh béo phì và bệnh đái tháo đường.

Một trong số các tình trạng viêm mãn tính phổ biến là bệnh viêm khớp dạng thấp (RA), với khoảng 2% dân số thế giới mắc phải. Mặc dù là bệnh phức tạp, nhưng có một số yếu tố sinh lý, tế bào, và sinh hóa liên quan đến tiến triển của bệnh viêm khớp dạng thấp thường gặp ở nhiều bệnh khác, bao gồm bệnh có yếu tố tự miễn (ví dụ bệnh xơ cứng rải rác), bệnh viêm (ví dụ bệnh xơ vữa động mạch và bệnh ung thư), chứng mất xương (ví dụ chứng loãng xương) và bệnh tăng sinh (ví dụ bệnh ung thư máu ác tính). Điều này khiến cho cơ chế chính xác của bệnh viêm khớp dạng thấp không chỉ quan trọng trong nghiên cứu nhiều bệnh, mà còn cho thấy rằng các dược chất tác dụng theo cơ chế biến đổi các quá trình này có thể hữu ích trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp. Điều này được rút ra trong quá trình thực hành lâm sàng khi dược chất điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp đã được chứng minh là có tác dụng điều trị hữu hiệu nhiều tình trạng bệnh khác

Bệnh viêm khớp dạng thấp và bệnh viêm và tự miễn liên quan

Bệnh viêm khớp dạng thấp là rối loạn tự miễn đặc trưng bởi tình trạng viêm mạn tính của màng hoạt dịch ở nhiều khớp cùng với tình trạng tiến triển thoái hóa khớp. Bệnh viêm khớp dạng thấp thường ảnh hưởng đến các khớp cổ tay và bàn tay và cũng có thể ảnh hưởng đến khuỷu tay, vai, hông, cổ và đầu gối gây đau nặng và biến dạng khớp (ví dụ, xem Scott et al., 2010). Tổ chức Y tế Thế giới dự đoán rằng 23,7 triệu người bị bệnh viêm khớp dạng thấp, với tỷ lệ ngày tăng là do sự kết hợp giữa tình trạng và tuổi tác ngày càng tăng.

Nguyên nhân chính xác gây bệnh viêm khớp dạng thấp, cũng như toàn bộ các rối loạn tự miễn, vẫn chưa được biết rõ, mặc dù có thể bao gồm giảm khả năng tự dung nạp, phản ứng bất thường với các yếu tố môi trường, tác nhân nhiễm trùng, và kích thích nội tiết tố (ví dụ, xem Klareskog et al., 2006; Firestein et al., 2005).

Ở cấp độ tế bào, sự phát triển bệnh viêm khớp dạng thấp thường bắt đầu bởi tế bào T thâm nhập vào niêm mạc màng hoạt dịch của khớp bị tổn thương; sau đó hoạt hóa bạch cầu đơn nhân, đại thực bào và nguyên bào sợi màng hoạt dịch bằng cách tiếp xúc tế bào với nhau, sau đó giải phóng nhiều xytokin, bao gồm yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF α) và interleukin tiền viêm như IL-1, IL-6, IL-12 và IL-23 (ví dụ, xem Astry et al., 2011). Sau đó, các xytokin tiền viêm này tham gia vào một loạt các quá trình truyền tín hiệu phức tạp, bao gồm quá trình NF κ B, yếu tố điều hòa interferon (IRF), thụ thể tương tự Toll (TLR), và Jak/STAT (ví dụ, xem Malemud et al., 2010) dẫn đến hoạt hóa gen mã hóa nhiều hợp chất gây lan truyền các phản ứng viêm và làm tăng phá hủy mô. Các hợp chất này bao gồm enzym phân giải mô như collagenaza, metaloproteinaza mạng lưới ngoại bào (MMP), cathepsin, và các yếu tố tiền viêm khác như selectin, integrin, leukotrien, prostaglandin, chemokin, và các xytokin khác (ví dụ, xem McInnes et al., 2007; Smolen et al., 2003). Ngoài ra, các tế bào này cũng làm tăng sản sinh MMP, dẫn đến phân hủy protein mạng lưới ngoại bào và làm giảm lượng sụn trong khớp (ví dụ, xem Sun, 2010), là quá trình có sự tham gia của nhóm tế bào chuyên biệt được gọi là tế bào hủy xương và yếu tố được gọi là yếu tố hoạt hóa thụ thể của phối tử Kappa-B của yếu tố nhân (RANKL) (ví dụ, xem Takayanagi, 2009).

RANKL là yếu tố cần thiết để sản sinh tế bào hủy xương, và sự sản sinh RANKL được điều hòa tăng dẫn đến làm tăng biệt hóa tế bào hủy xương và cuối cùng làm phá hủy xương (ví dụ, xem Long et al., 2012). Phản ứng viêm trong bệnh viêm khớp dạng thấp dẫn đến tích tụ lymphô bào, tế bào đuôi gai, và đại thực bào, toàn bộ các tế bào này kích hoạt tại chỗ để sản sinh xytokin và các chất điều hòa tiền viêm khác như TNF α và IL-6 mà tiếp tục làm tăng tác dụng tác dụng của RANKL trong quá trình phá hủy xương. Ngoài ra, một loạt phản ứng viêm dẫn đến tăng sản sinh tế bào hoạt dịch (ví dụ, xem Takayanagi, 2009), dẫn đến làm dày và tạo mạch màng hoạt dịch vào mô xâm lấn và phá hủy được gọi là dịch viêm khớp. Dịch viêm khớp chứa cả tế bào hủy xương, có tác dụng phá hủy xương, và metaloproteinaza, tham gia vào quá trình phá hủy sụn. Do đó, trục RANKL là rất quan trọng đối với quá trình tiến triển và cơ chế bệnh sinh của bệnh

viêm khớp dạng thấp cũng như đối với hệ miễn dịch ở xương (sự tương tác giữa hệ miễn dịch và hệ xương), là quan trọng đối với cơ chế của nhiều tình trạng bệnh, được mô tả dưới đây.

Vai trò của TNF α trong bệnh viêm khớp dạng thấp

Phân nhóm TNF của các thụ thể và phối tử đóng vai trò quan trọng trong nguyên nhân gây viêm và chứng mất xương toàn thân hoặc khu trú liên quan. TNF α là chất tiền viêm hoạt lực mạnh điều hòa nhiều đặc tính của chức năng đại thực bào. TNF được giải phóng nhanh sau chấn thương, nhiễm trùng, hoặc tiếp xúc với LPS có nguồn gốc từ vi khuẩn và là chất điều hòa xuất hiện sớm nhất ở mô bị viêm. Trong số các chức năng khác nhau thì TNF có vai trò quan trọng trong sản sinh hàng loạt xytokin tiền viêm. Ngoài xytokin tiền viêm, TNF α cũng làm tăng các chất điều hòa quá trình truyền tín hiệu lipit như prostaglandin. Căn cứ vào các vai trò này, TNF α được cho là có vai trò quan trọng trong hoạt hóa và huy động tế bào viêm và trong sự phát triển của nhiều bệnh viêm mãn tính bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp (ví dụ, xem Liu, 2005; Feldmann et al., 2001; Brennan et al., 1996; Brennan et al., 1992). Vai trò quan trọng của TNF α trong bệnh viêm khớp dạng thấp được làm sáng tỏ bởi sự phát hiện về kháng thể phong bế TNF α có thể phòng ngừa viêm trên mô hình động vật bị bệnh viêm khớp dạng thấp, và liệu pháp kháng TNF α hiện là phương pháp hữu hiệu nhất để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp (ví dụ, xem Pisetsky, 2012, và phần mô tả chi tiết dưới đây).

TNF α tự kích hoạt hàng loạt quá trình truyền tín hiệu dẫn đến hoạt hóa các yếu tố phiên mã NF κ B và AP-1 (ví dụ, xem Parameswaran et al., 2010). Sự gắn kết của TNF α và IL-1 với các thụ thể tương ứng của chúng dẫn đến huy động các yếu tố dẫn truyền tín hiệu giảm được gọi là TRAF. Hơn nữa, các kinaza được huy động bởi các TRAF, và phức hợp kinaza thu được hoạt hóa chu trình MAP kinaza, cuối cùng dẫn đến hoạt hóa AP-1, và phosphoryl hóa I κ B kinaza. I κ B là chất ức chế NF κ B, có tác dụng ngăn ngừa sự chuyển dịch của NF κ B vào nhân tế bào. Quá trình phosphoryl hóa I κ B bởi I κ B kinaza dẫn đến phân hủy I κ B. Khi I κ B đã được phân hủy, NF κ B di chuyển vào nhân tế bào, ở NF κ B kích thích quá trình phiên mã các gen chống gây chết tế bào theo chương trình, làm tăng khả năng sống sót của tế bào T và tế bào B, nhờ đó kéo dài đáp ứng miễn dịch. Sự kéo dài đáp ứng viêm này đóng vai trò quan trọng trong cơ chế mãn tính của bệnh viêm khớp dạng thấp. Vai trò quan trọng của sự hoạt hóa NF κ B được kiểm chứng bởi

thực tế là sự ức chế hoạt tính của NF κ B bởi peptit ức chế có thể phòng ngừa bệnh viêm khớp trên mô hình động vật bị bệnh viêm khớp dạng thấp (ví dụ, xem Jimi et al., 2004).

Các yếu tố quan trọng khác trong bệnh viêm khớp dạng thấp

Như mô tả nêu trên, ngoài TNF α và NF κ B, thì một số yếu tố khác cũng có tác dụng kích thích phản ứng viêm trong bệnh viêm khớp dạng thấp và các bệnh viêm mãn tính khác. Trong số các yếu tố này bao gồm IL-6 và yếu tố điều hòa interferon (IRF).

Interleukin-6 (IL-6) là xytokin tiền viêm có hàm lượng tăng khi hoạt hóa nhiều tế bào hệ miễn dịch trong phản ứng viêm trong bệnh viêm khớp dạng thấp, chủ yếu là đại thực bào và tế bào T. IL-6 có nhiều tác dụng trong bệnh do có vai trò quan trọng trong giai đoạn cấp tính và tham gia nhiều vào việc điều khiển quá trình tiến triển từ viêm cấp tính sang viêm mãn tính. IL-6 thực hiện tác dụng này bằng cách biến đổi thành phần bạch cầu thâm nhập vào ổ viêm, di chuyển từ bạch cầu trung tính đến bạch cầu đơn nhân/đại thực bào (ví dụ, xem Gabay, 2006). Ngoài ra, IL-6 cũng có tác dụng kích thích tế bào T và tế bào B, do đó kích thích các phản ứng viêm mãn tính, cũng như tế bào hủy xương, do đó kích thích quá trình chuyển hóa xương. Các tác dụng này liên quan đến cơ chế của nhiều bệnh tự miễn/viêm sau khi bị bệnh viêm khớp dạng thấp, bao gồm bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh hen suyễn, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, hội chứng Sjogren, bệnh xơ vữa động mạch, và bệnh viêm ruột, cũng như bệnh ung thư như bệnh đa u tủy xương và bệnh ung thư tuyến tiền liệt. Ngoài ra, IL-6 cũng liên quan đến các bệnh bao gồm chứng mất xương (ví dụ chứng loãng xương), bệnh xơ hóa (ví dụ bệnh xơ cứng toàn thân), bệnh đái tháo đường, thải loại cấy ghép, nhiều bệnh ung thư (bao gồm, ví dụ bệnh đa u tủy xương, bệnh u lymphô, bệnh ung thư tuyến tiền liệt), bệnh thoái hóa thần kinh (ví dụ bệnh Alzheimer), rối loạn tâm thần (ví dụ bệnh trầm cảm), và một số bệnh viêm mạch hiếm gặp (ví dụ bệnh Behcet). Để biết thêm chi tiết, xem ví dụ Rincon, 2012.

Yếu tố điều hòa interferon (IRF) bao gồm nhóm yếu tố phiên mã có chức năng khác nhau trong điều hòa phiên mã các phản ứng tế bào ở đối tượng khỏe mạnh và đối tượng bị bệnh. IRF thường chứa vùng gắn kết ADN ở đầu tận cùng N, với hầu hết các IRF cũng chứa vùng liên kết IRF ở đầu tận cùng C điều hòa tương tác giữa các protein. Mười IRF và một số thể tương đồng của IRF mã hóa bởi virus đã được xác định ở động vật có vú. IRF được hoạt hóa trong đáp ứng với các kích thích nội sinh và vi sinh vật

trong đáp ứng miễn dịch, và điều hòa chọn lọc và tương tác biểu hiện của các yếu tố phiên mã và xytokin quan trọng tham gia vào nhiều phản ứng viêm. Ví dụ, sự kích thích thụ thể TLR-4 của lipopolysaccharit của vi khuẩn làm hoạt hóa một loạt quá trình truyền tín hiệu mà hoạt hóa cả NF κ B lẫn IRF-5, trong khi đó IRF-7 được hoạt hóa bởi quá trình có sự tham gia của nhóm yếu tố phiên mã STAT, cũng được hoạt hóa độc lập bởi IL-6.

Sự hoạt hóa IRF gây ra một số tác dụng giảm bao gồm quá trình chết của đại thực bào (ví dụ, xem Krausgruber et al., 2011), biệt hóa tế bào hỗ trợ T (ví dụ, xem Zhang et al., 2012) và khả năng tăng sinh của tế bào B (ví dụ, xem Minamino et al., 2012). Các vai trò khác nhau này trong bệnh được thể hiện bởi dữ liệu thu được từ mô hình động vật có đột biến mất gen có hàm lượng thấp của IL-6 và TNF α trong đáp ứng với kích thích viêm (ví dụ, xem Takaoka et al., 2005).

Ngoài vai trò sinh học của IRF nêu trên, một số IRF có liên quan di truyền đến bản chất của các tình trạng viêm. Ví dụ, các dạng đa hình của IRF-3 và IRF-7 liên quan đến tính nhạy cảm của bệnh lupus ban đỏ hệ thống (ví dụ, xem Akahoshi et al., 2008; Fu et al., 2011). Ngoài ra, IRF-5, mà kiểm soát quá trình chết của đại thực bào, liên quan đến tính nhạy cảm của bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh u hạt Wegener, hội chứng Sjogren, và bệnh xơ cứng toàn thân (ví dụ, xem Sharif et al., 2012; Hu et al., 2011).

Điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp

Các liệu pháp điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp giai đoạn đầu tập trung kiểm soát các triệu chứng của bệnh, chủ yếu là làm giảm triệu chứng viêm, thay vì làm chậm tiến triển bệnh. Các hoạt chất này bao gồm NSAID như aspirin, diclofenac, và naproxen. Triệu chứng viêm cũng được kiểm soát bằng glucocorticoid, và sự kết hợp glucocorticoid với NSAID tạo ra hiệu quả kiểm soát hữu hiệu tình trạng viêm trong thời gian ngắn. Gần đây hơn, phương pháp hữu hiệu hơn để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp đã được sử dụng để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp ở giai đoạn khởi phát, bằng cách sử dụng hoạt chất chống thấp khớp điều hòa bệnh (DMARD), có tác dụng làm chậm hoặc thậm chí ngăn ngừa tiến triển bệnh. Các hoạt chất này bao gồm một số hoạt chất thế hệ cũ, bao gồm muối vàng; sulfasalazin; hoạt chất chống sốt rét như hydroxycloquin; D-penicilamin; hoạt chất ức chế miễn dịch như axit mycophenolic, azathioprin, cyclosporin

A, tacrolimus và sirolimus; minocyclin; leflunomid; và quan trọng nhất là methotrexat (ví dụ, xem Smolen et al., 2003).

Hiện nay, methotrexat là chất chuẩn hữu hiệu để so sánh thử nghiệm trên lâm sàng, và thường được sử dụng kết hợp với các hoạt chất mới. Methotrexat có hiệu quả trên hầu hết các đối tượng bị bệnh, như tương tự toàn các hoạt chất nêu trên, methotrexat cũng có tác dụng không mong muốn đáng kể trên đường tiêu hóa, dẫn đến khoảng 50% đối tượng bị bệnh phải dừng điều trị (ví dụ, xem Mount et al., 2005). Một nhược điểm nữa của các DMARD thế hệ cũ này là cần thời gian dài để các hoạt chất này phát huy tác dụng, thường là hàng tuần đối với methotrexat, hàng tháng đối với muối vàng. Trong khi chỉ khoảng một phần tư số đối tượng bị bệnh có triệu chứng thuyên giảm hoàn toàn, thì những đối tượng không có dấu hiệu thuyên giảm thường không thể ngừng điều trị mà không có nguy cơ tái phát bệnh nặng hơn (ví dụ, xem Smolen et al., 2003).

Trong các năm gần đây, việc điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp đã được cách mạng hóa bởi sự ra đời của các hoạt chất sinh học tác dụng tới các phản ứng viêm đặc trưng. Một số hoạt chất sinh học hiện đã được chấp thuận dùng để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp bao gồm hoạt chất sinh học kháng IL-6 và IL-1 như tocilizumab (Actemra®) và anakinra (Kineret®) (ví dụ, xem Scott et al., 2010). Tuy nhiên, vai trò quan trọng nhất và hàng đầu của các hoạt chất sinh học là các chất này có tác dụng kháng yếu tố hoại tử mô (kháng TNF).

Các hoạt chất kháng TNF α là lựa chọn hàng đầu để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp. Nhiều hoạt chất kháng TNF α có bán trên thị trường bao gồm kháng thể trung hòa như infliximab (Remicade®; J&J và Schering Plough) và adalimumab (Humira®; Abbott), hoặc thụ thể decoy như etanercept (Enbrel®; Amgen and Wyeth), cả hai hoạt chất này có hiệu lực cao trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp cũng như các bệnh khác như bệnh Crohn và bệnh vẩy nến. Cả hai hoạt chất này cũng đang được thử nghiệm trên một số bệnh viêm và tự miễn khác. Các hoạt chất khác để phong bế tác dụng của TNF α bao gồm certolizumab được gắn PEG kháng mảnh TNF α (Cimzia®, UCB). Toàn bộ các hoạt chất này có tác dụng ngăn ngừa sự hoạt hóa các yếu tố tác động giảm của TNF α mô tả nêu trên, bao gồm NF κ B. Tuy nhiên, mặc dù được tiêu thụ thành công trên thị trường, nhưng các hoạt chất kháng TNF α gây ra một số tác dụng không mong muốn bao gồm tăng nguy cơ một số bệnh ác tính như bệnh u lymphô và các bệnh nhiễm trùng nặng như

Legionella và *Listeria*, cũng như tăng nguy cơ suy tim, tái phát viêm gan B, và bệnh hủy myêlin.

Cuối cùng, gần đây nhất, chất ức chế JAK kinaza, tofacitinib (Xeljanz®, Pfizer) cũng đã được chấp thuận để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp. Tuy nhiên, tofacitinib cũng có một số vấn đề về độ an toàn bao gồm tăng nguy cơ nhiễm trùng nặng cũng như tăng nguy cơ xuất huyết đường tiêu hóa, tổn thương gan, và một số bệnh ung thư, do đó hạn chế sử dụng ở người (ví dụ, xem O'Shea et al., 2013).

Do đó, vẫn có nhu cầu về hoạt chất mới hiệu quả hơn trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp và các bệnh viêm khác và có độ an toàn cao hơn.

Hệ miễn dịch ở xương và rối loạn xương

Hệ miễn dịch ở xương là thuật ngữ được dùng để chỉ mối tương tác kết hợp và liên quan giữa hệ miễn dịch và hệ xương.

Trong các điều kiện sinh lý bình thường, hệ xương có tác dụng hỗ trợ, giúp di chuyển, bảo vệ các cơ quan nội tạng, và dự trữ canxi và phosphat. Để đạt được và thích ứng với các chức năng này, hệ xương tồn tại ở trạng thái cân bằng động được đặc trưng bởi quá trình tiêu xương liên tục bởi tế bào hủy xương quá trình tạo xương liên tục bởi tế bào tạo xương (ví dụ, xem Karsenty et al., 2002). Quá trình sinh học này được gọi là “quá trình tái tạo xương” và diễn ra theo mô hình liên hợp với tế bào tạo xương sản sinh các yếu tố biệt hóa tế bào tạo xương quan trọng, bao gồm RANKL, mô tả nêu trên, và tế bào hủy xương tăng cường tạo xương bằng cách sản sinh các chất điều hòa tạo xương khi chúng phân hủy hương.

Cả tế bào miễn dịch bẩm sinh và thu được đều ảnh hưởng đến tế bào hủy xương và tế bào tạo xương thông qua nhiều chất điều hòa bề mặt tế bào được tiết ra (ví dụ, xem Takayanagi, 2009). Hoạt hóa thụ thể RANKL (RANK) ở tiền tế bào hủy xương sẽ kích hoạt hàng loạt biến đổi phiên mã dẫn đến hình thành tế bào hủy xương và biểu hiện cơ chế cần để tiêu xương bao gồm các phân tử cần để gắn vào xương, bài tiết axit, và phân giải protein. Nhiều yếu tố phiên mã quan trọng để biệt hóa tế bào hủy xương là các yếu tố điều hòa quan trọng của các đáp ứng miễn dịch, như NF κ B và yếu tố nhân của tế bào T được hoạt hóa c1 (NFATc1) và quá trình này cũng được hoạt hóa bởi các yếu tố tham gia vào phản ứng viêm như TNF α và IL-6.

Ngoài vai trò quan trọng trong tiến triển và cơ chế bệnh sinh của bệnh viêm khớp dạng thấp, hệ miễn dịch ở xương có vai trò quan trọng trong một số bệnh khác bao gồm chứng loãng xương và các rối loạn khác ở xương và bệnh ung thư (ví dụ, xem Dallas et al., 2011).

Chứng loãng xương là bệnh phổ biến đặc trưng bởi các triệu chứng giảm mật độ xương, thoái hóa mô xương, và tăng nguy cơ gãy xương. Nhiều yếu tố góp phần tạo ra cơ chế của chứng loãng xương bao gồm chế độ ăn kiêng, ít vận động, hút thuốc, và uống quá nhiều rượu. Chứng loãng xương cũng liên quan đến các bệnh viêm như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh nội tiết như rối loạn tăng năng tuyến giáp, và một số dược chất như glucocorticoid. Thực tế là, các triệu chứng gãy xương liên quan đến chứng loãng xương là một trong những biến chứng quan trọng nhất có thể xuất hiện ở các đối tượng bị bệnh thấp khớp như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, và bệnh viêm cột sống dính khớp.

Bệnh Paget ở xương là bệnh phổ biến chưa rõ nguyên nhân, đặc trưng bởi các triệu chứng tăng chuyển hóa xương và tái tạo xương vô tổ chức, với các vùng tăng hoạt tính hủy xương và tạo xương. Mặc dù xương bị bệnh Paget thường đặc hơn thông thường, nhưng cấu trúc bất thường này làm cho xương yếu hơn, dẫn đến biến dạng xương và tăng nguy cơ gãy xương bệnh lý.

Quá trình truyền tín hiệu IL-6, TNF α , và RANKL có vai trò quan trọng trong hoạt tính quá mức của tế bào hủy xương và dẫn đến làm tăng chứng mất xương (ví dụ, xem Tanaka et al., 2003; Roodman, 2006). Việc sử dụng các dược chất tác động đến các quá trình này đã được kiểm chứng thông qua các thử nghiệm lâm sàng với kháng thể đơn dòng kháng RANKL, AMG-162 (Denosumab®, Amgen), để điều trị chứng loãng xương/bệnh đa u tủy xương, cũng như nhiều bằng chứng lâm sàng cho thấy rằng các liệu pháp kháng TNF α và IL-6 cũng ngăn ngừa chứng mất xương ở các bệnh viêm khớp (ví dụ, xem Ogata et al., 2012; Billau, 2010).

Hệ miễn dịch ở xương và bệnh ung thư

Nhiều bệnh ung thư ảnh hưởng đến xương. Bệnh về xương do ung thư có thể xuất hiện do bệnh tăng canxi máu hoặc phát triển tính trạng di căn hủy xương và/hoặc cứng xương. Tình trạng tăng tiêu xương bởi tế bào hủy xương đóng vai trò quan trọng trong cơ chế của cả hai tình trạng bệnh này. Trong khi hầu hết bệnh ung thư có thể gây biến chứng

di căn xương, nhưng các nguồn phổ biến nhất là bệnh đa u tủy xương, bệnh ung thư biểu mô vú, và bệnh ung thư biểu mô tuyến tiền liệt. The most common tumours liên quan đến bệnh tăng canxi máu là bệnh đa u tủy xương, bệnh ung thư biểu mô vú, và bệnh ung thư biểu mô phổi.

Như mô tả nêu trên, quá trình truyền tín hiệu RANK/RANKL là cần thiết để hình thành tế bào hủy xương và quá trình tiêu xương xuất hiện trong quá trình tái tạo xương. Mặc dù quá trình truyền tín hiệu RANK/RANKL ở mức độ sinh lý kích thích sự tăng sinh và sống sót của tế bào biểu mô tuyến vú, nhưng gần đây quá trình truyền tín hiệu bất thường RANK/RANKL trong các mô này đã được kiểm chứng là có ảnh hưởng đến sự khởi phát và tiến triển của khối u vú và việc phong bế quá trình truyền tín hiệu RANKL bằng denosumab (Xgeva®, Amgen) có hiệu quả trong phòng ngừa các biến chứng thứ phát của di căn xương, như gãy xương bệnh lý, và bệnh tăng canxi máu ở các đối tượng bị bệnh ung thư vú (ví dụ, xem Steger et al., 2011).

Các liệu pháp phong bế quá trình truyền tín hiệu RANK/RANKL có thể cũng làm giảm khả năng di căn vào xương của bệnh ung thư xương nguyên phát. Quá trình truyền tín hiệu thông qua RANK trên bề mặt của tế bào khối u biểu mô của người cũng như tế bào ung thư sắc tố đã được kiểm chứng là tạo ra đáp ứng hóa hướng động ở các tế bào khối u này, trong khi đó trên mô hình chuột bị bệnh ung thư tế bào sắc tố di căn, quá trình điều trị bằng osteoprotegrin, mà trung hòa thụ thể RANKL, RANK, đã làm giảm đáng kể thể tích khối u trong xương nhưng không ở các cơ quan khác.

Ngoài vai trò của RANKL trong bệnh ung thư, có nhiều bằng chứng cho thấy rằng hoạt hóa NFκB thông qua các phân tử như TNFα có thể có vai trò quan trọng trong thúc đẩy và tiến triển của cả bệnh ung thư máu ác tính, như bệnh u tủy và bệnh u lymphô, lẫn khối u rắn, như bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, và bệnh ung thư phổi (ví dụ, xem Baud et al., 2009). Điều này giúp nâng cao nhận thức về vai trò và tầm quan trọng của bệnh viêm và hệ miễn dịch ở xương trong bệnh ung thư và trong sự phát triển tính kháng các hoạt chất xạ trị và hóa trị liệu. Hơn nữa, đã biết rằng trong thực tế bệnh viêm là một trong các triệu chứng cơ bản của bệnh ung thư (ví dụ, xem Mantovani, 2009). Do đó, việc cải thiện hiệu quả của phương pháp điều trị chống bệnh ung thư bằng cách ngăn ngừa hoạt hóa NFκB là biện pháp triển vọng để làm tăng các chế độ điều trị hiện có và hiện đang được thử nghiệm, đặc biệt là để điều trị bệnh đa u tủy xương.

Các lỗi xảy ra trong các quá trình gây chết tế bào theo chương trình bình thường cũng liên quan đến sự phát triển và tiến triển của tế bào u cũng như phản ứng viêm. Quá trình chết tế bào theo chương trình đóng vai trò quan trọng trong loại bỏ tế bào bất thường; các lỗi xảy ra trong hàng loạt quá trình truyền tín hiệu, mà thường tạo ra các lỗi này, đóng vai trò quan trọng trong phát sinh bệnh ung thư. Hoạt chất xạ trị và nhiều hoạt chất hóa trị liệu tác dụng bằng cách gây tổn thương tế bào, mà thường gây chết tế bào theo chương trình; do đó các lỗi xảy ra trong quá trình này cũng sẽ làm giảm hiệu quả của các hoạt chất này. Các phân tử tác động quan trọng nhất trong quá trình truyền tín hiệu này dẫn đến gây chết tế bào theo chương trình được gọi là caspaza, có thể được hoạt hoá bởi một số yếu tố kích thích, bao gồm gắn kết TNF α với thụ thể của nó. Các đột biến ở các gen mã hóa caspaza đã được tìm thấy ở một số khối u, bao gồm tế bào ung thư dạ dày, tế bào ung thư vú, tế bào ung thư thận, và tế bào ung thư cổ tử cung cũng như bệnh u lymphô nguyên bào T và u nguyên bào tạo men tế bào đáy (ví dụ, xem Philchenkov et al., 2004). Hợp chất hoạt hóa caspaza, do đó làm cho tế bào dễ chết theo chương trình, sẽ có hiệu quả cao trong điều trị bệnh ung thư dưới dạng hoạt chất duy nhất hoặc tăng cường hiệu quả của các liệu pháp hóa trị liệu và liệu pháp xạ trị hiện nay.

Hoạt chất triệu chứng viêm phá hủy hệ miễn dịch ở xương

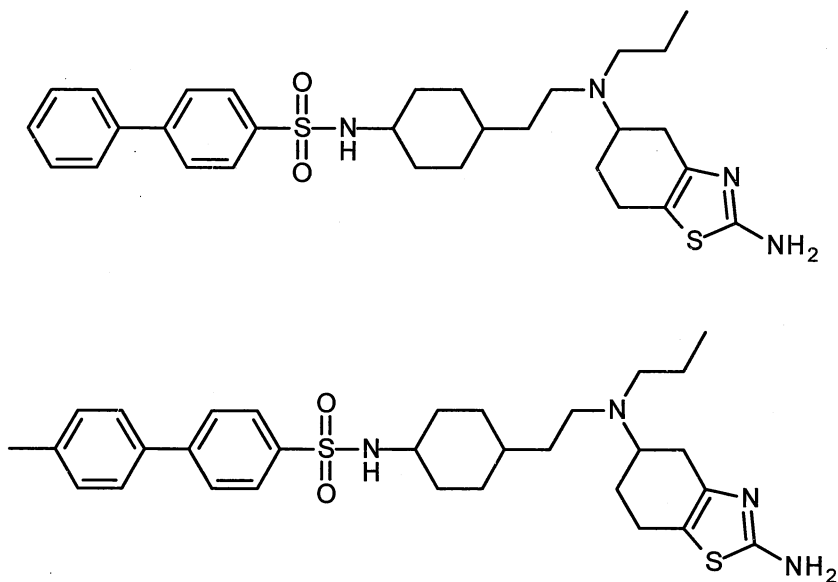
Các tác giả sáng chế đã tìm ra hợp chất mới có tác dụng phòng ngừa bệnh viêm và/hoặc chứng mất xương, do đó có thể được sử dụng trong điều trị bệnh có yếu tố viêm hoặc tự miễn, bao gồm, ví dụ bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm ruột, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh hen suyễn, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, bệnh viêm màng bồ đào, bệnh viêm vùng xương chậu, bệnh lạc nội mạc tử cung, bệnh vẩy nến và bệnh viêm khớp vẩy nến; bệnh liên quan đến chứng mất xương, bao gồm, ví dụ chứng mất xương liên quan đến bệnh viêm khớp dạng thấp, chứng loãng xương, bệnh Paget ở xương, và bệnh đa u tủy xương; cũng như bệnh ung thư liên quan đến hoạt hóa NF κ B, truyền tín hiệu bất thường NF κ B, hoặc bệnh viêm hoặc sản sinh quá mức IL-6, bao gồm bệnh ung thư máu ác tính như bệnh đa u tủy xương, bệnh bạch cầu, bệnh u lymphô nguyên bào T, và các bệnh u lymphô khác (ví dụ bệnh u lymphô không Hodgkin), và khối u rắn ác tính như bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú (ở nữ giới và/hoặc nam giới), bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư não, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tuyến giáp, và bệnh ung thư tế bào sắc tố; bệnh ung thư liên quan đến bất hoạt

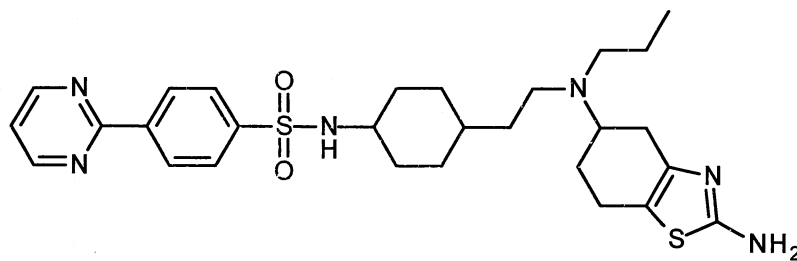
hoặc suy giảm sự chết tế bào được điều hòa bởi caspaza, như bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư cổ tử cung, và u nguyên bào tạo men tế bào đáy; tình trạng bệnh liên quan đến hoạt tính được điều hòa của IRF-5 bao gồm bệnh u hạt Wegener và bệnh xơ cứng toàn thân; bệnh xơ hóa liên quan đến sản sinh quá mức IL-6, như bệnh xơ cứng toàn thân hoặc bệnh xơ cứng bì; bệnh thoái hóa thần kinh liên quan đến sản sinh quá mức IL-6, như bệnh Alzheimer; rối loạn tâm thần cũng liên quan đến sản sinh quá mức IL-6, như bệnh trầm cảm; bệnh tạo mạch liên quan đến sản sinh quá mức IL-6 như bệnh thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác và bệnh võng mạc do đái tháo đường, bệnh tăng sinh liên quan đến IL-6 như bệnh Castleman và một số bệnh viêm mạch hiếm gặp liên quan đến sản sinh quá mức IL-6, như bệnh Behçet.

Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể, các tác giả sáng chế tin rằng tác dụng này có thể thông qua cơ chế bao gồm phong bế TNF α , và/hoặc quá trình truyền tín hiệu RANKL và/hoặc hoạt tính IRF và/hoặc ức chế sản sinh IL-6.

Hợp chất đã biết

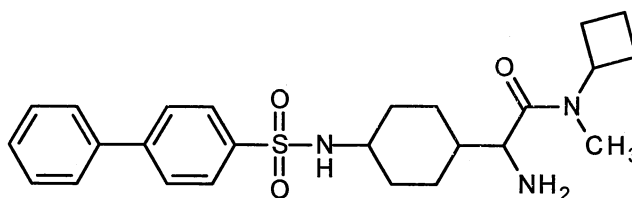
Wang et al., 2010, đề cập đến hợp chất có ái lực mạnh và hoạt tính chủ vận chọn lọc hoàn toàn trên thụ thể dopamin D³. Ví dụ về các hợp chất này được thể hiện dưới đây (ví dụ, xem trang 18-19 và 48-50 của tài liệu này):



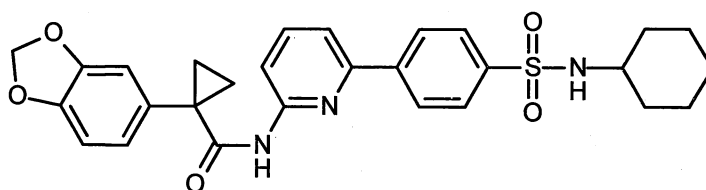


Chen et al., 2012 đề cập đến hợp chất tương tự.

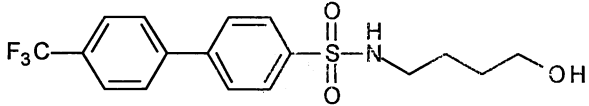
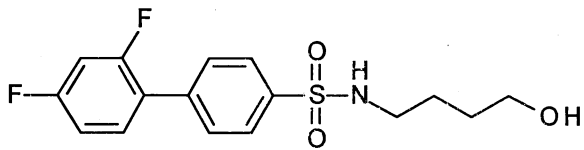
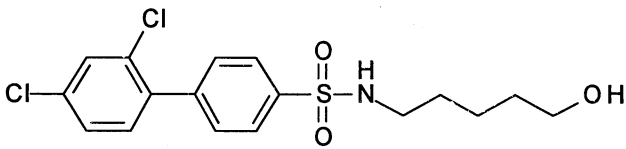
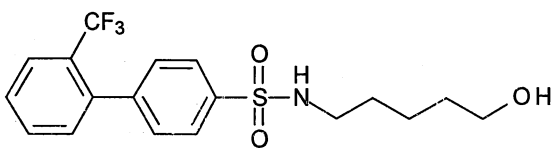
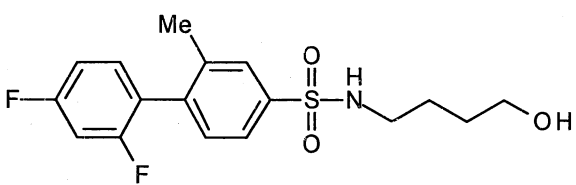
Tsutsumi et al., 2005, đề cập đến hợp chất có hoạt tính ức chế DPP-IV và hữu ích trong điều trị bệnh đái tháo đường type II và bệnh béo phì. Hợp chất sau được thể hiện trong Ví dụ 89, trang 192 của tài liệu này:



Hadida et al., 2007 đề cập đến hợp chất hữu ích để điều hòa protein vận chuyển mã hóa bởi cat-xet gắn kết ATP (ATP-binding cassette - ABC) hoặc mảnh peptit của nó, bao gồm protein điều hòa dẫn điện xuyên màng gây bệnh xơ nang (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator - CFTR). Hợp chất sau được thể hiện trong Ví dụ 208, trang 77 của tài liệu này:

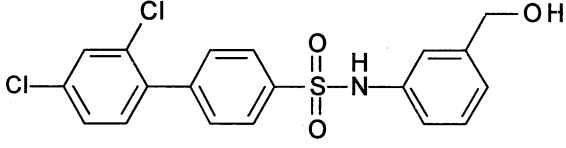
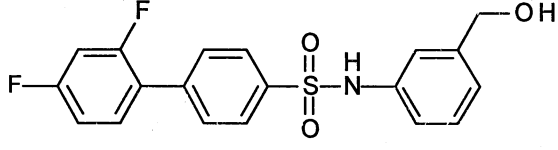


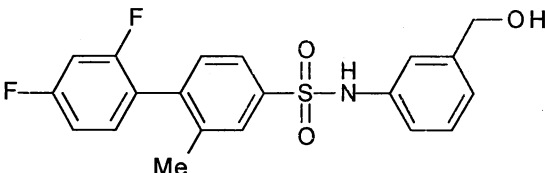
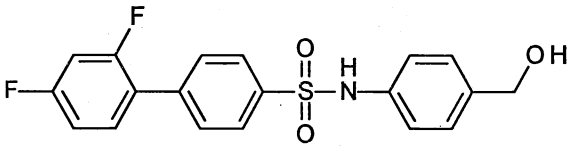
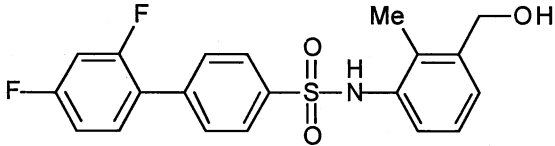
Ralston et al., 2005, đề cập đến hợp chất amit biphenyl-4-sulfonat dùng để ức chế khả năng sống sót, sự hình thành, và/hoặc hoạt tính của tế bào hủy xương; để ức chế tình trạng bệnh do tế bào hủy xương và/hoặc do tiêu xương; trong điều trị rối loạn về xương như chứng loãng xương, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh về xương do ung thư, và bệnh Paget; và trong điều trị tình trạng bệnh do viêm hoặc hoạt hóa hệ miễn dịch. Ví dụ về các hợp chất này được thể hiện dưới đây:

	(ABD-246)
	(ABD-256)
	(ABD-278)
	(ABD-284)
	(ABD-295)

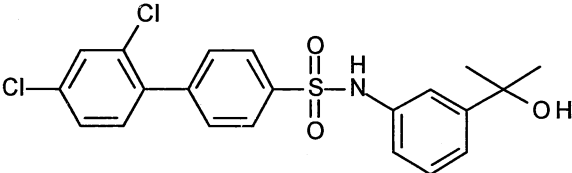
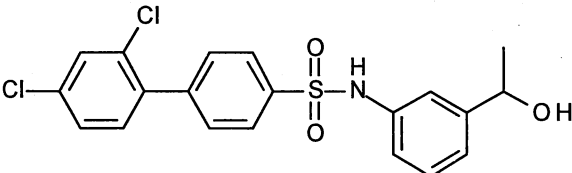
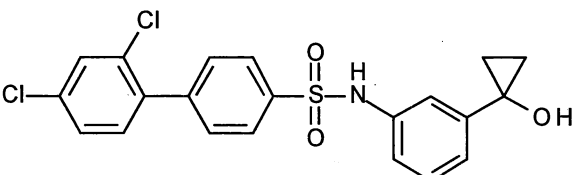
Greig et al., 2006, đề cập đến hợp chất tương tự.

Greig et al., 2008, đề cập đến hợp chất amit biphenyl-4-sulfonat để điều trị bệnh viêm và/hoặc tình trạng phá hủy khớp và/hoặc chứng mất xương; rối loạn do hệ miễn dịch hoạt động quá mức và/hoặc sai lệch và/hoặc kéo dài; bệnh viêm và tự miễn, ví dụ bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh viêm ruột, và bệnh viêm cột sống dính khớp; và rối loạn do chứng mất xương, như chứng mất xương do hoạt tính quá mức của tế bào hủy xương trong bệnh viêm khớp dạng thấp, chứng loãng xương, bệnh về xương do ung thư, và bệnh Paget. Ví dụ về các hợp chất này được thể hiện dưới đây:

	(ABD455)
	(ABD456)

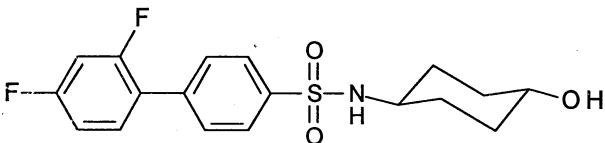
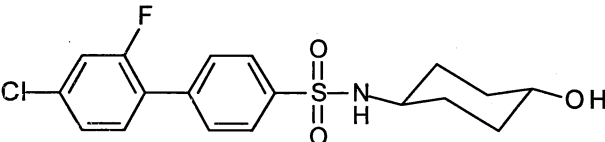
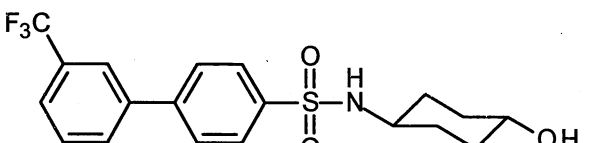
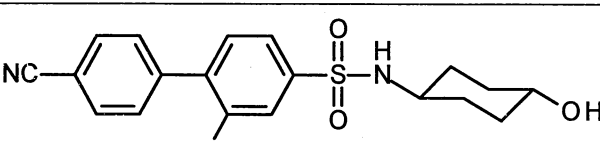
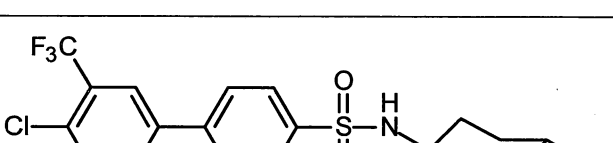
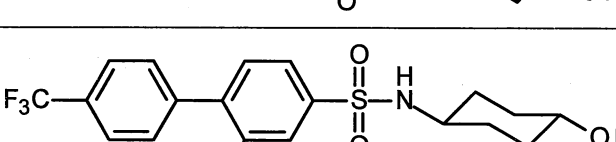
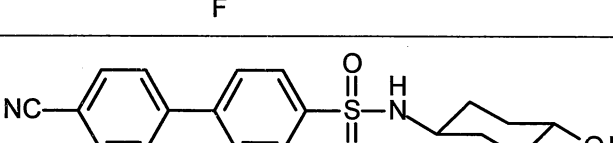
	(ABD465)
	(ABD466)
	(ABD527)

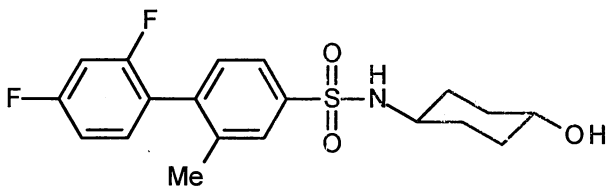
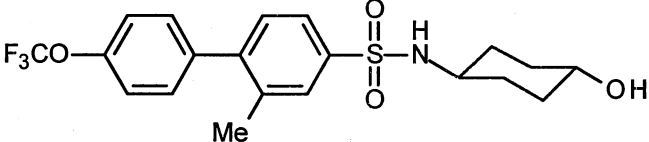
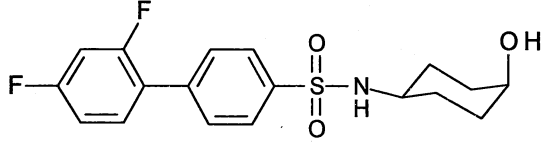
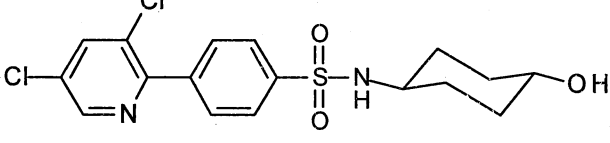
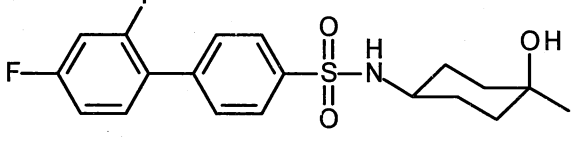
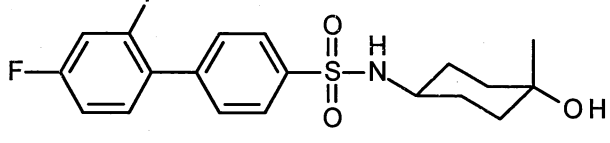
Greig et al., 2010b, đề cập đến amit biphenyl-4-sulfonat để điều trị bệnh viêm và/hoặc tình trạng phá hủy khớp và/hoặc chứng mất xương; rối loạn do hệ miễn dịch hoạt động quá mức và/hoặc sai lệch và/hoặc kéo dài; bệnh viêm và tự miễn, ví dụ bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh viêm ruột, và bệnh viêm cột sống dính khớp; disorders liên quan đến chứng mất xương, như chứng mất xương do hoạt tính quá mức của tế bào hủy xương trong bệnh viêm khớp dạng thấp, chứng loãng xương, bệnh về xương do ung thư, và bệnh Paget; và bệnh ung thư, như bệnh ung thư máu và khối u rắn ác tính. Ví dụ về các hợp chất này được thể hiện dưới đây:

	(ABD707)
	(ABD708)
	(ABD709)

Greig et al., 2013 đề cập đến hợp chất tương tự.

Greig et al., 2010a, đề cập đến amit biphenyl-4-sulfonat để điều trị bệnh viêm và/hoặc tình trạng phá hủy khớp và/hoặc chứng mất xương; rối loạn do hệ miễn dịch hoạt động quá mức và/hoặc sai lệch và/hoặc kéo dài; bệnh viêm và tự miễn, ví dụ bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh viêm ruột, và bệnh viêm cột sống dính khớp; disorders liên quan đến chứng mất xương, như chứng mất xương do hoạt tính quá mức của tế bào hủy xương trong bệnh viêm khớp dạng thấp, chứng loãng xương, bệnh về xương do ung thư, và bệnh Paget; và bệnh ung thư, như bệnh ung thư máu và khối u rắn ác tính. Ví dụ về các hợp chất này được thể hiện dưới đây:

	(ABD599)
	(ABD655)
	(ABD683)
	(ABD703)
	(ABD712)
	(ABD714)
	(ABD732)

	(ABD735)
	(ABD742)
	(ABD777)
	(ABD836)
	(ABD899)
	(ABD900)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất HMC không có một số độc tính xuất hiện ở các hợp chất đã biết, đặc biệt là các hợp chất được thể hiện trong Greig et al., 2010a và có hiệu lực được cải thiện trong các mô hình bệnh tật.

Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể, các tác giả sáng chế tin rằng việc kết hợp đặc hiệu các nhóm thế và vị trí của chúng trên cấu trúc vòng biaryl sẽ thu được các đặc tính vượt trội. Ngoài các cải thiện đáng kể trong độc tính in vivo cấp tính, việc kết hợp này giúp cho hợp chất theo sáng chế không gây độc tế bào, gây độc gen thông thường, và an toàn trên hệ tim mạch không giống như các hợp chất đã biết. Đặc biệt là, hợp chất HMC theo sáng chế không gây độc gen, có cải thiện đáng kể về khả năng gây độc tế bào, và không gây ức chế gen liên quan đến trạng thái run chân do gây mê bằng ete của người (hERG - human Ether-à-go-go-Related Gene) là gen thể hiện độ an toàn trên hệ tim mạch.

Khi được chất được sử dụng trên lâm sàng, thì được chất này phải an toàn và có hiệu lực thích hợp. Được chất này cũng phải có độ an toàn trong thời gian ngắn để dùng cho người mà không gây ra các tác dụng không mong muốn nghiêm trọng. Ngoài ra, được chất này cũng không được gây tổn thương di truyền (gây độc gen) do các chất gây độc gen có thể gây bệnh ung thư ở người. Được chất được chấp thuận để sử dụng trên lâm sàng cũng không được gây ức chế hERG - là kênh ion khi bị ức chế có thể gây ra rối loạn tim có nguy cơ tử vong được gọi là hội chứng QT kéo dài. Bên cạnh các đặc tính an toàn này, được chất này phải có hoạt lực đủ mạnh để kháng lại các đích sinh học để thu được tác dụng điều trị bệnh mong muốn; được chất này cũng phải có độ hòa tan đủ để được hấp thu từ đường tiêu hóa; và được chất này cũng phải có độ ổn định đủ để duy trì lâu dài trong hệ tuần hoàn đủ để đến được đích sinh học.

Hợp chất HMC theo sáng chế có hiệu lực được cải thiện trên các mô hình bệnh viêm khớp dạng thấp, ví dụ như so với hợp chất được thể hiện trên Greig et al., 2010a. Điều này được kiểm chứng bằng cả hiệu quả điều trị bệnh cao hơn, cũng như hiệu lực cao hơn, cả hai tác dụng này đều được thể hiện và quan trọng khi hợp chất HMC được sử dụng khi bệnh đã phát sinh. Điều này phản ánh thực tế lâm sàng để sử dụng hợp chất này. Hơn nữa, các tác dụng này được coi là không có độc tính.

Việc làm giảm các độc tính (tác dụng không mong muốn) của được chất là thách thức và có tầm quan trọng tương đương với việc tối ưu các đặc tính dược lực học (tác dụng của thuốc đến cơ thể) và các đặc tính dược động học (tác dụng của cơ thể đến thuốc). Hợp chất HMC theo sáng chế có các ưu điểm nổi trội thích hợp để sử dụng qua đường uống (khi so với các hợp chất đã biết) do không gây độc cấp tính in vivo nói chung, gây độc gen và gây độc tế bào, và an toàn trên hệ tim mạch, và làm thay đổi rất ít hoặc không làm thay đổi các đặc tính dược động học in vivo hoặc làm giảm hiệu lực kháng đích sinh học.

Hợp chất HMC theo sáng chế có các đặc tính cần thiết của hoạt chất thích hợp để sử dụng theo đường uống để điều trị bệnh, ví dụ tình trạng viêm mãn tính, chứng mất xương, và bệnh ung thư.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện 6 đồ thị mỗi đồ thị thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình dưới dạng hàm số theo thời gian (ngày sử dụng) đối với hợp chất

thử nghiệm ở liều lượng 10mg/kg/ngày theo đường uống (hình tròn màu trắng) và hợp chất đối chứng (hình tròn màu đen), trong đó Fig.1A thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-02-A (đồ thị trên cùng bên trái), Fig.1B thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-01-A (đồ thị trên cùng ở giữa), Fig.1C thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-N-02-A (đồ thị trên cùng bên phải), Fig.1D thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-N-01-A (đồ thị phía dưới bên trái), Fig.1E thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-01-B (đồ thị phía dưới ở giữa), Fig.1F thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-N-01-B (đồ thị phía dưới bên phải), như được mô tả trong thử nghiệm sinh học 6.

Fig.2 là hình vẽ thể hiện 2 đồ thị mỗi đồ thị thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình dưới dạng hàm số theo thời gian (ngày sử dụng) đối với hợp chất thử nghiệm (hình tròn màu trắng, hình vuông màu trắng), hợp chất đối chứng (hình tròn màu đen) và hợp chất đối chứng dương etanercept (hình tam giác), trong đó Fig.2A thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất ABD899 ở liều lượng 10mg/kg/ngày (đồ thị bên trái), Fig.2B thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-01-A ở liều lượng 0,3mg/kg/ngày và 3mg/kg/ngày (đồ thị bên phải), như được mô tả trong thử nghiệm sinh học 6.

Fig.3 là hình vẽ thể hiện 6 đồ thị mỗi đồ thị thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình dưới dạng hàm số theo thời gian (ngày sử dụng) đối với hợp chất thử nghiệm (hình tròn màu trắng), hợp chất đối chứng (hình tròn màu đen), và hợp chất đối chứng dương methotrexat (hình tam giác) trong đó Fig.3A thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất ABD899 ở liều lượng bằng 3mg/kg/ngày (đồ thị trên cùng bên trái), Fig.3B thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-01-A ở liều lượng bằng 3mg/kg/ngày (đồ thị trên cùng ở giữa), Fig.3C thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-N-01-A ở liều lượng bằng 3mg/kg/ngày (đồ thị trên cùng bên phải), Fig.3D thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất ABD899 ở liều lượng bằng 10mg/kg/ngày (đồ thị phía dưới bên trái), Fig.3E thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-01-A ở liều lượng bằng 10mg/kg/ngày (đồ thị phía dưới ở giữa), Fig.3F thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của

hợp chất HMC-N-01-A ở liều lượng bằng 10mg/kg/ngày (đồ thị phía dưới bên phải), như được mô tả trong thử nghiệm sinh học 11.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hợp chất N-(4-hydroxy-4-methyl-xyclohexyl)-4-phenyl-benzensulfonamit và N-(4-hydroxy-4-methyl-xyclohexyl)-4-(2-pyridyl)benzensulfonamit được thể (sau đây gọi chung là hợp chất HMC).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm (ví dụ dược phẩm) chứa hợp chất HMC, và tá dược pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm (ví dụ dược phẩm), bao gồm bước trộn hợp chất HMC với tá dược pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hợp chất HMC để dùng trong phương pháp điều trị bệnh cho người hoặc động vật, ví dụ để dùng trong phương pháp điều trị rối loạn (ví dụ bệnh) như được mô tả trong sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất HMC trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh, ví dụ điều trị rối loạn (ví dụ bệnh) như được mô tả trong sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị, ví dụ rối loạn (ví dụ bệnh) như được mô tả trong sáng chế, bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất HMC, tốt hơn nếu ở dạng dược phẩm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kit chứa (a) hợp chất HMC, tốt hơn nếu được bào chế ở dạng dược phẩm và trong đồ chứa thích hợp và/hoặc với bao bì thích hợp; và (b) tờ hướng dẫn sử dụng, ví dụ tờ hướng dẫn cách sử dụng hợp chất này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hợp chất HMC có thể được tổng hợp bằng phương pháp như được mô tả trong sáng chế, hoặc phương pháp bao gồm phương pháp tổng hợp như được mô tả trong sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hợp chất HMC được tổng hợp bằng phương pháp như được mô tả trong sáng chế, hoặc phương pháp bao gồm phương pháp tổng hợp như được mô tả trong sáng chế.

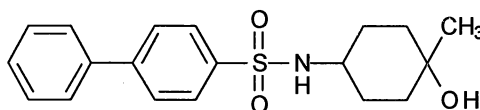
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các hợp chất trung gian mới thích hợp để sử dụng trong các phương pháp tổng hợp theo sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng các hợp chất trung gian mới này trong các phương pháp tổng hợp theo sáng chế.

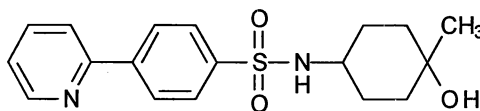
Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các dấu hiệu và phương án ưu tiên theo một khía cạnh của sáng chế cũng sẽ bao gồm các khía cạnh khác của sáng chế.

Hợp chất theo sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hợp chất N-(4-hydroxy-4-metyl-xyclohexyl)-4-phenyl-benzensulfonamit và N-(4-hydroxy-4-metyl-xyclohexyl)-4-(2-pyridyl)benzensulfonamit được thể.



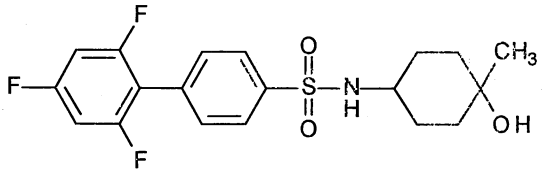
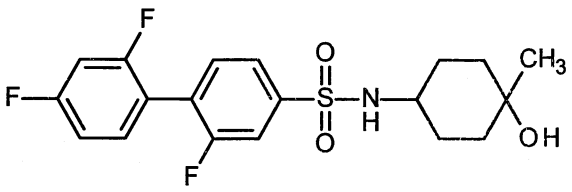
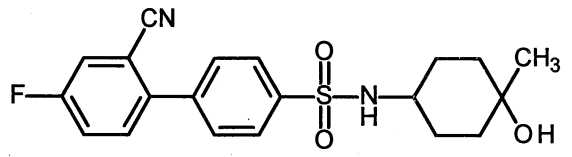
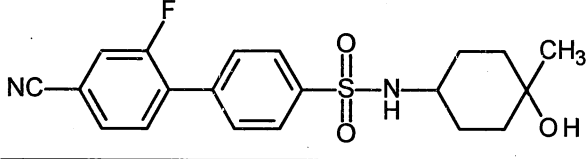
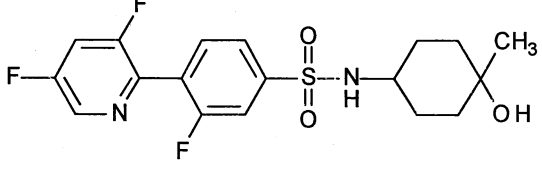
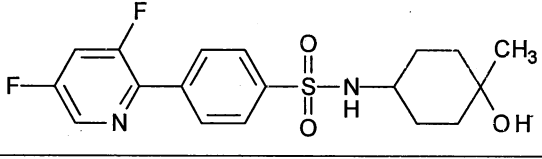
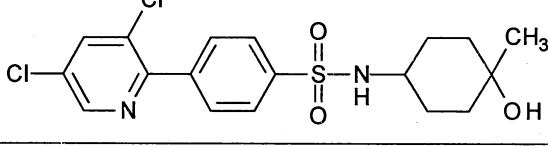
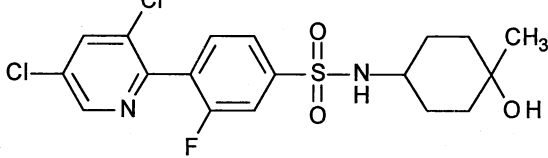
N-(4-hydroxy-4-metyl-xyclohexyl)-4-phenyl-benzensulfonamit



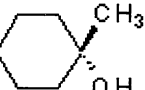
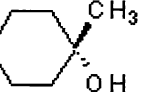
N-(4-hydroxy-4-metyl-xyclohexyl)-4-(2-pyridyl)benzensulfonamit

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó (sau đây gọi chung là “hợp chất HMC”):

	HMC-C-01
	HMC-C-02

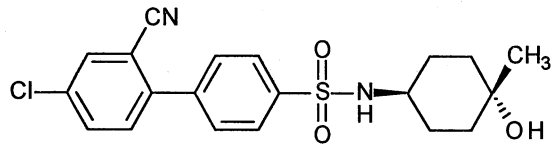
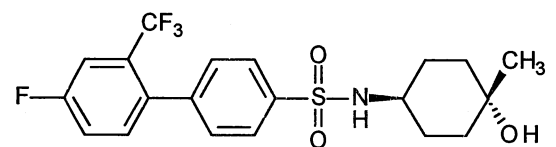
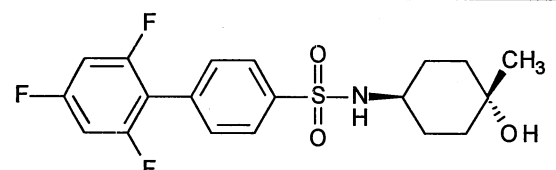
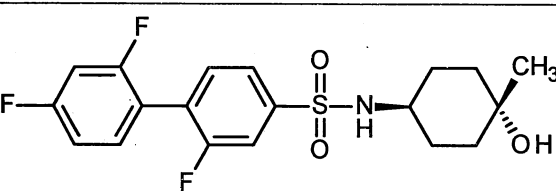
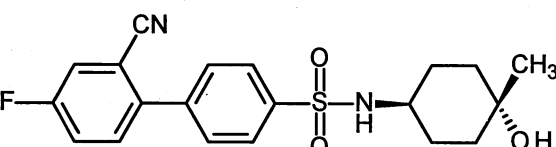
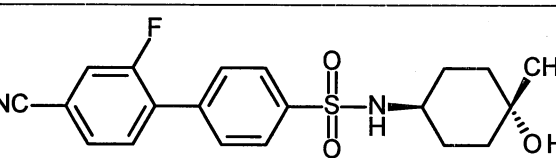
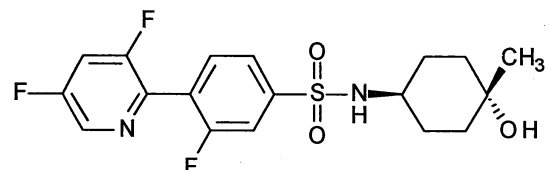
	HMC-C-03
	HMC-C-04
	HMC-C-05
	HMC-C-06
	HMC-N-01
	HMC-N-02
	HMC-N-03
	HMC-N-04

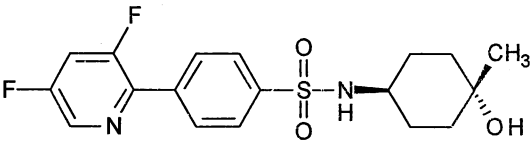
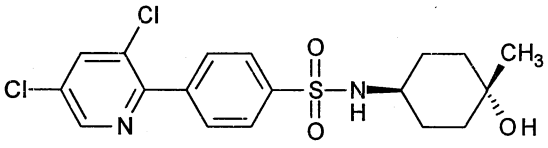
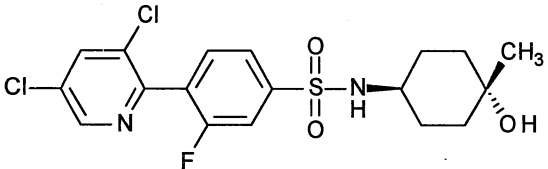
Lưu ý rằng các nhóm thế trên một mạch nhánh của vòng xyclohexyl (tức là -OH và -CH₃ ở mạch nhánh bên phải) có thể có cấu hình “trans/cis” hoặc “cis/trans” so với phần còn lại của phân tử hợp chất (tức là, trên vòng xyclohexyl các nhóm thế này được gắn vào ở vị trí para so với vị trí của phần còn lại của hợp chất).

phần còn lại của hợp chất 	phần còn lại của hợp chất 
“cis-OH”	“cis-OH”
phần còn lại của hợp chất 	phần còn lại của hợp chất 
“trans-OH”	“trans-OH”

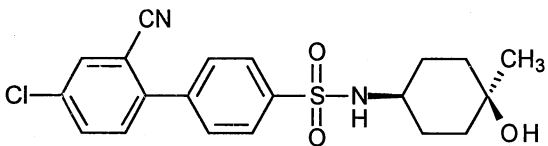
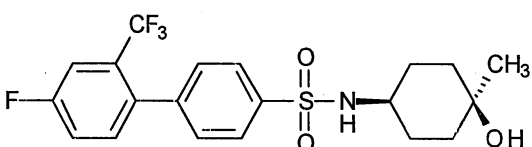
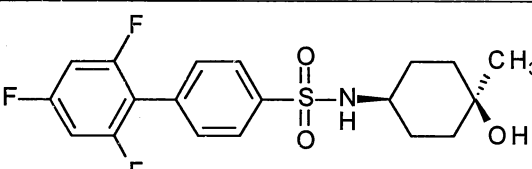
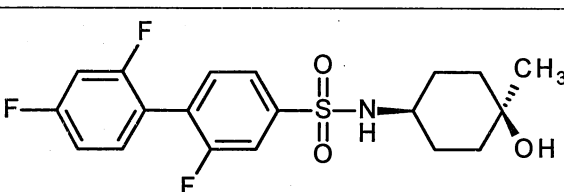
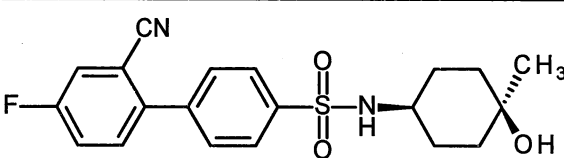
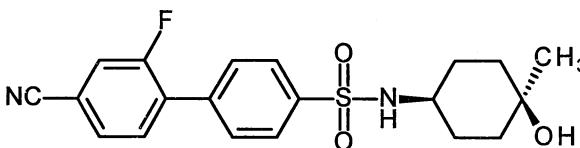
Trừ khi có quy định khác, cần hiểu rằng toàn bộ các cấu hình như vậy đều thể hiện công thức cấu tạo của hợp chất mà không thể hiện cấu hình cụ thể.

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế có cấu hình “trans-OH”, ví dụ các hợp chất sau:

	HMC-C-01-A
	HMC-C-02-A
	HMC-C-03-A
	HMC-C-04-A
	HMC-C-05-A
	HMC-C-06-A
	HMC-N-01-A

	HMC-N-02-A
	HMC-N-03-A
	HMC-N-04-A

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế có cấu hình “cis-OH”, ví dụ các hợp chất sau:

	HMC-C-01-B
	HMC-C-02-B
	HMC-C-03-B
	HMC-C-04-B
	HMC-C-05-B
	HMC-C-06-B

	HMC-N-01-B
	HMC-N-02-B
	HMC-N-03-B
	HMC-N-04-B

Cũng lưu ý rằng vòng xyclohexan có thể có “cấu hình dạng ghế”, “dạng thuyền”, hoặc “dạng xoắn ốc”, và sự biến đổi qua lại giữa các cấu hình có thể xảy ra. Trừ khi có quy định khác, được hiểu rằng toàn bộ các cấu hình như vậy (ví dụ “dạng ghế”, “dạng thuyền”, “dạng xoắn ốc”, “OH nằm ở vị trí hướng trục”, “OH nằm ở vị trí xích đạo”, v.v) đều thể hiện công thức cấu tạo của hợp chất mà không thể hiện cấu hình cụ thể.

Dạng gần như tinh khiết theo sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hợp chất HMC ở dạng gần như tinh khiết và/hoặc ở dạng gần như không chứa tạp chất.

Theo một phương án, dạng gần như tinh khiết là ít nhất 50% khối lượng, ví dụ ít nhất 60% khối lượng, ví dụ ít nhất 70% khối lượng, ví dụ ít nhất 80% khối lượng, ví dụ ít nhất 90% khối lượng, ví dụ ít nhất 95% khối lượng, ví dụ ít nhất 97% khối lượng, ví dụ ít nhất 98% khối lượng, ví dụ ít nhất 99% khối lượng.

Trừ khi có quy định cụ thể, dạng gần như tinh khiết là hợp chất ở dạng cấu hình bất kỳ. Ví dụ, theo một phương án, dạng gần như tinh khiết là hỗn hợp của các dạng cấu hình, tức là tinh khiết so với hợp chất khác. Theo một phương án, dạng gần như tinh khiết là một dạng cấu hình. Theo một phương án, dạng gần như tinh khiết là hỗn hợp của các dạng cấu hình. Theo một phương án, dạng gần như tinh khiết là hỗn hợp đẳng mol của các dạng cấu hình.

Theo một phương án, lượng tạp chất có mặt không lớn hơn 50% khối lượng, ví dụ không lớn hơn 40% khối lượng, ví dụ không lớn hơn 30% khối lượng, ví dụ không lớn hơn 20% khối lượng, ví dụ không lớn hơn 10% khối lượng, ví dụ không lớn hơn 5% khối lượng, ví dụ không lớn hơn 3% khối lượng, ví dụ không lớn hơn 2% khối lượng, ví dụ không lớn hơn 1% khối lượng.

Trừ khi có quy định cụ thể, tạp chất là hợp chất khác, tức là không phải các dạng cấu hình. Theo một phương án, tạp chất là hợp chất khác và dạng cấu hình khác.

Theo một phương án, dạng gần như tinh khiết ít nhất là 60% độ tinh khiết cấu hình (tức là 60% hợp chất, tính theo khối lượng mol, là dạng cấu hình mong muốn, và 40% là dạng cấu hình không mong muốn), ví dụ ít nhất 70% độ tinh khiết cấu hình, ví dụ ít nhất 80% độ tinh khiết cấu hình, ví dụ ít nhất 90% độ tinh khiết cấu hình, ví dụ ít nhất 95% độ tinh khiết cấu hình, ví dụ ít nhất 97% độ tinh khiết cấu hình, ví dụ ít nhất 98% độ tinh khiết cấu hình, ví dụ ít nhất 99% độ tinh khiết cấu hình.

Chất đồng phân theo sáng chế

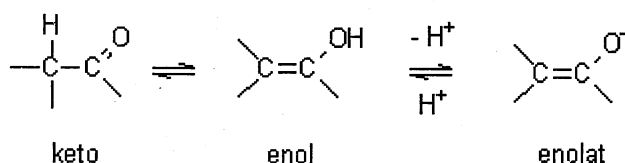
Một số hợp chất có thể tồn tại ở một hoặc nhiều chất đồng phân hình học, chất đồng phân quang học, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân epime, chất đồng phân atropic, chất đồng phân lập thể, chất đồng phân hỗn biến, chất đồng phân cấu hình, hoặc chất đồng phân anome, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, dạng cis và trans; dạng E và Z; dạng c, t, và r; dạng endo và exo; dạng R, S, và meso; dạng D và L; dạng d và l; dạng (+) và (-); dạng keto, enol, và enolat; dạng syn và dạng đối syn; dạng lồi và dạng lõm; dạng α và β ; dạng hướng trục và nằm ở vị trí xích đạo; dạng thuyền, dạng ghế, dạng xoắn ốc, dạng bao, và dạng nửa ghế; và dạng kết hợp của chúng, sau đây gọi chung là “chất đồng phân” hoặc “dạng đồng phân”.

Đối với nhóm cấu trúc cụ thể cũng bao gồm dạng đồng phân cấu trúc thuộc nhóm này (ví dụ C_{1-7} alkyl bao gồm n-propyl và iso-propyl; butyl bao gồm n-butyl, iso-butyl, sec-butyl, và tert-butyl; metoxyphenyl bao gồm ortho-metoxyphenyl, meta-metoxyphenyl, và para-metoxyphenyl).

Tuy nhiên, đối với nhóm hoặc nhóm thể đặc trưng không bao gồm các dạng cấu trúc khác (hoặc dạng đồng phân cấu hình khác) có sự khác biệt về các mối liên kết giữa các nguyên tử chứ không phải bởi các vị trí trong không gian. Ví dụ, đối với nhóm metoxy $-OCH_3$, không bao gồm dạng đồng phân của nó, nhóm hydroxymetyl $-CH_2OH$.

Tương tự, đối với ortho-clophenyl không bao gồm dạng đồng phân của nó là meta-clophenyl.

Các loại trừ nêu trên không bao gồm các dạng hổ biến, ví dụ dạng keto, enol, và enolat, như trong các cặp hổ biến sau: keto/enol (được thể hiện dưới đây, imin/enamin, amit/rượu imino, amidin/amidrin, nitroso/oxim, thioketon/enethiol, N-nitroso/hydroxyazo, và nitro/axi-nitro.



Thuật ngữ “chất đồng phân” cũng bao gồm hợp chất có một hoặc nhiều nhóm thế đồng vị. Ví dụ, H có thể ở dạng đồng vị bất kỳ, bao gồm ^1H , ^2H (D), và ^3H (T); C có thể ở dạng đồng vị bất kỳ, bao gồm ^{11}C , ^{12}C , ^{13}C , và ^{14}C ; O có thể ở dạng đồng vị bất kỳ, bao gồm ^{15}O , ^{16}O và ^{18}O ; N có thể ở dạng đồng vị bất kỳ bao gồm ^{14}N và ^{15}N ; F có thể ở dạng đồng vị bất kỳ bao gồm ^{18}F và ^{19}F và các dạng đồng vị tương tự.

Trừ khi có quy định khác, hợp chất cụ thể theo sáng chế toàn bộ các dạng đồng phân của nó, bao gồm cả hỗn hợp của chúng (ví dụ hỗn hợp raxemic). Phương pháp tổng hợp (ví dụ phương pháp tổng hợp đồng phân quang học) và phân tách (ví dụ phương pháp kết tinh phân đoạn và phương pháp sắc ký) các dạng đồng phân đã biết trong lĩnh vực này hoặc dễ dàng thu được bằng cách cải tiến phương pháp được đề cập trong sáng chế, hoặc phương pháp đã biết, theo cách thức đã biết.

Muối theo sáng chế

Được mong muốn để điều chế, tinh chế, và/hoặc xử lý muối tương ứng của hợp chất theo sáng chế, ví dụ muối được dụng. Ví dụ về muối được dụng được mô tả trong Berge et al., 1977, “Pharmaceutically Acceptance Salts,” J. Pharm. Sci., Vol. 66, pp. 1-19.

Ví dụ, khi hợp chất ở dạng anion, hoặc có nhóm chức ở dạng anion (ví dụ $-\text{COOH}$ có thể là $-\text{COO}^-$), thì muối được điều chế bằng cation thích hợp. Ví dụ về cation vô cơ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ion kim loại kiềm như Na^+ và K^+ , cation kim loại kiềm thổ như Ca^{2+} và Mg^{2+} , và các cation khác như Al^{3+} . Ví dụ về cation hữu cơ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ion amoni (tức là NH_4^+) và ion amoni

được thế (ví dụ NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Ví dụ về ion amoni được thế thích hợp là các ion thu được từ etylamin, dietylamín, đixyclohexylamin, trietylamin, butylamin, etylendiámin, etanolamin, dietanolamin, piperazin, benzylamin, phenylbenzylamin, cholin, meglumin, và trometamin, cũng như axit amin, như lysin và arginin. Ví dụ về ion amoni bậc bốn là $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Khi hợp chất ở dạng cation, hoặc có nhóm chức ở dạng cation (ví dụ $-\text{NH}_2$ có thể là $-\text{NH}_3^+$), thì muối được điều chế bằng anion thích hợp. Ví dụ về anion vô cơ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, anion thu được từ các axit vô cơ sau: hydrocloric, hydrobromic, hydroiodic, sulfuric, sulfuro, nitric, nitro, phosphoric, và photphoro. Ví dụ về anion hữu cơ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, anion thu được từ các axit hữu cơ sau: 2-axetyoxybenzoic, axetic, ascorbic, aspartic, benzoic, camphorsulfonic, xinamic, xitric, edetic, etandisulfonic, etansulfonic, fumaric, gluchep tonic, gluconic, glutamic, glycolic, hydroxymaleic, hydroxynaphtalen carboxylic, isethionic, lactic, lactobionic, lauric, maleic, malic, metansulfonic, mucic, oleic, oxalic, palmitic, pamoic, pantothenic, phenylaxetic, phenylsulfonic, propionic, pyruvic, salixylic, stearic, succinic, sulfanilic, tartaric, toluensulfonic, và valeric. Ví dụ về anion polyme hữu cơ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, anion thu được từ các axit polyme sau: axit tanic, carboxymetyl xenluloza.

Trừ khi có quy định khác, hợp chất cụ thể theo sáng chế cũng bao gồm dạng muối của nó.

Solvat và hydrat theo sáng chế

Được mong muốn để điều chế, tinh chế, và/hoặc xử lý solvat tương ứng của hợp chất theo sáng chế. Thuật ngữ “solvat” được dùng trong bản mô tả để chỉ phức hợp của chất tan (ví dụ hợp chất, muối của hợp chất) và dung môi. Khi dung môi là nước, solvat có thể là hydrat, ví dụ mono-hydrat, di-hydrat, tri-hydrat, v.v

Trừ khi có quy định khác, hợp chất cụ thể theo sáng chế dạng solvat và hydrat của nó.

Dạng được bảo vệ nhóm chức

Được mong muốn để điều chế, tinh chế, và/hoặc xử lý hợp chất này ở dạng được bảo vệ nhóm chức. Thuật ngữ “dạng được bảo vệ nhóm chức” được dùng trong bản mô tả

để chỉ hợp chất trong đó một hoặc nhiều nhóm chức được bảo vệ khỏi các phản ứng hóa học không mong muốn trong các điều kiện cụ thể (ví dụ pH, nhiệt độ, bức xạ, dung môi, và các điều kiện tương tự). Trong thực tế, các phương pháp hóa học đã biết được sử dụng để thu hồi nhóm chức không phản ứng, mà trong phản ứng khác nhóm chức này là nhóm chức phản ứng, trong các điều kiện cụ thể. Trong dạng được bảo vệ nhóm chức, một hoặc nhiều nhóm chức phản ứng là ở dạng nhóm được bảo vệ hoặc nhóm bảo vệ (cũng được gọi là nhóm được đánh dấu hoặc nhóm đánh dấu hoặc nhóm được phong bế hoặc nhóm phong bế). Bằng cách bảo vệ nhóm chức phản ứng, các phản ứng có sự tham gia của các nhóm chức phản ứng không được bảo vệ khác có thể được thực hiện, mà không ảnh hưởng đến nhóm được bảo vệ; nhóm bảo vệ có thể được loại bỏ, thường trong công đoạn tiếp theo, mà không ảnh hưởng đáng kể đến cấu trúc còn lại của phân tử hợp chất. Ví dụ xem *Protective Groups in Organic Synthesis* (T. Green and P. Wuts; 4th Edition; John Wiley and Sons, 2006).

Nhiều phương pháp “bảo vệ”, “phong bế”, hoặc “đánh dấu” được sử dụng rộng rãi và đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, hợp chất có hai nhóm chức phản ứng không tương đương, cả hai đều sẽ phản ứng trong các điều kiện cụ thể, có thể được tạo dẫn xuất để thu lại được một trong số các nhóm chức “được bảo vệ” và do đó không phản ứng trong các điều kiện cụ thể; sau đó hợp chất đã được bảo vệ này có thể được sử dụng làm chất phản ứng mà chỉ có một nhóm chức phản ứng. Sau khi phản ứng mong muốn (bao gồm nhóm chức còn lại) kết thúc, nhóm được bảo vệ có thể “được khử bảo vệ” thành nhóm chức ban đầu.

Ví dụ, nhóm amin có thể được bảo vệ dưới dạng amit (-NRCO-R) hoặc uretan (-NRCO-OR), ví dụ dưới dạng metyl amit (-NHCO-CH₃); benzyloxy amit (-NHCO-OCH₂C₆H₅, -NH-Cbz); dưới dạng t-butoxy amit (-NHCO-OC(CH₃)₃, -NH-Boc); 2-biphenyl-2-propoxy amit (-NHCO-OC(CH₃)₂C₆H₄C₆H₅, -NH-Bpoc), dưới dạng 9-florenylmetoxy amit (-NH-Fmoc), dưới dạng 6-nitroveratryloxy amit (-NH-Nvoc), dưới dạng 2-trimetylsilyletyloxy amit (-NH-Teoc), dưới dạng 2,2,2-tricloetyloxy amit (-NH-Troc), dưới dạng allyloxy amit (-NH-Alloc), dưới dạng 2-(phenylsulfonyl)etyloxy amit (-NH-Psec); hoặc trong các trường hợp thích hợp (ví dụ amin mạch vòng), dưới dạng gốc nitroxit (>N-O●).

Tiền dược chất theo sáng chế

Được mong muốn để điều chế, tinh chế, và/hoặc xử lý hợp chất theo sáng chế ở dạng tiền dược chất. Thuật ngữ “tiền dược chất” được dùng trong bản mô tả để chỉ hợp chất khi được chuyển hóa (ví dụ in vivo) sẽ tạo ra hoạt chất mong muốn. Thông thường, tiền dược chất là không có hoạt tính, hoặc có hoạt tính thấp hơn hoạt chất mong muốn, nhưng có thể tạo ra các đặc tính chuyển hóa, sử dụng hoặc điều chế có lợi.

Phương pháp tổng hợp hóa học theo sáng chế

Phương pháp tổng hợp hợp chất HMC được mô tả trong sáng chế. Các phương pháp này và/hoặc các phương pháp đã biết khác có thể được cải tiến và/hoặc cải biến theo cách thức đã biết để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tổng hợp hợp chất HMC theo sáng chế.

Chế phẩm theo sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm (ví dụ dược phẩm) chứa hợp chất HMC, và chất mang, tá dược pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế còn chứa một hoặc nhiều dược chất khác (ví dụ 1, 2, 3, 4), như được mô tả trong sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm (ví dụ dược phẩm), bao gồm bước trộn hợp chất HMC với chất mang, tá dược pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm (ví dụ dược phẩm), bao gồm bước trộn hợp chất HMC; một hoặc nhiều dược chất khác (ví dụ 1, 2, 3, 4), như được mô tả trong sáng chế với chất mang, tá dược pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

Sử dụng theo sáng chế

Hợp chất HMC theo sáng chế là hữu ích trong điều trị rối loạn (ví dụ bệnh) bao gồm, rối loạn (ví dụ bệnh) được mô tả trong sáng chế.

Sử dụng trong phương pháp điều trị

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hợp chất HMC để dùng trong phương pháp điều trị bệnh cho người hoặc động vật, ví dụ để dùng trong phương pháp điều trị rối loạn (ví dụ bệnh) như được mô tả trong sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hợp chất HMC, kết hợp với một hoặc nhiều dược chất khác (ví dụ 1, 2, 3, 4), như được mô tả trong sáng chế để dùng trong phương pháp điều trị bệnh cho người hoặc động vật, ví dụ để dùng trong phương pháp điều trị rối loạn (ví dụ bệnh) như được mô tả trong sáng chế.

Sử dụng trong sản xuất thuốc

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất HMC trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh, ví dụ điều trị rối loạn (ví dụ bệnh) như được mô tả trong sáng chế.

Theo một phương án, thuốc này chứa hợp chất HMC.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất HMC, và một hoặc nhiều dược chất khác (ví dụ 1, 2, 3, 4), như được mô tả trong sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh, ví dụ điều trị rối loạn (ví dụ bệnh) như được mô tả trong sáng chế.

Theo một phương án, thuốc này chứa hợp chất HMC và một hoặc nhiều dược chất khác (ví dụ 1, 2, 3, 4).

Phương pháp điều trị

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị, ví dụ rối loạn (ví dụ bệnh) như được mô tả trong sáng chế, bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất HMC, tốt hơn nếu ở dạng dược phẩm.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị, ví dụ rối loạn (ví dụ bệnh) như được mô tả trong sáng chế, bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất HMC, tốt hơn nếu ở dạng dược phẩm, và một hoặc nhiều dược chất khác (ví dụ 1, 2, 3, 4), như được mô tả trong sáng chế, tốt hơn nếu ở dạng dược phẩm.

Tình trạng bệnh cần điều trị

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là rối loạn viêm hoặc rối loạn tự miễn.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là rối loạn liên quan đến viêm và/hoặc hoạt hóa hệ miễn dịch.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là rối loạn do hoạt hóa quá mức và/hoặc không thích hợp và/hoặc kéo dài hệ miễn dịch.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh viêm.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là rối loạn liên quan đến viêm hoặc hoạt hóa hệ miễn dịch.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh viêm khớp dạng thấp; bệnh vẩy nến; bệnh viêm khớp vẩy nến; bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính; bệnh hen suyễn; bệnh xơ vữa động mạch; bệnh viêm ruột; hoặc bệnh viêm cột sống dính khớp.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh viêm khớp dạng thấp.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh vẩy nến.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh viêm khớp vẩy nến.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh hen suyễn.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh xơ vữa động mạch.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh viêm cột sống dính khớp.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh viêm ruột.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là đáp ứng miễn dịch gây thải loại mảnh ghép hoặc cơ quan sau khi cấy ghép.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là tình trạng viêm biểu hiện bất thường IRF-5 hoặc có hoạt tính bất thường của IRF-5.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là khối u biểu hiện quá mức TNF α , IL-1, IL-6, RANKL, và/hoặc NF κ B.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là khối u, trong đó việc ức chế TNF α , IL-1, RANKL, NF κ B, IRF như IRF-3, IRF-5 hoặc IRF-7 và/hoặc ức chế biểu hiện hoặc hoạt tính hoặc truyền tín hiệu của IL-6 tạo điều kiện thuận lợi hoặc tăng cường tác dụng của hoạt chất diệt khối u gây độc tế bào.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh ung thư máu.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh đa u tủy xương.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh bạch cầu; ví dụ bệnh bạch cầu nguyên bào cấp tính.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh u lymphô; ví dụ bệnh u lymphô không Hodgkin, bệnh u lymphô bào T (ví dụ bệnh u lymphô nguyên bào T, bệnh u lymphô bào T ngoài hạch, bệnh u lymphô bào T ở da, bệnh u lymphô tế bào lớn thoái biến, bệnh u lymphô bào T thể hạch), và bệnh u lymphô bào B (ví dụ bệnh u lymphô Hodgkin, bệnh u lymphô không Hodgkin) (ví dụ bệnh u lymphô bào B lớn lan tỏa, bệnh u lymphô thể nang, bệnh u lymphô mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc, bệnh u lymphô tế bào nhỏ, bệnh u lymphô tế bào vỏ, bệnh bạch cầu tế bào lông và bệnh u lymphô Burkitt).

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là khối u rắn ác tính, ví dụ bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú (ở nữ giới và/hoặc nam giới), bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư biểu mô tế bào thận, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư não, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tuyến giáp, u nguyên bào tạo men tế bào đáy, hoặc bệnh ung thư tế bào sắc tố.

Theo một phương án, bệnh ung thư máu (ví dụ bệnh đa u tủy xương, bệnh bạch cầu, bệnh u lymphô, v.v) và khối u rắn ác tính (ví dụ bệnh ung thư bàng quang, v.v) liên quan đến hoạt hóa NF κ B, truyền tín hiệu bất thường NF κ B, hoặc bệnh viêm.

Theo một phương án, bệnh ung thư máu (ví dụ bệnh đa u tủy xương, bệnh bạch cầu, bệnh u lymphô, v.v) và khối u rắn ác tính (ví dụ bệnh ung thư bàng quang, v.v) liên quan đến bất hoạt hoặc suy giảm hình thành caspaza hoặc truyền tín hiệu bất thường caspaza.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là rối loạn tăng sinh; ví dụ bệnh Castleman.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh hoặc rối loạn được chọn từ: bệnh có yếu tố viêm hoặc tự miễn, bao gồm bệnh hen suyễn, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh dị ứng, như atopy, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh viêm da cơ địa, sốc phản vệ, bệnh viêm phế quản-phổi dị ứng do nhiễm nấm *Aspergillus*, và bệnh viêm phổi quá mẫn (bệnh phổi ở người nuôi chim bồ câu, bệnh phổi ở người làm vườn, bệnh phổi do tiếp xúc với không khí ẩm ô nhiễm, bệnh phổi ở người làm malt); bệnh dị ứng, bao gồm bệnh viêm da dị ứng

do bọ chét ở động vật có vú như vật nuôi, ví dụ chó và mèo, bệnh dị ứng do tiếp xúc bao gồm muỗi đốt hoặc bệnh dị ứng do côn trùng khác đốt, do cây sơn độc, do cây sồi độc, do cây muối độc, hoặc bệnh dị ứng về da khác; rối loạn tự miễn, bao gồm bệnh đái tháo đường týp I và các biến chứng liên quan, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm khớp, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh viêm tuyến giáp tự miễn (bệnh Hashimoto), bệnh gan tự miễn như bệnh viêm gan và bệnh xơ gan mật nguyên phát, bệnh tăng năng tuyến giáp (bệnh Graves; rối loạn tăng năng tuyến giáp), bệnh đái tháo đường kháng insulin, bệnh suy thượng thận tự miễn (bệnh Addison), bệnh viêm buồng trứng tự miễn, bệnh viêm tinh hoàn tự miễn, bệnh thiếu máu tan máu tự miễn, hemoglobin niệu kích phát do lạnh, bệnh Behçet, bệnh giảm tiểu cầu tự miễn, bệnh giảm bạch cầu trung tính tự miễn, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh thiếu máu hồng cầu đơn thuần, bệnh đông máu tự miễn, bệnh lạc nội mạc tử cung, bệnh nhược cơ, bệnh viêm não dị ứng nguyên phát, bệnh viêm đa thần kinh tự miễn, bệnh bọng nước tự miễn và các bệnh bọng nước khác, bệnh thấp tim, hội chứng Goodpasture, hội chứng sau thủ thuật mổ tim, hội chứng Sjogren, bệnh viêm đa cơ, bệnh viêm bì cơ, và bệnh xơ cứng bì; bệnh do viêm bất thường ở cơ quan hoặc toàn thân, ví dụ hội chứng viêm ruột hoặc hội chứng ruột kích thích (Mazzucchelli et al., 1996), bệnh về da như bệnh sẩn phẳng, bệnh quá mẫn xuất hiện muộn, bệnh viêm phổi mãn tính, ví dụ bệnh viêm phế nang phổi và bệnh u hạt phổi, bệnh viêm nướu hoặc các bệnh nha chu khác, và bệnh viêm xương răng liên quan đến tổn thương gốc răng (Volejnikova et al., 1997), bệnh phổi quá mẫn như bệnh viêm phổi quá mẫn (Sugiyama et al., 1995), và bệnh viêm liên quan đến histamin được giải phóng từ bạch cầu ái kiềm (Dvorak et al., 1996), như bệnh dị ứng theo mùa, bệnh viêm liên quan đến histamin được giải phóng từ tế bào mast (Galli et al., 1989), hoặc khối u tế bào mast, các thể phản ứng quá mẫn týp 1 (sốc phản vệ, dị ứng da, phát ban, nổi u, bệnh viêm mũi dị ứng, và viêm dạ dày ruột dị ứng); bệnh viêm loét đại tràng hoặc bệnh Crohn; bệnh thận đa nang do TNF α (Li et al., 2008); hoặc hội chứng theo định kỳ liên quan đến, bao gồm hội chứng Muckle-Wells.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là rối loạn do tế bào hủy xương.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là rối loạn đặc trưng bởi hội chứng tiêu xương quá mức.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là rối loạn do chứng mất xương.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là chứng mất xương.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là chứng mất xương liên quan đến viêm.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là chứng mất xương không liên quan đến viêm.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là chứng mất xương liên quan đến hoạt hóa quá mức tế bào hủy xương.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là tình trạng phá hủy khớp.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là tình trạng phá hủy khớp liên quan đến viêm.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là tình trạng phá hủy khớp liên quan đến hoạt hóa quá mức tế bào hủy xương.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là chứng mất xương liên quan đến hoạt hóa quá mức tế bào hủy xương trong bệnh viêm khớp dạng thấp, chứng loãng xương, bệnh về xương do ung thư, hoặc bệnh Paget.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là chứng mất xương liên quan đến bệnh viêm khớp dạng thấp, chứng loãng xương, bệnh về xương do ung thư, hoặc bệnh Paget ở xương.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh viêm khớp dạng thấp, chứng loãng xương, bệnh về xương do ung thư, hoặc bệnh Paget ở xương.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh u xương, bao gồm cả khối u nguyên phát và khối u di căn, bao gồm bệnh ung thư mô liên kết xương và bệnh u xương (ví dụ, xem Zheng et al., 1998) và bệnh về xương do ung thư (ví dụ bệnh tăng canxi máu ác tính, di căn xương, di căn hủy xương, bệnh đa u tủy xương, bệnh ung thư biểu mô vú).

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh tăng canxi máu gây ra bởi các tình trạng liên quan đến tăng tiêu xương, bao gồm nhiễm độc vitamin D, bệnh cường giáp nguyên phát hoặc cường giáp nặng, trạng thái bất động, và bệnh u hạt lympho lành tính..

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là tình trạng bị rơi lỏng của bộ phận cấy ghép giả vô trùng (ví dụ khớp nhân tạo, ví dụ đầu gối, hông, v.v, có thể bị rơi lỏng do hoạt tính của tế bào hủy xương gây ra bởi viêm khu trú) (ví dụ, xem Childs et al., 2001).

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh đặc xương, bệnh viêm xương khớp, hoặc tình trạng tạo xương sai vị trí.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là rối loạn do xơ hóa, như bệnh xơ cứng toàn thân hoặc bệnh xơ cứng bì.

Theo một phương án, bệnh cần điều trị là bệnh viêm mạch hiếm gặp, như bệnh Behçet.

Điều trị

Thuật ngữ “điều trị” được dùng trong bản mô tả để chỉ phương pháp điều trị và liệu pháp điều trị bệnh cho cả người và động vật (ví dụ trong lĩnh vực thú y), trong đó một số tác dụng điều trị mong muốn đạt được, ví dụ ức chế tiến triển bệnh, và bao gồm giảm tốc độ tiến triển, ngừng tiến triển bệnh, giảm triệu chứng bệnh, cải thiện tình trạng bệnh, và chữa bệnh. Thuật ngữ “điều trị” cũng được dùng trong bản mô tả để chỉ biện pháp phòng ngừa (tức là điều trị dự phòng). Ví dụ, thuật ngữ “điều trị” cũng được dùng trong bản mô tả để chỉ việc sử dụng cho đối tượng bị bệnh chưa bị bệnh, nhưng có nguy cơ bị bệnh này.

Ví dụ, điều trị bệnh viêm bao gồm phòng ngừa bệnh viêm, giảm tỷ lệ bị viêm, giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh viêm, giảm các triệu chứng viêm, v.v

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu điều trị bệnh” được dùng trong bản mô tả để chỉ lượng hợp chất, hoặc nguyên liệu, chế phẩm hoặc dạng bào chế chứa hợp chất, mà hữu hiệu để tạo ra một số tác dụng điều trị mong muốn, tương xứng với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ rủi ro thích hợp, khi được sử dụng theo phác đồ điều trị mong muốn.

Liệu pháp kết hợp

Thuật ngữ “điều trị” bao gồm kết hợp các phương pháp điều trị và liệu pháp, trong đó hai hoặc nhiều phương pháp điều trị hoặc liệu pháp được kết hợp, ví dụ luân phiên hoặc đồng thời. Ví dụ, hợp chất theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong các liệu pháp kết hợp, ví dụ kết hợp với các hoạt chất khác, ví dụ hoạt chất chống viêm, v.v Ví dụ về các phương pháp điều trị và liệu pháp bao gồm liệu pháp hóa trị liệu (sử dụng hoạt chất, bao gồm, ví dụ dược chất, kháng thể (ví dụ trong liệu pháp miễn dịch), tiền dược chất (ví dụ trong liệu pháp quang động học, GDEPT, ADEPT, v.v); liệu pháp phẫu thuật;

liệu pháp chiếu xạ; liệu pháp quang động học; liệu pháp gen; và chế độ dinh dưỡng có kiểm soát.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hợp chất như được mô tả trong sáng chế, kết hợp với một hoặc nhiều dược chất khác.

Liệu pháp kết hợp cụ thể sẽ do bác sĩ điều trị quyết định dựa trên kiến thức chung và chế độ liều đã biết trong lĩnh vực này.

Hoạt chất (tức là hợp chất theo sáng chế, cộng với một hoặc nhiều hoạt chất khác) có thể được sử dụng đồng thời hoặc luân phiên, và có thể được sử dụng riêng theo các chế độ liều khác nhau và thông qua các đường đưa thuốc khác nhau. Ví dụ, khi được sử dụng luân phiên, hoạt chất có thể được sử dụng trong thời gian ngắn (ví dụ trong thời gian 5 đến 10 phút) hoặc trong thời gian lâu hơn (ví dụ 1, 2, 3, 4 hoặc nhiều giờ hoặc thậm chí trong thời gian lâu hơn khi cần), chế độ liều chính xác tương xứng với các đặc tính của hoạt chất.

Hoạt chất (tức là hợp chất theo sáng chế, cộng với một hoặc nhiều hoạt chất khác) có thể được bào chế cùng nhau trong dạng bào chế duy nhất, hoặc theo cách khác, các hoạt chất riêng biệt có thể được bào chế riêng và kết hợp cùng nhau ở dạng kit, tùy ý chứa tờ hướng dẫn sử dụng.

Sử dụng khác

Hợp chất HMC theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong thử nghiệm in vitro, ví dụ để xác định xem vật chủ thử nghiệm có được điều trị hiệu quả bằng này hay không.

Hợp chất HMC theo sáng chế có thể cũng được sử dụng làm chất chuẩn, ví dụ trong thử nghiệm, để xác định hợp chất khác, hoạt chất chống viêm khác, v.v

Kit

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kit chứa (a) hợp chất HMC như được mô tả trong sáng chế, hoặc chế phẩm chứa hợp chất HMC như được mô tả trong sáng chế, ví dụ tốt hơn nếu được đựng trong đồ chứa thích hợp và/hoặc với bao bì thích hợp; và (b) tờ hướng dẫn sử dụng, ví dụ tờ hướng dẫn cách sử dụng hợp chất này hoặc chế phẩm.

Theo một phương án, kit này còn chứa một hoặc nhiều dược chất khác (ví dụ 1, 2, 3, 4), như được mô tả trong sáng chế.

Tờ hướng dẫn sử dụng cũng bao gồm các chỉ định điều trị, trong đó hoạt chất là thích hợp để điều trị.

Đường đưa thuốc

Hợp chất HMC hoặc dược phẩm chứa hợp chất HMC theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng theo đường đưa thuốc thông thường, bao gồm cả đường đưa thuốc toàn thân/ngoại vi hoặc khu trú (tức là ở vị trí tác dụng mong muốn).

Đường đưa thuốc bao gồm đường uống (ví dụ theo đường tiêu hóa); qua niêm mạc; đặt dưới lưỡi; qua da (bao gồm, ví dụ băng dán, cao dán, v.v); qua niêm mạc (bao gồm, ví dụ băng dán, cao dán, v.v); qua mũi (ví dụ thuốc xịt mũi, thuốc nhỏ mũi hoặc từ bình xịt hoặc thiết bị phân phối bột khô; ở mắt (ví dụ thuốc nhỏ mắt); đường hô hấp (ví dụ bằng cách hít hoặc bơm sử dụng, ví dụ thuốc khí dung, ví dụ qua miệng hoặc mũi); đường trực tràng (ví dụ thuốc đạn hoặc thuốc thụt); đường âm đạo (ví dụ thuốc đặt phụ khoa); đường tiêm truyền, ví dụ theo đường tiêm, bao gồm tiêm dưới da, tiêm trong da, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch, tiêm vào động mạch, trong vào tim, tiêm vào nội tủy mạc, tiêm vào cột sống, tiêm vào ổ khớp, tiêm dưới ổ khớp, tiêm vào hốc mắt, tiêm màng bụng, tiêm vào khí quản, tiêm dưới biểu bì, tiêm vào khớp, tiêm vào dưới màng nhện, và tiêm vào xương ức; bằng cách cấy kem nền hoặc hồ nước, ví dụ bằng cách tiêm dưới da hoặc tiêm bắp.

Theo một phương án ưu tiên, đường đưa thuốc là đường uống (ví dụ theo đường tiêu hóa).

Theo một phương án ưu tiên, đường đưa thuốc là đường tiêm truyền (ví dụ theo đường tiêm).

Đối tượng/đối tượng bị bệnh

Đối tượng/đối tượng bị bệnh có thể là động vật có dây sống, vật có xương sống, động vật có vú, động vật có vú có nhau thai, thú có túi (ví dụ chuột túi, gấu túi), động vật gặm nhấm (ví dụ chuột lang, chuột đồng, chuột cống, chuột nhắt), động vật thuộc bộ chuột (ví dụ chuột nhắt), động vật gặm nhấm (ví dụ thỏ), động vật thuộc bộ chim (ví dụ chim), động vật thuộc bộ chó (ví dụ chó), động vật thuộc bộ mèo (ví dụ mèo), động vật thuộc bộ ngựa (ví dụ ngựa), động vật thuộc bộ lợn (ví dụ heo), động vật thuộc bộ cừu (ví dụ cừu), động vật thuộc bộ bò (ví dụ bò cái), động vật linh trưởng, khỉ (ví dụ khỉ hoặc

tinh tinh), động vật thuộc bộ khỉ (ví dụ khỉ đuôi sóc, khỉ đầu chó), động vật thuộc bộ tinh tinh (ví dụ khỉ đột, tinh tinh, đười ươi, vượn), hoặc người. Hơn nữa, đối tượng/đối tượng bị bệnh có thể ở dạng đang phát triển, ví dụ bào thai.

Theo một phương án ưu tiên, đối tượng/đối tượng bị bệnh là người.

Công thức bào chế

Mặc dù hợp chất HMC có thể được sử dụng riêng, nhưng tốt hơn nếu sử dụng hợp chất này dưới dạng dược phẩm (ví dụ chế phẩm, dược phẩm, thuốc) chứa ít nhất một hợp chất HMC theo sáng chế, cùng với một hoặc nhiều thành phần dược dụng khác đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm chất mang dược dụng, tá dược pha loãng, tá dược, tá dược hỗ trợ, tá dược đệm, tá dược đệm, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, tá dược trơn, chất ổn định, chất hòa tan, chất hoạt động bề mặt (ví dụ chất làm ẩm), chất che dấu mùi vị, chất màu, chất thơm, và chất làm ngọt. Dược phẩm này có thể còn chứa hoạt chất khác, ví dụ hoạt chất phòng ngừa hoặc điều trị khác.

Do đó, sáng chế cũng đề xuất dược phẩm như nêu trên, và phương pháp bào chế dược phẩm này bao gồm bước trộn ít nhất một hợp chất HMC theo sáng chế, cùng với một hoặc nhiều thành phần dược dụng khác đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ chất mang, tá dược pha loãng, tá dược, v.v Khi được bào chế ở dạng đơn vị rời (ví dụ viên nén, v.v), mỗi dạng đơn vị chứa lượng xác định trước (liều lượng) của hợp chất này.

Thuật ngữ “dược dụng” được dùng trong bản mô tả để chỉ hợp chất, thành phần, nguyên liệu, chế phẩm, dạng bào chế, v.v, được sử dụng trong lĩnh vực y tế, thích hợp để sử dụng tiếp xúc với mô của đối tượng cần điều trị (ví dụ người) không gây độc tính quá mức, kích ứng, dị ứng, hoặc các vấn đề hoặc biến chứng khác, tương xứng với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ rủi ro thích hợp. Mỗi chất mang, tá dược pha loãng, tá dược, v.v cũng phải là “chất dược dụng” dưới góc độ tương thích với các thành phần còn lại của dược phẩm.

Ví dụ về chất mang, tá dược pha loãng, tá dược thích hợp, v.v được mô tả trong các tài liệu dược học chuẩn, ví dụ Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; và Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th edition, 2005.

Dược phẩm có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm bước kết hợp hợp chất này với chất mang mà chứa

một hoặc nhiều thành phần bổ sung. Nhìn chung, dược phẩm được bào chế bằng cách làm đồng nhất, sau đó kết hợp hợp chất này với chất mang (ví dụ chất mang dạng lỏng, chất mang dạng hạt rắn mịn, v.v), sau đó tạo hình dược phẩm, khi cần.

Dược phẩm có thể được bào chế để tạo ra tác dụng giải phóng nhanh hoặc giải phóng từ từ, giải phóng tức thì, giải phóng chậm, giải phóng theo chương trình, hoặc giải phóng kéo dài; hoặc kết hợp các cách thức giải phóng này.

Dược phẩm có thể được bào chế thích hợp ở dạng dịch lỏng, dung dịch (ví dụ chứa nước, không chứa nước), hỗn dịch (ví dụ chứa nước, không chứa nước), nhũ tương (ví dụ dầu trong nước, nước trong dầu), cồn thuốc, xirô, thuốc tê, nước súc miệng, thuốc nhỏ, viên nén (bao gồm, ví dụ viên nén được bao), cốm thuốc, bột thuốc, viên ngậm, kẹo ngậm, viên nang (bao gồm, ví dụ viên nang cứng gelatin và viên nang mềm gelatin), viên nhộng, viên tròn, ống thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền, thuốc đạn, dụng cụ tránh thai, rượu thuốc, gel thuốc, bột nhào, thuốc mỡ, kem thuốc, thuốc sức, thuốc dầu, thuốc bột, thuốc xịt, thuốc phun mù, hoặc thuốc khí dung.

Dược phẩm có thể được bào chế thích hợp dưới dạng băng dán, cao dán, băng y tế, đồ băng bó, hoặc dạng bào chế tương tự mà được thấm với một hoặc nhiều hợp chất and tùy ý một hoặc nhiều thành phần dược dụng khác, bao gồm, ví dụ chất tăng cường khả năng hấp thu, tính thấm và khả năng thâm nhập. Dược phẩm cũng có thể được bào chế thích hợp ở dạng kem nền hoặc hồ nước.

Hợp chất này có thể được hòa tan trong, tạo hỗn dịch trong, hoặc trộn với một hoặc nhiều thành phần dược dụng khác. Hợp chất này có thể được bào chế ở dạng liposom hoặc các vi hạt khác được thiết kế để hướng đích hợp chất này, ví dụ với các thành phần của máu hoặc một hoặc nhiều cơ quan.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng theo đường uống (ví dụ theo đường tiêu hóa) bao gồm dịch lỏng, dung dịch (ví dụ chứa nước, không chứa nước), hỗn dịch (ví dụ chứa nước, không chứa nước), nhũ tương (ví dụ dầu trong nước, nước trong dầu), cồn thuốc, xirô, thuốc tê, viên nén, cốm thuốc, bột thuốc, viên nang, viên nhộng, viên tròn, ống thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường khoang miệng bao gồm nước súc miệng, viên ngậm, kẹo ngậm, cũng như băng dán, cao dán, kem nền, và hồ nước. Viên ngậm thường chứa hợp chất này trong chất thơm, thông thường là sucroza và acacia hoặc

tragacanth. Kẹo ngậm thường chứa hợp chất này trong cốt trơ, như gelatin và glycerin, hoặc sucroza và acacia. Nước súc miệng thường chứa hợp chất này trong chất mang dạng lỏng thích hợp.

Dược phẩm thích hợp để ngậm dưới lưỡi bao gồm viên nén, viên ngậm, kẹo ngậm, viên nang, và viên tròn.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường niêm mạc tiêu hóa bao gồm dịch lỏng, dung dịch (ví dụ chứa nước, không chứa nước), hỗn dịch (ví dụ chứa nước, không chứa nước), nhũ tương (ví dụ dầu trong nước, nước trong dầu), nước súc miệng, viên ngậm, kẹo ngậm, cũng như băng dán, cao dán, kem nền, và hồ nước.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường niêm mạc không tiêu hóa bao gồm dịch lỏng, dung dịch (ví dụ chứa nước, không chứa nước), hỗn dịch (ví dụ chứa nước, không chứa nước), nhũ tương (ví dụ dầu trong nước, nước trong dầu), thuốc đạn, dụng cụ tránh thai, gel thuốc, bột nhào, thuốc mỡ, kem thuốc, thuốc súc, thuốc dầu, cũng như băng dán, cao dán, kem nền, và hồ nước.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua da bao gồm gel thuốc, bột nhào, thuốc mỡ, kem thuốc, thuốc súc, và thuốc dầu, cũng như băng dán, cao dán, băng y tế, đồ băng bó, kem nền, và hồ nước.

Viên nén có thể được bào chế bằng phương pháp thông thường, ví dụ dập hoặc đúc, tùy ý với một hoặc nhiều tá dược. Viên nén dập có thể có thể được bào chế bằng cách dập hợp chất trong máy thích hợp ở dạng chảy tự do như bột thuốc hoặc cốm thuốc, tùy ý được trộn với một hoặc nhiều tá dược dính (ví dụ povidon, gelatin, acacia, sorbitol, tragacanth, hydroxypropylmetyl xenluloza); tá dược độn hoặc tá dược pha loãng (ví dụ lactoza, xenluloza vi tinh thể, canxi hydro phosphat); tá dược trơn (ví dụ magie stearat, talc, silica); tá dược rã (ví dụ natri tinh bột glycolat, povidon liên kết chéo, natri carboxymetyl xenluloza liên kết chéo); chất hoạt động bề mặt hoặc chất phân tán hoặc chất làm ẩm (ví dụ natri lauryl sulfat); chất bảo quản (ví dụ metyl p-hydroxybenzoat, propyl p-hydroxybenzoat, axit sorbic); chất thơm, chất tăng cường hương thơm, và chất làm ngọt. Viên nén đúc có thể được bào chế bằng cách đúc hỗn hợp chứa bột hợp chất được làm ẩm bằng tá dược pha loãng trơ dạng lỏng trong máy đúc viên thích hợp. Viên nén có thể tùy ý được bao hoặc tạo rãnh và có thể bào chế để giải phóng từ từ hoặc có kiểm soát hợp chất theo sáng chế bằng cách sử dụng, ví dụ hydroxypropylmetyl

xenluloza theo các tỷ lệ phần trăm khác nhau để thu được đặc tính giải phóng mong muốn. Viên nén có thể tùy ý được bào bằng màng bao, ví dụ để tác động đến quá trình giải phóng được chất, ví dụ bao tan trong ruột, để giải phóng được chất ở hệ ruột chứ không phải ở dạ dày.

Thuốc mỡ thường được bào chế từ hợp chất này và chất nền dạng mỡ đồng tan với nước hoặc chất nền parafin.

Kem thuốc thường được bào chế từ hợp chất này và kem nền dạng nhũ tương dầu trong nước. Khi cần, pha nước của kem nền có thể chứa, ví dụ ít nhất khoảng 30% khối lượng/khối lượng rượu đa chức, tức là rượu có hai hoặc nhiều nhóm hydroxy như propylen glycol, butan-1,3-diol, manitol, sorbitol, glyxerol và polyetylen glycol và hỗn hợp của chúng. Thông thường, kem thuốc có thể chứa hợp chất tăng cường khả năng hấp thu hoặc tính thấm của hợp chất này qua da hoặc các vùng da bị tổn thương khác. Ví dụ về các hợp chất tăng cường tính thấm qua da bao gồm dimetylsulfoxit và dẫn xuất của nó.

Nhũ tương thường được bào chế từ hợp chất này và pha dầu, có thể tùy ý chỉ chứa chất nhũ hóa (cũng được gọi là chất tạo nhũ tương), hoặc có thể chứa hỗn hợp của ít nhất một chất nhũ hóa với chất béo hoặc dầu hoặc với cả chất béo lẫn dầu. Tốt hơn nếu, chất nhũ hóa thân nước được kết hợp với chất nhũ hóa thân dầu đóng vai trò là chất ổn định. Tốt hơn nữa nếu, nhũ tương chứa cả dầu lẫn chất béo. Chất nhũ hóa chứa hoặc không chứa chất ổn định tạo ra sáp nhũ hóa, và sáp nhũ hóa cùng với dầu và/hoặc chất béo tạo ra mỡ nền nhũ hóa tạo ra pha phân tán dầu của kem thuốc.

Ví dụ về chất nhũ hóa và chất ổn định nhũ tương bao gồm Tween 60, Span 80, rượu xetostearic, rượu myristic, glyxeryl monostearat và natri lauryl sulfat. Dầu hoặc chất béo thích hợp để bào chế nhũ tương được lựa chọn dựa trên các đặc tính thẩm mỹ mong muốn cần đạt được, do độ hòa tan của hợp chất này trong hầu hết các dầu có thể được sử dụng trong nhũ tương thuốc có thể rất thấp. Do đó, tốt hơn nếu, kem thuốc là chế phẩm có thể rửa được, không gây nhờn và không bám dính có độ đồng nhất cao để tránh chảy ra khỏi ống đựng hoặc các đồ chứa khác. Các este alkyl monobazơ hoặc dibazơ, mạch thẳng hoặc mạch nhánh như di-isoadipat, isoxetyl stearat, propylen glycol dieste của axit béo có nguồn gốc từ dừa, isopropyl myristat, dexyl oleat, isopropyl palmitat, butyl stearat, 2-ethylhexyl palmitat hoặc hỗn hợp của các este mạch nhánh (Crodamol CAP) có thể được sử dụng, trong đó butyl stearat, 2-ethylhexyl palmitat và Crodamol CAP

được ưu tiên sử dụng. Các chất này có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp phụ thuộc vào đặc tính thẩm mỹ mong muốn. Theo cách khác, các lipit có nhiệt độ nóng chảy cao như parafin mềm trắng và/hoặc parafin lỏng hoặc các dầu khoáng khác có thể được sử dụng.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường mũi, trong đó chất mang là chất mang dạng lỏng, bao gồm, ví dụ thuốc xịt mũi, thuốc nhỏ mũi, hoặc sử dụng dưới dạng thuốc khí dung được đựng trong bình xịt, bao gồm dung dịch nước hoặc dung dịch dầu của hợp chất này.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường mũi, trong đó chất mang là chất mang dạng rắn, bao gồm, ví dụ các chất mang được bào chế dưới dạng bột thô có kích cỡ hạt, ví dụ nằm trong khoảng từ 20 μ m đến 500 μ m được sử dụng bằng cách hít, tức là bằng cách hít nhanh qua lỗ mũi từ đồ chứa đựng bột thuốc được đặt ở gần mũi.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường hô hấp (ví dụ bằng cách hít hoặc bơm) bao gồm thuốc khí dung đựng trong bình có áp lực, sử dụng chất đẩy thích hợp, như đicloclometan, tricloflometan, điclo-tetrafloetan, carbon dioxit, hoặc các khí thích hợp khác.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng ở mắt bao gồm thuốc nhỏ mắt, trong đó hợp chất này được hòa tan hoặc tạo hỗn dịch trong chất mang thích hợp, đặc biệt là dung môi chứa nước cho hợp chất này.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường trực tràng có thể được bào chế dưới dạng thuốc đạn chứa chất nền thích hợp chứa, ví dụ dầu tự nhiên hoặc dầu đặc, sáp, chất béo, rượu đa chức dạng lỏng hoặc rượu đa chức dạng bán lỏng, ví dụ bơ cacao hoặc salixylat; hoặc dưới dạng dung dịch hoặc hỗn dịch để điều trị bằng cách thụt rửa.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường âm đạo có thể được bào chế dưới dạng dụng cụ tránh thai, băng vệ sinh, kem thuốc, gel thuốc, bột nhào, thuốc bột hoặc thuốc xịt chứa hợp chất này, và chất mang thích hợp đã biết trong lĩnh vực này.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng theo đường tiêm truyền (ví dụ theo đường tiêm), bao gồm dịch lỏng vô trùng, không chứa chất gây sốt, đẳng trương, chứa nước hoặc không chứa nước (ví dụ dung dịch, hỗn dịch), trong đó hợp chất này được hòa tan, tạo hỗn dịch, hoặc bào chế theo cách khác (ví dụ trong liposom hoặc các vi hạt khác). Dịch

tiêm có thể còn chứa thành phần dược dụng khác, như chất chống oxy hóa, tá dược đệm, chất bảo quản, chất ổn định, chất diệt khuẩn, chất gây thẩm ổn định, chất làm đặc, và các chất hòa tan để làm đẳng trương dược phẩm với máu (hoặc các chất dịch khác của cơ thể) của đối tượng cần sử dụng. Ví dụ về tá dược bao gồm, ví dụ nước, rượu, rượu đa chức, glyxerol, dầu thực vật, và tá dược tương tự. Ví dụ về chất mang đẳng trương thích hợp để sử dụng trong dược phẩm tiêm truyền bao gồm dung dịch natri clorua pha tiêm, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch pha tiêm Lactat Ringer. Thông thường, nồng độ hợp chất này trong dịch tiêm nằm trong khoảng từ 1ng/mL đến 10 μ g/mL, ví dụ nằm trong khoảng từ 10ng/mL đến 1 μ g/mL. Dược phẩm có thể đựng trong đồ chứa kín đơn liều hoặc đa liều, ví dụ ống thuốc tiêm và lọ thuốc, và có thể được bảo quản trong điều kiện đông khô (lạnh đông) chỉ cần bổ sung chất mang dạng lỏng vô trùng, ví dụ nước pha tiêm, ngay trước khi sử dụng. Dung dịch tiêm và hỗn dịch tiêm để pha chế tại chỗ có thể được bào chế từ bột thuốc, cốm thuốc, và viên nén vô trùng.

Liều lượng

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng liều lượng thích hợp của hợp chất HMC, và chế phẩm chứa hợp chất HMC, có thể thay đổi theo từng bệnh nhân. Việc xác định liều lượng tối ưu là để làm cân bằng lợi ích điều trị liệu và nguy cơ rủi ro hoặc tác dụng không mong muốn nghiêm trọng bất kỳ. Liều lượng được chọn sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm hoạt tính của hợp chất HMC cụ thể, đường đưa thuốc, thời gian sử dụng, tốc độ thải trừ hợp chất HMC, thời gian điều trị, dược chất, hợp chất, và/hoặc hoạt chất khác được sử dụng kết hợp, mức độ nghiêm trọng của bệnh, và loài, giới tính, độ tuổi, cân nặng, tình trạng bệnh, tình trạng sức khỏe chung, và tiền sử trước khi điều trị của đối tượng bị bệnh. Lượng hợp chất HMC và đường đưa thuốc sẽ được quyết định bởi bác sĩ điều trị, bác sĩ thú y, hoặc nhân viên y tế, mặc dù nhìn chung liều lượng sẽ được chọn để đạt được các nồng độ khu trú ở vị trí tác dụng để thu được tác dụng mong muốn và không gây ra các tác dụng không mong muốn nghiêm trọng hoặc có hại.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng một liều, liên tục hoặc không liên tục (ví dụ ở các liều được chia trong khoảng thời gian thích hợp) trong suốt quá trình điều trị. Phương pháp xác định liều lượng sử dụng và đường đưa thuốc tối ưu nhất là đã biết trong lĩnh vực này và sẽ thay đổi theo dược phẩm được sử dụng để điều trị, mục đích điều trị, tế bào định cần điều trị, và đối tượng cần điều trị. Việc sử dụng đơn

liều hoặc đa liều có thể được thực hiện với mức liều và dạng bào chế được chọn bởi bác sĩ điều trị, bác sĩ thú y, hoặc nhân viên y tế.

Nhìn chung, liều lượng thích hợp của hợp chất HMC nằm trong khoảng từ 50 μ g đến 20 mg (tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 100 μ g đến 10 mg)/kg thể trọng của đối tượng/ngày. Để sử dụng qua đường hô hấp (ví dụ bằng cách hít), liều lượng thích hợp nằm trong khoảng từ 50 ng đến 1 mg /kg thể trọng của đối tượng/ngày. Khi hợp chất này là muối, este, amit, tiền dược chất hoặc dạng tương tự, lượng sử dụng được tính toán dựa trên hợp chất gốc và do đó trọng lượng thực tế được sử dụng được tăng lên tương ứng.

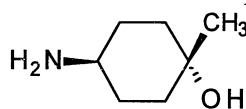
Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ tổng hợp

Phương pháp tổng hợp hợp chất HMC được mô tả trong sáng chế. Các phương pháp này và/hoặc các phương pháp đã biết khác (ví dụ, xem Greig et al., 2010a; Bahmanyar et al., 2010) có thể được cải tiến và/hoặc cải biến theo các cách thức đã biết để tạo ra phương pháp tổng hợp thay thế hoặc cải thiện.

Ví dụ tổng hợp 1

(1r,4r)-4-amino-1-metylcyclohexan-1-ol

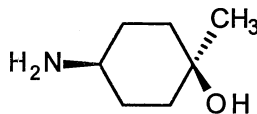


Paladi hydroxit (hỗn dịch nước 50%; 2,0g) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa (1r,4r)-4-(đibenzylamino)-1-metylcyclohexanol (7,5g, 24,2mmol) trong metanol (100mL) trong nồi hấp dung tích 300mL. Nồi hấp được nạp với hydro (50atm; khoảng 5MPa) và gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 24 giờ. Hỗn hợp thu được được làm nguội và chất xúc tác được lọc loại bỏ. Dịch lọc được bổ sung trở lại vào nồi hấp và paladi hydroxit (hỗn dịch nước 50%; 3,0g) được bổ sung vào. Nồi hấp được nạp với khí hydro (50atm; khoảng 50MPa) và gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C qua đêm. Hỗn hợp thu được được làm nguội và lọc qua đệm xelit và dịch lọc được cô để thu được hợp chất mong muốn dưới dạng gồm rắn màu trắng nhạt (3,2g, định lượng).

^1H NMR: (400 MHz; CDCl_3) δ 2,86-2,76 (1H, m), 1,84-1,76 (2H, m), 1,75-1,63 (2H, m), 1,55-1,43 (2H, m), 1,30-1,17 (5H, m).

Ví dụ tổng hợp 1A

(1s,4s)-4-amino-1-metylcyclohexan-1-ol

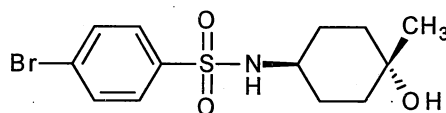


Bốn mẻ tương đương chứa (1s,4s)-4-đibenzylamino-1-metylcyclohexan-1-ol (khối lượng mỗi mẻ là 15g, tổng cộng 60g) được khử nhóm benzyl riêng rẽ như sau: bổ sung 10% paladi hydroxit (15g, 50% chất xúc tác ẩm) vào (1s,4s)-4-đibenzylamino-1-metylcyclohexan-1-ol (15g, 193,9mmol) trong etanol (450mL). Hỗn hợp phản ứng được sục với khí nitơ, sau đó bằng khí hydro và khuấy trong điều kiện khí hydro trong 16 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch thu được được lọc qua đệm xelit và đệm này được tiếp tục rửa bằng etyl axetat. Dịch lọc từ toàn bộ bốn mẻ được thu gom và làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất mong muốn (23g, hiệu suất 91,8%). Hợp chất này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,6 (m, 1H), 1,74-1,56 (m, 4H), 1,5-1,3 (m, 7H), 1,21 (s, 3H).

Ví dụ tổng hợp 2

4-brom-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylcyclohexyl)benzensulfonamit



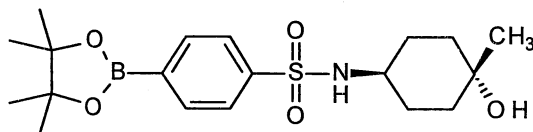
Diisopropyletylamin (24mL, 137,8mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (1r,4r)-4-amino-1-metylcyclohexanol (3,6g, 27,86mmol) trong diclometan (150mL) và hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C . 4-brombenzen-1-sulfonyl clorua (7,83g, 30,6mmol) được bổ sung vào dưới dạng chất rắn và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng axit hydrocloric 1M và hợp chất thu được được chiết vào diclometan. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulfat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn thu được được rửa bằng pentan, lọc và làm khô để thu được hợp chất mong muốn (7g, 72%).

^1H NMR: (400 MHz; CDCl_3) δ 7,74 (2H, d), 7,65 (2H, d), 4,77-4,61 (1H, m), 3,33-3,23 (1H, m), 1,85-1,75 (2H, m), 1,63-1,51 (2H, m), 1,49-1,30 (4H, m), 1,20 (3H, s).

LCMS: (Thời gian chạy mẫu: 3,5 phút): Thời gian lưu: 1,33 phút (97%, MS (ESI) m/z 346 (M-H^+)).

Ví dụ tổng hợp 3

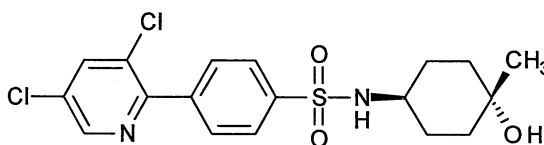
N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit



Dung dịch chứa 4-brom-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)benzensulfonamit (9g, 25,8mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametyl-2,2'-bi(1,3,2-dioxabolan) (9,87g, 38,9mmol) và kali axetat (7,6g, 77,5mmol), trong toluen (50mL) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen]điclopaladi(II) (1,8g, 2,5mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa và khuấy ở nhiệt độ 100°C trong 4 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và hợp chất thu được được chiết vào etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulfat và cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất mong muốn (8g, 78%) MS (ESI) m/z 394 (M-H^+). Đối với các mẻ trên quy mô lớn, hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. Khi thực hiện phương pháp tổng hợp này trên quy mô nhỏ, phần cặn được bổ sung vào ete, lọc và dịch lọc được cô để thu được hợp chất mong muốn.

Ví dụ tổng hợp 4

4-(3,5-điclopyridin-2-yl)-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)benzensulfonamit (HMC-N-03-A)

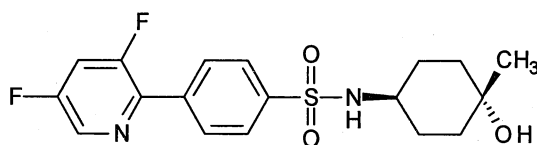


Hỗn hợp chứa dioxan và nước (3:1; 20mL) được đuổi khí. 2,3,5-triclopypiridin (1,65g, 9,0mmol), N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-di-oxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (1,8g, 4,6mmol), K_2CO_3 (1,24g, 9,0mmol) và [1,1-bis(diphenylphosphino)ferocen]điclopalađi(II) (257mg, 0,35mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 120°C trong lò vi sóng trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô, pha loãng bằng etyl axetat và rửa bằng nước. Dịch chiết hữu cơ được làm khô ($MgSO_4$) và cô để thu được phần cần thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh (rửa giải bằng etyl axetat ở gradien nồng độ nằm trong khoảng từ 40% đến 50% trong heptan). Hợp chất này được tiếp tục tinh chế bằng cách kết tinh ba lần (etyl axetat/heptan) để thu được hợp chất mong muốn (284mg, 15%). 1H NMR: (400 MHz; $CDCl_3$) δ 8,59 (1H, m), 7,97 (2H, d), 7,92-7,85 (3H, m), 4,62-4,55 (1H, m), 3,38-3,28 (1H, m), 1,92-1,76 (2H, m), 1,8-1,35 (7H, m), 1,22 (3H, s).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 0,05% axit trifloaxetic, pha động B: dung dịch axetonitril chứa 0,05% axit trifloaxetic; Cột: YMC ODS A, C18 (50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,2mL/phút; Nhiệt độ: nhiệt độ môi trường. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 20:80 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 3 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 0,5 phút, sau đó đưa trở lại ngay đến 20:80 B:A trong 1,5 phút cuối. Thời gian lưu: 2,50 phút, m/z 415 ($M+H$)⁺.

Ví dụ tổng hợp 5

4-(3,5-điflopyridin-2-yl)-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)benzensulfonamit (HMC-N-02-A)



Dung dịch được khuấy chứa dioxan và nước (9:1; 100mL), N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-di-oxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (20g, 50,6mmol), 2-brom-3,5-điflopyridin (14,73g, 75,94mmol) và natri carbonat (10,73g, 101,2mmol) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(diphenylphosphino)ferocen] điclopalađi(II) (3,7g, 5,06mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa và khuấy ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và hợp chất thu được được

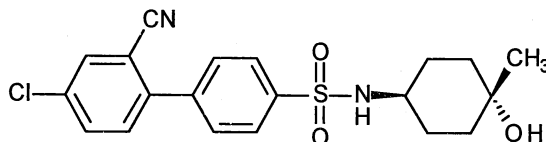
chiết vào etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulfat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel và phân đoạn mong muốn được cô đến thể tích tối thiểu, sau đó lọc. Phần cặn thu được được rửa bằng 20% etyl axetat trong hexan, sau đó bằng n-pentan để thu được hợp chất mong muốn (8g, 41%).

^1H NMR: (400 MHz; metanol- d_4) δ 8,54 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 8,11 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,99 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,74 (m, 1H), 3,20 (m, 1H), 1,83 - 1,27 (m, 8H), 1,18 (s, 3H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 10mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 1,75 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 1 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 1,25 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 1,88 phút, m/z 381 (M-H) $^+$.

Ví dụ tổng hợp 6

4'-clo-2'-xyano-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxcyclohexyl)biphenyl-4-sulfonamit (HMC-C-01-A)



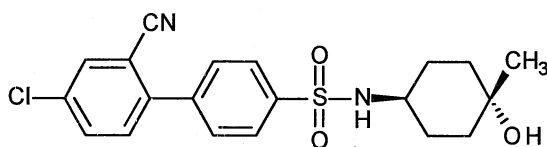
Dung dịch được khuấy chứa đioxan và nước (9:1; 100mL), N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxcyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-đioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (12g, 30,4mmol), 2-brom-5-clobenzonitril (9,86g, 45,5mmol) và natri carbonat (6,44g, 60,8mmol) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen] điclopaladi(II) (2,21g, 3,0mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa và khuấy ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và hợp chất thu được được chiết vào etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulfat và cô trong điều kiện áp suất giảm, sau đó bằng rửa hai lần bằng n-pentan và làm khô trong điều kiện chân không ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45°C đến 50°C để thu được hợp chất mong muốn (5,7g, 46,5%).

^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ 8,01 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,95 (m, 1H), 7,83-7,74 (m, 3H), 7,64 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 3,25 - 3,17 (m, 1H), 1,8-1,54 (m, 4H), 1,47-1,34 (m, 4H), 1,18 (s, 3H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 10mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μM ; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2,5 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 0,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 1 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,167 phút, m/z 403 (M-H) $^+$.

Ví dụ tổng hợp 6A

4'-clo-2'-xyano-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxcyclohexyl)biphenyl-4-sulfonamit (HMC-C-01-A)



Bổ sung (1r,4r)-4-amino-1-metylxcyclohexan-1-ol được nghiền mịn (123,7g, 0,957mol) và điclotetan (2400mL) vào bình phản ứng dung tích 10L. Trietylamin (534mL, 3,830mol) được bổ sung nhỏ giọt vào. Hỗn dịch thu được được làm lạnh đến nhiệt độ nhỏ hơn 5°C và 4-(4-clo-2-xyanophenyl)benzen-1-sulfonyl clorua (298,9g, 0,957mol) trong điclotetan (768mL) được bổ sung nhỏ giọt vào và duy trì nhiệt độ phản ứng nhỏ hơn 25°C. Hỗn hợp phản ứng được để ấm đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 40 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến nhiệt độ nhỏ hơn 10°C và dung dịch nước axit hydrocloric 2M (2090mL) được bổ sung nhỏ giọt vào đồng thời duy trì nhiệt độ phản ứng nhỏ hơn 25°C (quan sát thấy nhiệt tỏa ra và khói trắng). Các pha được phân tách và pha hữu cơ được rửa bằng nước (2090mL). Pha hữu cơ được làm khô bằng magie sulphat khan, lọc, và phần cần được rửa bằng điclotetan (2 x 50mL)., sau đó dịch lọc thu gom được trộn với hợp chất thô thu được từ phản ứng trên quy mô nhỏ của 4-(4-clo-2-xyanophenyl)benzen-1-sulfonyl clorua (50g) và (1r,4r)-4-amino-1-metylxcyclohexan-1-ol, và toàn bộ các chất thu gom được hấp thụ trực tiếp lên silica (800g). Hỗn hợp này được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica (8000g), rửa giải ban đầu bằng etyl axetat : điclotetan 20:80, sau đó lần lượt bằng hỗn hợp etyl axetat : điclotetan 30:70,

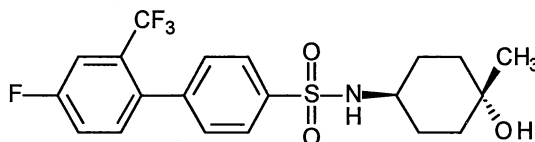
40:60, 50:50, sau đó bằng riêng etyl axetat. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được kết hợp và cô để thu được chất rắn màu vàng. Hợp chất này được làm khô trong lò chân không qua đêm ở nhiệt độ 40°C để thu được hợp chất mong muốn (406,8g; hiệu suất tổng cộng bằng 88%). Kết quả phân tích NMR cho thấy hợp chất này có độ tinh khiết >97%.

^1H NMR: (270 MHz; CDCl_3) δ 8,02 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,78 (d, $J = 2$ Hz, 1H), 7,73-7,63 (m, 3H), 7,49 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 4,89 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 3,38 (m, 1H), 1,98-1,75 (m, 2H), 1,75-1,3 (m, 7H, m), 1,23 (s, 3H).

HPLC: pha động A: nước tinh khiết + 0,1% axit trifloaxetic, pha động B: axetonitril + 0,1% axit trifloaxetic; Cột: Fortis C18 4,6 x 150mm; 3 μM ; Tốc độ dòng: 1,0mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 30 phút - dung môi khởi động 5:95 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 15 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 15 phút cuối. Thời gian lưu 12,0 phút. Khối phổ: Bruker Esquire 3000 Plus Ion Trap MS; Độ phân cực ion dương, ESI: m/z 403 (M-H) $^+$.

Ví dụ tổng hợp 7

4'-flo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylcyclohexyl)-2'-(triflometyl)biphenyl-4-sulfonamit (HMC-C-02-A)



Dung dịch được khuấy chứa đioxan và nước (9:1; 100mL), N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylcyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit-yl)benzensulfonamit (20g, 50,6mmol), 1-brom-4-flo-2-(triflometyl)benzen (18,45g, 75,9mmol) và natri carbonat (10,73g, 101,2mmol) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(diphenylphosphino)ferocen]điclopaladi(II) (3,7g, 5,06mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa và khuấy ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và hợp chất thu được được chiết vào etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulfat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel và các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được

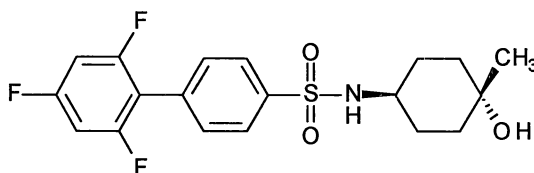
cô, sau đó lọc. Phần cần thu được được rửa bằng thể tích tối thiểu diclometan, sau đó bằng rửa hai lần bằng n-pentan và làm khô trong điều kiện chân không ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45°C đến 50°C để thu được hợp chất mong muốn (10,2g, 47%).

^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ 7,93 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,59 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 7,51 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,46 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,20 (m, 1H), 1,79 - 1,51 (m, 4H), 1,49 - 1,30 (m, 4H), 1,18 (s, 3H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 10mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μM ; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 1,75 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 1 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 1,25 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,16 phút, m/z 430 (M-H) $^+$.

Ví dụ tổng hợp 8

2',4',6'-triflo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylcyclohexyl)biphenyl-4-sulfonamit (HMC-C-03-A)



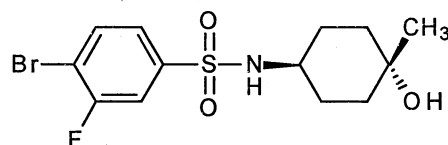
Hỗn hợp chứa đioxan và nước (3:1; 20mL) được đuổi khí. 1-brom-2,4,6-triflobenzen (1,91g, 9,1mmol), N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylcyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-đioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (1,8g, 4,6mmol), K_2CO_3 (1,24g, 9,0mmol) và [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen]điclopaladi(II) (257mg, 0,35mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 120°C trong lò vi sóng trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô, pha loãng bằng etyl axetat và rửa bằng nước. Dịch chiết hữu cơ được làm khô (MgSO_4) và cô để thu được phần cần thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh (rửa giải bằng etyl axetat ở gradien nồng độ nằm trong khoảng từ 40% đến 50% trong heptan). Hợp chất này được tiếp tục tinh chế bằng phương pháp kết tinh (etyl axetat/heptan) để thu được hợp chất mong muốn (620mg, 34%).

^1H NMR: (400 MHz; CDCl_3) δ 7,95 (d, 2H), 7,58 (d, 2H), 6,80 (t, 2H), 4,62-4,52 (m, 1H), 3,41-3,30 (m, 1H), 1,91-1,81 (m, 2H), 1,66-1,34 (m, 6H), 1,22 (s, 3H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 10mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μM ; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 5,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2,5 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 1 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 1,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,40 phút m/z 400 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Ví dụ tổng hợp 9

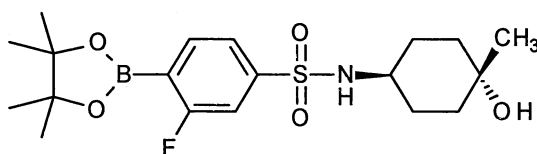
4-brom-3-flo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)benzensulfonamit



Diisopropyletylamin (20mL, 116,2mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (1r,4r)-4-amino-1-metylxclohexanol (3g, 23,2mmol) trong điclotetan (150mL) và hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C. 4-brom-3-flobenzen-1-sulfonyl clorua (6,98g, 25,5mmol) được bổ sung vào dưới dạng chất rắn và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng axit hydrocloric 1M và hợp chất thu được được chiết vào điclotetan. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulfat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn thu được được rửa bằng n-pentan, lọc và làm khô để thu được hợp chất mong muốn (7g, 82%). MS (ESI) m/z 368 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Ví dụ tổng hợp 10

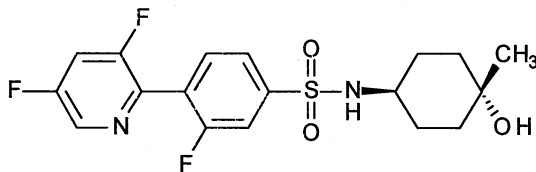
3-flo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit



Dung dịch được khuấy chứa toluen (50mL), 4-brom-3-flo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-methylxyclohexyl)benzensulfonamit (9g, 24,6mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametyl-2,2'-bi(1,3,2-đioxabolan) (9,33g, 36,7mmol) và kali axetat (7,23g, 73,7mmol) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen] điclopalađi(II) (1,8g, 2,5mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa và khuấy ở nhiệt độ 110°C trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ phòng và lọc qua đệm xelit. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulfat và cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất mong muốn (10g, 98%). Đối với các mẻ trên quy mô lớn, hợp chất này được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. Khi thực hiện phương pháp tổng hợp này trên quy mô nhỏ, phần cặn được bổ sung vào ete, lọc và dịch lọc được cô để thu được hợp chất mong muốn. MS (ESI) m/z 412 (M-H)⁺.

Ví dụ tổng hợp 11

4-(3,5-điflopyridin-2-yl)-3-flo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-methylxyclohexyl)benzensulfonamit (HMC-N-01-A)



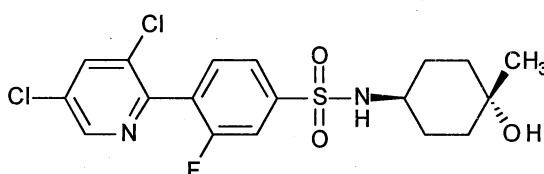
Dung dịch được khuấy chứa đioxan (50mL), 3-flo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-methylxyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-đioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (18g, 43,6mmol), 2-brom-3,5-điflopyridin (12,68g, 65,37mmol) và caesium carbonat (35,52g, 109,0mmol) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen]điclopalađi(II) (3,2g, 4,4mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa, sau đó khuấy ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và hợp chất thu được được chiết vào etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulfat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel, sau đó bằng rửa bằng n-pentan để thu được hợp chất mong muốn (8,19g, 47%).

¹H NMR (400 MHz, metanol-d₄) δ 8,55 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,87 - 7,71 (m, 4H), 3,24 (m, 1H), 1,8-1,7 (m, 2H), 1,66-1,55 (m, 2H), 1,51 - 1,34 (m, 4H), 1,19 (s, 3H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2,5 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 0,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 1 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 1,88 phút, m/z 399 (M-H)⁺.

Ví dụ tổng hợp 12

4-(3,5-điclopyridin-2-yl)-3-flo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)benzensulfonamit (HMC-N-04-A)



Dung dịch chứa 3-flo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (0,338g, 0,82mmol) trong đimetoxyetan (10mL) được sục với argon trong 15 phút. 2-brom-3,5-điclopyridin (0,185g, 0,82mmol) và natri carbonat (0,175g, 1,65mmol) trong nước được bổ sung vào và đuổi khí bằng argon trong 30 phút. [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen] điclopaladi(II) (0,12g, 0,16mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa, sau đó khuấy ở nhiệt độ 80°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội và lọc qua đệm xelit. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel bằng 50% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất mong muốn (0,04g, 11%).

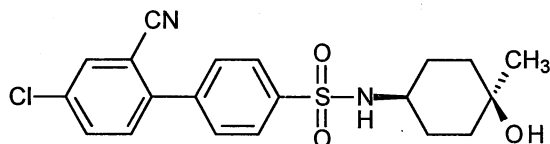
¹H NMR (400 MHz, metanol-d₄) δ 1,19 (3H, s), 1,33 - 1,52 (4H, m), 1,54-1,66 (2H, m), 1,69 - 1,82 (2H, m), 3,25 (1H, m), 7,68 (1H, m), 7,75 (1H, m), 7,82 (1H, m), 8,20 (1H, d, J = 2,1 Hz), 8,65 (1H, d, J = 2,1 Hz).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 10mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,2mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 5 phút - dung môi khởi động 35:65 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2,5 phút đầu, giữ ở 95:5

B:A trong 1,3 phút, giảm ngay đến 35:65 B:A trong 1,2 phút cuối. Thời gian lưu 2,59 phút, m/z 431 (M-H)⁺.

Ví dụ tổng hợp 13

4'-clo-2'-xyano-N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)-[1,1'-biphenyl]-4-sulfonamit (HMC-C-01-B)



Dung dịch chứa N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (17g, 43,0mmol), 2-brom-5-clobenzonitril (14g, 64,7mmol), và natri carbonat (9,1g, 86mmol) trong hỗn hợp chứa đioxan và nước (240mL, 9:1) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(diphenylphosphino)ferocen] điclopaladi(II) (3,14g, 4,3mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, nước được bổ sung vào, và hợp chất thu được được chiết trong etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulphat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel có kích cỡ nằm trong khoảng từ rây số 100 đến rây số 200 với dung môi rửa giải là 20-40% etyl axetat trong hexan. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được cô đến thể thích bằng 1/10 (85mL), sau đó lọc. Phần cặn thu được được rửa bằng 20% etyl axetat trong hexan, sau đó bằng n-pentan để thu được hợp chất mong muốn. Hiệu suất: 5,8g, 33% (qua hai công đoạn).

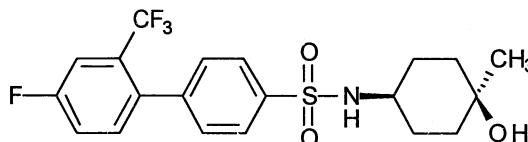
¹H NMR (400 MHz, Cloform-d) δ 8,04 - 7,97 (m, 2H), 7,79 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,69-7,64 (m, 3H), 7,48 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,45 (d, J = 8 Hz, 1H), 3,3-3,15 (br, 1H), 1,74 - 1,51 (m, 6H), 1,45-1,35 (m, 2H), 1,20 (s, 3H), 1,00 (s, 1H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3μM; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2 phút đầu, giữ ở 95:5

B:A trong 1,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 0,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,62 phút m/z 403,30 $[M-1]$.

Ví dụ tổng hợp 14

4'-flo-N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxcyclohexyl)-2'-(triflometyl)-[1,1'-biphenyl]-4-sulfonamit (HMC-C-02-B)



Dung dịch chứa N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxcyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (13,5g, 34,1mmol), 1-brom-4-flo-2-(triflometyl)benzen (12,45g, 51,2mmol), và natri carbonat (7,24g, 68,3mmol) trong hỗn hợp chứa đioxan và nước (230mL, 9:1) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(diphenylphosphino)ferocen] diclopaladi(II) (2,49g, 3,4mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, nước được bổ sung vào, và hợp chất thu được được chiết trong etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulphat, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel có kích cỡ nằm trong khoảng từ rây số 100 đến rây số 200 với dung môi rửa giải là 20-40% etyl axetat trong hexan. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được cô đến thể thích bằng 1/10 (80mL), sau đó lọc. Phần cặn thu được được rửa bằng 20% etyl axetat trong hexan, sau đó bằng n-pentan để thu được hợp chất mong muốn. Hiệu suất: 5,6g, 20% (qua hai công đoạn).

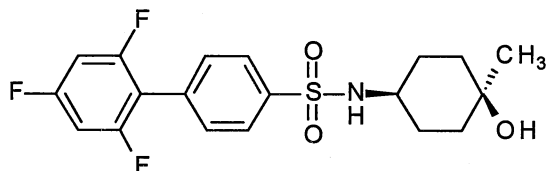
^1H NMR (400 MHz, Cloform-d) δ 7,97 - 7,88 (m, 2H), 7,52 - 7,40 (m, 3H), 7,31 (dd, $J = 7,0, 2,4$ Hz, 2H), 4,40 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 3,25-3,12 (br, 1H), 1,70-1,50 (m, 6H), 1,45-1,33 (m, 2H), 1,20 (s, 3H), 1,00 (bs, 1H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2 phút đầu, giữ ở 95:5

B:A trong 1,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 0,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,79 phút m/z 430 $[M-1]$.

Ví dụ tổng hợp 15

2',4',6'-triflo-N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)-[1,1'-biphenyl]-4-sulfonamit (HMC-C-03-B)



Dung dịch chứa N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (15g, 37,9mmol), 2-brom-1,3,5-triflobenzen (12g, 56,9mmol), và natri carbonat (8,03g, 75,8mmol) trong hỗn hợp chứa đioxan và nước (250mL, 9:1) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(diphenylphosphino)ferocen] diclopaladi(II) (2,77g, 3,8mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, nước được bổ sung vào, và hợp chất thu được được chiết trong etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulphat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel có kích cỡ nằm trong khoảng từ rây số 100 đến rây số 200 với dung môi rửa giải là 20-40% etyl axetat trong hexan. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được cô đến thể thích bằng 1/10 (90mL), sau đó lọc. Phần cặn thu được được rửa bằng 20% etyl axetat trong hexan, sau đó bằng n-pentan để thu được hợp chất mong muốn. Hiệu suất: 4,98g, 18% (qua hai công đoạn).

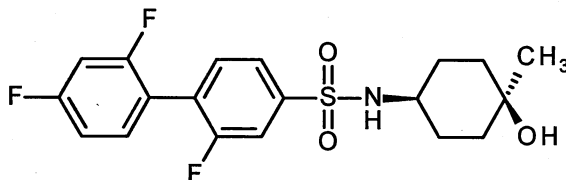
^1H NMR (400 MHz, Cloform-d) δ 7,99 - 7,92 (m, 2H), 7,61 - 7,53 (m, 2H), 6,80 (t, J = 8,2 Hz, 2H), 4,39 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 3,25-3,12 (br, 1H), 1,75 - 1,51 (m, 6H), 1,48 - 1,33 (m, 2H), 1,20 (s, 3H), 0,99 (s, 1H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2 phút đầu, giữ ở 95:5

B:A trong 1,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 0,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,65 phút, m/z 398 [M-1].

Ví dụ tổng hợp 16

2,2',4'-triflo-N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)-[1,1'-biphenyl]-4-sulfonamit (HMC-C-04-B)



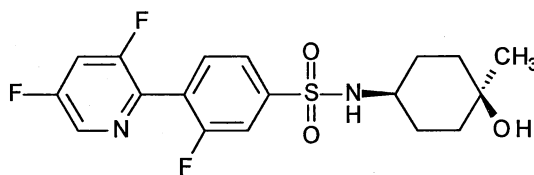
Dung dịch chứa 3-flu-N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (3,1g, 7,5mmol), 1-brom-2,4-diflobenzen (2,1g, 10,9mmol), và natri carbonat (1,6g, 15,0mmol) trong hỗn hợp chứa dioxan và nước (60mL, 5:1) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(diphenylphosphino)ferocen] diclopaladi(II) (0,548g, 0,75mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, nước được bổ sung vào, và hợp chất thu được được chiết trong etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulphat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel có kích cỡ nằm trong khoảng từ rây số 100 đến rây số 200 với dung môi rửa giải là 20-40% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất mong muốn. Hiệu suất: 0,6g, 18% (qua hai công đoạn).

¹H NMR (400 MHz, Cloform-d) δ 7,73-7,69 (m, 2H), 7,56-7,47 (m, 1H), 7,44-7,32 (m, 1H), 7,06 - 6,91 (m, 2H), 4,41 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 3,27-3,14 (br, 1H), 1,76 - 1,52 (m, 6H), 1,48 - 1,35 (m, 2H), 1,21 (s, 3H), 0,97 (s, 1H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3μM; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 1,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 0,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,70 phút, m/z 398 [M-1].

Ví dụ tổng hợp 17

4-(3,5-điflopyridin-2-yl)-3-flo-N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxcyclohexyl)benzensulfonamit (HMC-N-01-B)



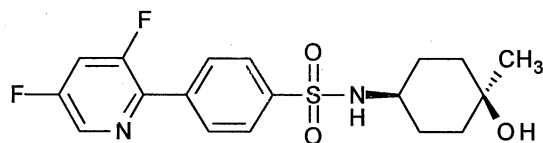
Dung dịch chứa 3-flo-N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxcyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-đioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (22g, 53,2mmol), 2-brom-3,5-điflopyridin (15,5g, 79,9mmol), và xeri carbonat (52,0g, 159,6mmol) trong hỗn hợp chứa đioxan và nước (100mL) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen] điclopaladi(II) (3,9g, 5,3mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, nước được bổ sung vào, và hợp chất thu được được chiết trong etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulphat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel có kích cỡ nằm trong khoảng từ rây số 100 đến rây số 200 với dung môi rửa giải là 20-40% etyl axetat trong hexan. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được cô đến thể tích bằng 1/10 (110mL) và lọc. Phần cặn thu được được rửa bằng 20% etyl axetat trong hexan, sau đó bằng n-pentan để thu được hợp chất mong muốn. Hiệu suất: 5,6g, 26% (qua hai công đoạn).

^1H NMR (400 MHz, Cloform-d) δ 8,50 (m, 1H), 7,83 - 7,67 (m, 3H), 7,41-7,33 (m, 1H), 4,43 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 3,28-3,13 (m, 1H), 1,74 - 1,52 (m, 6H), 1,46-1,35 (m, 2H), 1,21 (s, 3H), 0,97 (s, 1H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 1,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 0,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,42 phút m/z 399 [M-1].

Ví dụ tổng hợp 18

4-(3,5-diflopyridin-2-yl)-N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)benzensulfonamit (HMC-N-02-B)



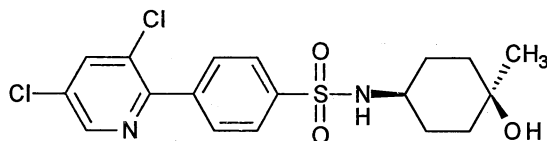
Dung dịch được khuấy chứa N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (26,5g, 67,0mmol), 2-brom-3,5-diflopyridin (19,5g, 100,5mmol), và natri carbonat (14,22g, 134,2mmol) trong hỗn hợp chứa đioxan và nước (250mL, 9:1) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(diphenylphosphino)ferocen] điclopalađi(II) (4,90g, 6,70mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, nước được bổ sung vào, và hợp chất thu được được chiết trong etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulphat và cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được phân căn. Phân căn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel có kích cỡ nằm trong khoảng từ rây số 100 đến rây số 200 với dung môi rửa giải là 20-40% etyl axetat trong hexan. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được cô đến thể thích bằng 1/10 (100mL), sau đó lọc. Phân căn thu được được rửa bằng 20% etyl axetat trong hexan, sau đó bằng n-pentan để thu được hợp chất mong muốn. Hiệu suất: 5,9g, 26% (qua hai công đoạn).

^1H NMR (400 MHz, Cloform-d) δ 8,48 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 8,13 - 8,06 (m, 2H), 7,98 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,39-7,31 (m, 1H), 4,39 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 3,25-3,1 (br, 1H), 1,72 - 1,5 (m, 6H), 1,42-1,32 (m, 2H), 1,19 (s, 3H), 0,96 (s, 1H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 1,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 0,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,41 phút m/z 381 [M-1].

Ví dụ tổng hợp 19

4-(3,5-điclopyridin-2-yl)-N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)benzensulfonamit (HMC-N-03-B)



Dung dịch chứa N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (1,5g, 3,8mmol), 2-brom-3,5-điclopyridin (1,3g, 5,7mmol), và natri carbonat (0,805g, 7,6mmol) trong hỗn hợp chứa đioxan và nước (18mL, 5:1) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen] điclopaladi(II) (0,277mg, 0,38mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung dịch khác chứa N-((1s,4s)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (4g, 10,1mmol), 2-brom-3,5-điclopyridin (3,44g, 15,2mmol), và natri carbonat (2,14g, 20,2mmol) trong hỗn hợp chứa đioxan và nước (54mL, 5:1) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen] điclopaladi(II) (0,739g, 1,0mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Hai mẻ trên được trộn với nhau. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, nước được bổ sung vào, và hợp chất thu được được chiết trong etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulphat và cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được phân cấn. Phần cấn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel có kích cỡ nằm trong khoảng từ rây số 100 đến rây số 200 với dung môi rửa giải là 20-40% etyl axetat trong hexan. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được cô đến thể thích bằng 1/10 (30mL), sau đó lọc. Phần cấn thu được được rửa bằng 20% etyl axetat trong hexan, sau đó bằng n-pentan để thu được hợp chất mong muốn. Hiệu suất: 0,79g, 14% (qua hai công đoạn).

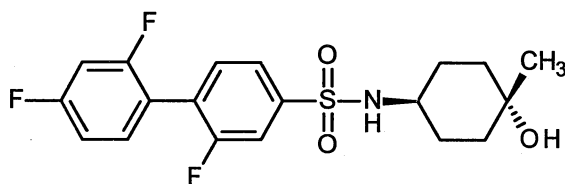
^1H NMR (400 MHz, Cloform-d) δ 8,59 (m, 1H), 8,02 - 7,94 (m, 2H), 7,90 - 7,83 (m, 3H), 4,47 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 3,25-3,1 (br, 1H), 1,73 - 1,5 (m, 6H), 1,44-1,32 (m, 2H), 1,19 (s, 3H), 1,01 (s, 1H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18

(50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 1,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 0,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,69 phút m/z 413[M-1].

Ví dụ tổng hợp 20

2,2',4'-triflo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-methylcyclohexyl)-[1,1'-biphenyl]-4-sulfonamid (HMC-C-04-A)



Dung dịch chứa 3-flu-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-methylcyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamid (3,5g, 8,4mmol), 1-brom-2,4-điflobenzen (2,44g, 12,7mmol), và natri carbonat (1,79g, 16,9mmol) trong hỗn hợp chứa đioxan và nước (60mL, 5:1) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(diphenylphosphino)ferocen] diclopaladi(II) (0,619g, 0,85mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, nước được bổ sung vào, và hợp chất thu được được chiết trong etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulphat, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu tới hạn: Pha động: CO₂:Metanol (05-50 trong 5 phút), Cột: Silica 2-Etylpyridin (250x4,6 mm, 5 μ), Tốc độ dòng: 3mL/phút, Bước sóng: 210-400nm để thu được hợp chất mong muốn. Hiệu suất: 0,7g, 19% (qua hai công đoạn).

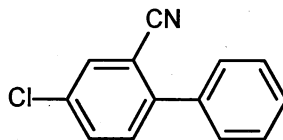
¹H NMR (400 MHz, Cloform-d) δ 7,78-7,64 (m, 2H), 7,62-7,45 (m, 1H), 7,44-7,34 (m, 1H), 7,06 - 6,91 (m, 2H), 4,51 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 3,40-3,35 (br, 1H), 1,95 - 1,83 (m, 2H), 1,67 - 1,37 (m, 6H), 1,25 (d, J = 3,3 Hz, 3H), 1,13 (s, 1H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 4,5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2 phút đầu, giữ ở 95:5

B:A trong 1,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 0,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,56 phút, m/z 398 [M-1].

Ví dụ tổng hợp 21

5-clo-2-phenylbenzonitril

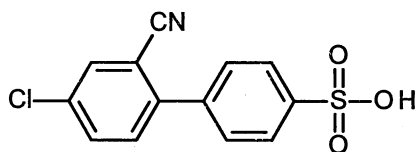


2-brom-5-clo-benzonitril (297,0g, 1,372mol), axit phenyl boronic (184,0g, 1,509mol), natri carbonat (436,3g, 4,116mol), 1,2-đimetoxyetan (4455mL) và nước (1485mL) được bổ sung vào bình phản ứng trong điều kiện khí nitơ. Bình phản ứng được đuổi khí ba lần bằng khí nitơ và tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) (79,3g, 0,069mol) được bổ sung vào. Bình phản ứng được đuổi khí ba lần bằng khí nitơ, khuấy và gia nhiệt đến nhiệt độ 70°C, sau đó khuấy ở nhiệt độ này trong 24 giờ. Axit phenyl boronic (36,8g, 0,302mol), natri carbonat (87,3g, 0,824mol) và tetrakis(triphenylphosphin) paladi (15,9g, 0,014mol) được bổ sung thêm vào và hỗn hợp được khuấy thêm trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ phòng và hỗn dịch thu được được lọc và chất rắn được rửa bằng etyl axetat (2 x 2000mL). Dịch lọc thu gom được được phân tách và pha hữu cơ được rửa bằng nước muối bão hòa (2 x 2000mL). Pha hữu cơ được làm khô bằng magie sulphat khan, lọc và chất rắn được rửa bằng etyl axetat (1000mL). Dịch lọc thu gom được được cô đồng thời hấp thụ lên silica gel (600g). Hợp chất thô này được tinh chế trên silica gel (6kg), rửa giải bằng 25-50% toluen trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được kết hợp và cô để thu được chất rắn màu trắng. Chất rắn này được tạo hỗn hợp đẳng phí với heptan (8 x 800mL) để loại bỏ toluen còn dư và thu được hợp chất mong muốn. Hiệu suất = 215,9g (73,6%).

^1H NMR (270 MHz, DMSO d_6) δ 8,18 - 8,12 (m, 1 H), 7,86 (dd, J = 8,4 Hz, 2,4 Hz, 1H), 7,7 - 7,45 (m, 6 H).

Ví dụ tổng hợp 22

axit 4-(4-clo-2-xyanophenyl)benzen-1-sulfonic

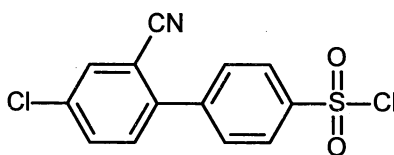


Bổ sung 5-clo-2-phenylbenzonitril thô (407,8g, 1,909mol) và cloform (2325mL) vào bình phản ứng dung tích 5L. Dung dịch màu vàng nhạt thu được được làm lạnh đến nhiệt độ nhỏ hơn 5°C và axit closulfonic (343mL, 5,15mol) được bổ sung vào, duy trì nhiệt độ phản ứng nhỏ hơn 10°C. Hỗn hợp phản ứng được để ấm đến nhiệt độ phòng và dung dịch màu nâu sẫm thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được cô ở nhiệt độ 20°C và phần cặn được hòa tan trong etyl axetat (2325mL) - quan sát thấy nhiệt độ tỏa ra đến 33°C. Nước (490mL) được bổ sung vào (nhiệt độ tỏa ra đến 64°C), sau đó bằng nước muối bão hòa (1920mL), và hỗn hợp này được làm nguội đến nhiệt độ 19°C. Hỗn dịch đặc thu được được lọc (lọc rất chậm) và phần cặn được rửa bằng nước (2 x 1 L) và etyl axetat (2 x 1,5 L). Bánh lọc được làm khô trong điều kiện chân không ở nhiệt độ 40°C trong 64 giờ để thu được 435g hợp chất dưới dạng chất rắn màu vàng. Hợp chất này được tạo hỗn dịch trong etyl axetat (1740mL) ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Hỗn dịch thu được được lọc và phần cặn được rửa bằng etyl axetat (435mL). Bánh lọc được làm khô trong điều kiện chân không ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C trong hai đêm để thu được chất rắn dạng kem (366,3 g), chứa 289g hợp chất mong muốn (hiệu suất = 52%). Kết quả phân tích bằng phương pháp Karl-Fischer cho thấy hợp chất này chứa 4,3% nước.

^1H NMR (270 MHz, DMSO d_6) δ 8,16 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 7,85 (dd, J = 2,3 Hz, 8,5 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,65 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 8,3 Hz, 2H).

Ví dụ tổng hợp 23

4-(4-clo-2-xyanophenyl)benzen-1-sulfonyl clorua

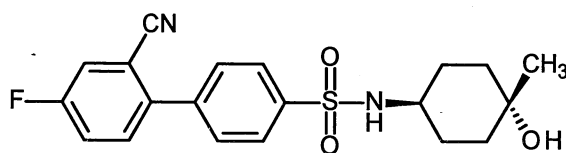


Bổ sung axit 4-(4-clo-2-xyanophenyl)benzen-1-sulfonic thô (366,3g, chứa 289g axit 4-(4-clo-2-xyanophenyl)benzen-1-sulfonic, 0,98mol) và toluen (3000mL) vào bình phản ứng dung tích 5L. Thionyl clorua (423mL, 5,83mol) được bổ sung nhỏ giọt vào, sau đó bằng dimetylformamit (5mL, 0,0646mol). Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 75°C và khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội, cô trong điều kiện chân không, và phần cặn được phân lớp giữa etyl axetat (3000mL) và nước (1500mL) và pha hữu cơ được rửa bằng nước muối bão hòa (1500mL). Pha hữu cơ được làm khô bằng magie sulphat khan (50g) và lọc. Phần cặn được rửa bằng etyl axetat (2 x 100mL) và lớp hữu cơ thu gom được được cô để thu được hợp chất mong muốn (297,6g, hiệu suất 93%) dưới dạng chất rắn màu vàng. Kết quả phân tích NMR cho thấy hợp chất này có độ tinh khiết khoảng 95%.

^1H NMR (270 MHz, DMSO d_6) δ 8,16 (d, $J = 2$ Hz, 1H), 7,87 (dd, $J = 2,1$ Hz, 8,2 Hz, 1H), 7,73 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,64 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,54 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H).

Ví dụ tổng hợp 24

2'-xyano-4'-flo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)-[1,1'-biphenyl]-4-sulfonamit (HMC-C-05-A)



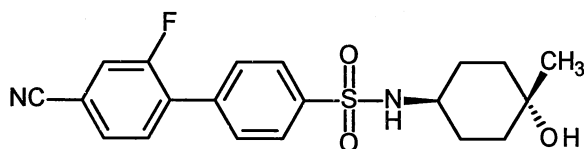
Dung dịch được khuấy chứa N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxyclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (1,6g, 4,05mmol), 2-brom-5-flobenzonitril (2,03g, 10,15mmol), natri carbonat (1,07g, 10,1mmol) trong hỗn hợp chứa đioxan và nước (30:3mL) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen] điclopalađi(II) (0,296g, 0,405mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa và khuấy ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và hợp chất thu được được chiết trong etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulphat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel. Phần cặn thu được được rửa bằng hexan, sau đó bằng n-pentan để thu được hợp chất mong muốn dưới dạng chất rắn màu trắng. Hiệu suất: 1,1g, 70%.

^1H NMR (400 MHz, Cloform-d) δ 8,04 - 7,97 (m, 2 H), 7,71 - 7,64 (m, 2 H), 7,55 - 7,49 (m, 2 H), 7,39 - 7,46 (m, 1 H), 4,46 (d, $J=6,6$ Hz, 1H), 3,45 - 3,32 (m, 1H), 1,92 - 1,82 (m, 2 H), 1,65 - 1,35 (m, 6 H), 1,23 (s, 3H), 1,11 (brs, 1H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μM ; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2,50 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 1,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 0,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,50 phút (ESI) m/z 387[M-1].

Ví dụ tổng hợp 25

4'-xyano-2'-flo-N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)-[1,1'-biphenyl]-4-sulfonamit (HMC-C-06-A)



Dung dịch được khuấy chứa N-((1r,4r)-4-hydroxy-4-metylxclohexyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzensulfonamit (1,6g, 4,05mmol), 4-brom-3-flobenzonitril (2,03g, 10,1mmol), natri carbonat (1,07g, 10,1mmol) in đioxan/nước (30/3mL) được đuổi khí bằng argon trong 10 phút. [1,1-bis(điphenylphosphino)ferocen] điclopaladi(II) (0,296g, 0,405mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đuổi khí thêm 10 phút nữa và khuấy ở nhiệt độ 110°C trong 6 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và hợp chất thu được được chiết trong etyl axetat. Pha hữu cơ được phân tách, làm khô bằng natri sulphat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel. Phần cặn thu được được rửa bằng hexan, sau đó bằng n-pentan để thu được hợp chất mong muốn dưới dạng chất rắn màu trắng. Hiệu suất: 1,19g, 75,79%.

^1H NMR (400 MHz, Cloform-d) δ 8,03 - 7,96 (m, 2 H), 7,73 - 7,66 (m, 2 H), 7,62 - 7,56 (m, 2 H), 7,54 - 7,48 (m, 1 H), 4,51 (d, $J=6,65$ Hz, 1 H), 3,42 - 3,30 (m, 1 H), 1,95 - 1,82 (m, 2 H), 1,66 - 1,55 (m, 2 H), 1,53 - 1,37 (m, 4 H), 1,23 (s, 3H), 1,12 (brs, 1 H).

LCMS: pha động A: dung dịch nước chứa 5mM amoni format + 0,1% amoniac, pha động B: axetonitril + 5% pha động A + 0,1% amoniac; Cột: YMC Triart, C18 (50X4,6mm) 3 μ M; Tốc độ dòng: 1,4mL/phút. Thời gian chạy mẫu: 5 phút - dung môi khởi động 30:70 B:A được tăng tuyến tính đến 95:5 B:A trong 2,50 phút đầu, giữ ở 95:5 B:A trong 1,5 phút, giảm tuyến tính đến 30:70 B:A trong 0,5 phút và giữ ở 30:70 B:A trong 0,5 phút cuối. Thời gian lưu 2,52 phút (ESI) m/z 387[M-1].

Hợp chất khác theo sáng chế

Các hợp chất sau cũng được tổng hợp để dùng làm các chất đối chiếu trong các thử nghiệm sinh học theo sáng chế:

Hợp chất	Công thức cấu tạo
ABD599	
ABD735	
ABD836	
ABD899	
ABD900	
REF001	

Ví dụ thử nghiệm sinh học

Hiệu lực của hợp chất theo sáng chế được xác định bằng cách đánh giá khả năng sống sót của đại thực bào J774. Đại thực bào có mối liên hệ di truyền gần với tế bào hủy xương và đã được sử dụng làm mô hình để đánh giá khả năng sống sót của tế bào hủy xương (ví dụ, xem Luckman et al., 1998, “Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages,” J. Bone Miner. Res., Vol. 13, pp. 1668-1678). Mô hình này đánh giá cả tác dụng bảo vệ xương ở các bệnh như chứng loãng xương, bệnh viêm xương khớp và bệnh viêm khớp dạng thấp, lẫn tác dụng chống viêm do tương tự tế bào hủy xương, khả năng sống sót của đại thực bào J774 phụ thuộc vào quá trình hoạt hóa liên tục NFκB.

Độ ổn định chuyển hóa được đo bằng cách xác định tốc độ chuyển hóa của hợp chất trong sự có mặt của chế phẩm vi lập thể ở gan của người, và định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ và phương pháp khối phổ (LC-MS/MS).

Độ hòa tan được đo bằng cách trộn hợp chất này trong dịch ruột nhân tạo khi đói (FaSSIF) và định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Tác dụng chống viêm cũng được xác định bằng cách đánh giá sự sản sinh interleukin-6 (IL-6) bằng đại thực bào Thp-1 của người được kích thích bằng lipopolysaccharit kích thích tiền viêm của vi khuẩn (LPS). LPS phản ứng với NFκB và IRF để sản sinh IL-6. Sự giảm IL-6 trong thử nghiệm kích thích này sẽ thể tác dụng chống viêm hữu ích trong điều trị các tình trạng bệnh có sản sinh bất thường IL-6.

Các thử nghiệm in vivo cũng được thực hiện để đánh giá hiệu lực của các hợp chất này dưới dạng dược phẩm.

Quá trình dược động học được đánh giá ở chuột cống và tác dụng điều trị bệnh được đánh giá trên mô hình chuột nhắt bị bệnh viêm khớp do collagen.

Thử nghiệm sinh học 1

Đánh giá khả năng sống sót của đại thực bào J774 bằng resazurin

Hoạt tính in vitro của các hợp chất thử nghiệm được xác định bằng cách ủ với đại thực bào J774, sau đó đánh giá khả năng sống sót của tế bào bằng resazurin.

Resazurin là chất màu có khả năng oxy hóa khử thường được sử dụng làm chỉ thị để đánh giá khả năng sống sót của tế bào được nuôi cấy (ví dụ, xem Anoopkumar-Dukie, 2005, British Journal of Radiology, Vol. 78, pp. 945-947). Resazurin là không độc với tế bào và ổn định trong môi trường nuôi cấy, cho phép đánh giá liên tục khả năng tăng sinh của tế bào in vitro dưới dạng thử nghiệm động học hoặc thử nghiệm điểm cuối. Thử nghiệm này được dựa trên khả năng của tế bào hoạt hóa chuyển hóa sống sót để khử resazurin (hợp chất có màu xanh dương và không phát huỳnh quang) thành resorufin và dihydroresorufin (các hợp chất có màu đỏ và phát huỳnh quang) bằng cách sử dụng các điện tử từ các chất khử, như nicotinamid adenin dinucleotit (NADPH) và flavin adenin dinucleotit (FADH). Quá trình biến đổi từ dạng oxy hóa thành dạng khử này có thể được xác định bằng phương pháp đo màu hoặc phương pháp đo flo. Việc làm giảm khả năng tăng sinh và sống sót của tế bào cũng ảnh hưởng đến khả năng khử resazurin của tế bào, và tốc độ khử màu tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống sót đo được.

Để đo mật độ huỳnh quang, bước sóng phát xạ 590nm và bước sóng kích thích nằm trong khoảng từ 530nm đến 560nm thường được sử dụng. Để đo cường độ màu, độ hấp thụ ở bước sóng 570nm (dạng khử) và 600nm (dạng oxy hóa) thường được đo. Phép tính đơn giản được thực hiện để xác định hàm lượng tương đối của hai dạng chất này: tỷ lệ cao của resorufin (dạng khử) so với resazurin (dạng oxy hóa) sẽ cho thấy tế bào có khả năng tăng sinh và sống sót. Tỷ lệ thấp cho thấy rằng tế bào không hoạt động hoặc không có khả năng sống sót.

Tế bào J774 được cấy ở mật độ 10^4 tế bào/giếng trong 100 μ L α MEM (môi trường Eagle α cải tiến) trong đĩa 96-giếng và được để cho bám dính vào nhau qua đêm. Ngày hôm sau, các hợp chất thử nghiệm được điều chế dưới dạng dung dịch 100mM trong DMSO. Các dung dịch gốc này được pha loãng trong DMSO, sau đó pha loãng theo tỷ lệ 1:1000 trong môi trường nuôi cấy (α MEM) trước khi bổ sung trực tiếp vào các giếng để thu được nồng độ hợp chất cuối cùng mong muốn. Sau 72 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂, resazurin (xanh Alamar, Biosource International) được bổ sung vào mỗi giếng (1:10 thể tích/thể tích, 10 μ L), sau đó đĩa nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ và mật độ huỳnh quang được đo ở bước sóng 590nm, bằng băng tần có chiều dài 25nm.

Các kết quả trung bình của mỗi hợp chất thử nghiệm được tính theo tỷ lệ phần trăm (%) theo trị số trung bình của mẫu đối chứng thể hiện khả năng sống sót của tế bào., sau đó các trị số trung bình ở các nồng độ thử nghiệm được vẽ đồ thị và trị số IC₅₀ được

tính toán từ dữ liệu thử nghiệm theo phương trình 4-thông số bằng phần mềm Grafit do Erithacus cung cấp. Mỗi thử nghiệm được lặp lại hai lần và dữ liệu thử nghiệm được tính theo trị số IC_{50} trung bình thu được từ cả hai thử nghiệm.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1 Đánh giá khả năng sống sót của đại thực bào J774 bằng resazurin

Hợp chất	IC_{50} (μM) ⁽¹⁾	IC_{50} (μM) ⁽²⁾
ABD599	0,19	0,41
ABD735	0,10	0,07
ABD836	0,28	1,45
ABD900	0,56	3,64
ABD899	0,08	0,27
REF001	0,12	0,05
HMC-C-01-A	0,13	1,89
HMC-C-02-A	0,26	14,7
HMC-C-03-A	0,14	0,41
HMC-C-04-A		0,50
HMC-C-05-A		2,46
HMC-C-06-A		0,71
HMC-N-01-A	0,13	2,66
HMC-N-02-A	0,18	4,59
HMC-N-03-A	0,17	0,62
HMC-N-04-A	0,18	
HMC-C-01-B		0,16
HMC-C-02-B		1,74
HMC-C-03-B		0,20
HMC-C-04-B		0,06
HMC-N-01-B		0,14
HMC-N-02-B		0,36
HMC-N-03-B		0,08

⁽¹⁾ Kết quả thu được từ thử nghiệm đánh giá khả năng sống sót của đại thực bào J774 bằng resazurin được thực hiện ở 6 điểm nồng độ nằm trong khoảng từ $10\mu M$ đến $10nM$ với mỗi điểm nồng độ được lặp lại ba lần ($n=3$). Dữ liệu thử nghiệm được tính theo trị số IC_{50} trung bình thu được từ 2 thử nghiệm độc lập.

⁽²⁾ Kết quả thu được từ thử nghiệm đánh giá khả năng sống sót của đại thực bào J774 bằng resazurin được thực hiện ở 12 điểm nồng độ nằm trong khoảng từ $10\mu M$ đến $0,5 nM$ với mỗi điểm nồng độ được lặp lại bốn lần ($n=4$). Dữ liệu thử nghiệm được tính theo trị số IC_{50} trung bình thu được từ 3 thử nghiệm độc lập.

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy hợp chất HMC theo sáng chế, đặc biệt là HMC-C-01-A và HMC-C-01-B; HMC-C-03-A và HMC-C-03-B; HMC-C-04-A và HMC-C-04-B; HMC-C-06-A; HMC-N-01-B; HMC-N-02-B; và HMC-N-03-B có hoạt tính rất mạnh trong thử nghiệm đánh giá khả năng sống sót của đại thực bào J774 bằng resazurin và không bị mất hoạt tính, như các hợp chất đối chiếu.

Thử nghiệm sinh học 2

Đánh giá độ ổn định của hợp chất theo sáng chế bằng vi lập thể ở gan của người

Độ ổn định chuyển hóa của các hợp chất thử nghiệm được đánh giá bằng cách xác định tốc độ chuyển hóa của hợp chất này khi được ủ với vi lập thể ở gan của người. Vi lập thể ở gan được tách từ mạng lưới nội chất của tế bào gan và là nguồn chứa chủ yếu các enzym quan trọng nhất (xytochrom P450) tham gia vào quá trình chuyển hóa được chất. Nghiên cứu độ ổn định của được chất trong sự có mặt của vi lập thể ở gan được chấp thuận là mô hình có giá trị cho phép dự đoán nhanh độ ổn định in vivo của được chất.

Vi lập thể ở gan của người được mua từ nguồn trên thị trường. Các hợp chất thử nghiệm ($1\mu\text{M}$) được ủ với khối vi lập thể ở gan (nam giới và nữ giới). Các mẫu được ủ trong 60 phút và lấy ra ở 6 thời điểm và sự có mặt/lượng của các hợp chất thử nghiệm được phân tích bằng LC-MS/MS.

Vi nạp thể (nồng độ protein cuối cùng bằng $0,25\text{ mg/mL}$ hoặc $0,5\text{mg/mL}$), dung dịch đệm phosphat $0,1\text{M}$ (độ pH = 7,4), và hợp chất thử nghiệm (nồng độ cuối cùng bằng $1\mu\text{M}$; được pha loãng từ dung dịch gốc 10mM để thu được nồng độ DMSO cuối cùng bằng $0,1\%$) được ủ ở nhiệt độ 37°C trước khi bổ sung nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADPH, nồng độ cuối cùng bằng 1mM) để hoạt hóa phản ứng. Thể tích ủ cuối cùng bằng $100\mu\text{L}$. Mẫu ủ đối chứng cho mỗi hợp chất thử nghiệm, trong đó dung dịch đệm phosphat $0,1\text{M}$ (độ pH = 7,4) được bổ sung vào thay cho NADPH. Hợp chất đối chứng dương terfenadin được sử dụng trong mỗi thử nghiệm và toàn bộ các mẫu ủ được thực hiện một lần cho mỗi hợp chất.

Mỗi hợp chất được ủ trong 0, 5, 15, 30, 45 hoặc 60 phút. Các phản ứng được dừng bằng cách bổ sung $100\mu\text{L}$ axetonitril lạnh chứa chuẩn nội ($0,001\text{ mM}$ glipizid) ở thời điểm thích hợp. Các đĩa ủ được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C để kết tủa protein và $0,1\text{mL}$ dịch ly tâm được phân tích bằng LC-MS/MS, ở các điều kiện được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2 Điều kiện phân tích LC-MS/MS

Thiết bị HPLC	Schimadzu Agilent
Thiết bị MS/MS	API 4000, API 4000 Q-Trap
Phần mềm phân tích	Analyst 1.5
Kiểu ion hóa	Kiểu ion hóa bằng tia điện Turbo

Chế độ kiểm soát	Kiểm soát nhiều phản ứng (MRM)
Cột:	Waters, Xterra, MS-C18 (2) 5 μ M 50 x 3,0mM
Nhiệt độ cột (°C)	40
Pha A:	dung dịch nước chứa 0,1% axit formic
Pha B:	dung dịch axetonitril chứa 0,1% axit formic
Thể tích tiêm mẫu chuẩn (μ L)	1, 2, 3, 5, 7, 10
Thể tích tiêm mẫu thử (μ L)	1, 2, 3, 10, 20, 50
Tốc độ dòng (mL/phút)	0,8-1

Từ đồ thị logarit tự nhiên của tỷ lệ diện tích pic (tức là tỷ lệ diện tích pic của hợp chất thử nghiệm : diện tích pic của chuẩn nội) theo thời gian, độ dốc của đường chuẩn được xác định, sau đó thời gian bán thải ($T_{1/2}$) và độ thanh thải nội sinh ($CL_{\text{nội sinh}}$) được tính toán theo các phương trình dưới đây, trong đó V = Thể tích ủ (μ L/mg protein vi lập thể):

Hằng số tốc độ thải trừ (k) = (- Gradient).

Thời gian bán thải ($T_{1/2}$) (phút) = $0,063/k$.

Độ thanh thải nội sinh ($CL_{\text{nội sinh}}$) (μ L/phút/ triệu tế bào) = $(V \times 0,693)/T_{1/2}$.

Dữ liệu thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3 Đánh giá độ ổn định của hợp chất theo sáng chế bằng vi lập thể ở gan của người.

Hợp chất	$T_{1/2}$ (phút) ⁽¹⁾	$T_{1/2}$ (phút) ⁽²⁾
ABD599	287	
ABD735	524	
ABD836	> 900	
ABD899	72	105
ABD900		87
REF001	43	
HMC-C-01-A	82	
HMC-C-02-A	55	
HMC-C-03-A	84	
HMC-C-04-A		100
HMC-C-05-A		123
HMC-C-06-A		240
HMC-N-01-A	175	
HMC-N-02-A	367	
HMC-N-03-A	258	
HMC-N-04-A	156	
HMC-C-01-B		70
HMC-C-02-B		18
HMC-C-03-B		48
HMC-C-04-B		107
HMC-N-01-B		127
HMC-N-02-B		168
HMC-N-03-B		70

⁽¹⁾ Hợp chất được ủ với vi lập thể ở gan của người ở nồng độ protein cuối cùng bằng

0,25mg/mL với 5 thời điểm lấy mẫu: 0, 5, 15, 30, và 60 phút. Mỗi thời điểm lấy mẫu được lặp lại 1 lần.

⁽²⁾ Hợp chất được ủ với vi lập thể ở gan của người ở nồng độ protein cuối cùng bằng 0,5mg/mL với 6 thời điểm lấy mẫu: 0, 5, 15, 30, 45 và 60 phút. Mỗi thời điểm lấy mẫu được lặp lại 2 lần.

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy hợp chất HMC theo sáng chế có khả năng làm ổn định chuyển hóa tương đương với hợp chất đối chiếu.

Thử nghiệm sinh học 3

Độ hòa tan trong môi trường nước

Độ hòa tan trong môi trường nước được đo bằng cách trộn hợp chất với dịch ruột nhân tạo khi đói (FaSSIF) và định lượng bằng phương pháp quang phổ.

FaSSIF được điều chế như sau:

Điều chế FaSSIF mẫu trắng: 0,21g natri hydroxit dạng hạt (NaOH), 1,97g dihydro natri phosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) và 3,09g natri clorua (NaCl) được hòa tan trong 400mL nước khử ion. Độ pH được điều chỉnh đến pH = 6,5 bằng axit hydrocloric 1M và nước khử ion được bổ sung thêm vào đến thể tích cuối cùng bằng 500 mL.

Điều chế FaSSIF: 0,056g bột SIF (chứa natri taurocholat và lecithin) (Phares AG) được hòa tan trong 25mL dung dịch FaSSIF mẫu trắng và khuấy cho đến khi bột này hòa tan hoàn toàn. Dung dịch này được để yên trong 2 giờ và chuyển sang màu trắng đục trong khoảng thời gian này; dung dịch này được sử dụng trong vòng 24 giờ. Thành phần của dung dịch cuối cùng như sau:

Natri taurocholat: 3mM.

Lecithin: 0,75mM.

Độ thẩm thấu: 270 ± 10 mOsmol.

Độ pH: 6,5

Độ hòa tan trong môi trường nước được xác định bằng cách trộn nồng độ đã biết của hợp chất thử nghiệm (được hòa tan trong DMSO) vào FaSSIF, sau đó ủ trong 16 giờ. Mật độ quang được đo khi kết thúc quá trình ủ các hợp chất thử nghiệm và hợp chất đối chứng được sử dụng để xác định độ hòa tan. Cụ thể, hai mẫu được điều chế cho mỗi thử nghiệm: mẫu đối chứng chứa dung dịch gốc chứa hợp chất thử nghiệm trong DMSO

được pha loãng trong dung dịch hệ thống (không chứa phosphat, dung dịch đệm có khả năng hấp thụ thấp) và propanol; và mẫu thử nghiệm (gồm ba mẫu lặp lại) chứa 0,5mL FaSSIF được trộn hợp chất thử nghiệm ở nồng độ bằng 0,2mM. Mỗi mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ kết hợp lắc ở tốc độ không đổi bằng 250 vòng/phút. Khi kết thúc quá trình ủ, 0,3mL mỗi mẫu được lọc qua đĩa lọc pION (PION, Woburn MA), được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với propanol và phân tích bằng phương pháp quang phổ UV ở bước sóng $\lambda_{\text{cực đại}}$ nằm trong khoảng từ 190nm đến 400nm bằng máy quang phổ Spectra Max Plus, phiên bản 2.1000 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), với phần mềm xác định độ hòa tan $\mu\text{SOL Explorer}$ (pION, Woburn, MA).

Độ hòa tan FaSSIF được tính theo công thức sau:

$$\text{Độ hòa tan FaSSIF, } \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = \frac{\left[\frac{150}{75} \right] * \left[\frac{\text{OD của mẫu thử}}{\text{OD của mẫu đối chứng}} \right] * \text{Cr} * \text{Trọng lượng phân tử}}{10^6}$$

trong đó:

“OD” là mật độ quang;

“Cr” là nồng độ của hợp chất đối chứng (33,4 μM); và

“Trọng lượng phân tử” là trọng lượng phân tử của hợp chất thử nghiệm (ví dụ trọng lượng phân tử của hợp chất ABD735 bằng 381,44).

Dữ liệu thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4 Độ hòa tan FaSSIF

Hợp chất	Độ hòa tan (mg/mL) ⁽¹⁾	Độ hòa tan (mg/mL) ⁽²⁾
ABD599	0,03	
ABD735	0,02	
ABD836	0,03	
ABD899	0,06	0,13
ABD900		0,12
REF001	0,05	
HMC-C-01-A	0,06	
HMC-C-02-A	0,04	
HMC-C-03-A	0,03	
HMC-C-04-A		0,08
HMC-C-05-A		0,19
HMC-C-06-A		0,11
HMC-N-01-A	0,03	
HMC-N-02-A	0,02	
HMC-N-03-A	> 0,08	
HMC-N-04-A	0,06	
HMC-C-01-B		0,08
HMC-C-02-B		0,07
HMC-C-03-B		0,15
HMC-C-04-B		0,13
HMC-N-01-B		0,12
HMC-N-02-B		0,12
HMC-N-03-B		0,10
⁽¹⁾ Mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần ở độ pH = 6,5.		
⁽²⁾ Mỗi thử nghiệm được lặp lại 2 lần ở độ pH = 6,8.		

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy hợp chất HMC theo sáng chế có độ hòa tan tương đương với hợp chất đối chiếu.

Thử nghiệm sinh học 4

Đánh giá tỷ lệ giải phóng IL-6 bằng đại thực bào Thp1

Hoạt tính in vitro của các hợp chất thử nghiệm trên tế bào của người được xác định bằng cách ủ với đại thực bào Thp1, sau đó kích thích bằng chất kích thích gây viêm (lipopolysaccharit của vi khuẩn (LPS)), sau đó đo tỷ lệ giải phóng interleukin-6 (IL-6) của tế bào.

Thử nghiệm này thể hiện chi tiết các tác dụng đến phản ứng viêm. LPS là phối tử của thụ thể tương tự Toll-4 (TLR4), thuộc nhóm thụ thể tương tự Toll của các thụ thể bề mặt tế bào. Thụ thể này là quan trọng trong hoạt hóa hệ miễn dịch bẩm sinh, với các chức năng chính bao gồm:

(a) huy động tế bào miễn dịch đến các vị trí nhiễm khuẩn thông qua việc sản sinh xytokin, như IL-6;

(b) hoạt hóa hệ thống bổ thể để phát hiện vi khuẩn, hoạt hóa tế bào và ly giải cả tế bào chết lẫn phức hợp kháng thể;

(c) hoạt hóa loại bỏ các chất lạ bởi tế bào như đại thực bào và tế bào đuôi gai; và

(d) hoạt hóa nhận diện kháng nguyên, là một phần hệ miễn dịch thu được.

TLR4 có tác dụng hoạt hóa một loạt quá trình truyền tín hiệu dẫn đến hoạt hóa một số yếu tố phiên mã, bao gồm NF κ B và IRF-3, IRF-5, và IRF-7 thuộc họ yếu tố phiên mã điều hòa interferon. Sự hoạt hóa các yếu tố phiên mã này, đặc biệt là NF κ B và IRF-5 dẫn đến tổng hợp và bài tiết cytokin, như interleukin 6 (IL-6).

Sự biểu hiện/sản sinh quá mức IL-6 liên quan đến nhiều rối loạn, bao gồm bệnh tự miễn, bệnh viêm và bệnh ung thư. IL-6 được tổng hợp chủ yếu bởi đại thực bào và tế bào T và tham gia nhiều vào việc điều khiển quá trình tiến triển từ viêm cấp tính sang viêm mãn tính. Cụ thể, IL-6 làm biến đổi thành phần bạch cầu thâm nhập vào ổ viêm, di chuyển nó từ bạch cầu trung tính đến bạch cầu đơn nhân/đại thực bào (ví dụ, xem Gabay, 2006). Ngoài ra, IL-6 có tác dụng kích thích tế bào T và tế bào B (do đó kích thích các phản ứng viêm mãn tính) cũng như tế bào hủy xương (do đó kích thích quá trình chuyển hóa xương). Các tác dụng này liên quan đến nhiều bệnh bao gồm chứng loãng xương, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh đái tháo đường, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh trầm cảm, bệnh Alzheimer, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh Behçet, bệnh đa u tủy xương, và bệnh ung thư tuyến tiền liệt. Hơn nữa, những người bệnh bị ung thư tiến triển hoặc di căn có hàm lượng IL-6 cao hơn mức bình thường. Do đó, việc làm giảm hàm lượng IL-6 trong đại thực bào sẽ tạo ra tác dụng điều trị có lợi.

Tế bào Thp1 được cấy ở mật độ bằng 1×10^5 tế bào/giếng hoặc $1,7 \times 10^5$ tế bào/giếng trong 500 μ L hoặc 150 μ L môi trường RPMI đầy đủ chứa 1% penicillin-streptomycin và 10% huyết thanh bào thai bò bất hoạt bằng nhiệt lần lượt trong đĩa 24 giếng hoặc đĩa 96 giếng, và được để cho bám dính vào nhau qua đêm. Ngày hôm sau, tế bào được kích thích bằng axit phorbol myristic (PMA) ở nồng độ cuối cùng bằng 100nM (đĩa 24 giếng) hoặc 200nM (đĩa 96 giếng) để biệt hóa và duy trì trong 8 ngày và thay môi trường nuôi cấy ở ngày thứ 5 khi tế bào được nuôi cấy đến ngày thứ 8. Các hợp chất thử nghiệm được điều chế dưới dạng dung dịch 100nM trong DMSO, sau đó pha loãng liên tiếp trong DMSO trước khi pha loãng trong môi trường nuôi cấy. Hợp chất đã pha loãng được bổ sung vào các giếng nuôi cấy 1 giờ trước khi kích thích bằng 100ng/mL LPS.

Sau 16 hoặc 18 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂, môi trường nuôi cấy tế bào được thu nhận và phân tích hàm lượng IL-6 của người bằng kit phân tích IL-6 của người duo-set ELISA (R&D Systems). Các kết quả trung bình của mỗi hợp chất thử nghiệm (n=3) được tính theo tỷ lệ phần trăm (%) trị số trung bình của mẫu đối chứng., sau đó các trị số trung bình ở các nồng độ thử nghiệm được vẽ đồ thị và trị số IC₅₀ để ức chế IL-6 được tính toán từ dữ liệu thử nghiệm theo phương trình 4-thông số bằng phần mềm Grafit phiên bản 6.0.12 (Erithacus Software Ltd., do Dr Robin Leatherbarrow thiết kế) hoặc GraphPad Prism phiên bản 5.04 dùng cho hệ điều hành Window (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, www.graphpad.com). Mỗi thử nghiệm được lặp lại hai lần và dữ liệu thử nghiệm được tính theo trị số IC₅₀ trung bình thu được từ cả hai thử nghiệm.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5 Đánh giá tỷ lệ giải phóng IL-6 bằng đại thực bào Thp1

Hợp chất	IC ₅₀ (μM) ⁽¹⁾	IC ₅₀ (μM) ⁽²⁾
ABD599		0,07
ABD899		0,03
ABD900		0,09
HMC-C-01-A	0,04	0,18
HMC-C-02-A	0,001	0,97
HMC-C-03-A	0,004	0,05
HMC-C-04-A		0,13
HMC-C-05-A		1,02
HMC-C-06-A		0,19
HMC-N-01-A	0,13	0,28
HMC-N-02-A	0,15	0,29
HMC-N-03-A	0,05	
HMC-C-01-B		0,06
HMC-C-02-B		0,29
HMC-C-03-B		0,02
HMC-C-04-B		0,03
HMC-N-01-B		0,03
HMC-N-02-B		0,02
HMC-N-03-B		0,02

(1) Tế bào Thp1 được cấy ở mật độ bằng 1×10^5 tế bào/giếng trong 500 μ L môi trường RPMI đầy đủ chứa 1% penicilin-streptomycin và 10% huyết thanh bào thai bò bất hoạt bằng nhiệt in đĩa 24 giếng trong 8 ngày và thay môi trường nuôi cấy ở ngày thứ 5. Hợp chất được thử nghiệm lặp lại 3 lần ở 6 điểm nồng độ bằng 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M và 0,0001 μ M, với hàm lượng IL-6 được đo 16 giờ sau khi kích thích bằng LPS. Trị số IC50 được đo bằng phần mềm Grafit phiên bản 6.0.12 (Erithacus Software).

(2) Tế bào Thp1 được cấy ở mật độ bằng $1,7 \times 10^5$ tế bào/giếng trong 150 μ L môi trường RPMI đầy đủ chứa 1% penicilin-streptomycin và 10% huyết thanh bào thai bò bất hoạt bằng nhiệt trong đĩa 96-giếng trong 3 ngày. Hợp chất được thử nghiệm lặp lại 3 lần ở 9 điểm nồng độ bằng 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 0,3 μ M, 0,1 μ M, 0,03 μ M, 0,01 μ M và 0,001 μ M với hàm lượng IL-6 được đo sau 18 giờ kích thích bằng LPS. Trị số IC50 được đo bằng phần mềm GraphPad Prism phiên bản 5.04 dùng cho hệ điều hành Window (GraphPad Software).

Dữ liệu thử nghiệm này cho thấy hợp chất HMC theo sáng chế có hoạt tính ức chế giải phóng rất mạnh IL-6 từ đại thực bào của người, do đó hữu ích trong điều trị rối loạn có IL-6 được điều hòa kích thích biểu hiện. Đặc biệt là, hợp chất HMC-C-01-A, HMC-C-03-A, HMC-C-06-A, HMC-C-01-B, HMC-C-03-B, HMC-C-04-B, HMC-N-01-B, HMC-N-02-B và HMC-N-03-B có hoạt tính ức chế giải phóng IL-6 rất mạnh.

Thử nghiệm sinh học 5

Nghiên cứu dược động học trên chuột

Khả năng hấp thu và độ ổn định chuyển hóa được nghiên cứu bằng thử nghiệm dược động học in vivo.

Ba chuột đực Sprague-Dawley, 8 đến 12 tuần tuổi, được cho sử dụng các hợp chất thử nghiệm theo đường uống hoặc đường tiêm tĩnh mạch (liều lượng bằng 1mg/kg thể trọng theo đường tiêm tĩnh mạch hoặc 5mg/kg thể trọng đường uống). Các hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong 0,5% carboxymethylxenluloza (CMC)/0,1% Tween-80 để sử dụng theo đường uống, hoặc trong 5% DMSO/10% solutol trong nước muối để sử dụng theo đường tiêm tĩnh mạch. Đối với hợp chất HMC-C-01-A, để sử dụng theo đường uống hợp chất này được hòa tan trong 2% dimethylacetamid/20% hydroxypropyl- β -cyclodextrin trong nước. Các chuột thử nghiệm được cho ăn đầy đủ trong toàn bộ thời gian nghiên cứu ngoại trừ bị đói qua đêm và cho đến 2 giờ sau khi dùng liều cuối cùng trong ngày.

Các mẫu máu được lấy từ đám rối sau hốc mắt ở các thời điểm dưới đây và bổ sung vào các ống ly tâm chứa dung dịch K₂EDTA 20%:

Các thời điểm lấy mẫu máu khi cho chuột dùng theo đường uống: trước khi sử dụng hợp chất; 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, và 24 giờ sau khi dùng liều cuối cùng.

Các thời điểm lấy mẫu máu khi cho chuột dùng theo đường tiêm tĩnh mạch: trước khi sử dụng hợp chất; 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, và 24 giờ sau khi dùng liều cuối cùng.

Các mẫu máu được ly tâm để thu được huyết tương, và chuyển vào đồ chứa riêng và bảo quản lạnh ở nhiệt độ -20°C .

Để phân tích, các mẫu được rã đông ở nhiệt độ phòng và điều chế bằng cách kết tủa protein bằng axetonitril được trộn chuẩn nội (500ng/mL glipizid) theo tỷ lệ 1 : 4 với huyết tương. Sau đó, các mẫu này được lắc xoáy trong 5 phút và ly tâm trong 10 phút ở tốc độ bằng $20600 \times g$ ở nhiệt độ 4°C . 100 μL phần dịch nổi được thu lấy để phân tích. Các mẫu chuẩn được điều chế tương tự, sau khi trộn các mẫu huyết tương nguyên chất của chuột với 10 μL dung dịch chất phân tích.

Nồng độ hợp chất thử nghiệm trong các mẫu huyết tương của chuột được xác định bằng LC-MS/MS, với các điều kiện được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6 Điều kiện phân tích LC-MS/MS

Thiết bị HPLC	Schimidzu Agilent
Thiết bị MS/MS	API 4000
Phần mềm phân tích	Analyst 1.5
Kiểu ion hóa	Kiểu ion âm bằng tia điện Turbo
Chế độ kiểm soát	Kiểm soát nhiều phản ứng (MRM)
Cột	Waters, Xterra, MS-C18 (2) 5 μM 50 x 3,0mm; Discovery Grace Smart RP183 μ , 150 x 2,1, 3 μM ; Waters Symmetry Shelf C18 75 x 4,6, 3,5 μM ; Agilent Zorbax XDB, 150 x 4,6, 5 μM
Nhiệt độ cột ($^{\circ}\text{C}$)	40
Pha A	Axetonitril
Pha B	0,1% axit formic
Tốc độ dòng (mL/phút)	0,8-1,2

Các thông số dược động học của các hợp chất thử nghiệm được tính toán bằng phần mềm Phoenix WinNonlin phiên bản 6.3 (Pharsight Corp, CA) theo phương pháp không chia ngăn chuẩn. Nồng độ cực đại trong huyết tương ($C_{\text{cực đại}}$) và thời gian để đạt được nồng độ cực đại trong huyết tương ($T_{\text{cực đại}}$) được đo. Diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết tương-thời gian (AUC) được xác định theo quy tắc hình thang tuyến tính tính đến nồng độ cuối cùng có thể đo được ($\text{AUC}_{\text{cuối}}$) sau đó ngoại suy pha thải trừ cuối cùng đến thời điểm vô cùng ($\text{AUC}_{\text{vô cùng}}$). Hằng số tốc độ thải trừ cuối cùng (k_{el}) được xác định bằng cách phân tích hồi quy các đoạn tuyến tính phía cuối của đường cong

logarit nồng độ-thời gian. Thời gian bán thải pha thải trừ ($T_{1/2}$) được tính theo công thức: $T_{1/2} = 0,693/k_{el}$. Độ sinh khả dụng đường uống (F) được xác định bằng cách lấy AUC (0-24 giờ) sau khi sử dụng theo đường uống chia cho AUC đã được điều chỉnh (0-8 giờ) sau khi sử dụng theo đường tiêm tĩnh mạch (tức là $F = \text{AUC (đường uống)} \times \text{liều lượng (đường tiêm tĩnh mạch)} / \text{AUC (đường tiêm tĩnh mạch)} \times \text{liều lượng (đường uống)}$) và tính theo tỷ lệ phần trăm (%).

Dữ liệu dược động học được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7 Dữ liệu dược động học

Hợp chất	Độ sinh khả dụng, F (%)	AUC đường tiêm tĩnh mạch (ng/mL/phút)	AUC đường uống (ng/mL/phút)	$T_{1/2}$ (giờ)
ABD735	83	1081	8965 ‡	3,8
ABD836	55	2142	5927	5,3
ABD899	50	2133	10740 ‡	10,8
REF001	50	963	4766 ‡	7,2
HMC-C-01-A	89	900	4002	6,2
HMC-C-02-A	39	546	1069	3,2
HMC-C-03-A	55	1427	3910	2,4
HMC-N-01-A	64	740	1408	13,4
HMC-N-02-A	43	3053 †	3303	6,3
HMC-N-03-A	8	5102 †	962	3,1
HMC-N-04-A	66	1279	4203	2,9
HMC-C-01-B	67	1539	5121	5,7
HMC-C-03-B	116	816 *	9432	8,3
HMN-C-04-B	59	1589 *	9360	5,5
HMC-N-01-B	60	2824	8454	9,1
HMC-N-02-B	66	1931	6412	6,0
HMC-N-03-B	84	1380*	11609	7,4
† Liều lượng 2mg/kg đường tiêm tĩnh mạch. *Liều lượng 0,5mg/kg đường tiêm tĩnh mạch. ‡ Liều lượng 10mg/kg đường uống.				

Dữ liệu thử nghiệm này cho thấy hợp chất HMC theo sáng chế có đặc tính dược động học đường uống rất cao tương đương với hợp chất đối chiếu. Do đó, hợp chất theo sáng chế thích hợp để sử dụng theo đường uống.

Thử nghiệm sinh học 6

Đánh giá khả năng ức chế bệnh viêm khớp trên chuột bị gây viêm khớp bằng collagen

Chuột đực DBA/1j, 7 đến 8 tuần tuổi được sử dụng trong toàn bộ các thử nghiệm. Các chuột thử nghiệm được nuôi nhốt theo các nhóm mỗi nhóm gồm 10 con, và duy trì nhiệt độ ở $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với 12 giờ chiếu sáng ban ngày/ban đêm và cho ăn và uống nước

đầy đủ. Tá dược Freund đầy đủ (CFA) được điều chế bằng cách nhũ hóa collagen tít II của bò ở nồng độ 4mg/mL với 4mg/mL hỗn dịch *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra trong tá dược Freund không đầy đủ (IFA) (0,85mL dầu parafin và 0,15mL manua monooleat) theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích). Toàn bộ các chuột được gây miễn dịch bằng cách tiêm dưới da với 200 μ g collagen tít II của bò trong CFA. Sau 21 ngày, toàn bộ các chuột được gây miễn dịch bằng cách tiêm dưới da với 100 μ g collagen tít II của bò trong IFA. Các chuột thử nghiệm bắt đầu xuất hiện các triệu chứng và dấu hiệu của bệnh viêm khớp sau khi tăng cường miễn dịch.

Để đánh giá một cách đầy đủ tình trạng viêm khớp, các dấu hiệu sau được kiểm soát ở mỗi chân của mỗi chuột ba lần một tuần và tính toán để thu được chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp (Arthritic Index - AI) (chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp cực đại cho một chuột bằng 16):

- 0 = không có triệu chứng viêm khớp.
- 1 = phù nề và/hoặc ban đỏ ở 1 ngón chân.
- 2 = phù nề và/hoặc ban đỏ ở 2 ngón chân.
- 3 = phù nề và/hoặc ban đỏ ở nhiều hơn 2 ngón chân.
- 4 = viêm khớp nặng ở toàn bộ chân và các ngón chân.

Các chuột thử nghiệm được chia thành các nhóm điều trị với chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình bằng 2,5, sau đó sử dụng một lần hàng ngày trong 14 ngày với hợp chất bằng cách sử dụng theo đường uống bằng ống thông đối với các hợp chất thử nghiệm, hoặc bằng cách tiêm dưới da ở liều lượng bằng 10mg/kg đối với hợp chất đối chứng dương etanercept. Sau khi kết thúc thử nghiệm, các chuột bị giết.

Dữ liệu thử nghiệm được phân tích bằng cách tính toán chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của mỗi nhóm điều trị. Sau đó, chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình được so sánh với chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp của các chuột đối chứng (không được điều trị) và tính toán tỷ lệ phần trăm ức chế bệnh viêm khớp theo công thức sau.

$$\% \text{ ức chế bệnh} = 100 - \left[\frac{\text{chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của nhóm chuột được điều trị}}{\text{chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của nhóm chuột không được điều trị}} * 100 \right]$$

Dữ liệu thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8 Tỷ lệ phần trăm ức chế bệnh viêm khớp

Hợp chất	Liều lượng (mg/kg/ngày)	Tỷ lệ phần trăm ức chế bệnh viêm khớp
ABD735	10	44
ABD899	10	77
HMC-C-01-A	10	40
HMC-C-01-A	3	60
HMC-C-01-A	1	50
HMC-C-01-A	0,3	60
HMC-N-01-A	10	45
HMC-C-02-A	10	61
HMC-N-02-A	10	36
HMC-C-01-B	10	26
HMC-N-01-B	10→1 (*)	38

(*) Giảm từ 10 xuống 1mg/kg/ngày do có chuột bị chết.

Dữ liệu thử nghiệm của một số hợp chất này được thể hiện trong Fig.1 và Fig.2.

Fig.1 là hình vẽ thể hiện 6 đồ thị mỗi đồ thị thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình dưới dạng hàm số theo thời gian (ngày sử dụng) đối với hợp chất thử nghiệm ở liều lượng 10mg/kg/ngày theo đường uống (hình tròn màu trắng) và hợp chất đối chứng (hình tròn màu đen), trong đó Fig.1A thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-02-A (đồ thị trên cùng bên trái), Fig.1B thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-01-A (đồ thị trên cùng ở giữa), Fig.1C thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-N-02-A (đồ thị trên cùng bên phải), Fig.1D thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-N-01-A (đồ thị phía dưới bên trái), Fig.1E thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-01-B (đồ thị phía dưới ở giữa), Fig.1F thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-N-01-B (đồ thị phía dưới bên phải).

Fig.2 là hình vẽ thể hiện 2 đồ thị mỗi đồ thị thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình dưới dạng hàm số theo thời gian (ngày sử dụng) đối với hợp chất thử nghiệm (hình tròn màu trắng, hình vuông màu trắng), hợp chất đối chứng (hình tròn

màu đen) và hợp chất đối chứng dương etanercept (hình tam giác), trong đó Fig.2A thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất ABD899 ở liều lượng 10mg/kg/ngày (đồ thị bên trái), Fig.2B thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-01-A ở liều lượng 0,3mg/kg/ngày và 3mg/kg/ngày (đồ thị bên phải).

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy hợp chất HMC theo sáng chế có hoạt tính in vivo đường uống rất cao trong việc phòng ngừa sự tiến triển của bệnh viêm khớp nặng.

Ngoài ra, dữ liệu thử nghiệm cũng cho thấy ở liều lượng thấp hoạt tính điều trị của hợp chất HMC-C-01-A cao hơn nhiều so với etanercept. Hoạt tính này là rất ngạc nhiên do HMC-C-01-A không phải là hoạt chất mạnh nhất trong thử nghiệm sinh học 1 hoặc thử nghiệm sinh học 4. Ngoài ra, hoạt tính của HMC-C-01-A là mạnh hơn hợp chất có cùng cấu trúc phân tử HMC-C-01-B, mà có hoạt tính mạnh hơn HMC-C-01-A trong thử nghiệm sinh học 1 và 4, điều này chứng tỏ rằng việc xác định các hợp chất có hiệu lực rất mạnh là rất quan trọng nhưng không dễ dự đoán được.

Thử nghiệm sinh học 7

Liều lượng dung nạp cực đại

Độ an toàn cấp tính của hợp chất này được đánh giá ở chuột để xác định liều lượng dung nạp cực đại (MTD), là chỉ số thể hiện độ an toàn của hợp chất trên động vật. Liều lượng dung nạp cực đại càng cao, thì độ an toàn của hợp chất thử nghiệm càng cao.

Hai chuột đực và hai chuột cái Sprague-Dawley, 8 đến 12 tuần tuổi, được sử dụng với mỗi mức liều tăng dần. Các hợp chất thử nghiệm được sử dụng theo đường uống dưới dạng hỗn dịch được bào chế trong 0,5% carboxymethylxenuloza (CMC)/0,1% Tween-80 ở liều lượng bằng 10mL/kg. Các chuột được cho ăn đầy đủ trong toàn bộ thời gian thử nghiệm.

Các chuột được quan sát ít nhất hai lần trong một giờ đầu sau khi dùng hợp chất thử nghiệm, khoảng 30 phút một lần, sau đó theo các khoảng thời gian còn lại trong ngày trong ít nhất 4 giờ. Ngày tiếp theo, các chuột được quan sát ít nhất một lần vào buổi sáng và một lần vào cuối ngày. Bản chất và mức độ của các dấu hiệu lâm sàng và thời điểm thử nghiệm được ghi lại ở mỗi lần quan sát. Các dấu hiệu quan sát bao gồm các thay đổi ở da, lông, mắt và màng nhầy, và hệ hô hấp, hệ tuần hoàn, hệ thần kinh thực vật và hệ

thần kinh trung ương, cũng như khả năng vận động và trạng thái hành vi. Các dấu hiệu đặc biệt được quan sát bao gồm tình trạng run, co giật, tiết nước bọt, tiêu chảy, ngủ lịm, ngủ, và hôn mê.

Khi kết thúc thử nghiệm, kết quả thử nghiệm được xác định dưới dạng liều lượng dung nạp cực đại của mỗi hợp chất, là liều cao nhất của mỗi hợp chất mà không gây ra độc tính không mong muốn.

Liều lượng cực đại không gây ra các tác dụng không mong muốn được xác định là MTD (được tính theo mg/kg).

Dữ liệu thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9 Liều lượng dung nạp cực đại

Hợp chất	Liều lượng dung nạp cực đại (mg/kg)	
	Chuột cái	Chuột đực
ABD735	20	10
ABD899	30	30
REF001	7,5	10
HMC-C-03-A	30	30
HMC-N-03-A	50	50
HMC-C-01-A ⁽¹⁾	70	70
HMC-C-01-A ⁽²⁾	>500	>500
HMC-N-01-A	80	80
HMC-C-02-A	> 200	> 200
HMC-N-02-A	> 200	> 200
⁽¹⁾ Thử nghiệm trên chuột Sprague Dawley.		
⁽²⁾ Thử nghiệm trên chuột Han Wistar.		

Dữ liệu thử nghiệm này cho thấy hợp chất HMC theo sáng chế có độ an toàn cao hơn rất nhiều so với các hợp chất đối chiếu ABD735, ABD899 và REF001.

Dữ liệu thử nghiệm này cũng cho thấy việc cải thiện độ an toàn cấp tính là rất quan trọng nhưng không dễ dự đoán được và các dữ liệu thử nghiệm thay thế tương tự, ví dụ các dữ liệu thử nghiệm được thực hiện trên REF001 có thể làm giảm độ an toàn cấp tính. Hơn nữa, dữ liệu thử nghiệm này cũng cho thấy hợp chất HMC-C-01A, HMC-C-02-A, HMC-N-01-A, và HMC-N-02-A có độ an toàn rất cao, đặc biệt là HMC-C-01-A.

Do liều lượng dung nạp cực đại của hợp chất HMC theo sáng chế tăng, nên hợp chất này có khoảng liều lượng an toàn rộng hơn các hợp chất đối chứng do đó, hợp chất theo sáng chế thích hợp để sử dụng theo đường uống.

Thử nghiệm sinh học 8

Thử nghiệm gây độc tế bào và gây độc gen GreenScreen HC

GreenScreen HC là thử nghiệm dựa trên tế bào động vật có vú để đánh giá khả năng gây độc tế bào và gây độc gen của hợp chất hóa học và hỗn hợp.

Thuật ngữ “gây độc gen” được dùng trong bản mô tả để chỉ hợp chất có khả năng gây tổn thương vật liệu di truyền (ADN) bên trong tế bào, mà có thể có tác dụng gây đột biến gen, gây ung thư hoặc đột biến ác tính ở người.

Thử nghiệm GreenScreen phân tích các tác nhân có hại gây độc gen theo mức độ gia tăng cường độ huỳnh quang thu được từ dòng đột biến di truyền của dòng tế bào TK6 u nguyên bào lymphô mang gen p53 của người. Trong tế bào đột biến, các trình tự ADN điều hòa mà thúc đẩy quá trình phiên mã gen GADD45a mã hóa biểu hiện protein phát huỳnh quang màu xanh (GFP). GADD45a có vai trò quan trọng đối với tính toàn vẹn của bộ gen, và tác nhân có hại gây độc gen tạo ra quá trình phiên mã nó. Do đó, quá trình tiếp xúc với hợp chất gây độc gen làm tăng biểu hiện GFP, được quan sát theo mức độ gia tăng cường độ huỳnh quang và được kiểm soát bằng cách phát hiện tín hiệu huỳnh quang bằng máy đọc đĩa hoặc máy đếm tế bào theo dòng chảy. Trong thử nghiệm GreenScreen HC, cường độ huỳnh quang được chuẩn hóa theo độ hấp thụ đo được để hiệu chỉnh độ sai lệch về số lượng tế bào do sự giảm khả năng sống sót của tế bào hoặc khả năng gây độc tế bào. Giới hạn có ý nghĩa thống kê đối với kết quả có gây độc tế bào trong thử nghiệm GreenScreen HC bằng 1,5, tức là tỷ lệ gây độc tế bào cao hơn 50% và cao hơn tế bào đối chứng được xử lý bằng dung môi.

Khả năng gây độc tế bào và khả năng gây độc gen được đo trong thử nghiệm GreenScreen và các kết quả đánh giá khả năng gây độc tế bào được sử dụng để chuẩn hóa các kết quả đánh giá khả năng gây độc gen như mô tả nêu trên.

Trong thử nghiệm GreenScreen HC, khả năng sống sót của tế bào được đánh giá bằng thử nghiệm hấp thụ propidium iodđua. Propidium iodđua là tác nhân cài xen và phân tử phát huỳnh quang có thể được sử dụng để nhuộm tế bào. Propidium iodđua thường được sử dụng để định lượng hàm lượng ADN để đánh giá khả năng sống sót của tế bào hoặc hàm lượng ADN trong phân tích chu trình tế bào và có thể được sử dụng để để biệt hóa các tế bào bình thường, tế bào chết theo chương trình và tế bào hoại tử (ví dụ, xem Dengler et al., 1995, Anticancer Drugs, Vol. 6, No. 4, pp. 522-532). Quá trình tiếp

xúc với hợp chất gây độc tế bào làm tăng hấp thu propidium iodđua, được kiểm soát bằng cách đo độ hấp thụ và tỷ lệ thuận với khả năng tăng sinh của tế bào. Hợp chất gây độc tế bào là hợp chất có khả năng làm giảm tỷ lệ sống sót của quần thể tế bào dưới giới hạn có ý nghĩa thống kê bằng 90% so với tế bào đối chứng được xử lý bằng dung môi, ở một hoặc nhiều nồng độ thử nghiệm.

Mỗi hợp chất thử nghiệm được pha loãng liên tiếp đồng thời trên vi đĩa 96-giếng màu đen có để trong suốt. Hợp chất gây độc gen chuẩn (metyl metansulfonat, MMS) được sử dụng làm mẫu đối chứng. Các đĩa này được phân tích sau 24 giờ và 48 giờ bằng máy đọc vi đĩa, được sử dụng để đo độ hấp thụ ánh sáng và cường độ huỳnh quang của tế bào và dung dịch trong các giếng của các vi đĩa.

Ngoài các thử nghiệm đánh giá khả năng sống sót của tế bào và khả năng gây độc gen nêu trên, tác dụng hoạt hóa chuyển hóa cũng được đánh giá trong thử nghiệm này, tức là thử nghiệm GreenScreen HC S9. Để thực hiện thử nghiệm này, tế bào được ủ trong cả sự có mặt và vắng mặt của phân dịch nổi thu được sau khi phá hủy ty lạp thể chiết xuất được từ gan (được gọi là “dịch chiết S9”). S9 thường được sử dụng trong các nghiên cứu đánh giá khả năng gây độc gen để đưa tế bào thử nghiệm vào quá trình chuyển hóa pha I ở động vật có vú. Để đánh giá tác dụng chuyển hóa, hợp chất được ủ với chủng TK6 trong sự có mặt của 1% thể tích/thể tích dịch chiết S9 trong 3 giờ và thu nhận tế bào sau 45 giờ. Sau thời gian thu nhận, tín hiệu huỳnh quang GFP và khả năng sống sót của tế bào (được đánh giá bằng thử nghiệm hấp thu propidium iodđua) được đo bằng máy đếm tế bào theo dòng chảy. Xyclophosphamid thường được sử dụng làm mẫu đối chứng trong các nghiên cứu đánh giá khả năng gây độc gen bằng cách hoạt hóa chuyển hóa, được sử dụng làm mẫu đối chứng dương trong thử nghiệm này. Trong thử nghiệm GreenScreen HC S9, khả năng gây độc gen được đánh giá bằng cách cảm ứng biểu hiện GFP được định lượng bằng mật độ huỳnh quang trung bình của mẫu và khả năng gây độc tế bào được đánh giá bằng thử nghiệm hấp thu propidium iodđua nêu trên. Giới hạn có ý nghĩa thống kê đối với kết quả có gây độc gen bằng 1,3, tức là tỷ lệ gây độc gen cao hơn 30% và cao hơn tế bào đối chứng được xử lý bằng dung môi và kết quả thử nghiệm được ghi dưới dạng có gây độc gen hoặc không gây độc gen. Hợp chất gây độc tế bào là hợp chất có khả năng làm giảm tỷ lệ sống sót của quần thể tế bào dưới giới hạn có ý nghĩa thống kê bằng 90% so với tế bào đối chứng được xử lý bằng dung môi, ở một hoặc nhiều nồng độ thử nghiệm.

Dòng tế bào chỉ thị được chuyển gen ổn định thu được từ dòng tế bào TK6 u nguyên bào lymphô mang gen p53 của người. Dòng tế bào chỉ thị này mang plasmit sao chép episom chứa vùng khởi đầu nằm trước và các trình tự điều hòa khác của gen GADD45a của người được liên kết với gen mã hóa protein phát huỳnh quang màu xanh đã tối ưu hóa ở người (Green Fluorescent Protein - GFP). Dòng tế bào đối chứng cũng mang plasmit tương tự chỉ khác là 4 cặp bazơ nitơ ở vị trí khởi đầu của gen EGFP đã được loại bỏ, để không tạo ra GFP. Cả hai plasmit này cũng mang gen kháng hygromycin B cho dòng tế bào này, cho phép tiếp tục chọn lọc sự có mặt của plasmit (200µg/mL hygromycin B; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Cả hai dòng tế bào này được nuôi cấy trong môi trường đầy đủ (RPMI 1640 chứa Glutamax™ và 25mM axit N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-etansulfonic (Invitrogen Corporation) được bổ sung 10% (thể tích/thể tích) huyết thanh ngựa được bất hoạt bằng nhiệt (Lonza Wokingham Ltd, Wokingham, UK), 10mM natri pyruvat (Invitrogen Corporation) và 5000U/ml penicilin G natri và 5000µg/ml streptomycin sulphat (Invitrogen Corporation)) ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ trong điều kiện khí ẩm.

Mỗi đĩa thử nghiệm được thiết kế để đánh giá mỗi hợp chất thử nghiệm trong 9 dung dịch pha loãng 2 lần liên tiếp, với cả dòng tế bào chỉ thị lẫn dòng tế bào đối chứng chứa đột biến di truyền tương tự như dòng tế bào thử nghiệm, nhưng không sản sinh GFP do 4 cặp bazơ nitơ ở trình tự khởi đầu của gen GFP chèn vào đã được loại bỏ. Quá trình tiếp xúc được thực hiện trong 48 giờ trong các vi đĩa vô trùng 96-giếng đáy bằng trong suốt thành đĩa màu đen làm bằng polystyren. Hai giếng giống nhau chứa methyl metansulfonat ở cả nồng độ cao (50µg/mL) lẫn nồng độ thấp (10µg/mL) được sử dụng làm các mẫu đối chứng dương để xử lý dữ liệu. Các giếng đối chứng còn lại chứa tế bào được xử lý bằng dung môi (1% thể tích/thể tích DMSO) là mẫu đối chứng âm, môi trường thử nghiệm để kiểm tra riêng tạp chất, và hợp chất thử nghiệm với môi trường thử nghiệm để xác định chất phát huỳnh quang và/hoặc chất hấp thụ quang học có sẵn do phản ứng tạo màu hoặc kết tủa.

Các màng thông khí (BreathEasy, Diversified Biotech, USA) được đặt lên các vi đĩa trước khi lắc mạnh (20 giây). Sau đó, các đĩa này được ủ ở trạng thái tĩnh trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ trong điều kiện khí ẩm. Sau 48 giờ, các vi đĩa này được lắc mạnh trong 10 giây để hỗn dịch hóa lại tế bào trước khi thu thập dữ liệu quang phổ. Dữ liệu huỳnh quang được chuẩn hóa theo dữ liệu độ hấp thụ để thu được trị số "độ sáng" so

với trị số trung bình của các tế bào đối chứng được xử lý bằng dung môi và vẽ đồ thị theo nồng độ hợp chất thử nghiệm. Độ sáng tăng $\geq 50\%$ được phân loại là kết quả có gây độc gen: điều này phản ánh sự gia tăng gấp ba lần độ lệch chuẩn về dữ liệu huỳnh quang thu được từ các tế bào được xử lý bằng dung môi và các tế bào được xử lý không gây độc gen. Dữ liệu độ hấp thụ được chuẩn hóa theo tế bào đối chứng được xử lý bằng dung môi và vẽ đồ thị dưới dạng khả năng gây độc tế bào. Khả năng gây độc tế bào bằng 90% thể hiện sự suy giảm đáng kể về số lượng tế bào có ý nghĩa thống kê và được xác định là tác dụng gây độc ức chế sinh trưởng.

Dữ liệu thu được từ các vi đĩa thử nghiệm GreenScreen HC, bằng cách sử dụng vi đĩa được phân tích tự động bằng phần mềm GreenScreen HC để thu được kết quả nghiên cứu theo các thông số sau: nồng độ hữu hiệu cực tiểu (LEC) tạo ra các kết quả dương tính trong thử nghiệm loại trừ propidium iodide (tức làm giảm khả năng sống sót của tế bào) sau 24 giờ và 48 giờ trong sự có mặt hoặc vắng mặt của dịch chiết S9; không gây độc hoặc có gây độc gen.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10 Khả năng gây độc tế bào và gây độc gen

Hợp chất	Khả năng gây độc tế bào, LEC (μM)			Khả năng gây độc gen
	24 giờ	48 giờ, -S9	48 giờ, +S9	
ABD735	0,31	0,31	5	Không gây độc
ABD836	0,04	0,01	40	Có gây độc
ABD899 (1)	< 0,001	< 0,001	0,32	Có gây độc
ABD899 (2)	0,64	0,08	81,9	Không gây độc
ABD900	0,29	0,07	74,1	Không gây độc
REF001	0,039	0,039	0,63	Có gây độc
HMC-C-01-A	0,47	0,12	60	Không gây độc
HMC-C-02-A	> 1000	60	120	Không gây độc
HMC-C-03-A	0,24	0,06	15	Không gây độc
HMC-N-01-A	0,94	0,12	60	Không gây độc
HMC-N-02-A	0,94	0,47	120	Không gây độc
HMC-N-03-A	0,94	0,24	30	Không gây độc
HMC-N-04-A	0,47	0,12	30	Không gây độc
HMC-C-01-B	0,08	0,005	4,82	Không gây độc
HMC-C-03-B	0,17	0,08	10,8	Có gây độc
HMC-N-01-B	0,01	0,05	5,85	Không gây độc
HMC-N-02-B	0,04	0,01	10,2	Không gây độc

(1) Hợp chất được thử nghiệm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1,3mM đến 0,3 pM trong quy mô phòng thí nghiệm.

(2) Hợp chất được thử nghiệm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 164 μM đến 0,003 μM trên quy mô vừa.

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy hợp chất HMC theo sáng chế có khả năng gây độc tế bào và gây độc gen được cải thiện hoặc ít nhất tương đương với hợp chất đối chiếu và cao hơn ABD836 và REF001.

Dữ liệu thử nghiệm này cũng cho thấy các thay đổi cần có để cải thiện khả năng gây độc tế bào hoặc gây độc gen là rất quan trọng nhưng không dễ dự đoán được. Điều này được thể hiện rõ bởi đặc tính của hợp chất có cùng cấu trúc phân tử ABD836 và HMC-N-02-A.

Ngoài ra, dữ liệu thử nghiệm cũng cho thấy ngoài khả năng gây độc tế bào thì hợp chất HMC-C-02-A, HMC-C-01-A, HMC-N-02-A, và HMC-N-01-A cũng có độ an toàn rất cao.

Thử nghiệm sinh học 9

Đánh giá hoạt tính ức chế kênh ion hERG

Sự ức chế kênh ion mã hóa bởi gen liên quan đến trạng thái run chân do gây mê bằng ete của người (hERG - human Ether-à-go-go-Related Gene) điều hòa dòng IKr tái phân cực trong thế điện động của tim, nhờ đó góp phần tạo ra cường độ dòng điện để điều hòa nhịp tim. Khi khả năng của hERG để dẫn dòng điện qua màng tế bào bị ức chế hoặc suy giảm sẽ gây ra rối loạn có nguy cơ tử vong cao được gọi là hội chứng QT kéo dài. Sự liên quan giữa hERG và hội chứng QT kéo dài có ức chế hERG là vấn đề quan trọng cần phải tránh trong phát triển thuốc mới.

Hoạt tính ức chế kênh ion hERG của hợp chất theo sáng chế được đánh giá. Thử nghiệm này được thực hiện bằng kẹp điện thế tự động, phương pháp kẹp điện thế Q sử dụng tế bào trứng chuột đất vàng Trung quốc đã chuyển gen ổn định (hERG-CHO). Tế bào hERG-CHO được nuôi cấy môi trường dinh dưỡng hỗn hợp F-12 Kaighn (Invitrogen) +10% FBS ở nhiệt độ 37°C trong 1 đến 3 ngày. Tế bào được giữ ở nhiệt độ 30°C trong 24 đến 48 giờ trước khi kẹp điện thế để làm tăng biên độ dòng hERG, sau đó tế bào được thu bằng trypsin, và giữ trong môi trường không chứa huyết thanh (SFM) trong giai đoạn chuẩn bị tế bào kẹp điện thế Q trong thời gian lên đến 6 giờ ở nhiệt độ phòng trước khi rửa và tạo hỗn dịch lại trong dung dịch ngoại bào và đưa vào các vị trí kẹp điện thế để ghi dữ liệu.

Quy trình kẹp điện thế: Sau khi tế bào phát triển đến hình dạng đầy đủ, tế bào được giữ ở -80 mV. Xung 50 phần nghìn giây đến -40 mV được phân phối để đo dòng thoát ra, được trừ trực tiếp từ dòng đoạn cuối. Sau đó, tế bào được khử phân cực bằng +20 mV trong 2 giây, sau đó bằng một giây với -40 mV để hiển thị dòng hERG đoạn cuối. Mô hình này được thực hiện 5 giây một lần để kiểm soát biên độ dòng.

Dung dịch ngoại bào: 137mM NaCl, 4mM KCl, 1,8mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10mM D(+)-glucoza, 10mM dung dịch đệm HePES (độ pH được điều chỉnh đến pH = 7,4 bằng NaOH).

Sau khi tế bào phát triển đến hình dạng đầy đủ, dung dịch ngoại bào (đối chứng) được đưa vào trước tiên và tế bào được làm ổn định trong 2 phút trong dung dịch ngoại bào. Sau đó, hợp chất thử nghiệm được đưa vào ở nồng độ tích lũy từ nồng độ thấp đến nồng độ cao. Tế bào được ủ với mỗi nồng độ thử nghiệm trong 5 phút. Trong mỗi quá trình ủ, tế bào được kích thích lặp đi lặp lại bằng quy trình kẹp điện thế mô tả nêu trên, và biên độ dòng đoạn cuối được kiểm soát liên tục.

Tiêu chuẩn đánh giá:

- (1) Dòng đoạn cuối cực đại >100 pA ở hợp chất đối chứng.
- (2) Dòng quan sát ban đầu < 30% và dòng quan sát dừng trước khi bổ sung lần đầu hợp chất thử nghiệm.
- (3) Dòng thoát ra < 50% dòng đoạn cuối cực đại của hợp chất đối chứng ở thời điểm bất kỳ.
- (4) $r_s < 20 \text{ M}\Omega$ trong toàn bộ thời gian thử nghiệm.

Mức độ ức chế (%) được tính toán bằng cách đo biên độ dòng đoạn cuối, được tạo ra bởi xung thử nghiệm một giây với -40 mV sau xung hai giây với +20 mV, trước và sau khi ủ với hợp chất thử nghiệm. Sự khác biệt về cường độ dòng điện được chuẩn hóa theo mẫu đối chứng và nhân với 100 để thu được tỷ lệ phần trăm ức chế.

Đường cong đáp ứng nồng độ (log) được tính toán theo phương trình hồi quy (3 thông số giả sử rằng phong bế hoàn toàn dòng điện ở nồng độ hợp chất thử nghiệm tối đa) để ước lượng nồng độ ức chế 50% (IC_{50}). Mối tương quan giữa đáp ứng và nồng độ của mỗi hợp chất được xác định từ tỷ lệ phần trăm giảm biên độ dòng tạo ra bởi các nồng độ pha loãng liên tiếp.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 11.

Bảng 11 Tỷ lệ phần trăm ức chế kênh ion hERG

Hợp chất	IC ₅₀ (μM) ⁽¹⁾	Tỷ lệ phần trăm ức chế kênh ion hERG 30μM
ABD599	4,9	85
ABD735	-	62,5
ABD836	-	50
ABD899	2,9	100 ⁽²⁾
ABD899		53 ⁽³⁾
ABD900		51
REF001	-	60
HMC-C-01-A	19,3	79
HMC-C-02-A	25	57
HMC-C-03-A	> 30	45
HMC-C-04-A		69
HMC-N-01-A	183	2
HMC-N-02-A	231	31
HMC-N-03-A	> 30	13
HMC-N-04-A	> 30	26
HMC-C-01-B		74
HMC-C-02-B		94
HMC-C-03-B		36
HMC-N-01-B		27
HMC-N-02-B		23
HMC-N-03-B		47
HMC-N-04-B		60

⁽¹⁾ IC₅₀ được tính toán tự động theo phương trình 4 thông số bằng phần mềm Grafit phiên bản 6.0.12 (Erithacus Software Ltd., do Dr Robin Leatherbarrow thiết kế).

⁽²⁾ Hợp chất được đánh giá trên quy mô phòng thí nghiệm.

⁽³⁾ Hợp chất được đánh giá trên quy mô vừa.

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy hợp chất HMC theo sáng chế an toàn cho hệ tim mạch thích hợp để sử dụng theo đường uống, và có độ an toàn cao hơn so với các hợp chất đối chiếu, như ABD599 và ABD899, đặc biệt hợp chất HMC-N-01-A, HMC-N-02-A và HMC-N-03-A có độ an toàn rất cao.

Thử nghiệm sinh học 10

Thử nghiệm trên bạch cầu sơ cấp của người

Hệ miễn dịch của người bao gồm nhiều tế bào và cơ quan có thể bị ảnh hưởng tiêu cực bởi dược chất hoặc hóa chất. Điều này dẫn đến làm tăng tính nhạy cảm với bệnh lây nhiễm, khối u, phản ứng dị ứng, phản ứng tự miễn hoặc các bệnh khác thuộc hệ miễn dịch. Do đó, việc đánh giá độc tính miễn dịch là quan trọng trong đánh giá độ an toàn của hoạt chất, và kiểm chứng các đặc tính ưu việt của dược chất chống viêm có hoạt tính mạnh mà tác dụng thông qua điều hòa hệ miễn dịch một cách chọn lọc trên một số tế bào

hệ miễn dịch mà không ảnh hưởng đến các tế bào khác, do đó tránh được hoạt hóa hoặc ức chế miễn dịch. Ví dụ, dược chất có tác dụng làm giảm khả năng sống sót hoặc hoạt tính của bạch cầu đơn nhân mà không ảnh hưởng đến bạch cầu trung tính cần có có đặc tính chống viêm trong một số bệnh mà không ảnh hưởng đến khả năng đáp ứng của người bệnh, và ly giải ổ nhiễm khuẩn.

Khả năng của hợp chất đối chiếu (ABD735) ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tế bào bạch cầu của người được đánh giá bằng cách sử dụng tế bào có nguồn gốc từ máu người. Tác dụng của hợp chất đối chiếu (ABD735) được đánh giá trên các loại tế bào bạch cầu sau của người: bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân, lymphô bào B, và lymphô bào T, bao gồm cả loại lymphô bào T biểu hiện CD4 (tế bào hỗ trợ T) lẫn lymphô bào T biểu hiện CD8 (tế bào gây độc T). Mỗi loại tế bào này có chức năng khác nhau ở hệ miễn dịch của người.

Bạch cầu trung tính cũng được gọi là bạch cầu hạt. Bạch cầu hạt là tế bào bạch cầu có nhiều nhất ở người và là một thành phần của hệ miễn dịch bẩm sinh. Bạch cầu trung tính đóng vai trò là tác nhân đáp ứng miễn dịch nguyên phát với giai đoạn viêm cấp tính do nhiễm khuẩn.

Bạch cầu đơn nhân là một thành phần của hệ miễn dịch bẩm sinh được tìm thấy trong hệ tuần hoàn. Bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi biệt hóa để tạo thành đại thực bào, là tiền chất của một số tế bào tham gia điều hòa đáp ứng miễn dịch, bao gồm tế bào đuôi gai. Chức năng cơ bản của bạch cầu đơn nhân-đại thực bào đóng vai trò là tế bào đáp ứng miễn dịch. Bạch cầu đơn nhân tham gia nhiều vào cơ chế bệnh sinh của nhiều tình trạng viêm mãn tính bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp và bệnh xơ cứng rải rác.

Lymphô bào T là một thành phần của hệ miễn dịch thu được và đóng vai trò quan trọng trong miễn dịch. Có nhiều loại lymphô bào T, mỗi loại có chức năng khác nhau trong hệ miễn dịch. Lymphô bào T gây độc tế bào cũng được gọi là tế bào T biểu hiện CD8 do sự có mặt của phân tử được gọi là CD8 trên bề mặt của nó. Vai trò của tế bào T biểu hiện CD8 là phá hủy tế bào bị lây nhiễm và tế bào khối u, nhưng trong các tình trạng viêm, tế bào T biểu hiện CD8 có thể là tác nhân làm trầm trọng thêm bệnh. Lymphô bào hỗ trợ T cũng được gọi là tế bào T biểu hiện CD4 do sự có mặt của phân tử được gọi là CD4 trên bề mặt của nó. Chức năng của tế bào hỗ trợ T là để hỗ trợ trong việc trưởng thành lymphô bào B và hoạt hóa tế bào gây độc T.

Lymphô bào B là một thành phần của hệ miễn dịch thu được. Chức năng cơ bản của lymphô bào B là để sản sinh kháng thể và đóng vai trò là tế bào nhận diện kháng nguyên, điều này cho phép lymphô bào T nhận diện được các kháng nguyên lạ.

Tác dụng của hợp chất đối chiếu (ABD735) đến khả năng sống sót của bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân, tế bào T biểu hiện CD4 và tế bào T biểu hiện CD8 và lymphô bào B được đánh giá trong cả điều kiện không có đáp ứng miễn dịch và điều kiện kích thích miễn dịch. Điều kiện không có đáp ứng miễn dịch được sử dụng để đánh giá tác dụng tương tự đến tế bào thường được tìm thấy trong máu người, và điều kiện kích thích miễn dịch được sử dụng để đánh giá tác dụng của hợp chất này trong các tình trạng bệnh.

Tác dụng của hợp chất đối chiếu (ABD735) đến khả năng sống sót của tế bào được đánh giá bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy là kỹ thuật laze sinh lý học được sử dụng để đếm tế bào, sàng lọc tế bào, và phát hiện chỉ thị sinh học, bằng cách hỗn dịch hóa tế bào trong dòng chất lỏng và cho chảy qua thiết bị phát hiện điện tử. Thiết bị này cho phép phân tích đồng thời nhiều thông số về đặc tính vật lý và hóa học lên đến hàng ngàn hạt tế bào mỗi giây. Quá trình sàng lọc tế bào bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy cần sử dụng chỉ thị đặc hiệu tế bào. Để định lượng số lượng tế bào, hạt đếm được sử dụng làm chuẩn nội. Hạt đếm là các vi hạt hỗn dịch đã hiệu chuẩn chứa vi hạt được bổ sung vào thể tích mẫu đã biết đến thể tích mẫu/hạt đã biết. Điều này cho phép xác định chính xác số lượng tế bào trong mẫu. Ngoài ra, đối với lymphô bào B và lymphô bào T, khả năng tăng sinh của tế bào được đo bằng chất màu đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào (eFluor® 450). eFluor® 450 là chất màu hữu cơ có thể được liên hợp với chỉ thị đặc hiệu tế bào. eFluor® 450 phát huỳnh quang khi được kích thích bằng tia laze tỷ lệ thuận với số lượng tế bào được liên kết bởi phức chất này. Do đó, tín hiệu huỳnh quang của eFluor® 450 sẽ thể hiện khả năng tăng sinh của loại tế bào đặc hiệu.

Phân lập bạch cầu trung tính và đánh giá tác dụng của hợp chất đối chiếu (ABD735) đến khả năng sống sót của tế bào này

Bạch cầu trung tính được phân lập từ máu của người tình nguyện khỏe mạnh bằng phương pháp gradien tỷ trọng hai bước Histopaque® 1077 và Histopaque® 1119. Tế bào đa nhân được rửa trong môi trường RPMI được bổ sung kháng sinh (penicilin 100U/mL,

streptomycin 100 μ g/mL) và hỗn dịch lại ở mật độ 2×10^6 tế bào/mL trong môi trường RPMI được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FCS) và kháng sinh (penicilin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/mL). Sau đó, 50 μ L hỗn dịch tế bào được bổ sung vào đĩa 96 giếng, có hoặc không có hợp chất đối chiếu (ABD735) (ở 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, hoặc 0,3 μ M) hoặc hợp chất đối chứng (0,3% DMSO), chứa hoặc không chứa dexamethason (1 μ M) và ủ ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂ trong 24 giờ. Sau khi ủ, tế bào được cố định và lượng chính xác hạt đếm được bổ sung vào mỗi ống để xác định số lượng tế bào sống.

Phân lập bạch cầu đơn nhân và đánh giá tác dụng của hợp chất đối chiếu (ABD735) đến khả năng sống sót của tế bào này

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân lập từ máu của người tình nguyện nam giới khỏe mạnh và phân tách bằng các ly tâm trên tấm Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). Sau đó, tế bào được hỗn dịch hóa lại (3×10^6 tế bào/mL) trong môi trường RPMI được bổ sung 10% FCS và kháng sinh (penicilin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/mL) và 1mL hỗn dịch tế bào được bổ sung vào đĩa 48 giếng, sau đó ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂, sau đó phần dịch nổi được hút ra để loại bỏ các tế bào không bám dính, which was, sau đó bằng hai bước rửa để đảm bảo loại bỏ hoàn toàn các tế bào không bám dính. Sau đó, tế bào bám dính (bạch cầu đơn nhân) được kích thích bằng LPS (10ng/mL), TNF α (10ng/mL) hoặc yếu tố kích thích sản sinh đại thực bào (M-CSF) (10ng/mL) trong sự vắng mặt của hợp chất đối chứng hoặc trong sự có mặt của hợp chất đối chiếu (ABD735) (ở 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, hoặc 0,3 μ M) trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂, sau đó các đĩa này được ly tâm và bạch cầu đơn nhân được rửa trong PBS trước khi bổ sung PBS cộng với EDTA (10mM) và ủ ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút để hỗ trợ phân tách tế bào, với sự hỗ trợ của pipet. Bạch cầu đơn nhân được bổ sung vào ống Falcon và rửa bằng cách ly tâm với PBS trước khi lượng chính xác hạt đếm được bổ sung vào mỗi ống để xác định số lượng tế bào sống.

Phân lập lymphô bào B và đánh giá tác dụng của hợp chất đối chiếu (ABD735) đến khả năng sống sót của tế bào này

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân lập từ máu của người tình nguyện nữ giới khỏe mạnh và phân tách bằng các ly tâm trên tấm Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). Sau đó, tế bào được hỗn dịch hóa lại trong môi trường RPMI được bổ sung 10% FCS và

kháng sinh (penicilin 100 U/mL, streptomycin 100µg/mL). Hỗn dịch tế bào được bổ sung vào đĩa 96 giếng có hoặc không có hợp chất đối chiếu (ABD735) (ở 30µM, 10µM, 3µM, 1µM, hoặc 0,3µM) hoặc hợp chất đối chứng (0,3% DMSO) có hoặc không có *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) và interleukin-2 (SAC/IL-2) (1:10,000 và 2ng/mL) và ủ ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂ trong 48 giờ. Sau khi ủ, tế bào được nhuộm với kháng thể kháng CD19 của người trước khi lượng chính xác hạt đếm được bổ sung vào mỗi ống để xác định số lượng tế bào sống.

Phân lập lymphô bào B và đánh giá tác dụng của hợp chất đối chiếu (ABD735) đến khả năng tăng sinh của tế bào này

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân lập từ máu của người tình nguyện nữ giới khỏe mạnh và phân tách bằng các ly tâm trên tấm Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). Sau đó, tế bào được nhuộm với chất màu đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào (eFluor® 450) vào hỗn dịch hóa lại trong môi trường RPMI được bổ sung 10% FCS và kháng sinh (penicilin 100 U/mL, streptomycin 100µg/mL). Hỗn dịch tế bào được bổ sung vào đĩa 96 giếng có hoặc không có hợp chất đối chiếu (ABD735) (ở 30µM, 10µM, 3µM, 1µM, hoặc 0,3µM) hoặc hợp chất đối chứng (0,3% DMSO) có hoặc không có *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) và interleukin-2 (SAC/IL-2) (1:10,000 và 2ng/mL) và ủ ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂ trong 5 ngày. Sau khi ủ, tế bào được nhuộm với kháng thể kháng CD19 của người, chất chỉ thị lymphô bào B, trước khi phân tích bằng máy đếm tế bào theo dòng chảy. Tế bào có e450 thấp được coi là tế bào có khả năng tăng sinh.

Phân lập lymphô bào T và đánh giá tác dụng của hợp chất đối chiếu (ABD735) đến khả năng sống sót của tế bào này

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân lập từ máu của người tình nguyện nữ giới khỏe mạnh và phân tách bằng các ly tâm trên tấm Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). Sau đó, tế bào được hỗn dịch hóa lại ở mật độ 2×10^6 tế bào/mL trong môi trường RPMI được bổ sung 10% FCS và kháng sinh (penicilin 100 U/mL, streptomycin 100µg/mL). Hỗn dịch tế bào được bổ sung vào đĩa 96 giếng có hoặc không có hợp chất đối chiếu (ABD735) (ở 30µM, 10µM, 3µM, 1µM, hoặc 0,3µM) hoặc hợp chất đối chứng (0,3% DMSO) chứa hoặc không chứa phytohaemagglutinin (PHA, 5µg/mL) và ủ ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂ trong 48 giờ. Sau khi ủ, tế bào được nhuộm với kháng thể kháng CD8

hoặc kháng thể kháng CD4 của người trước khi lượng chính xác hạt đếm được bổ sung vào mỗi ống để xác định số lượng tế bào sống.

Phân lập lymphô bào B và đánh giá tác dụng của hợp chất đối chiếu (ABD735) đến khả năng tăng sinh của tế bào này

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân lập từ máu của người tình nguyện nữ giới khỏe mạnh và phân tách bằng các ly tâm trên tấm Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). Tế bào được nhuộm với chất màu đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào (eFluor® 450) vào hỗn dịch hóa lại trong môi trường RPMI được bổ sung 10% FCS và kháng sinh (penicilin 100 U/mL, streptomycin 100µg/mL). Hỗn dịch tế bào được bổ sung vào đĩa 96 giếng có hoặc không có hợp chất đối chiếu (ABD735) (ở 30µM, 10µM, 3µM, 1µM, hoặc 0,3µM) hoặc hợp chất đối chứng (0,3% DMSO) chứa hoặc không chứa phytohaemagglutinin (PHA, 5µg/mL) và ủ ở nhiệt độ 37°C/5% CO₂ trong 5 ngày. Sau khi ủ, tế bào được nhuộm với kháng thể kháng CD8 hoặc kháng thể kháng CD4 của người trước khi phân tích bằng máy đếm tế bào theo dòng chảy. Tế bào có e450 thấp được coi là tế bào có khả năng tăng sinh.

Kết quả trung bình (n = 3) của hợp chất đối chiếu (ABD735) được tính theo tỷ lệ thay đổi khả năng sống sót so với trị số trung bình của hợp chất đối chứng. Sau đó dữ liệu được vẽ đồ thị bằng phần mềm Grafit do Erithacus cung cấp. Mỗi thử nghiệm được lặp lại ba lần và dữ liệu thử nghiệm là trị số trung bình của toàn bộ các thử nghiệm.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 12 và Bảng 13.

Bảng 12 Khả năng sống sót của tế bào trong sự có mặt của ABD735 (3µM)

Tế bào	Hợp chất kích thích	Tỷ lệ thay đổi về khả năng sống sót
Bạch cầu trung tính	-	1,0
	Dexamethason	0,8
Lymphô bào B	-	0,9
	SAC/IL-2	1,1
Lymphô bào T biểu hiện CD4	-	0,9
	phytohaemagglutinin	0,6
Lymphô bào T biểu hiện CD8	-	0,8
	phytohaemagglutinin	0,7
Bạch cầu đơn nhân	-	0,7
	M-CSF	1,1
	LPS	1,0
	TNFα	0,5

Bảng 13 Khả năng tăng sinh của tế bào trong sự có mặt của ABD735 (3µM)

Loại tế bào	Hợp chất kích thích	Tỷ lệ thay đổi về khả năng tăng sinh
Lymphô bào B	-	0,9
	SAC/IL-2	0,6
Lymphô bào T biểu hiện CD4	-	1
	phytohaemagglutinin	0,6
Lymphô bào T biểu hiện CD8	-	0,7
	phytohaemagglutinin	0,3

Kết quả thu được ở một nồng độ cao duy nhất ($3\mu\text{M}$) của hợp chất đối chiếu (ABD735) đối với các loại tế bào bạch cầu được thể hiện ở trên. Trong thử nghiệm này, tỷ lệ thay đổi về khả năng sống sót bằng 0,5 hoặc thấp hơn thì hợp chất này làm giảm đáng kể khả năng sống sót của tế bào, và tỷ lệ thay đổi về khả năng tăng sinh bằng 0,6 hoặc thấp hơn thì hợp chất này làm giảm đáng kể khả năng tăng sinh của tế bào.

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy hợp chất đối chiếu (ABD735) làm giảm một cách có chọn lọc khả năng sống sót của bạch cầu đơn nhân khi chỉ có mặt $\text{TNF}\alpha$, và không làm giảm một cách có chọn lọc khả năng sống sót của bạch cầu đơn nhân khi có mặt M-CSF hoặc LPS. Ngoài ra, hợp chất đối chiếu (ABD735) có ảnh hưởng rất thấp đến khả năng sống sót của các tế bào bạch cầu khác, điều này cho thấy rằng các hợp chất có cùng cấu trúc phân tử với ABD735 nói chung không ức chế miễn dịch. Hợp chất đối chiếu (ABD735) cũng có tác dụng làm giảm khả năng tăng sinh của lymphô bào, với các tác dụng rất mạnh quan sát được ở lymphô bào T biểu hiện CD8 được kích thích miễn dịch. Cơ chế làm giảm một cách có chọn lọc khả năng tăng sinh của một số lymphô bào như vậy là cơ chế rất hữu hiệu để điều trị các bệnh viêm như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh Crohn, và bệnh xơ cứng rải rác, cũng như để điều trị các bệnh bạch cầu bao gồm: bệnh u lymphô bào T, như bệnh u lymphô bào T ngoài hạch, bệnh u lymphô bào T ở da, bệnh u lymphô tế bào lớn thoái biến, và bệnh u lymphô bào T ung thư hạch; bệnh u lymphô bào B, như bệnh u lymphô Hodgkin và bệnh u lymphô không Hodgkin, bao gồm bệnh u lymphô bào B lớn lan tỏa, bệnh u lymphô thể nang, bệnh u lymphô mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc, bệnh u lymphô tế bào nhỏ, bệnh u lymphô tế bào vỏ, và bệnh u lymphô Burkitt; và các bệnh bạch cầu khác, như bệnh bạch cầu lymphô bào mãn tính và bệnh đa u tủy xương.

Thử nghiệm sinh học 11

Đánh giá khả năng ức chế bệnh viêm khớp trên chuột bị gây viêm khớp bằng pristan

Chuột cái Lewis được sử dụng trong toàn bộ các thử nghiệm. Các chuột thử nghiệm được nuôi nhốt theo các nhóm mỗi nhóm gồm 5 con, và duy trì nhiệt độ ở $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với 12 giờ chiếu sáng ban ngày/ban đêm và cho ăn và uống nước đầy đủ. Các chuột được gây bệnh viêm khớp bằng cách tiêm qua da ở hốc đuôi 0,3 mL pristan. Các chuột thử nghiệm bắt đầu xuất hiện các triệu chứng và dấu hiệu của bệnh viêm khớp sau khoảng 7 ngày tiêm pristan.

Để đánh giá một cách đầy đủ tình trạng viêm khớp, các dấu hiệu sau được kiểm soát ở mỗi chân của mỗi chuột ba lần một tuần và tính toán để thu được chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp (AI) (chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp cực đại cho một chuột bằng 16):

0 = không có triệu chứng viêm khớp.

1 = phù nề và/hoặc ban đỏ ở 1 ngón chân.

2 = phù nề và/hoặc ban đỏ ở 2 ngón chân.

3 = phù nề và/hoặc ban đỏ ở nhiều hơn 2 ngón chân.

4 = viêm khớp nặng ở toàn bộ chân và các ngón chân bao gồm biến dạng bàn chân và cứng khớp.

Các chuột thử nghiệm được chia thành các nhóm điều trị trước khi sử dụng pristan và sử dụng một lần hàng ngày trong 28 ngày với hợp chất thử nghiệm ở liều lượng bằng 3 và 10mg/kg/ngày theo đường uống, hoặc bằng cách tiêm màng bụng ở liều lượng bằng 0,05mg/kg đối với hợp chất đối chứng dương methotrexat. Sau khi kết thúc thử nghiệm, các chuột bị giết chết.

Dữ liệu thử nghiệm được phân tích bằng tính toán chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của mỗi nhóm điều trị. Sau đó, chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình được so sánh với chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp của nhóm chuột đối chứng (không được điều trị) và tính toán tỷ lệ phần trăm ức chế bệnh theo công thức sau.

$$\% \text{ ức chế bệnh} = 100 - \left[\frac{\text{chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của nhóm chuột được điều trị}}{\text{chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của nhóm chuột không được điều trị}} \times 100 \right]$$

Dữ liệu thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 14.

Bảng 14 Tỷ lệ phần trăm ức chế bệnh viêm khớp

Hợp chất	Liều lượng (mg/kg/ngày)	Tỷ lệ phần trăm ức chế bệnh viêm khớp
ABD899	3	21
ABD899	10	ND ⁽¹⁾
HMC-C-01-A	3	40
HMC-C-01-A	10	67
HMC-N-01-A	3	39
HMC-N-01-A	10	60

⁽¹⁾ Thử nghiệm được kết thúc vào ngày thứ 10 do xuất hiện tác dụng không mong muốn.

Dữ liệu thử nghiệm của một số hợp chất này được thể hiện trên Fig.3.

Fig.3 là hình vẽ thể hiện 6 đồ thị mỗi đồ thị thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình dưới dạng hàm số theo thời gian (ngày sử dụng) đối với hợp chất thử nghiệm (hình tròn màu trắng), hợp chất đối chứng (hình tròn màu đen), và hợp chất đối chứng dương methotrexat (hình tam giác) trong đó Fig.3A thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất ABD899 ở liều lượng bằng 3mg/kg/ngày (đồ thị trên cùng bên trái), Fig.3B thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-01-A ở liều lượng bằng 3mg/kg/ngày (đồ thị trên cùng ở giữa), Fig.3C thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-N-01-A ở liều lượng bằng 3mg/kg/ngày (đồ thị trên cùng bên phải), Fig.3D thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất ABD899 ở liều lượng bằng 10mg/kg/ngày (đồ thị phía dưới bên trái), Fig.3E thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-C-01-A ở liều lượng bằng 10mg/kg/ngày (đồ thị phía dưới ở giữa), và Fig.3F thể hiện chỉ số đánh giá tình trạng viêm khớp trung bình của hợp chất HMC-N-01-A ở liều lượng bằng 10mg/kg/ngày (đồ thị phía dưới bên phải).

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy hợp chất HMC theo sáng chế có hoạt tính in vivo đường uống rất cao trong phòng ngừa tiến triển bệnh viêm khớp gây ra bởi pristan, trong khi đó hợp chất ABD899 có hiệu lực điều trị bệnh thấp trong mô hình này, mặc dù có hoạt tính mạnh trong thử nghiệm sinh học 6. Ngoài ra, hợp chất HMC-C-01-A và HMC-

N-01-A được dung nạp tốt bởi các chuột thử nghiệm trong thời gian sử dụng kéo dài, trong khi đó hợp chất ABD899 được dung nạp kém, do đó cần dừng sử dụng hợp chất này và loại bỏ các chuột thử nghiệm bằng hợp chất này khỏi nghiên cứu (được thể hiện trên Fig.3D). Hơn nữa, hợp chất HMC-C-01-A có hiệu lực điều trị rất cao trong mô hình này tương đương với methotrexat là được chất được ưu tiên sử dụng hàng đầu để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp.

Dữ liệu thử nghiệm cũng cho thấy việc xác định hợp chất có hiệu lực rất mạnh là rất quan trọng nhưng không dễ dự đoán được.

Các nguyên lý, phương án ưu tiên và phương án thực hiện sáng chế được mô tả nêu trên. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án này. Thay vào đó, các phương án nêu trên chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Cần hiểu rằng các biến đổi có thể được thực hiện trong các phương án này bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

Tài liệu tham khảo

Một số tài liệu công bố được viện dẫn trong bản mô tả để mô tả chi tiết hơn sáng chế và tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Các tài liệu công bố cụ thể được viện dẫn trong bản mô tả được thể hiện dưới đây. Mỗi tài liệu công bố này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, với cùng nội dung khi mỗi tài liệu công bố được trích dẫn cụ thể và kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Akahoshi et al., 2008, "Promoter polymorphisms in the IRF3 gene confer protection against systemic lupus erythematosus", *Lupus*, Vol. 17 pp. 568-574.

Astry et al., 2011, "A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis", *J Interferon Cytokine Res.*, Vol. 31, pp.927-940.

Bahmanyar et al., 2010, "Aminotriazolopyridines and their use as kinase inhibitors", international patent publication number WO 2010/027500 A1 published 11 March 2010.

Baud et al., 1999, "Signalling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain", *Genes Dev.*, Vol. 13, pp. 1297-1308.

Baud et al., 2009, "Is NF κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls", *Nat. Rev. Drug Disc.*, Vol. 8, pp. 33-40.

Billiau, 2010, "Etanercept improves linear growth and bone mass acquisition in MTX-resistant polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis", *Rheumatology (Oxford)*, Vol. 49, pp. 1550-1558.

Bladh et al., 2006, "Novel sulphonamide derivatives as glucocorticoid receptor modulators for the treatment of inflammatory diseases", international patent publication number WO 2006/046916 A1 published 04 May 2006.

Brennan et al., 1992, "Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints", *Eur. J. Immunol.*, Vol. 22, pp. 1907-1912.

Brennan et al., 1996, "Cytokines in autoimmunity", *Curr. Opin. Immunol.*, Vol. 8, pp. 872-877.

Chen et al., 2012, "High-affinity and selective dopamine D₃ receptor full agonists", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, Vol. 22, pp. 5612-5617.

Childs, L.M., et al., 2001, "Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis", *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 16, No. 2, pp. 338-347.

Dallas et al., 2011, "Osteoimmunology at the nexus of arthritis, osteoporosis, cancer, and infection", *J. Clin. Invest.*, Vol. 121, pp. 2534-2542.

Dimitris et al., 1998, "The Pathophysiologic Roles of Interleukin-6 in Human Disease", *Ann Intern Med.*, Vol. 128, No. 2, pp. 127-137.

Dvorak et al., 1996, "Comparative ultrastructural morphology of human basophils stimulated to release histamine by anti-IgE, recombinant IgE-dependent histamine-releasing factor, or monocyte chemotactic protein-1", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 98, pp. 355-370.

Feldmann et al., 1994, "TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis," *Circ. Shock*, Vol. 43, pp. 179-184.

Feldmann et al., 1996, "Rheumatoid arthritis", *Cell*, Vol. 85, pp. 307-310.

Feldmann et al., 2001, "The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis," Curr. Dir. Autoimmun., Vol. 3, pp. 188-199.

Firestein, 2005 "Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis", J. Clin. Rheumatol., Vol. 11. pp. S39-S44.

Fu et al., 2011, "Association of a functional IRF7 variant with systemic lupus erythematosus", Arthritis Rheum., Vol. 63, pp. 749-754.

Gabay, 2006, "Interleukin-6 and chronic inflammation", Arthritis Research & Therapy, Vol. 8 (Suppl 2), S3.

Galli et al., 1989, "IgE, Mast Cells and the Allergic Response", Ciba Foundation Symposium, Vol. 147, pp. 53-73.

Gottlieb, 2005, "Psoriasis: Emerging Therapeutic Strategies", Nat. Rev. Drug Disc., Vol. 4, pp. 19-34.

Greig et al., 2006, "Development and characterization of biphenylsulfonamides as novel inhibitors of bone resorption", J. Med. Chem., Vol 49: pp 7487-7492.

Greig et al., 2008, "Biphenyl-4-yl-sulfonic acid arylamides and their use as therapeutic agents", international patent publication number WO 2008/114022 A1 published 25 September 2008.

Greig et al., 2010a, "Aryl-phenyl-sulfonamido-cycloalkyl compounds and their use", international patent publication number WO 2010/032009 A1 published 25 March 2010.

Greig et al., 2010b, "Aryl-phenyl-sulfonamido-phenylene compounds and their use", international patent publication number WO 2010/032010 A1 published 25 March 2010.

Greig et al., 2013, "Development of triarylsulfonamides as novel anti-inflammatory agents", Bioorg. & Med. Chem. Lett., Vol. 23, pp. 816-820.

Hadida et al., 2007, "Heterocyclic modulators of ATP-binding cassette transporters", international patent publication number WO 2007/056341 A1 published 18 May 2007.

Hu et al., 2011, "A meta-analysis of the association of IRF5 polymorphism with systemic lupus erythematosus International", *Journal of Immunogenetics*, Vol. 38, pp. 411-417.

Jimi et al., 2004, "Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo", *Nat. Med.*, Vol. 10, pp. 617-624.

Joosten et al., 1996, "Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra," *Arthritis Rheum.*, Vol. 39, pp. 797-809.

Karsenty et al., 2002, "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development", *Dev. Cell.*, Vol. 2, pp. 389-406.

Klareskog et al., 2006, "Mechanisms of disease: Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis," *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, Vol. 2, pp. 425-433.

Korzenik et al., 2006, "Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease," *Nat. Rev. Drug Disc.*, Vol. 5, pp. 197-209.

Krausgruber et al., 2011, "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses", *Nat. Immunol.*, Vol. 12, pp. 231-238.

Li et al., 2008, "A tumor necrosis factor- α -mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease", *Nature Medicine*, Vol. 14, No. 8, pp. 863-868.

Liu, 2005, "Molecular mechanism of TNF signalling and beyond," *Cell Res.*, Vol. 15, pp. 24-27.

Long, 2012, "Osteoimmunology: the expanding role of immunoreceptors in osteoclasts and bone remodeling", *Bone Key Rep.*, Vol. 1, p. 59.

Malemud et al., 2010, "Myeloid-related protein activity in Rheumatoid Arthritis", *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, Vol. 2, pp. 97-111.

Mantovani, 2009, "Inflaming metastasis", *Nature*, Vol. 457, pp. 36-37.

Mazzucchelli et al., 1996, "Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease", *J. Pathol.*, Vol. 178, No. 2, pp. 201-206.

McInnes et al., 2007, "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis", *Nat. Rev. Immunol.*, Vol. 7, pp. 429-442.

Minamino et al., 2012, "IRF-2 regulates B-cell proliferation and antibody production through distinct mechanisms", *Int Immunol.*, Vol. 24, pp. 573-581.

Mount et al., 2005, "Rheumatoid arthritis market", *Nat. Rev. Drug Disc.*, Vol. 2, pp. 11-12.

O'Shea et al., 2013, "Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases", *Annals of Rheumatic Disease*, Vol. 72, Supplement 2, pp. 111-115.

Ogata et al., 2012, "Safety and Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis", *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.*, Vol. 5, pp. 27-42.

Parameswaran et al., 2010, "Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages", *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, Vol. 20, pp. 87-103.

Philchenkov et al., 2004, "Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities", *Exp. Oncol.*, Vol 26, pp 82-97.

Pisetsky, 2012, "Advances in the treatment of inflammatory arthritis", *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, Vol. 26. pp.251-261.

Ralston et al., 2005, "Aryl alkyl sulfonamides as therapeutic agents for the treatment of bone conditions", international patent publication number WO 2005/118528 A2 published 15 December 2005.

Rincon, 2012 "Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases", *Trends in Immunology*, Vol. 33, No. 11, pp. 571-577.

Roodman, 2006, "Regulation of osteoclast differentiation", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol. 1068, pp. 100-109.

Scott et al., 2010, "Rheumatoid Arthritis", *Lancet*, Vol. 376, pp. 1094-1108.

Sharif et al., 2012, "IRF5 polymorphism predicts prognosis in patients with systemic sclerosis", *Annals of the Rheumatic Diseases*, Vol. 71, pp. 1197-1202.

Smolen et al., 2003, "Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis", *Nat. Rev. Drug Disc.*, Vol. 2, pp. 473-488.

Steger et al., 2011, "Denosumab for the treatment of bone metastases in breast cancer: evidence and opinion", *Ther. Adv. Med. Oncol.*, Vol. 3, pp. 233-243.

Sugiyama et al., 1995, "Chemokines in bronchoalveolar lavage fluid in summer-type hypersensitivity pneumonitis", *Eur. Respir. J.*, Vol. 8, pp. 1084-1090.

Sun, 2010, "Mechanical loading, cartilage degradation and arthritis", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1211, pp. 37-50.

Takaoka et al., 2005, "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors", *Nature*, Vol. 434, pp. 243-249.

Takayanagi, 2009, "Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone", *Nature Reviews Rheumatology*, Vol. 5, pp. 667-676.

Tanaka et al., 2003, "Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function", *J. Bone Miner. Metab.*, Vol. 21, pp. 123-133.

Tsutsumi et al., 2005, "Dipeptidyl peptidase IV inhibitor", international patent publication number WO 2005/025554 A2 published 24 March 2005.

van den Berg et al., 1999, "Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-I", *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, Vol. 13, pp. 577-597.

van den Berg, 2002, "Is there a rationale for combined TNF and IL-1 blocking in arthritis?", *Clin. Exp. Rheumatol.*, Vol. 20, pp. S21-S25.

Volejnikova et al., 1997, "Monocyte recruitment and expression of monocyte chemoattractant protein-1 are developmentally regulated in remodeling bone in the mouse", *Am. J. Pathol.*, Vol. 150, No. 5, pp. 1711-1721.

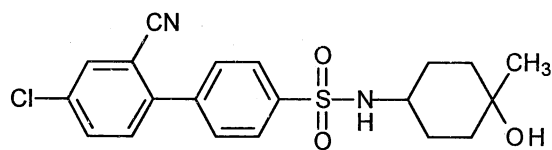
Wang et al., 2010, "Selective ligands for the dopamine 3 (D₃) receptor and methods of using same", international patent publication number WO 2010/025235 A1 published 04 March 2010.

Zhang et al., 2012 "Regulation of T helper cell differentiation by interferon regulatory factor family members", Immunol. Res., Vol. 54 pp. 169-176.

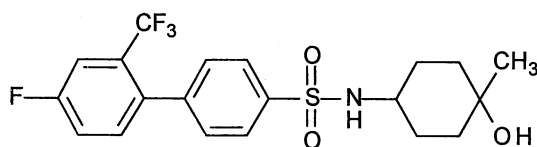
Zheng et al., 1998, "Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in giant cell tumors of bone osteoclastoma: Possible involvement in CD68⁺ macrophage-like cell migration", Journal of Cellular Biochemistry, Vol. 70, No. 1, pp. 121-129.

YÊU CẦU BẢO HỘ

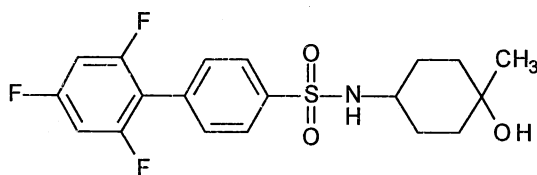
1. Hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



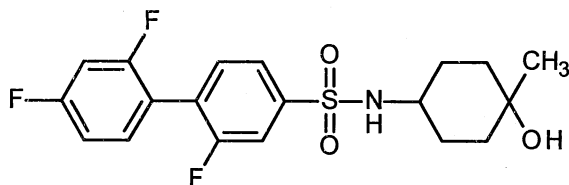
(HMC-C-01),



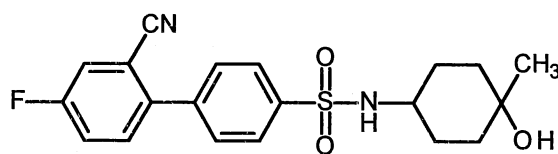
(HMC-C-02),



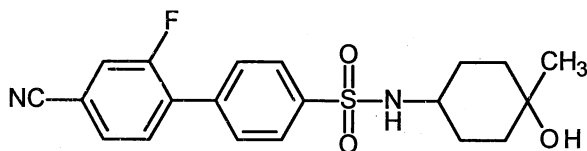
(HMC-C-03),



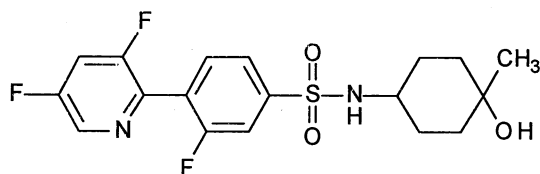
(HMC-C-04),



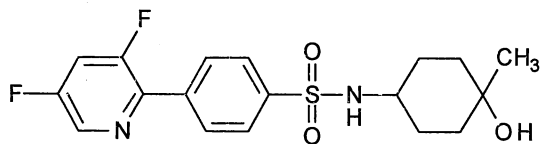
(HMC-C-05),



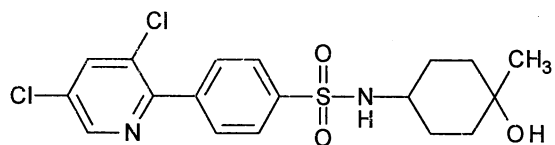
(HMC-C-06),



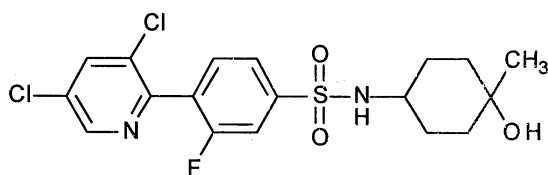
(HMC-N-01),



(HMC-N-02),

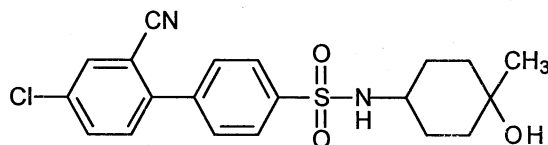


(HMC-N-03), và



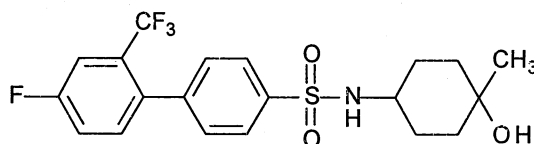
(HMC-N-04).

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



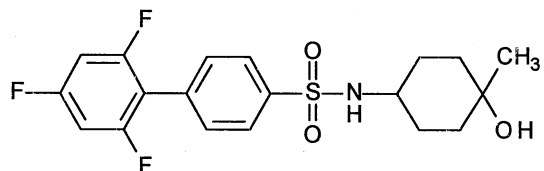
(HMC-C-01).

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



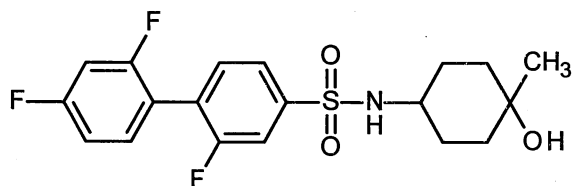
(HMC-C-02).

4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



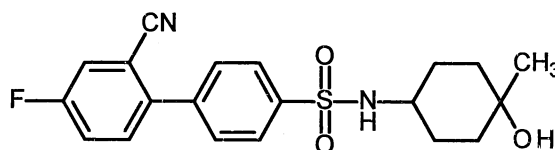
(HMC-C-03).

5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



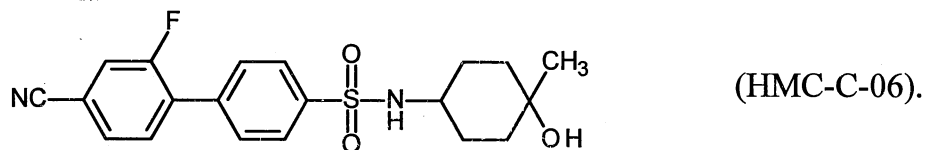
(HMC-C-04).

6. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:

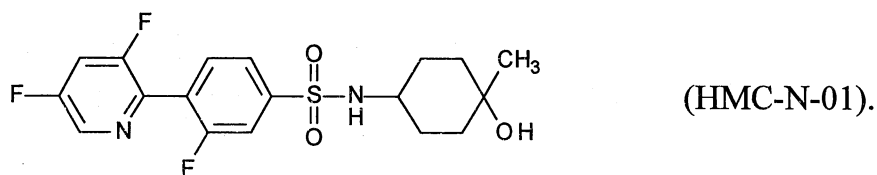


(HMC-C-05).

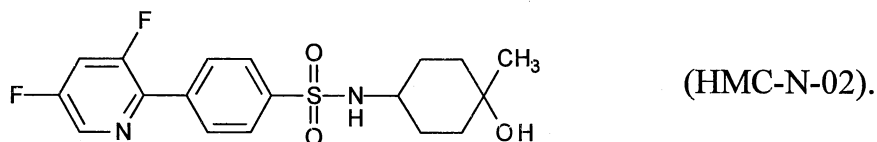
7. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



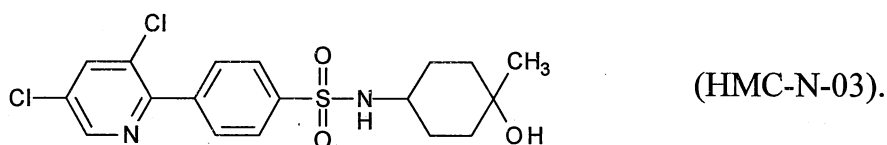
8. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



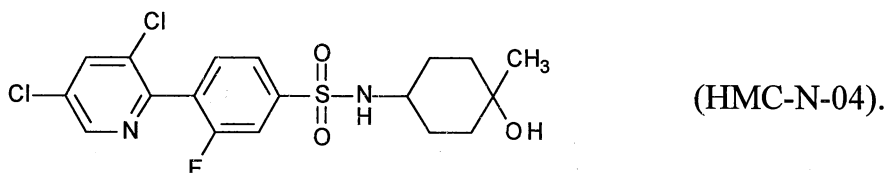
9. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



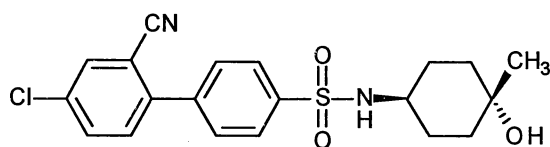
10. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



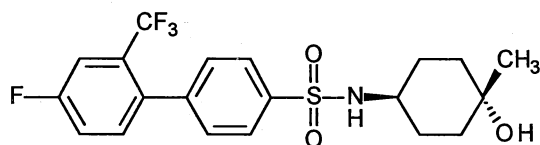
11. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



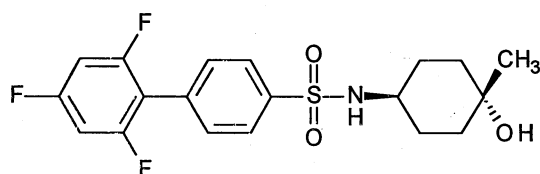
12. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được chọn từ các hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



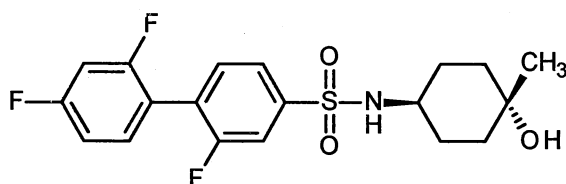
(HMC-C-01-A),



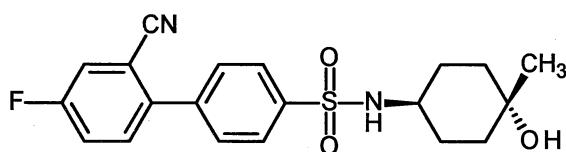
(HMC-C-02-A),



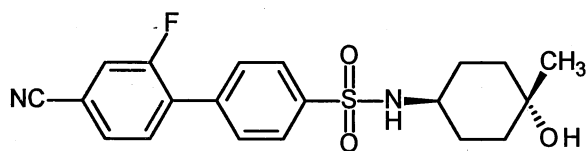
(HMC-C-03-A),



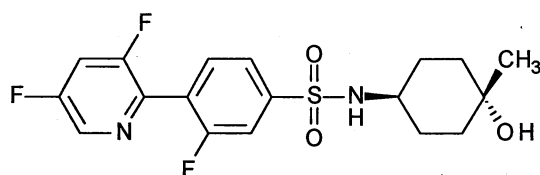
(HMC-C-04-A),



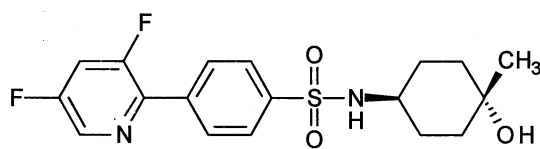
(HMC-C-05-A),



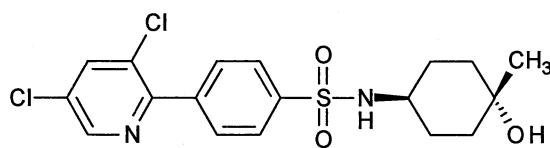
(HMC-C-06-A),



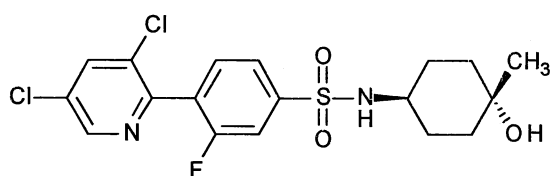
(HMC-N-01-A),



(HMC-N-02-A),

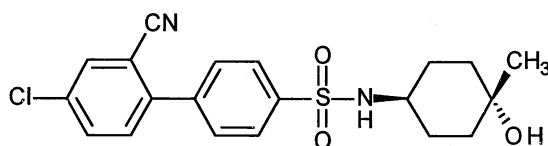


(HMC-N-03-A), và



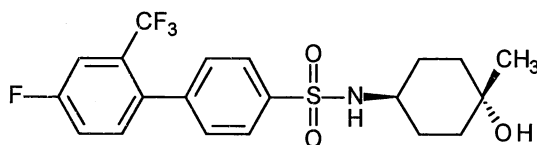
(HMC-N-04-A).

13. Hợp chất theo điểm 12, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



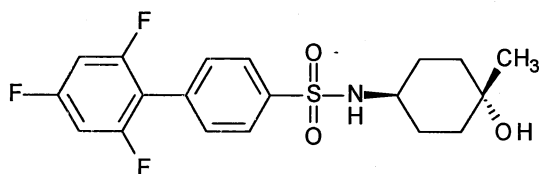
(HMC-C-01-A).

14. Hợp chất theo điểm 12, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



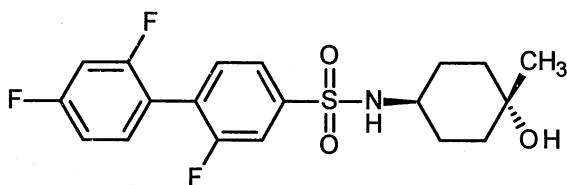
(HMC-C-02-A).

15. Hợp chất theo điểm 12, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



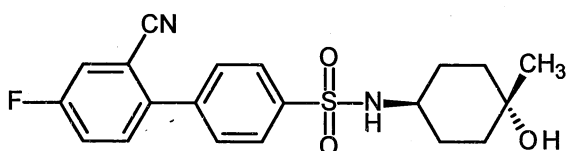
(HMC-C-03-A).

16. Hợp chất theo điểm 12, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



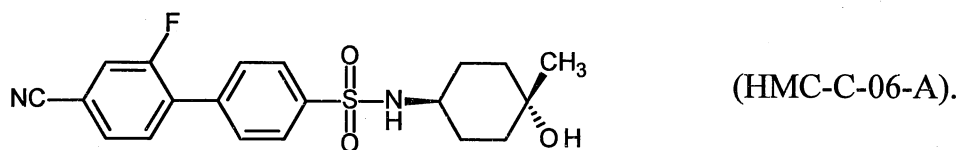
(HMC-C-04-A).

17. Hợp chất theo điểm 12, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:

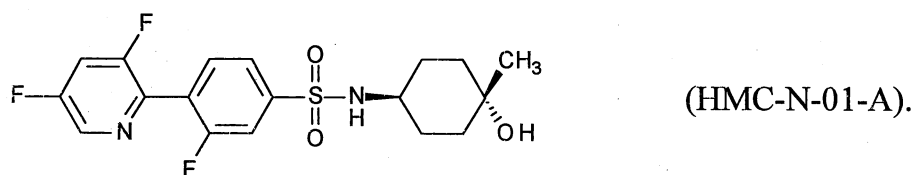


(HMC-C-05-A).

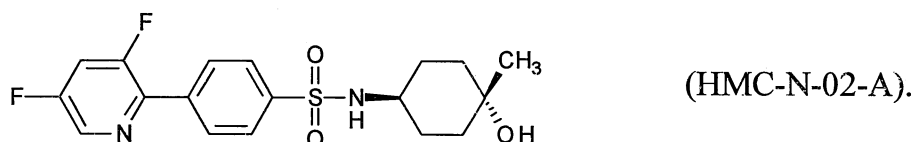
18. Hợp chất theo điểm 12, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



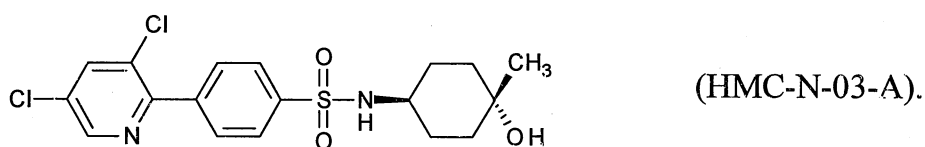
19. Hợp chất theo điểm 12, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



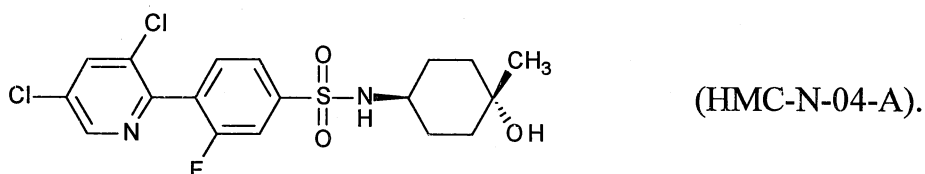
20. Hợp chất theo điểm 12, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



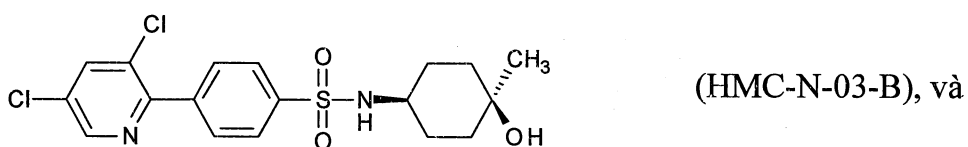
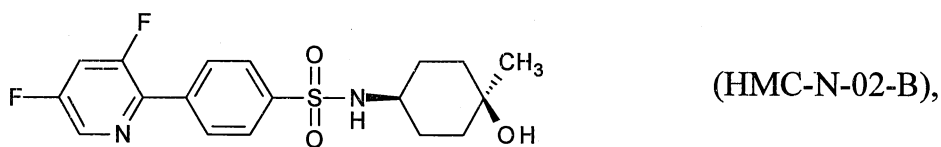
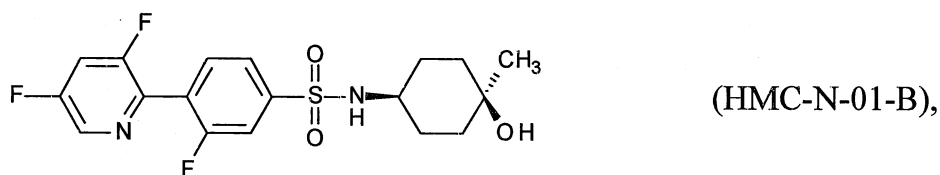
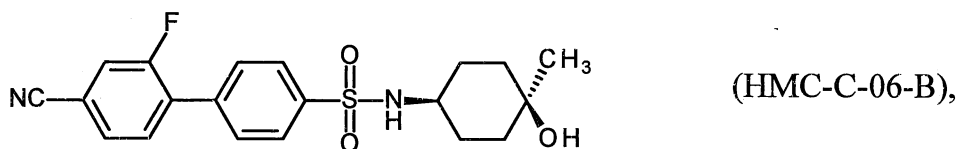
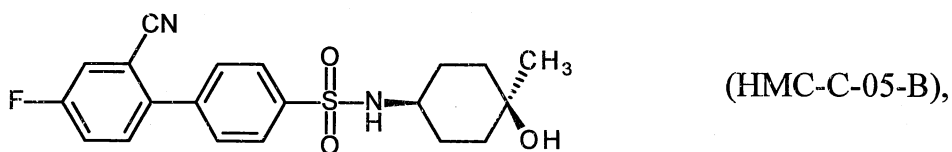
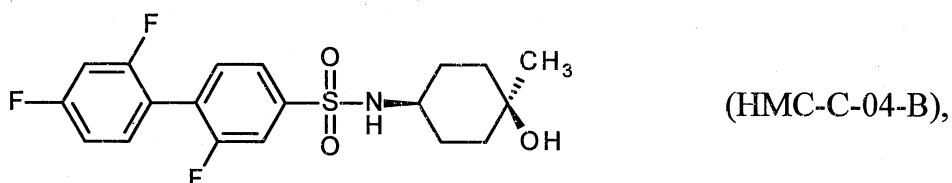
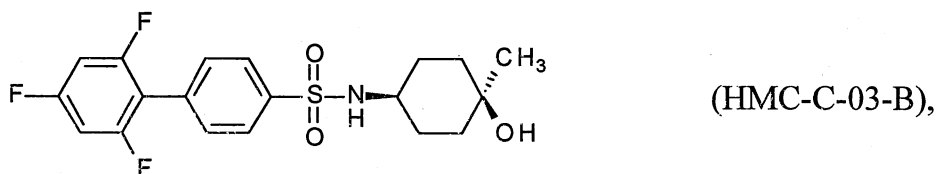
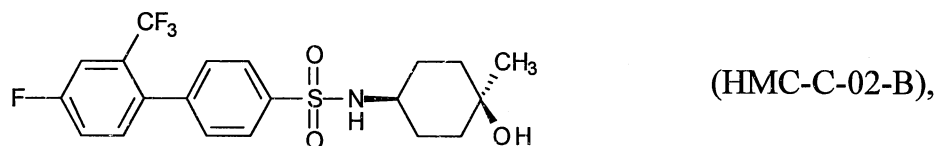
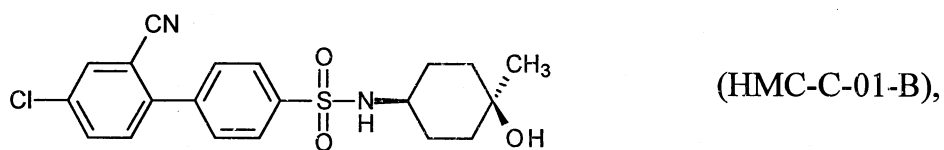
21. Hợp chất theo điểm 12, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:

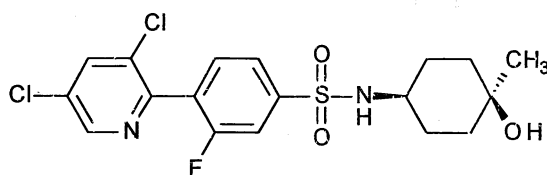


22. Hợp chất theo điểm 12, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



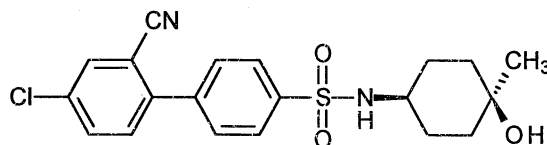
23. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được chọn từ các hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:





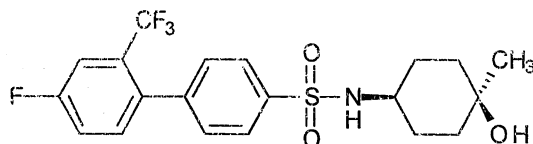
(HMC-N-04-B).

24. Hợp chất theo điểm 23, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dùng, hydrat, hoặc solvat của nó:



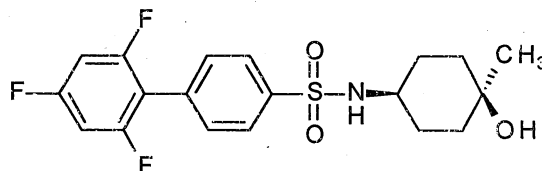
(HMC-C-01-B).

25. Hợp chất theo điểm 23, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dùng, hydrat, hoặc solvat của nó:



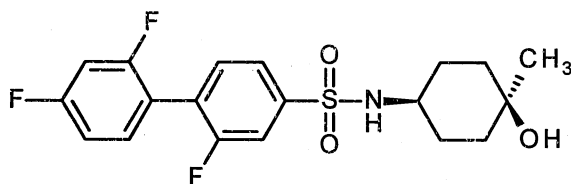
(HMC-C-02-B).

26. Hợp chất theo điểm 23, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dùng, hydrat, hoặc solvat của nó:



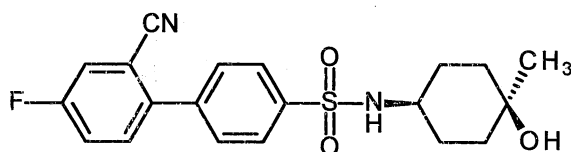
(HMC-C-03-B).

27. Hợp chất theo điểm 23, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dùng, hydrat, hoặc solvat của nó:



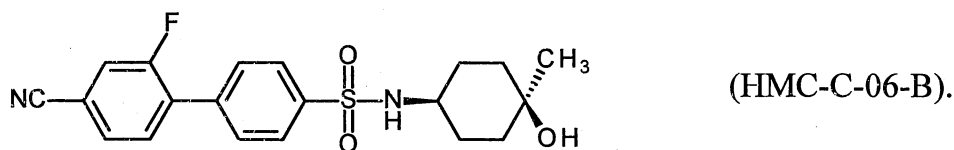
(HMC-C-04-B).

28. Hợp chất theo điểm 23, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dùng, hydrat, hoặc solvat của nó:

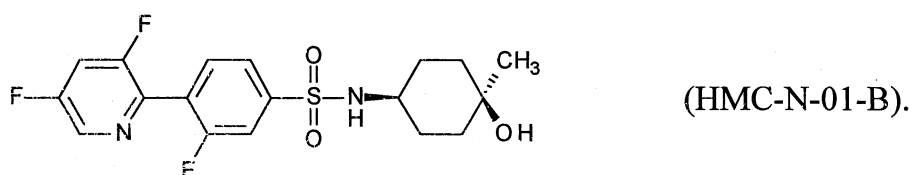


(HMC-C-05-B).

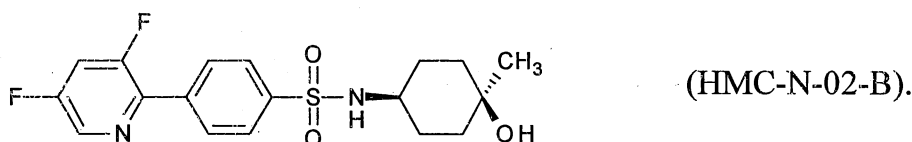
29. Hợp chất theo điểm 23, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



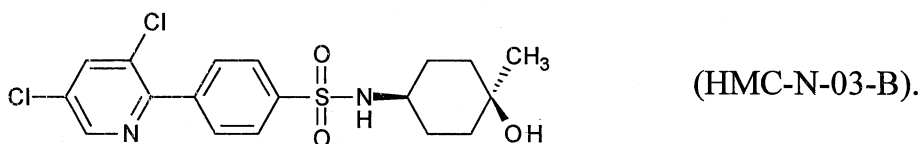
30. Hợp chất theo điểm 23, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



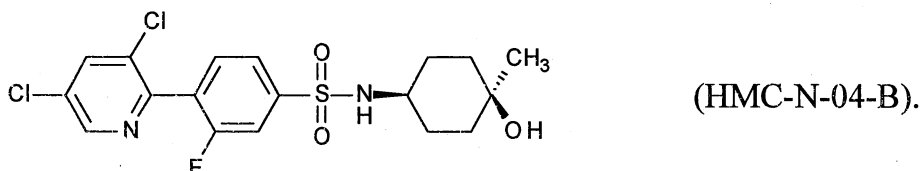
31. Hợp chất theo điểm 23, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



32. Hợp chất theo điểm 23, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



33. Hợp chất theo điểm 23, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối được dụng, hydrat, hoặc solvat của nó:



34. Chế phẩm, chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 33, và tá dược pha loãng hoặc chất mang được dụng.

35. Phương pháp bào chế chế phẩm, bao gồm bước trộn hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 33 và tá dược pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Fig.1

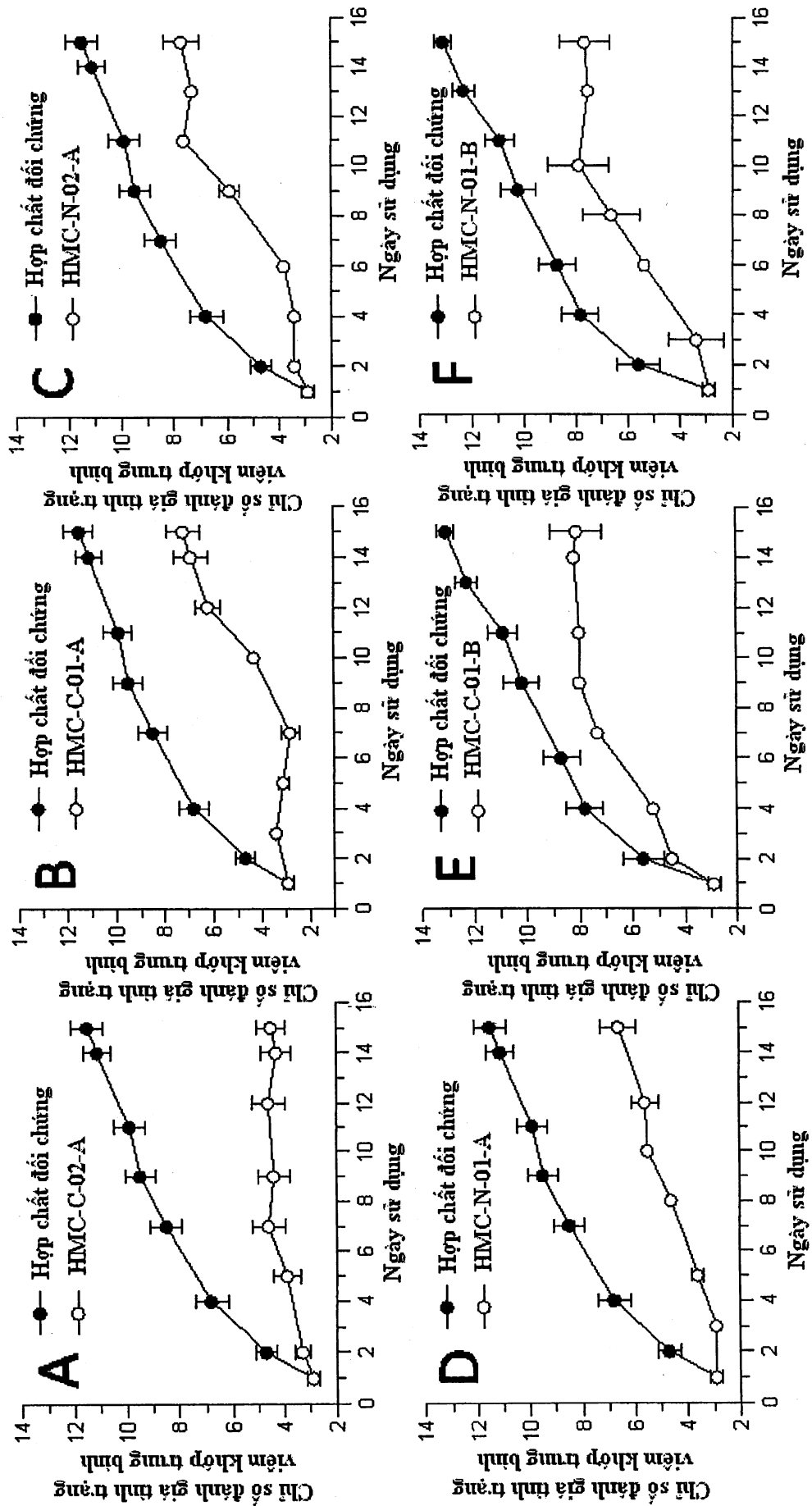


Fig.2

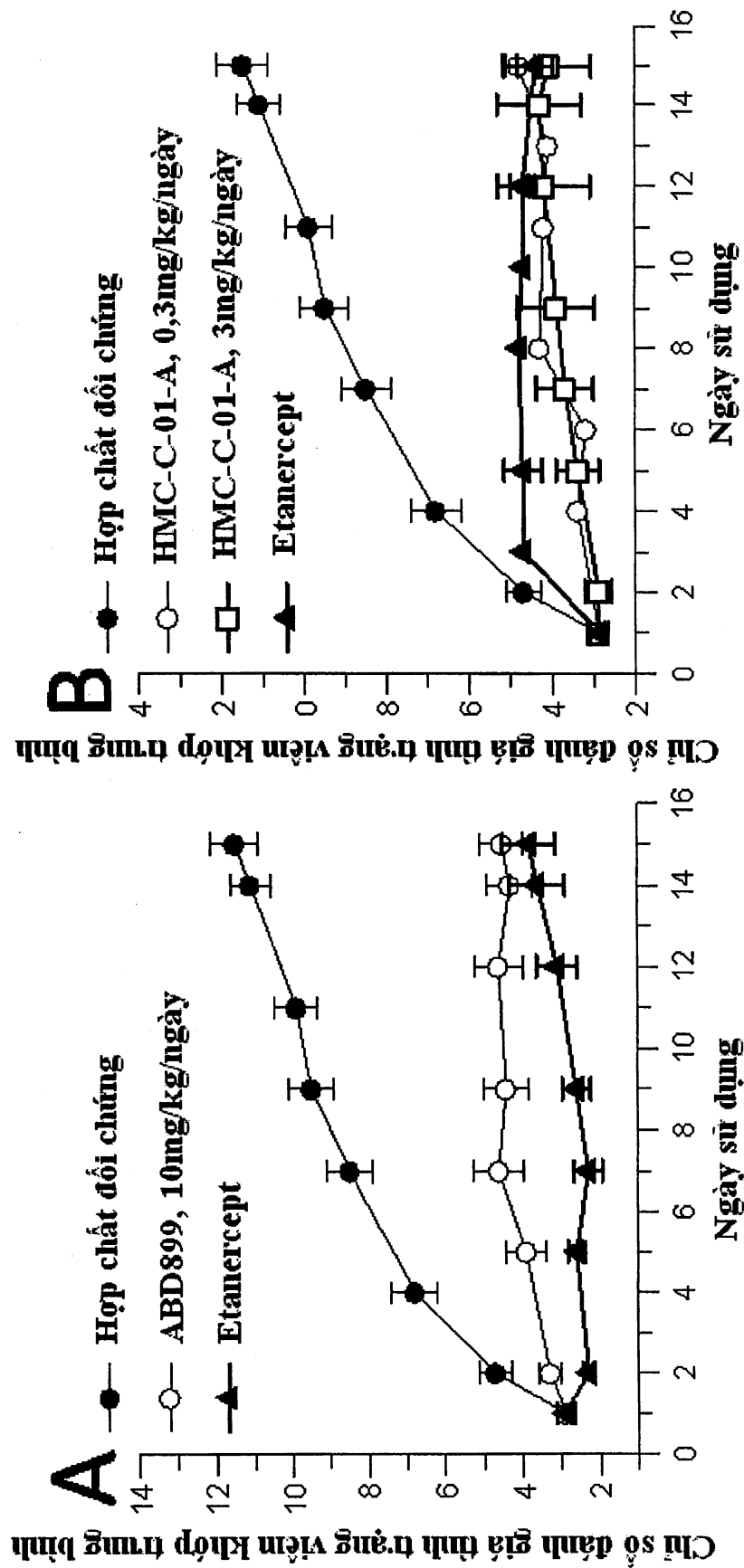


Fig.3

