



(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)



1-0029916

(51)⁷ C07H 17/02; A61K 31/7056; A61P 3/10 (13) B

(21) 1-2016-01511

(22) 30/10/2014

(86) PCT/US2014/063161 30/10/2014

(87) WO2015/069541 14/05/2015

(30) 61/901,488 08/11/2013 US

(45) 25/10/2021 403

(43) 25/08/2016 341A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

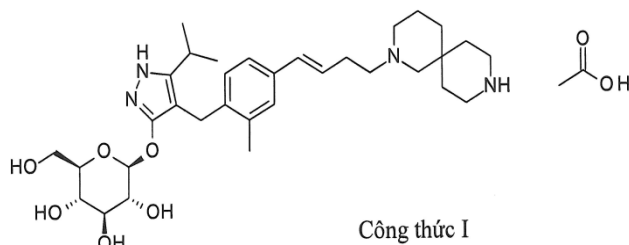
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) REUTZEL-EDENS, Susan Marie (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT 4-{4-[(1E)-4-(2,9-DIAZASPIRO[5.5]UNDEC-2-YL)BUT-1-EN-1-YL]-2-METYL BENZYL}-5-(PROPAN-2-YL)-1H-PYRAZOL-3-YL BETA-D-GLUCOPYRANOSIT AXETAT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I:



hoặc hydrat của nó. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất ức chế kênh đồng vận chuyển glucoza kết hợp natri 1 (sodium-coupled glucoza cotransporter - SGLT1) mới là muối axetat của hợp chất pyrazol, được phẩm chứa hợp chất này, phương pháp sử dụng hợp chất này để điều trị các rối loạn sinh lý, và các hợp chất trung gian và quy trình hữu dụng để tổng hợp hợp chất này.

Sáng chế thuộc lĩnh vực điều trị bệnh tiểu đường và các bệnh và rối loạn khác có liên quan đến tình trạng tăng đường huyết.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh tiểu đường là nhóm bệnh đặc trưng bởi mức glucoza trong máu cao. Bệnh này ảnh hưởng đến khoảng 25 triệu người ở Mỹ và cũng là nguyên nhân gây tử vong thứ 7 ở Mỹ theo Báo cáo quốc gia về bệnh tiểu đường năm 2011 (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention). Kênh đồng vận chuyển glucoza kết hợp natri (sodium-coupled glucoza cotransporter - SGLT) là một trong số các kênh vận chuyển đã biết là chịu trách nhiệm hấp thu carbohydrat, như glucoza. Cụ thể hơn, SGLT1 chịu trách nhiệm vận chuyển glucoza qua màng vi nhung mao của ruột non. Việc ức chế SGLT1 có thể dẫn đến giảm hấp thu glucoza ở ruột non, do đó tạo ra cách hữu dụng để điều trị bệnh tiểu đường.

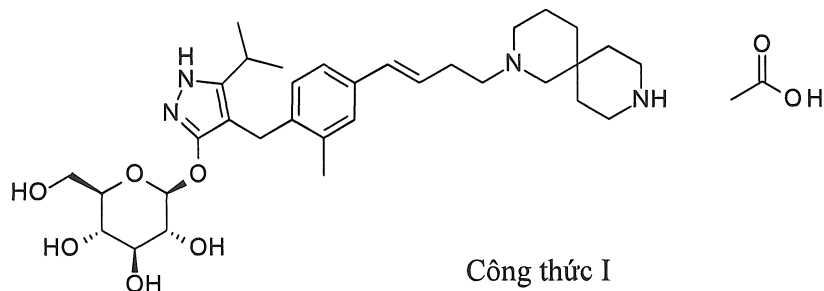
Patent Mỹ số 7,655,632 bộc lộ các dẫn xuất pyrazol nhất định với hoạt tính ức chế SGLT1 người mà được bộc lộ tiếp là hữu dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh có liên quan đến tình trạng tăng đường huyết, như bệnh tiểu đường. Ngoài ra, WO 2011/039338 bộc lộ các dẫn xuất pyrazol nhất định với hoạt tính ức chế SGLT1/SGLT2 mà được bộc lộ tiếp là hữu dụng để điều trị các bệnh về xương, như bệnh loãng xương.

Có nhu cầu tìm ra thuốc và phương pháp điều trị thay thế đối với bệnh tiểu đường.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất muối axetat của hợp chất pyrazol, là chất ức chế SGLT1, và như vậy, có thể thích hợp để điều trị các rối loạn nhất định, như bệnh tiểu đường.

Theo đó, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I:



hoặc hydrat của nó.

Sáng chế cũng đề xuất dạng tinh thể của hợp chất có công thức I mà được hydrat hóa.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất dạng tinh thể của hợp chất có công thức I, mà được hydrat hóa, đặc trưng bởi ít nhất một trong số các thông số sau:

- a. nhiễu xạ đồ bột tia X bằng cách sử dụng bức xạ $\text{CuK}\alpha$ có đỉnh cường độ lớn ở góc nhiễu xạ 2θ là $5,2^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh cường độ lớn được chọn từ nhóm gồm $7,8^\circ$, $8,0^\circ$, và $10,7^\circ$ (lần lượt $\pm 0,2^\circ$); và
- b. phổ NMR trạng thái rắn ^{13}C chứa các đỉnh cường độ lớn liên quan đến cộng hưởng cao trường của adamantan ($\delta=29,5$ ppm) ở: 181,8, 161,2, 160,0, 147,6 và 137,4 ppm (lần lượt $\pm 0,2$ ppm).

Sáng chế cũng đề xuất dạng tinh thể của hợp chất có công thức I mà được hydrat hóa, trong đó hàm lượng nước ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 9% đến 12% khối lượng.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh tiểu đường ở bệnh nhân bao gồm việc cho đối bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị bệnh tiểu đường typ 1 ở bệnh nhân bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh tiểu đường typ 2 ở bệnh nhân bao gồm việc cho đối bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị tình trạng rối loạn dung nạp glucoza (impaired glucose tolerance - IGT), tình trạng rối loạn dung nạp glucoza lúc đói (impaired fasting glucose - IFG), hoặc hội chứng chuyển hóa ở bệnh nhân bao gồm việc cho

bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó để sử dụng trong điều trị, cụ thể là điều trị bệnh tiểu đường. Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó để sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường typ 1. Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó để sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường typ 2. Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó để sử dụng trong điều trị IGT, IFG hoặc hội chứng chuyển hóa. Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó để sản xuất thuốc để điều trị bệnh tiểu đường. Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó để sản xuất thuốc để điều trị bệnh tiểu đường. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó để sản xuất thuốc để điều trị bệnh tiểu đường typ 2. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó để sản xuất thuốc để điều trị IGT, IFG hoặc hội chứng chuyển hóa.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dùng. Theo một phương án cụ thể, được phẩm này chứa thêm một hoặc nhiều tác nhân điều trị khác. Sáng chế cũng bao gồm các hợp chất trung gian và quy trình mới để tổng hợp chất có công thức I hoặc hydrat của nó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất quy trình điều chế chất ức chế SGLT1 dạng tinh thể, bao gồm bước trộn hợp chất 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit với etyl axetat ướt. Ngoài ra, sáng chế đề xuất quy trình điều chế chất ức chế SGLT dạng tinh thể, bao gồm bước trộn hợp chất 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit với etyl axetat ướt, và sau đó thu gom chất rắn thu được.

Mô tả chi tiết sáng chế

Việc tách và tinh chế 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit (bazơ tự do) dạng chất rắn vô định hình đòi hỏi việc sử dụng phương pháp sắc ký, mà có thể đòi hỏi nhiều tài nguyên. Hợp chất có công thức I cho phép cải thiện bước tách và tinh chế

thông qua việc loại bỏ phương pháp sắc ký, và tạo ra dạng tinh thể với độ ổn định về hình thái và các đặc tính xử lý được cải thiện để bao chế được phẩm, cụ thể là sản xuất thương mại và bảo quản được phẩm.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “đỉnh cường độ lớn” chỉ đỉnh có cường độ ít nhất 5% so với đỉnh cường độ lớn cao nhất trong phổ hoặc mẫu bột tương ứng.

Như được sử dụng trong bản mô tả, các thuật ngữ “điều trị” hoặc “để điều trị” bao gồm việc ngăn chặn, làm chậm, chấm dứt, hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn đã có.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "bệnh nhân" chỉ động vật có vú, như chuột nhắt, chuột lang, chuột cống, chó, hoặc người. Cần hiểu rằng bệnh nhân là người được ưu tiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng hoặc liều hợp chất theo sáng chế mà, khi cho bệnh nhân sử dụng một hoặc nhiều liều, tạo ra tác dụng mong muốn ở bệnh nhân được chẩn đoán hoặc điều trị.

Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng được xác định bởi bác sĩ khám bệnh, được xem là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được từ những ca tương tự. Khi xác định lượng hữu hiệu đối với bệnh nhân, một số yếu tố được cân nhắc bởi bác sĩ khám bệnh, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: loài động vật; kích thước của động vật; độ tuổi và thể trạng chung, mức độ liên quan hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn; đáp ứng của từng bệnh nhân; hợp chất cụ thể được sử dụng; phương thức dùng; các đặc tính sinh khả dụng của chế phẩm được dùng; chế độ liều lượng được áp dụng; việc sử dụng các biện pháp y học đồng thời khác; và các tình trạng có liên quan khác.

Hợp chất có công thức I thường hữu hiệu trong khoảng liều rộng. Chẳng hạn, liều mỗi ngày thường nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30 mg/kg thể trọng. Trong một số trường hợp mức liều dưới giới hạn dưới của khoảng đã nêu có thể đã quá đủ, trong khi đó trong một số trường hợp khác liều lớn hơn có thể được sử dụng mà không gây ra tác dụng phụ có hại bất kỳ, và do đó khoảng liều nêu trên không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Tốt hơn nếu hợp chất theo sáng chế được bào chế thành dược phẩm để sử dụng theo đường bất kỳ mà làm cho hợp chất này sinh khả dụng. Tốt nhất, các dược phẩm này để sử dụng đường uống. Các dược phẩm này và quy trình bào chế chúng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. (Xem, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition., Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

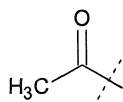
Theo khía cạnh tiếp theo của sáng chế, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân điều trị, như tác nhân chống tiểu đường. Việc sử dụng kết hợp bao gồm sử dụng đồng thời hoặc lần lượt. Ngoài ra, việc sử dụng đồng thời tổ hợp này có thể dưới dạng liều hỗn hợp đơn hoặc liều riêng rẽ của từng tác nhân điều trị. Ví dụ về tác nhân chống tiểu đường bao gồm metformin; chất ức chế DPPIV, như sitagliptin hoặc linagliptin; sulfonylure, như glimepirit; thiazolidinedion, như pioglitazon; insulin cơ bản, như glargin; insulin tác dụng nhanh, như HUMALOG hoặc NOVOLOG; chất chủ vận GLP-1, như exenatid hoặc liraglutid; chất ức chế SGLT2, như dapagliflozin hoặc empagliflozin; chất đối kháng thụ thể glucagon, như LY2409021; và các chất tương tự.

Hợp chất có công thức I có thể được điều chế như được minh họa trong các quy trình điều chế, ví dụ, và sơ đồ nêu dưới đây. Các chất phản ứng và nguyên liệu ban đầu là dễ dàng có được đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tất cả các phần tử thể, trừ khi được chỉ định khác, là như được xác định trên đây. Cần hiểu rằng các sơ đồ, quy trình điều chế, và ví dụ không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

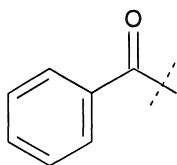
Ví dụ về các phương pháp tách bao gồm các kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc phương pháp sắc ký bất đối. (Xem, ví dụ tài liệu của J. Jacques, và các đồng tác giả, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, và tài liệu của E.L. Eliel và S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Cũng rõ ràng với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này rằng việc tách và phân lập, bằng phương pháp sắc ký, sắc ký bất đối hoặc kết tinh chọn lọc, các chất đồng phân không đối quang hoặc chất đồng phân hình học riêng rẽ có thể thực hiện ở thời điểm bất kỳ thuận tiện trong quy trình tổng hợp.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "δ" chỉ phân triệu về phía trường thấp từ tetrametylsilan; "min" chỉ phút; "THF" chỉ tetrahydrofuran; "MeOH" chỉ metanol hoặc rượu metylic; "HPLC" chỉ phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao;

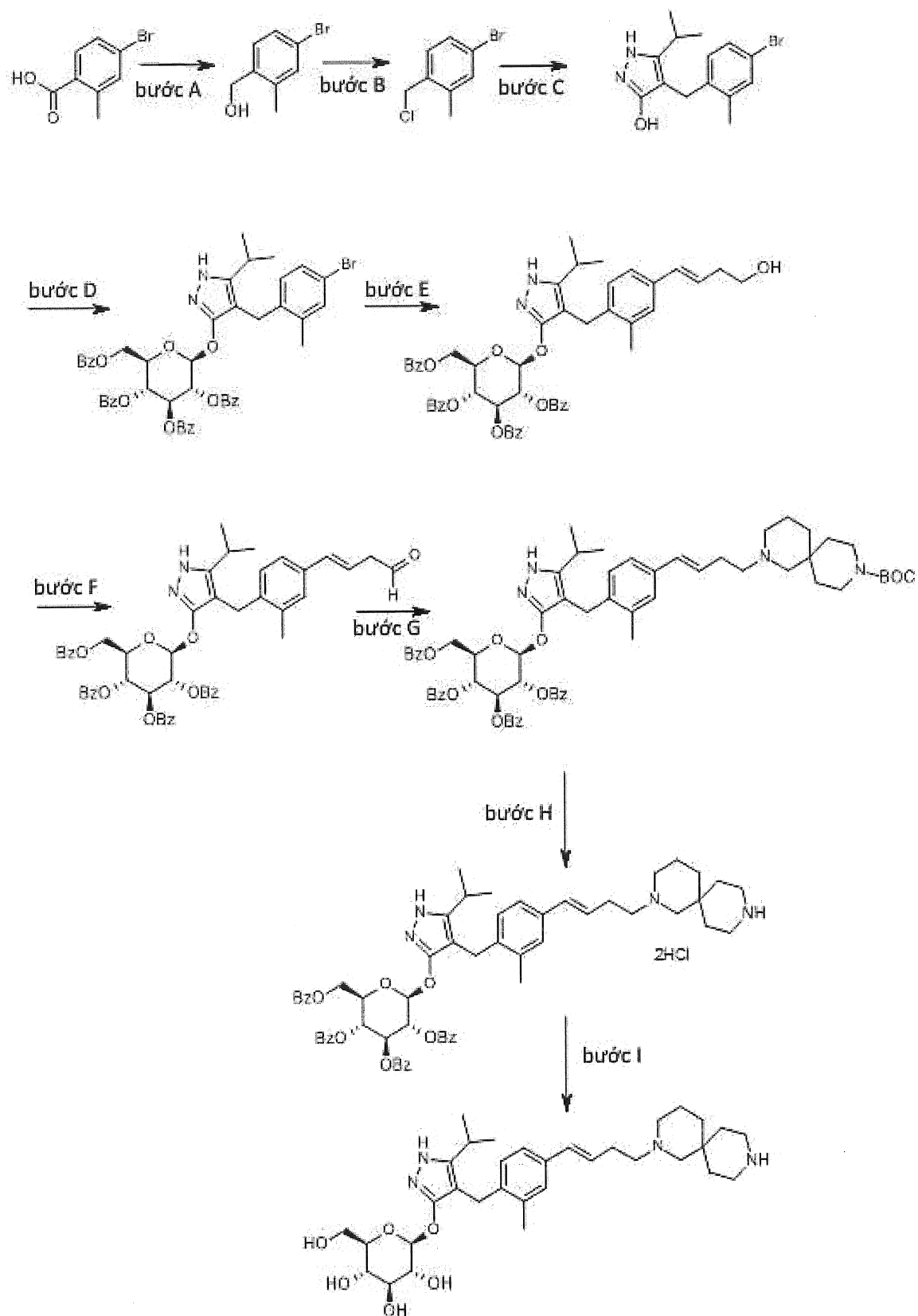
Thuật ngữ “Ac” chỉ phần tử thể axetyl có cấu trúc sau:



Thuật ngữ “Bz” chỉ phần tử thể benzoyl có cấu trúc sau:

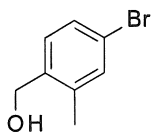


Thuật ngữ “BOC” chỉ nhóm bảo vệ t-butyloxycarbonyl.

Sơ đồ 1

Ví dụ điều chế 1

(4-bromo-2-metyl-phenyl)metanol



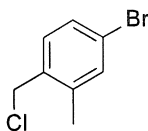
Sơ đồ 1, bước A: Bỏ sung phức boran-tetrahydrofuran (0,2 mol, 200 mL, dung dịch 1,0 M) vào dung dịch chứa axit 4-bromo-2-metylbenzoic (39 g, 0,18 mol) trong tetrahydrofuran (200 mL). Sau 18 giờ ở nhiệt độ trong phòng, loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để tạo ra chất rắn. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng (32,9 g, 0,16 mol). ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,55 (s, 1H), 2,28 (s, 3H), 4,61 (s, 2H), 7,18-7,29 (m, 3H).

Phương pháp khác để tổng hợp (4-bromo-2-metyl-phenyl)metanol.

Phức boran-dimetyl sulfua (2M trong THF; 116 mL, 0,232 mol) được bỏ sung từ từ vào dung dịch chứa axit 4-bromo-2-metylbenzoic (24,3 g, 0,113 mol) trong tetrahydrofuran khan (THF, 146 mL) ở 3 °C. Sau khi khuấy lạnh trong 10 phút bề làm mát được mang đi và hỗn hợp phản ứng được để cho ấm từ từ đến nhiệt độ môi trường. Sau 1 giờ, dung dịch này được làm mát đến 5°C, và nước (100 mL) được bỏ sung từ từ. Etyl axetat (100 mL) được bỏ sung vào và các pha được tách. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (200 mL) và làm khô qua Na_2SO_4 . Việc lọc và cô trong áp suất giảm tạo ra phần cặn mà được tinh chế bằng cách lọc qua đệm silic oxit ngắn giải hấp bằng 15% etyl axetat/iso-hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (20,7 g, hiệu suất 91,2%). MS (m/z): 183/185 ($\text{M}+1-18$).

Ví dụ điều chế 2

4-bromo-1-clometyl-2-metyl-benzen



Sơ đồ 1, bước B: Bỏ sung thionyl clorua (14,31 mL, 0,2 mol,) vào dung dịch chứa (4-bromo-2-metyl-phenyl)metanol (32,9 g, 0,16 mol) trong diclometan (200 mL) và dimetylformamit (0,25 mol, 2,0 mL) ở 0°C. Sau 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, rót hỗn hợp này vào nước đá (100 g), chiết bằng diclometan (300 mL), rửa phần chiết

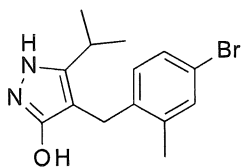
bằng dung dịch nước natri bicacbonat 5% (30 mL) và nước muối (200 mL), làm khô qua natri sulfat, và cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục thô dưới dạng chất rắn màu trắng (35,0 g, 0,16 mol). Nguyên liệu này được sử dụng trong bước phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế. ^1H NMR (CDCl_3): δ 2,38 (s, 3H), 4,52 (s, 2H), 7,13-7,35 (m, 3H).

Phương pháp khác để tổng hợp 4-bromo-1-clometyl-2-metyl-benzen.

Metansulfonyl clorua (6,83 mL, 88,3 mmol) được bổ sung từ từ vào dung dịch chứa (4-bromo-2-metyl-phenyl)metanol (16,14 g, 80,27 mmol) và trietylamin (16,78 mL; 120,4 mmol) trong diclometan (80,7 mL) được làm mát trong nước đá/nước. Hỗn hợp này được để cho ấm từ từ đến nhiệt độ môi trường và khuấy trong 16 giờ. Metansulfonyl clorua (1,24 mL; 16,1 mmol) được bổ sung vào tiếp và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 2 giờ. Nước (80 mL) được bổ sung vào và các pha được tách. Lớp hữu cơ được rửa bằng axit clohydric (1N; 80 mL) sau đó là dung dịch nước hydro cacbonat bão hòa (80 mL), sau đó là nước (80 mL), và làm khô qua Na_2SO_4 . Việc lọc và cô trong áp suất giảm tạo ra phần cặn mà được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (giải hấp bằng hexan) để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (14,2 g; hiệu suất 80,5%). ^1H NMR (300,11 MHz, CDCl_3): δ 7,36-7,30 (m, 2H), 7,18 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 4,55 (s, 2H), 2,41 (s, 3H).

Ví dụ điều chế 3

4-[(4-bromo-2-metyl-phenyl)metyl]-5-isopropyl-1*H*-pyrazol-3-ol



Sơ đồ 1, bước C: Bổ sung natri hydrua (8,29 g, 0,21 mol, thể phân tán 60% trong dầu) vào dung dịch chứa methyl 4metyl-3-oxovalerat (27,1 mL, 0,19 mol) trong tetrahydrofuran ở 0°C. Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, bổ sung dung dịch chứa 4-bromo-1-clometyl-2-metyl-benzen (35,0 g, 0,16 mol) trong tetrahydrofuran (50 mL). Đun nóng hỗn hợp thu được ở 70 °C qua đêm (18 giờ). Bổ sung 1,0 M HCl (20 mL) để ngừng phản ứng. Chiết bằng etyl axetat (200 mL), rửa phần chiết bằng nước (200 mL) và nước muối (200 mL), làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và cô dưới áp suất giảm. Hòa tan

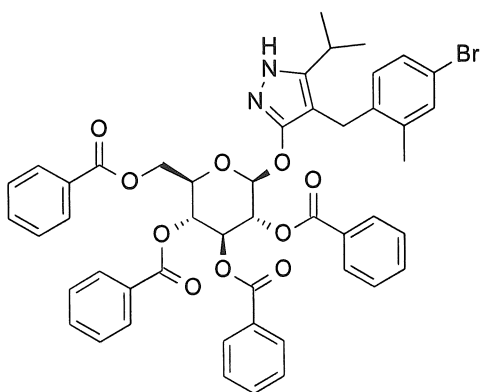
phần cặn thu được trong toluen (200 mL) và bổ sung hydrazin monohydrat (23,3 mL, 0,48 mol). Đun nóng hỗn hợp này ở 120 °C trong 2 giờ bằng thiết bị Dean-Stark để loại nước. Làm mát và loại dung môi trong áp suất giảm, hòa tan phần cặn bằng diclometan (50 mL) và metanol (50 mL). Rót dung dịch này từ từ vào cốc chứa nước (250 mL). Thu gom sản phẩm được kết tủa thu được bằng cách lọc chân không. Làm khô trong chân không trong lò qua đêm ở 40 °C để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn (48,0 g, 0,16 mol). MS (m/z): 311,0 (M+1), 309,0 (M-1).

Cách khác để tổng hợp 4-[(4-bromo-2-metyl-phenyl)metyl]-5-isopropyl-1*H*-pyrazol-3-ol.

Dung dịch chứa 4-bromo-1-clometyl-2-metyl-benzen (13,16 g, 59,95 mmol) trong axetonitril (65,8 mL) được điều chế. Kali cacbonat (24,86 g, 179,9 mmol), kali iodua (11,94 g, 71,94 mmol) và metyl 4-metyl-3-oxovalerat (8,96 mL; 62,95 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 20 giờ. Axit clohydric (2N) được bổ sung vào để tạo ra độ pH=3. Dung dịch này được chiết bằng etyl axetat (100 ml), pha hữu cơ được rửa bằng nước muối (100 ml) và làm khô qua Na₂SO₄. Hỗn hợp này được lọc và cô trong áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong toluen (65,8 mL) và hydrazin monohydrat (13,7 mL, 0,180 mol) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được đun nóng đến hồi lưu và nước được loại bỏ bằng thiết bị Dean and Stark. Sau 3 giờ, hỗn hợp này được làm mát đến 90°C và hydrazin monohydrat (13,7 mL; 0,180 mol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được đun nóng đến hồi lưu trong 1 giờ. Hỗn hợp này được làm mát và cô trong áp suất giảm. Chất rắn thu được được nghiền mịn với nước (200 mL), lọc và làm khô trong lò chân không qua P₂O₅ ở 60°C. Chất rắn này được nghiền trong iso-hexan (200 mL) và lọc để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (14,3 g; hiệu suất 77,1%). MS (m/z): 309/311 (M+1).

Ví dụ điều chế 4

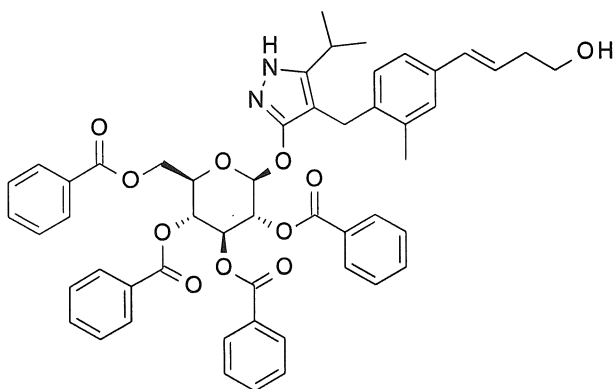
4-(4-bromo-2-metylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranosit



Sơ đồ 1, bước D: Bổ sung vào bình dung tích 1L, 4-[(4-bromo-2-methylphenyl)methyl]-5-isopropyl-1*H*-pyrazol-3-ol (20 g, 64,7 mmol), alpha-D-glucopyranosyl bromua tetrabenzoat (50 g, 76 mmol), benzyltributylamoni clorua (6 g, 19,4 mmol), diclometan (500 mL), kali cacbonat (44,7 g, 323 mmol) và nước (100 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Chiết bằng diclometan (500mL). Rửa phần chiết bằng nước (300 mL) và nước muối (500 mL). Làm khô pha hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô trong áp suất giảm. Tinh chế phần cặn bằng phương pháp sắc ký nhanh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (37 g, 64 mmol). MS (m/z): 889,2 (M+1), 887,2 (M-1).

Ví dụ điều chế 5

4-{4-[(1*E*)-4-hydroxybut-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranosit

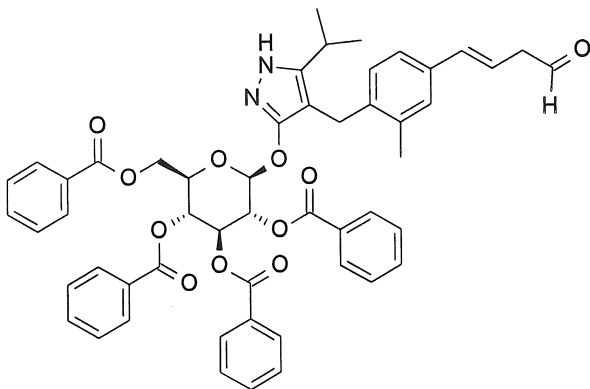


Sơ đồ 1, bước E: Bổ sung 3-buten-1-ol (0,58 mL, 6,8 mmol) vào dung dịch chứa 4-(4-bromo-2-methylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranosit (3 g, 3,4 mmol) trong axetonitril (30 mL) và

triethylamin (20 mL). Loại khí dung dịch này bằng nitơ trong 10 phút. Bổ sung tri-*o*-tolylphosphin (205 mg, 0,67 mmol) và paladi axetat (76 mg, 0,34 mmol). Hồi lưu ở 90 °C trong 2 giờ. Làm mát đến nhiệt độ trong phòng và cô để loại dung môi trong áp suất giảm. Tinh chế phân cận bằng phương pháp sắc ký nhanh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (2,1 g, 2,4 mmol). MS (*m/z*): 878,4 (*M*+1).

Ví dụ điều chế 6

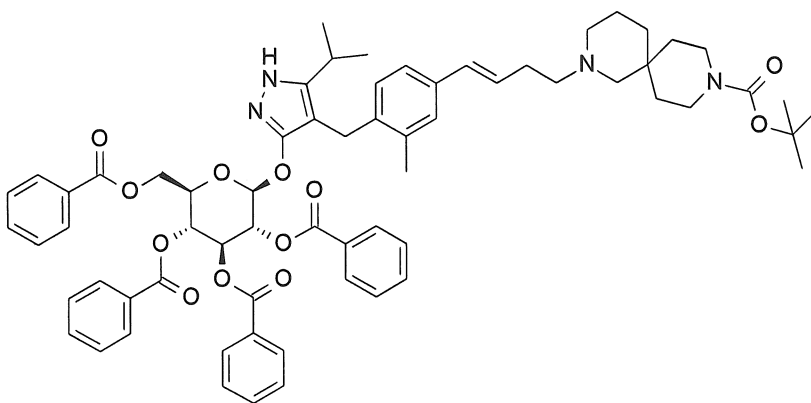
4-{4-[(1*E*)-4-oxybut-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl
2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-beta-D-glucopyranosit



Sơ đồ 1, bước F: Bổ sung 3,3,3-triaxetoxy-3-iodophtalit (134 mg, 0,96 mmol) vào dung dịch chứa 4-{4-[(1*E*)-4-hydroxybut-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-beta-D-glucopyranosit (280 mg, 0,32 mmol) và natri bicacbonat (133,8 mg, 1,6 mmol) trong diclometan (20 mL) ở 0 °C. Sau 15 phút ở nhiệt độ trong phòng, ngừng phản ứng bằng dung dịch nước natri thiosulfat bão hòa (10 mL). Chiết bằng diclometan (30 mL). Rửa phần chiết bằng nước (30 mL) và nước muối (40 mL). Làm khô pha hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô trong áp suất giảm. Tinh chế phân cận thu được bằng phương pháp sắc ký nhanh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (270 mg, 0,31 mmol). MS (*m/z*): 876,5 (*M*+1), 874,5 (*M*-1).

Ví dụ điều chế 7

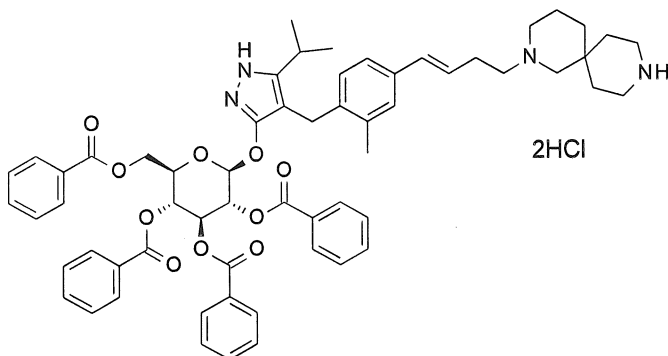
tert-butyl 2-{(3*E*)-4-[3-metyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl}metyl)phenyl]but-3-en-1-yl}-2,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat



Sơ đồ 1, bước G: Bổ sung natri triaxetoxymorhydrua (98 mg, 0,46 mmol) vào dung dịch chứa 4-{4-[(1*E*)-4-oxybut-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranosit (270 mg, 0,31 mmol) và tert-butyl 2,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat hydroclorua (179 mg, 0,62 mmol) trong 1,2-dicloetan (5 mL). Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, ngừng phản ứng bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (10 mL). Chiết bằng diclometan (30 mL). Rửa phần chiết bằng nước (30 mL) và nước muối (40 mL), làm khô pha hữu cơ qua natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký nhanh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (275 mg, 0,25 mmol).
MS (*m/z*): 1115,6 (*M*+1).

Ví dụ điều chế 8

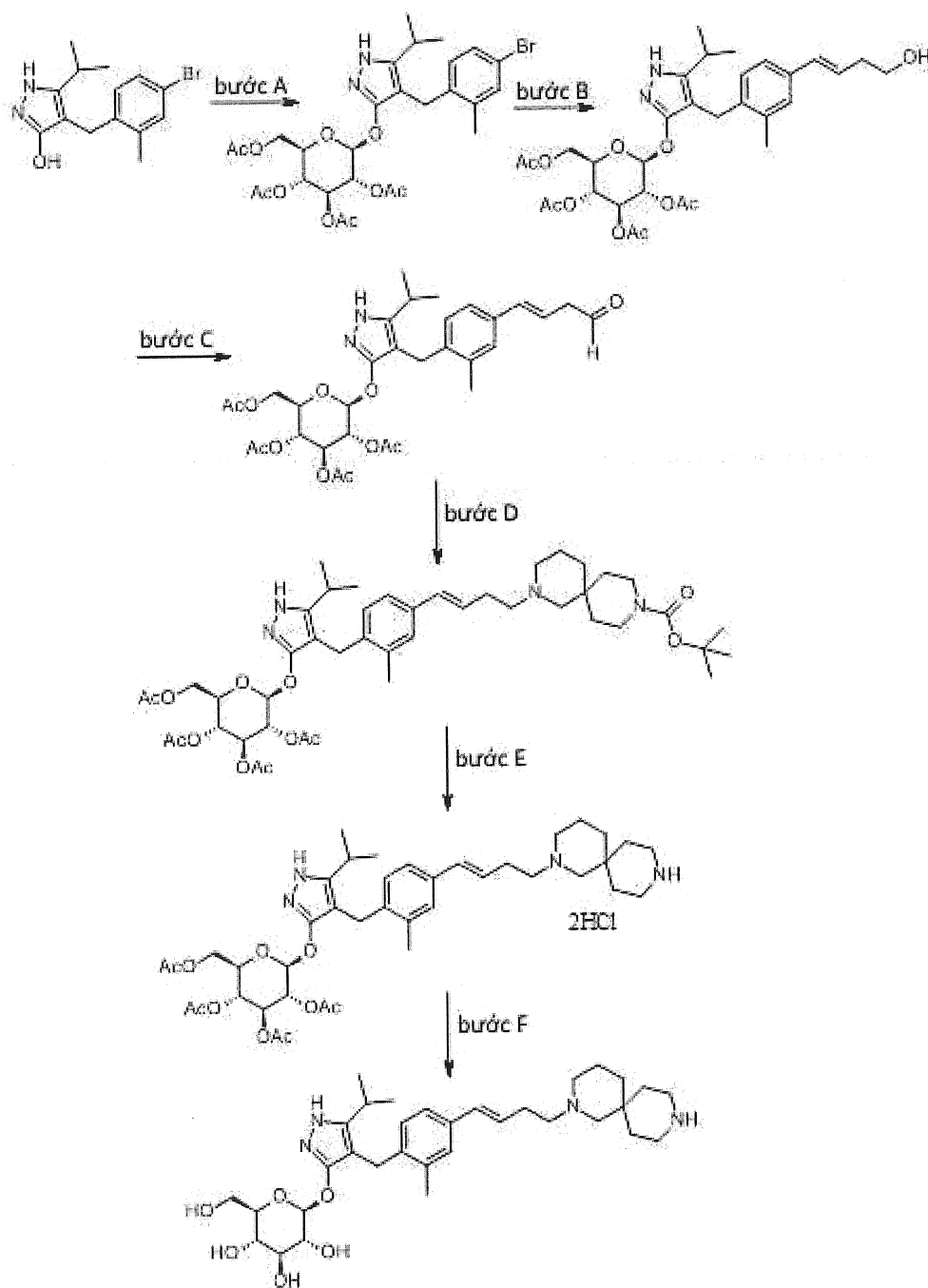
4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranosit dihydroclorua



Sơ đồ 1, bước H: Bổ sung hydro clorua (dung dịch 4,0 M trong 1,4-dioxan, 0,6 mL, 2,4 mmol) vào dung dịch chứa tert-butyl 2-{(3*E*)-4-[3-metyl-4-((5-(propan-2-yl)-

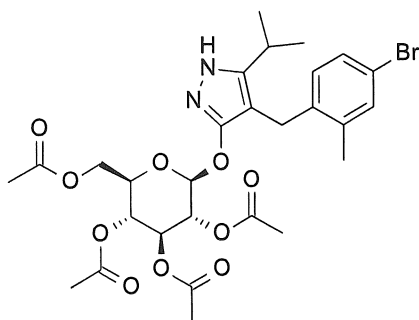
3-[(2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl]phenyl]but-3-en-1-yl}-2,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (275 mg, 0,25 mmol) trong diclometan (5 mL). Sau khi để qua đêm (18 giờ) ở nhiệt độ trong phòng, cô để loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn (258 mg, 0,24 mmol). MS (m/z): 1015,6 (M+1).

Sơ đồ 2



Ví dụ điều chế 9

4-(4-bromo-2-metylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit.



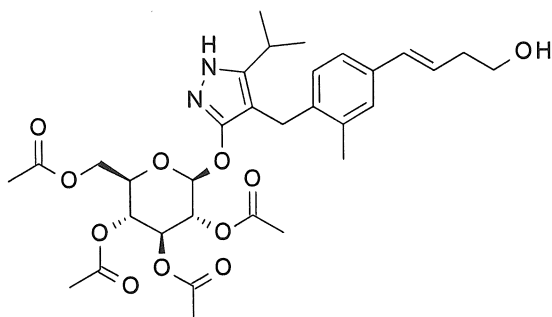
Sơ đồ 2, bước A: Bổ sung vào bình dung tích 1L, 4-[(4-bromo-2-metylphenyl)metyl]-5-isopropyl-1H-pyrazol-3-ol (24 g, 77,6 mmol), 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-alpha-D-glucopyranosyl bromua (50,4 g, 116 mmol), benzyltributylamoni clorua (5 g, 15,5 mmol), diclometan (250 mL), kali cacbonat (32 g, 323 mmol) và nước (120 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Chiết bằng diclometan (450 mL). Rửa phần chiết bằng nước (300 mL) và nước muối (500 mL). Làm khô pha hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô trong áp suất giảm. Tinh chế phân cận thu được bằng phương pháp sắc ký nhanh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (36,5 g, 57 mmol). MS (m/z): 638,5 (M+1), 636,5 (M-1).

Phương pháp khác để tổng hợp 4-(4-bromo-2-metylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit.

Chất phản ứng 4-[(4-bromo-2-metylphenyl)metyl]-5-isopropyl-1H-pyrazol-3-ol (24,0 g, 77,6 mmol), 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-alpha-D-glucopyranosyl bromua (50,4 g, 116 mmol), benzyltributylamoni clorua (4,94 g, 15,52 mmol), kali cacbonat (32,18 g, 232,9 mmol), diclometan (250 mL) và nước (120 mL) được kết hợp và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 18 giờ. Hỗn hợp này được phân đoạn giữa diclometan (250 mL) và nước (250 mL). Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối (250 mL), làm khô qua Na₂SO₄, lọc, và cô trong áp suất giảm. Phân cận thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (giải hấp bằng etyl axetat 10% trong diclometan đến etyl axetat trong diclometan 70%) để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (36,5 g, hiệu suất 74%). MS (m/z): 639/641 (M+1).

Ví dụ điều chế 10

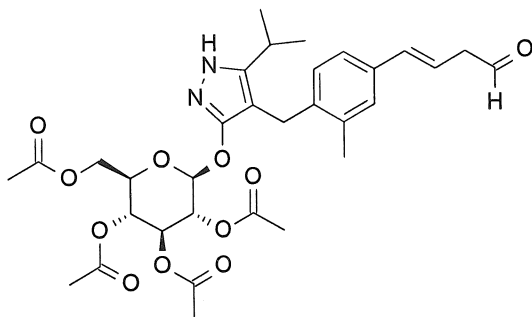
4-{4-[(1*E*)-4-hydroxybut-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl
2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit



Sơ đồ 2, bước B: Bổ sung 3-buten-1-ol (6,1 mL, 70 mmol) vào dung dịch chứa 4-(4-bromo-2-metylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit (15 g, 23,5 mmol) trong axetonitril (200 mL) và trietylamin (50 mL). Loại khí dung dịch này bằng nitơ trong 10 phút. Bổ sung tri-*o*-tolylphosphin (1,43 g, 4,7 mmol) và paladi axetat (526 mg, 2,35 mmol). Sau khi hồi lưu ở 90 °C trong 2 giờ, làm mát, và cô để loại bỏ dung môi trong áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký nhanh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (7,5 g, 11,9 mmol). MS (*m/z*): 631,2 (*M*+1), 629,2 (*M*-1).

Ví dụ điều chế 11

4-{4-[(1*E*)-4-oxybut-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl
2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit

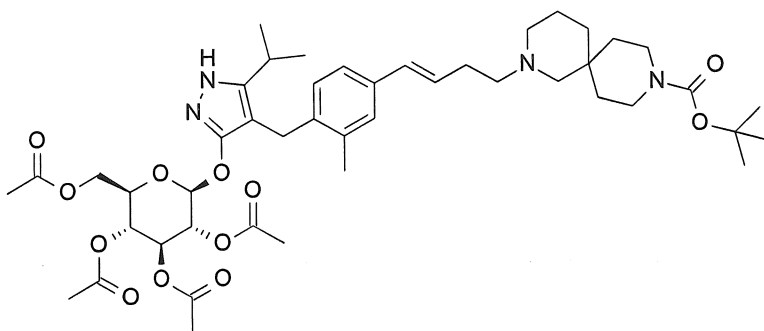


Sơ đồ 2, bước C: Bổ sung 3,3,3-triaxetoxy-3-iodophtalit (2,1g, 4,76 mmol) vào dung dịch chứa 4-{4-[(1*E*)-4-hydroxybut-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit (1,5 g, 2,38 mmol) và natri bicacbonat (2 g, 23,8 mmol) trong diclometan (50 mL) ở 0 °C. Sau 15 phút ở

nhiệt độ trong phòng, ngừng phản ứng bằng dung dịch nước natri thiosulfat bão hòa (10 mL). Chiết bằng diclometan (30 mL), rửa phần chiết bằng nước (30 mL) và nước muối (40 mL). Làm khô pha hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô trong áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký nhanh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (0,95 g, 1,51 mmol). MS (m/z): 628,8 (M+1), 626,8 (M-1).

Ví dụ điều chế 12a

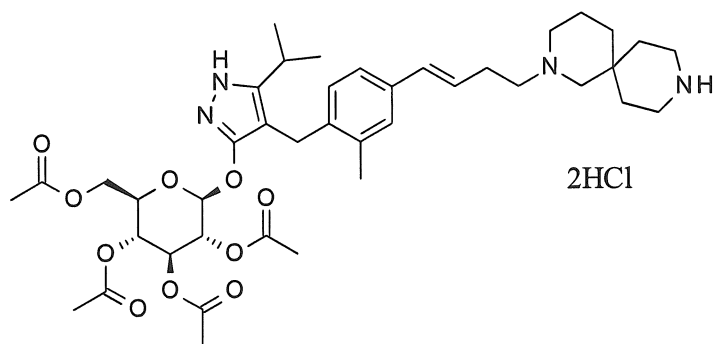
tert-butyl 2-{(3*E*)-4-[3-metyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl)metyl]phenyl]but-3-en-1-yl}-2,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat



Sơ đồ 2, bước D: Bổ sung natri triaxetoxyborohydrua (303 mg, 1,4 mmol) vào dung dịch chứa 4-{4-[(1*E*)-4-oxybut-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit (600 mg, 0,95 mmol) và tert-butyl 2,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat hydroclorua (333 mg, 1,2 mmol) trong 1,2-dicloetan (30 mL). Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, ngừng phản ứng bằng dung dịch nước natri bicarbonat bão hòa (15 mL). Chiết bằng diclometan (60 mL). Rửa phần chiết bằng nước (30 mL) và nước muối (60 mL). Làm khô pha hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô trong áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký nhanh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (500 mg, 0,58 mmol). MS (m/z): 866,8, 867,8 (M+1), 864,8, 865,8 (M-1).

Ví dụ điều chế 13

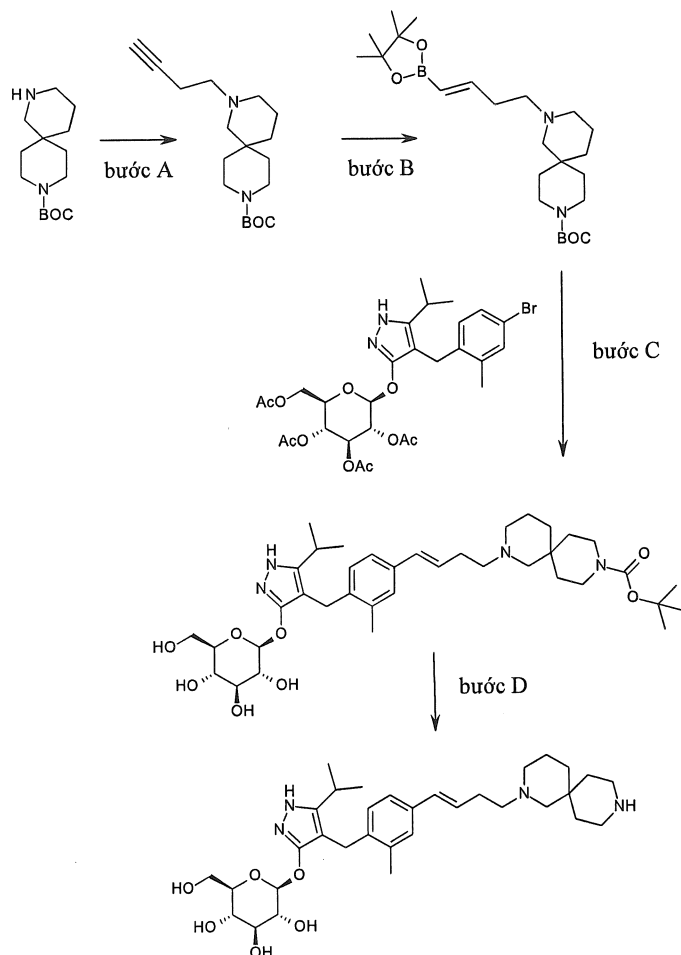
4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit dihydroclorua



Sơ đồ 2, bước E: Bổ sung hydro clorua (dung dịch 4,0 M trong 1,4-dioxan, 1,5 mL, 5,8 mmol) vào dung dịch chứa tert-butyl 2-[(3*E*)-4-[3-metyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl}metyl)phenyl]but-3-en-1-yl]-2,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (500 mg, 0,58 mmol) trong diclometan (20 mL). Sau 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, cô để loại dung môi trong áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn (480 mg, 0,57 mmol).

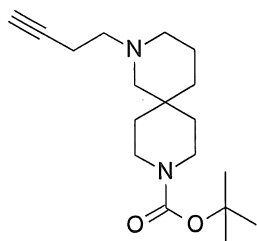
MS (m/z): 767,4 (M+1).

Sơ đồ 3



Ví dụ điều chế 14

tert-butyl 4-but-3-ynyl-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat

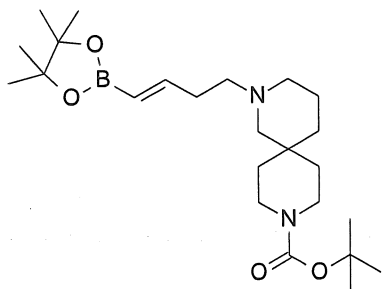


Sơ đồ 3, bước A: Xesi cacbonat (46,66 g, 143,21 mmol) được bổ sung vào huyền phù chứa tert-butyl 4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat hydroclorua (16,66 g, 57,28 mmol) trong axetonitril (167 mL). Hỗn hợp này được khuấy trong 10 phút ở nhiệt độ môi trường sau đó bổ sung 4-bromobutyn (6,45 mL, 68,74 mmol). Hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến hồi lưu và khuấy trong 18 giờ. Hỗn hợp này được làm mát và cô trong áp suất giảm. Phần cặn được phân đoạn giữa nước (200 mL) và

ethyl axetat (150 mL). Các pha được tách và lớp nước được chiết bằng ethyl axetat (100 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước (200 mL), sau đó là nước muối (150 mL), làm khô qua MgSO_4 , lọc, và cô trong áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (17,2 g, hiệu suất 98%). ^1H NMR (300,11 MHz, CDCl_3): δ 3,43-3,31 (m, 4H), 2,53-2,48 (m, 2H), 2,37-2,29 (m, 4H), 2,20 (s, 2H), 1,94 (t, $J = 2,6$ Hz, 1H), 1,44 (s, 17H).

Ví dụ điều chế 15

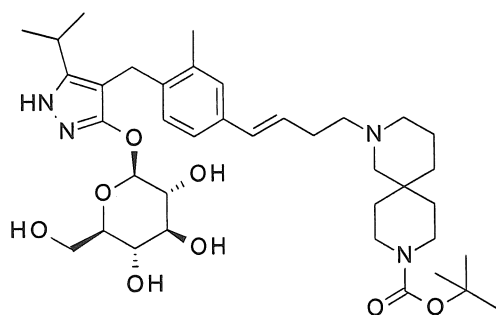
tert-butyl 4-[(*E*)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)but-3-enyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat



Sơ đồ 3, bước B: Triethylamin (5,62 mmol; 0,783 mL), 4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan (8,56 mL, 59,0 mmol) và zirconoxen clorua (1,45 g, 5,62 mmol) được bổ sung vào tert-butyl 4-but-3-ynyl-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (17,21 g, 56,16 mmol). Hỗn hợp thu được được đun nóng đến 65°C trong 3,5 giờ. Hỗn hợp này được làm mát và hòa tan trong diclometan (150 mL). Dung dịch thu được được cho chảy qua đệm silica gel dày ~4cm, giải hấp bằng diclometan (2 x 200 mL). Dịch lọc được cô trong áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (21,2 g, hiệu suất 87%). ^1H NMR (300,11 MHz, CDCl_3): δ 6,65-6,55 (m, 1H), 5,49-5,43 (m, 1H), 3,42-3,29 (m, 4H), 2,40-2,27 (m, 6H), 2,25-2,08 (m, 2H), 1,70 – 1,13 (m, 29H).

Ví dụ điều chế 16

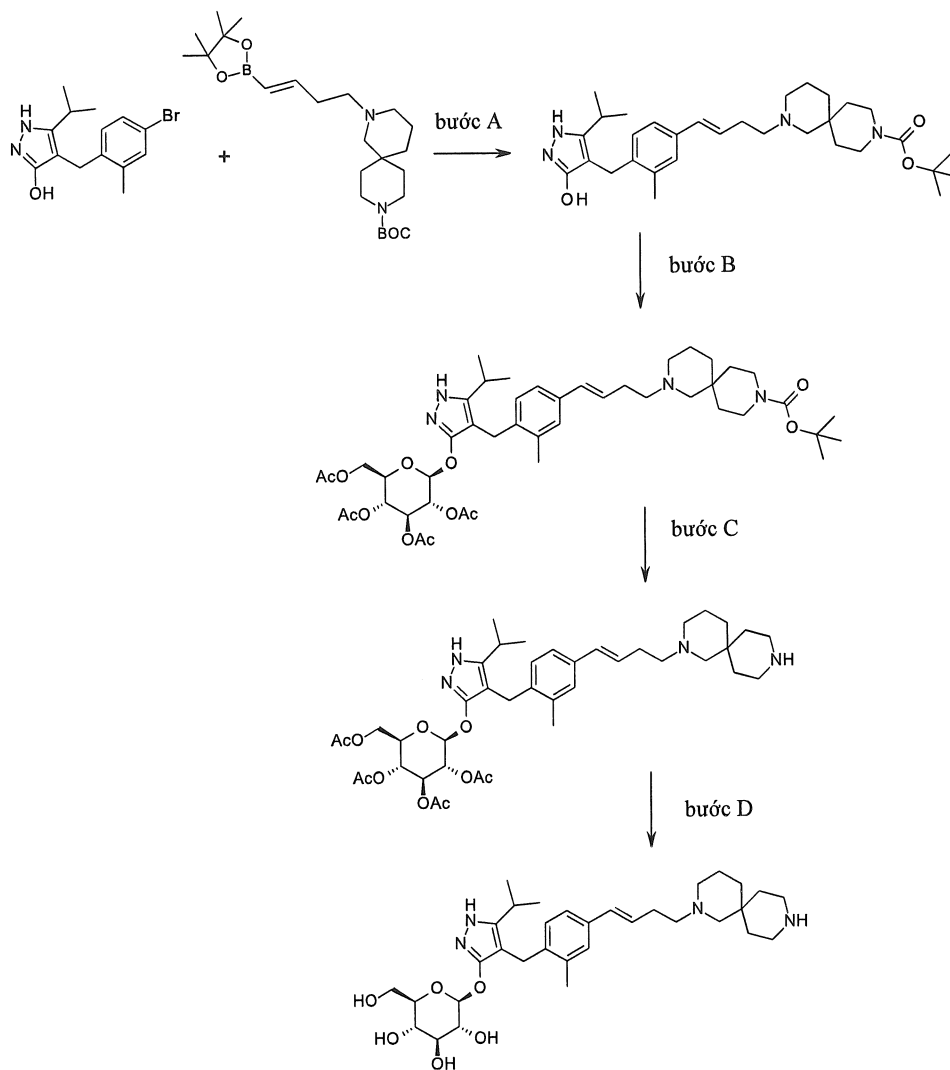
tert-butyl 2-[(3*E*)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-beta-D-glucopyranosyl}oxy)-1*H*-pyrazol-4-yl]methyl]phenyl]but-3-en-1-yl]-2,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat



Sơ đồ 3, bước C: Dung dịch chứa 4-(4-bromo-2-methylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit (20 g, 31,3 mmol), tert-butyl 4-[(*E*)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)but-3-enyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (16,3 g, 37,5 mmol) và kali cacbonat (12,97 g, 93,82 mmol) trong tetrahydrofuran (200 mL) và nước (40 mL) được loại khí trong 15 phút bằng các sục bong bóng khí nitơ qua đó. Pd(OAc)₂ (140 mg, 625 μmol) và 2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-tri-*i*-propyl-1,1'-biphenyl (0,596 g, 1,25 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến hồi lưu trong 16 giờ. Dung dịch này được làm mát đến nhiệt độ môi trường và metanol (200 mL) được bổ sung vào. Sau 30 phút, dung môi được loại bỏ trong áp suất giảm. Hỗn hợp này được phân đoạn giữa etyl axetat (500 mL) và nước muối (500 ml) có bổ sung dung dịch nước MgSO₄ (1M; 500 ml) để hỗ trợ việc phân pha. Các lớp được tách và lớp hữu cơ được làm khô qua MgSO₄ và lọc qua đệm silica gel dày 10 cm, giải hấp bằng etyl axetat (~1,5 L). Dịch lọc được loại bỏ và đệm silica được dội bằng 5% MeOH trong THF (2 L). Dịch lọc chứa metanol được cô trong áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (20,1g, 92%).

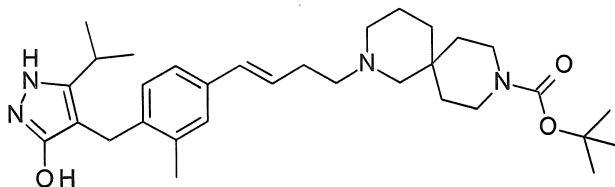
MS (*m/z*): 699 (*M*+1).

Sơ đồ 4



Ví dụ điều chế 17

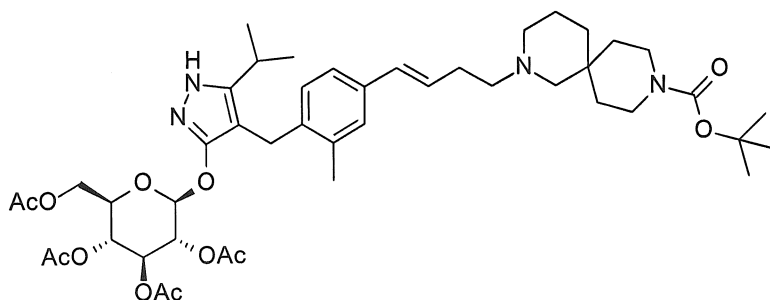
tert-butyl 4-[(E)-4-[4-[(3-hydroxy-5-isopropyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-3-methylphenyl]but-3-enyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat



Sơ đồ 4, bước A: Bổ sung tert-butyl 4-[(*E*)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)but-3-enyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (35,8 kg, 82,4 mol) trong metanol (130 L) vào dung dịch chứa 4-[(4-bromo-2-methyl-phenyl)methyl]-5-isopropyl-1*H*-pyrazol-3-ol (23,9 kg, 77,3 mol) trong metanol (440 L) ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung nước (590 L) và trikali phosphat (100 kg, 471,7 mol) và đặt hỗn hợp phản ứng trong khí quyển nitơ. Bổ sung vào dung dịch có khuấy huyền phù chứa tris(dibenzylidenaxeton) dipaladi (1,42 kg, 1,55 mol) và di-tert-butylmethylphosphoni tetraflorolat (775 g, 3,12 mol) trong metanol (15 L). Hỗn hợp thu được được đun nóng ở 75 °C trong 2 giờ. Làm mát hỗn hợp và lọc qua đất diatomit. Rửa bánh lọc bằng metanol (60 L), và cô dịch lọc trong áp suất giảm. Bổ sung etyl axetat (300 L), tách các lớp, và rửa lớp hữu cơ bằng nước muối 15% (3 x 120 L). Cô lớp hữu cơ trong áp suất giảm, bổ sung etyl axetat (300 L), và khuấy hỗn hợp này trong 18 đến 20 giờ. Bổ sung heptan (300 L), làm mát hỗn hợp đến 10 °C, và khuấy hỗn hợp trong thêm 18 đến 20 giờ nữa. Thu gom các chất rắn thu được bằng cách lọc, rửa bánh lọc bằng etyl axetat/heptan (2:3, 2 x 90 L), và làm khô trong chân không ở 40°C để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (29,3 kg, hiệu suất 70,6%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,14 (s, 1H), 7,07 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,92 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,39 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 6,25-6,12 (m, 1H), 3,63 (s, 2H), 3,45-3,38 (bs, 3H), 3,34 (s, 3 H), 3,33 (s, 3H), 2,85-2,75 (m, 1H), 2,49-2,40 (m, 5 H), 2,33 (s, 3H), 1,68-1,62 (m, 2H), 1,60-1,36 (m, 15H), 1,11 (s, 3H), 1,10 (s, 3H).

Ví dụ điều chế 12b

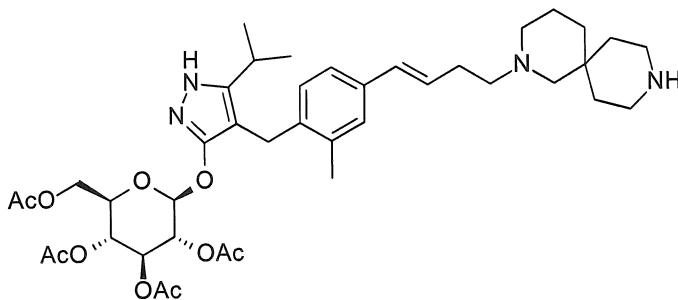
Cách khác để điều chế tert-butyl 2-[(3*E*)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl}methyl)phenyl]but-3-en-1-yl]-2,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat.



Sơ đồ 4, bước B: Kết hợp tert-butyl 4-[(E)-4-[4-[(3-hydroxy-5-isopropyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-3-methyl-phenyl]but-3-enyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (17,83 kg, 33,2 mol), axetonitril (180 L), và benzyltributylamoni clorua (1,52 kg, 4,87 mol) ở nhiệt độ trong phòng. Từ từ bổ sung kali cacbonat (27,6 kg, 199,7 mol) và khuấy hỗn hợp này trong 2 giờ. Bổ sung 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-alpha-D-glucopyranosyl bromua (24,9 kg, 60,55 mol), làm ấm hỗn hợp phản ứng đến 30°C và khuấy trong 18 giờ. Cô hỗn hợp này trong áp suất giảm và bổ sung etyl axetat (180 L), tiếp theo là nước (90 L). Tách các lớp, rửa pha hữu cơ bằng nước muối 15% (3 x 90 L), cô hỗn hợp, và tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký cột trên silica gel (63 kg, etyl axetat/heptan làm chất giải hấp (1:2→1:0)) để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (19,8 kg, độ tinh khiết 94%, hiệu suất 68,8%) dưới dạng bột màu vàng. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,13 (s, 1H), 7,03 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 6,78 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 6,36 (d, J= 16,0, 1H), 6,25-6,13 (m, 1H), 5,64 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 5,45-5,25 (m, 2H), 5,13-4,95 (m, 2H), 4,84-4,76 (m, 1H), 4,25-4,13 (m, 2H), 4,10-4,00 (m, 2H), 3,90-3,86 (m, 1H), 3,58-3,50 (m, 2H), 3,40-3,22 (m, 4H), 2,89-2,79 (m, 1H), 2,10-1,90 (m, 18 H), 1,82 (s, 3H), 1,62-0,82 (m, 22H).

Ví dụ điều chế 18

2-[(3E)-4-[3-metyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1H-pyrazol-4-yl)methyl]phenyl]but-3-en-1-yl]-2,9-diazaspiro[5.5]undecan



Sơ đồ 4, bước C: Kết hợp tert-butyl 2-[(3E)-4-[3-metyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1H-pyrazol-4-yl)methyl]phenyl]but-3-en-1-yl]-2,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (19,6 kg, 22,6 mol) với diclometan (120 L) và làm mát đến 0°C. Từ từ bổ sung axit trifloaxetic

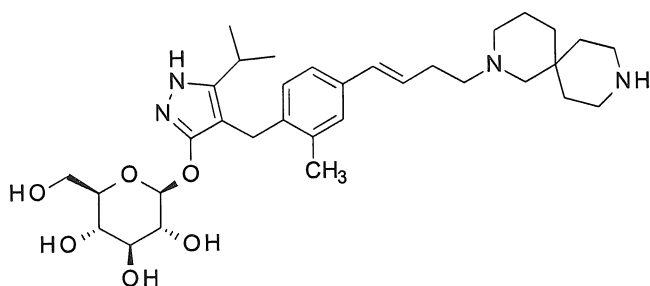
(34,6 L, 51,6 kg, 452 mol) và khuấy trong 9 giờ. Ngừng phản ứng bằng nước đá (80 L), và bổ sung amoni hydroxit (85-90 L) để điều chỉnh độ pH của hỗn hợp phản ứng đến (8-9). Bổ sung diclometan (120 L), làm ấm hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, và tách các lớp. Rửa lớp hữu cơ bằng nước (75 L), nước muối, và cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (16,2 kg, độ tinh khiết 95,0%, hiệu suất 93%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,08 (s, 1H), 6,99 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,76 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,38 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 6,00-5,83 (m, 1H), 5,31 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,25-5,13 (m, 4H), 4,32 (dd, J = 12,8, 9,2 Hz, 1H), 4,14 (d, J = 11,2 Hz, 1H), 3,90 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 3,75-3,50 (m, 3H), 3,30-3,00 (m, 5 H), 2,85-2,75 (m, 1H), 2,70-2,48 (m, 3H), 2,25 (s, 1H), 2,13-1,63 (m, 19H), 1,32-1,21 (m, 1H), 1,14 (s, 3H), 1,13 (s, 3H), 1,12 (s, 3H), 1,10 (s, 3H).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit axetat dạng tinh thể được hydrat hóa

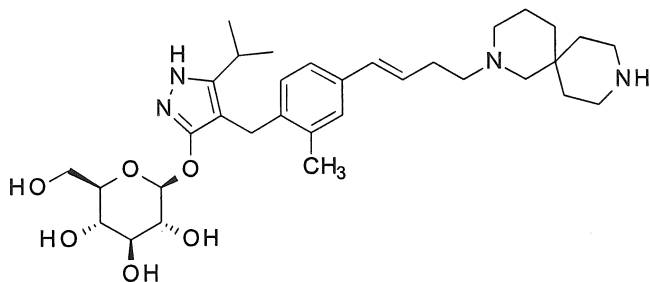
Phương pháp khác thứ nhất để điều chế 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit (bazơ tự do).



Sơ đồ 1, bước I: Bổ sung natri hydroxit (0,5 mL, 0,5 mmol, dung dịch 1,0 M) vào dung dịch chứa 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-metylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranosit dihydroclorua (258 mg, 0,24 mmol) trong metanol (2 mL). Sau 2 giờ ở 40°C, cô để loại bỏ dung môi trong áp suất giảm để tạo ra phần cặn, mà được tinh chế bằng

phương pháp HPLC điều chế: độ pH cao, 25% B trong 4 phút, 25-40% B trong 4 phút @ 85 mL/phút bằng cách sử dụng cột C18XBridge ODB 30 x 75 mm, 5 μ m, dung môi A – H₂O với NH₄HCO₃ ở độ pH=10, dung môi B – MeCN để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (bazơ tự do) dưới dạng chất rắn (46 mg, 0,08 mmol). MS (m/z): 598,8 (M+1), 596,8 (M-1).

Phương pháp khác thứ hai để điều chế 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit (bazơ tự do).



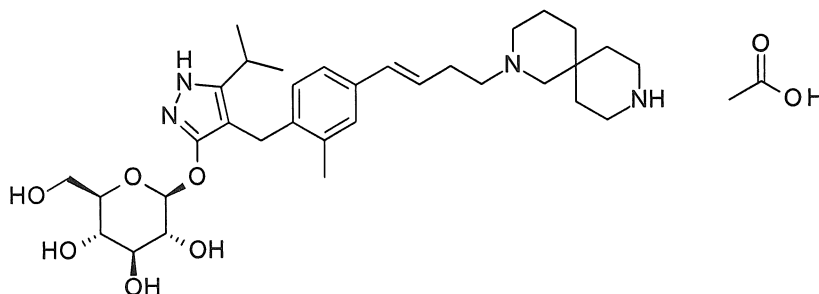
Sơ đồ 2, bước F: Bổ sung metanol (5 mL), triethylamin (3 mL), và nước (3 mL) vào 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit dihydroclorua (480 mg, 0,24 mmol). Sau 18 giờ (qua đêm) ở nhiệt độ trong phòng, cô đến khô trong áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp HPLC điều chế: độ pH cao, 25% B trong 4 phút, 25-40% B trong 4 phút ở tốc độ 85 mL/phút bằng cách sử dụng cột C18XBridge ODB 30 x 75 mm, 5 μ m, dung môi A – H₂O với NH₄HCO₃ ở độ pH=10, dung môi B – MeCN để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (bazơ tự do) dưới dạng chất rắn (50 mg, 0,08 mmol).

MS (m/z): 598,8 (M+1), 596,8 (M-1). ¹H NMR (400,31 MHz, CD₃OD): δ 7,11 (d, J=1,3 Hz, 1H), 7,04 (dd, J=1,3,8,0 Hz, 1H), 6,87 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 6,36 (d, J= 15,8 Hz, 1H), 6,16 (dt, J= 15,8, 6,3 Hz, 1H), 5,02 (m, 1H), 3,81 (d, J= 11,7 Hz, 1H), 3,72 (d, J= 16,8 Hz, 1H), 3,68 (d, J= 16,8 Hz, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,37-3,29 (m, 4H), 2,79 (m, 1H), 2,72 (t, J= 5,8 Hz, 4H), 2,44-2,33 (m, 6H), 2,30 (s, 3H), 2,26 (broad s, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,50 (m, 2H), 1,43 (m, 2H), 1,36 (m, 2H), 1,11 (d, J= 7,0 Hz, 3H), 1,10 (d, J= 7,0 Hz, 3H).

Phương pháp khác thứ ba để điều chế 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit.

Sơ đồ 3, bước D: Axit trifluoroacetic (32,2 mL; 0,426 mol) được bổ sung vào dung dịch chứa tert-butyl 2-[(3*E*)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl]methyl]phenyl]but-3-en-1-yl]-2,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (14,87 g; 21,28 mmol) trong diclometan (149 mL) được làm mát trong nước đá. Dung dịch này được để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng. Sau 30 phút, hỗn hợp này được bổ sung từ từ vào amoniac trong MeOH (2M; 300 mL), làm mát nếu cần để duy trì nhiệt độ không đổi. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Hỗn hợp này được cô trong áp suất giảm và phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng nhựa SCX-2. Dịch lọc có tính bazơ được cô trong áp suất giảm và phần cặn được nghiền/siêu âm trong etyl axetat, lọc và làm khô. Chất rắn thu được được hòa tan trong MeOH (200mL) và cô trong chân không. Bước này được lặp lại vài lần để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (bazơ tự do) (12,22 g, hiệu suất 96%). MS (m/z): 599 (M+1); $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ (C=0,2, MeOH).

Điều chế hợp chất nêu ở đề mục cuối cùng, 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit axetat dạng tinh thể được hydrat hóa.



4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit (902 mg) được cho vào bình đáy tròn (100 mL) và xử lý bằng etyl axetat ấm (18 mL). [Lưu ý - etyl axetat ấm được điều chế bằng cách trộn etyl axetat (100 mL) với nước khử ion (100 mL). Sau khi trộn, các lớp được để cho tách riêng, và lớp etyl axetat ấm trên cùng được lấy ra để sử dụng.

Axit axetic là sản phẩm thủy phân của etyl axetat và có trong etyl axetat ẩm.] Hợp chất này tan, dù không hoàn toàn khi etyl axetat ẩm được bổ sung vào. Sau vài phút, kết tủa trắng tạo thành. Một lượng etyl axetat ẩm nữa (2 mL) được bổ sung vào để hòa tan phần hợp chất còn lại. Dung dịch này được để có khuấy không đáy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng, trong thời gian đó dung môi bay hơi một phần. Dung môi còn lại trong huyền phù đặc thu được được loại bỏ trong chân không, và chất rắn thu được được làm khô dưới dòng khí nitơ để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục cuối cùng dưới dạng chất rắn tinh thể. Lượng nhỏ nguyên liệu vô định hình được nhận dạng trong sản phẩm bằng NMR trạng thái rắn. Hợp chất nêu ở đề mục cuối cùng dạng tinh thể này có thể được sử dụng làm tinh thể mầm để điều chế thêm hợp chất nêu ở đề mục cuối cùng dạng tinh thể.

Phương pháp khác để điều chế hợp chất nêu ở đề mục cuối cùng, 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit axetat dạng tinh thể được hydrat hóa.

Trong khi quyền nitơ, kết hợp 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-axetyl-beta-D-glucopyranosit (2,1 kg, 2,74 mol), metanol (4,4 L), tetrahydrofuran (4,2 L), và nước (210 mL). Bổ sung kali cacbonat (460 g, 3,33 mol) và khuấy trong bốn đến sáu giờ, sau đó lọc hỗn hợp phản ứng để loại bỏ chất rắn. Cô dịch lọc trong áp suất giảm, sau đó bổ sung etanol (9,0 L) tiếp theo là axit axetic (237 mL, 4,13 mol) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Bổ sung từ từ vào dung dịch đang khuấy etyl axetat ẩm (10 L, chứa nước với lượng khoảng 3% khối lượng/khối lượng) trong năm giờ, tiếp theo là nước (500 mL). Khuấy huyền phù này trong mười hai giờ và bổ sung etyl axetat ẩm (4,95 L, chứa nước với lượng khoảng 3% khối lượng/khối lượng) trong khoảng thời gian tám giờ. Khuấy huyền phù này trong mười hai giờ và bổ sung etyl axetat ẩm (11,5 L, chứa nước với lượng khoảng 3% khối lượng/khối lượng) từ từ trong mười sáu giờ. Khuấy huyền phù này trong mười hai giờ, thu gom các chất rắn bằng cách lọc và rửa các chất rắn này bằng etyl axetat ẩm (3,3 L, chứa nước với lượng khoảng 3% khối lượng/khối lượng). Làm khô bằng lò trong áp suất giảm ở nhiệt độ dưới 30°C để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn dạng tinh thể màu trắng

nhờ (1,55 kg, 2,35 mol, độ tinh khiết 96,7%, hiệu lực 72,4% khối lượng/khối lượng, hiệu suất 68,0% dựa trên hiệu lực). HRMS (m/z): 599,3798 (M+1).

Nhiều xạ bột tia X (X-Ray Powder Diffraction - XRD)

Thu được các nhiễu xạ đồ XRD của các chất rắn dạng tinh thể bằng cách sử dụng máy nhiễu xạ bột tia X Bruker D8 Advance, có lắp nguồn CuK α ($\lambda = 0,154060$ nm (1,54060 Å)) và cảm biến Linxeye, vận hành ở 40 kV và 40 mA. Mẫu được quét trong khoảng góc nhiễu xạ 2-theta từ 4 và 40°, với bước góc nhiễu xạ 2-theta là 0,0084° và tốc độ quét là 0,5 giây/bước, và với khe phân kỳ là 0,2 mm. Bột khô được đưa vào thiết bị chứa mẫu bằng silic oxit nền thấp và tạo bề mặt trơn bằng cách sử dụng con trượt thủy tinh. Các nhiễu xạ đồ dạng tinh thể thu được ở nhiệt độ 22°C và độ ẩm tương đối 42%. Đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì cường độ tương đối của các đỉnh nhiễu xạ có thể thay đổi do sự định hướng ưu tiên có nguyên nhân từ các yếu tố nhất định, như yếu tố hình thái tinh thể. Khi xuất hiện tác động của sự định hướng được ưu tiên, thì cường độ đỉnh bị thay đổi, nhưng các vị trí đỉnh có tính đặc trưng dạng đa hình là không thay đổi. Xem, *ví dụ*, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, trang 1843-1844, 1995. Ngoài ra, cũng đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là đối với một dạng tinh thể nào đó thì các vị trí đỉnh góc có thể thay đổi một chút. Ví dụ, các vị trí đỉnh có thể bị dịch chuyển do biến đổi của nhiệt độ hoặc độ ẩm, là môi trường phân tích mẫu, của sự dịch chuyển mẫu, hoặc của sự có mặt hay không có mặt của chất nội chuẩn. Trong trường hợp này, sai khác vị trí đỉnh về góc nhiễu xạ 2-theta là $\pm 0,2$ thì sẽ tính đến khả năng do các biến đổi nêu trên mà không ảnh hưởng đến việc xác định một cách rõ ràng dạng tinh thể được phân tích. Có thể khẳng định một dạng tinh thể dựa trên tổ hợp duy nhất các đỉnh có tính phân biệt (theo đơn vị ° của góc nhiễu xạ 2-theta), thường là các đỉnh nổi trội hơn hẳn. Các nhiễu xạ đồ nhiễu xạ tinh thể, được tạo ở nhiệt độ môi trường xung quanh và độ ẩm tương đối, được điều chỉnh theo các đỉnh tiêu chuẩn 675 của National Bureau of Standards (NBS) ở góc nhiễu xạ 2-theta là 8,853 và 26,774 độ.

Mẫu được chuẩn bị của hợp chất 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit axetat dạng tinh thể được hydrat hóa đặc trưng bởi mẫu XRD bằng cách sử

dụng bức xạ CuK α có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2-theta) như được mô tả trong Bảng 1 dưới đây, và cụ thể là có các đỉnh ở 5,2° kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm 7,8°, 8,0°, và 10,7° (lần lượt $\pm 0,2^\circ$).

Đỉnh nhiễu xạ bột tia X của hợp chất 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranosit axetat dạng tinh thể được hydrat hóa.

Bảng 1

Đỉnh	Góc (2θ) +/- 0,2°	Cường độ tương đối (% so với đỉnh cường độ lớn cao nhất)
1	5,2	100
2	7,8	22,6
3	8,0	30,4
4	10,1	25,6
5	10,5	29,8
6	10,7	63,8
7	12,0	12,8
8	15,0	14,3
9	15,8	16,7
10	18,6	32,4
11	19,8	26,5
12	20,9	18,2

NMR trạng thái rắn ^{13}C (^{13}C ssNMR)

Phổ NMR phân cực chéo/quay góc ma thuật ^{13}C (NMR trạng thái rắn hay ssNMR) thu được bằng cách sử dụng phổ kế NMR Bruker Avance II 400 MHz vận hành ở tần số cacbon 100,622 MHz và tần số proton 400,131 MHz và được trang bị đầu dò cộng hưởng kép Bruker 4mm. Bộ khử vạch phụ TOSS được dùng cùng với bộ phân cực chéo có sử dụng bộ tách cặp SPINAL64 và xung CP hạt nhân H được tạo hình bằng RAMP100. Các thông số tiếp nhận là như sau: Độ rộng xung r.f. proton 90° là 2,6 μs , thời gian tiếp xúc là 2,0 ms, thời gian lặp lại xung là 3s, tần số MAS là 10 kHz, độ rộng phổ là 30 kHz, thời gian tiếp nhận là 34 ms và số lần quét là 18.661. Độ dịch chuyển hóa học được chuẩn hóa đến adamantan ($\delta = 29,5$ ppm) trong thử nghiệm riêng.

Cộng hưởng ssNMR ^{13}C đại diện của hợp chất 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diaza-spiro-[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl β -D-glucopyranosit axetate dạng tinh thể được hydrat hóa bao gồm: 181,8, 161,2, 160,0, 147,6, 137,4, 135,9, 135,3, 132,6, 131,6, 129,4, 127,3, 126,4, 122,2, 101,9, 99,7, 98,5, 97,9, 78,3, 77,7, 77,2, 76,3, 75,6, 69,1, 68,1, 64,2, 62,6, 60,1, 56,1, 54,2, 41,7, 40,5, 39,1, 34,7, 32,3, 31,5, 31,0, 29,2, 27,8, 26,4, 23,8, 20,8, 19,9, 18,4, và 16,9 ppm (lần lượt $\pm 0,2$ ppm).

Thử nghiệm yếu tố vận chuyển glucoza phụ thuộc natri 1 (SGLT1) và SGLT2

cADN mã hóa SGLT1 người (*slc5a1*, NM_000343), SGLT2 người (*slc5a2*, NM_003041) và SGLT1 chuột (*slc5a1*, NM_019810.4) lần lượt được mua từ các hãng Openbiosystems, Invitrogen và Openbiosystems. cADN được tách dòng vào vector pcDNA3.1+ để biểu hiện ở động vật có vú và được chuyển nhiễm ổn định vào tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO)-K1 bằng cách sử dụng quy trình chuyển nhiễm động vật có vú chuẩn. Dòng phụ biểu hiện SGLT của từng dòng tế bào biểu hiện quá mức được chọn dựa trên khả năng kháng neomycin (Geneticin, Invitrogen) và hoạt tính trong thử nghiệm hấp thu ^{14}C - α -methyl-D-glucopyranosit (^{14}C -AMG) (xem dưới đây). Các tế bào biểu hiện SGLT ổn định được duy trì bằng cách sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy tế bào chuẩn.

Hoạt tính SGLT được xác định bằng mức độ hấp thu ^{14}C -AMG phụ thuộc natri trong các dòng tế bào trên đây được mô tả như sau. Một trăm μL môi trường nuôi cấy chứa 30.000 tế bào được gieo vào từng lỗ của đĩa BioCoat poly-D-lysine 96 lỗ (Becton Dickinson) và nuôi cấy ở 37°C qua đêm. Môi trường nuôi cấy được hút ra và các tế bào được rửa hai lần bằng 200 μL dung dịch đệm phản ứng (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , MgCl_2 , và 14 mM axit N-2-hydroethylpiperazin-N'-2-etansulfonic (Hepes), độ pH=7,5). Dung dịch đệm dư được tháo ra lên trên khăn giấy. Ba mươi lăm μL dung dịch đệm phản ứng được bổ sung vào mỗi lỗ. Năm μL dimethylsulfoxit (DMSO) 10% trong dung dịch đệm phản ứng chứa hợp chất thử nghiệm với nồng độ khác nhau hoặc không chứa hợp chất thử nghiệm làm đối chứng, được pha vào mỗi lỗ. Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 10 μL ^{14}C -AMG trong dung dịch đệm phản ứng để tạo ra nồng độ cuối là 4 μM . Đĩa này được ủ ở 37°C trong 125 phút. Phản ứng được kết thúc

bằng cách hút dung dịch đệm phản ứng ra và sau đó rửa ba lần bằng 200 μ L dung dịch đệm phản ứng lạnh bằng. Hút thủ công để đảm bảo loại bỏ hoàn toàn dung dịch đệm phản ứng. Mười μ L NaOH 0,1 N được bổ sung vào mỗi lỗ và sau đó 100 μ L hỗn hợp nhấp nháy Supermix (PerkinElmer) được bổ sung vào. Sau khi trộn, tín hiệu nhấp nháy trong đĩa được đếm bằng thiết bị MicroBeta (PerkinElmer). Đường cong đáp ứng muối-liều được khớp với mô hình bốn-thông số thực nghiệm bằng cách sử dụng phần mềm ActivityBase (ID Business Solution) để xác định nồng độ ức chế ở mức ức chế bán tối đa (IC_{50}). Bazơ tự do theo Ví dụ 1 chủ yếu được thử nghiệm như mô tả trên đây.

Bảng 2: Hiệu lực *in vitro* của bazơ tự do theo Ví dụ 1 đối với SGLT1 và SGLT2

Hợp chất thử nghiệm	IC_{50} đối với SGLT1 người, nM	IC_{50} đối với SGLT2 người, nM	SGLT1 chuột IC_{50} , nM
Ví dụ 1 (bazơ tự do)	26 ± 20 (n=10)	6100 ± 1200 (n=10)	10 ± 2 (n=9)

Cụ thể hơn, dữ liệu trong Bảng 2 chứng tỏ rằng bazơ tự do theo Ví dụ 1 ức chế SGLT1 người và chuột *in vitro*, và hiệu lực hơn đối với SGLT1 người và chuột so với SGLT2 người *in vitro*.

Hiệu quả làm giảm mức glucoza trong thử nghiệm dung nạp glucoza đường uống (Oral Glucose Tolerance Test - OGTT)

Hợp chất thử nghiệm được bào chế bằng cách bổ sung chất dẫn 1% hydroxy-ethylxenluloza, 0,25% Tween® 80 với chất chống tạo bọt 0,05% vào hợp chất thử nghiệm đã cân trước để tạo ra dung dịch 1mg/ml. Hỗn hợp này được siêu âm bằng đầu dò trong khoảng 30 giây. Dung dịch thu được được sử dụng làm dung dịch gốc để từ đó pha chế các dung dịch liều với nồng độ thấp hơn bằng cách pha loãng bản chất chất dẫn.

Chuột C57Bl/6 được nhốt từng con một được cho nhịn đói qua đêm bằng cách không cho ăn từ chiều muộn ngày trước ngày thử nghiệm. Sáng hôm sau, chuột được cân và thu một mẫu máu khi đói bằng cách bấm đuôi để xác định mức glucoza bằng đường kế (Roche AccuChek). Các nhóm nghiên cứu (n=5) được xác định dựa trên mức đường glucoza trong máu khi đói và tốt hơn là bao gồm các động vật có mức glucoza nằm trong khoảng 80-100 mg/dl.

Sau khi chia nhóm, chuột đầu tiên được đưa vào dạ dày 10 ml/kg chế phẩm chứa hợp chất thử nghiệm và bắt đầu tính giờ. Mỗi động vật tiếp theo được cho sử dụng liều cách nhau một phút rưỡi. Ba giờ sau khi bắt đầu lần điều trị bằng hợp chất đầu tiên, mẫu máu mót cơ sở được thu để đo mức glucoza (từ động vật đầu tiên, bằng cách bấm đuôi). Sau đó động vật này được cho dùng ngay dextroza 50% (Hospira) đường uống với liều 3 g/kg. Các mẫu máu được thu để xác định mức glucoza, cách nhau chính xác một phút rưỡi, qua tĩnh mạch đuôi sao cho máu được thu ở mỗi động vật sau khi sử dụng liều dextroza 20, 40, 60 và 120 phút.

Bảng 3. Tác dụng làm giảm mức glucoza trong OGTT.

Kết quả thử nghiệm dung nạp glucoza đường uống trung bình $\pm$ sai số chuẩn (SE)					
ANOVA/ Bonferroni 2 chiều **p<0,01, ***p<0,001 so với chất dẫn					
	Tá dược	Ví dụ 1 (bazơ tự do) 0,3 mg/kg	Ví dụ 1 (bazơ tự do) 1 mg/kg	Ví dụ 1 (bazơ tự do) 3 mg/kg	Ví dụ 1 (bazơ tự do) 10 mg/kg
Glucoza (mg/dl)					
0 phút	84 $\pm$ 8,4	78 $\pm$ 4,2	76 $\pm$ 3,3	72 $\pm$ 2,6	78 $\pm$ 5,4
20 phút	268 $\pm$ 49,3	185 $\pm$ 13,7***	147 $\pm$ 8,3***	133 $\pm$ 7,1***	124 $\pm$ 1,2***
40 phút	192 $\pm$ 26,8	197 $\pm$ 14,7	171 $\pm$ 11,1	150 $\pm$ 7,5	137 $\pm$ 5,4**
60 phút	139 $\pm$ 6,2	164 $\pm$ 6,3	162 $\pm$ 5,8	155 $\pm$ 7,2	138 $\pm$ 6,1
120 phút	105 $\pm$ 5,1	121 $\pm$ 11,8	109 $\pm$ 7,3	115 $\pm$ 10	114 $\pm$ 4,3
ANOVA/ Dunnett 1 chiều *p<0,05, **p<0,01, so với chất dẫn					
AUC được điều chỉnh theo mót cơ sở	6408 $\pm$ 1500	5400 $\pm$ 519	4158 $\pm$ 374	3606 $\pm$ 421*	2693 $\pm$ 309**
Glucoza (mg/dl)					
Cmax glucoza	268 $\pm$ 49,3	199 $\pm$ 14,1	174 $\pm$ 9,38**	161 $\pm$ 5,00**	141 $\pm$ 5,67**
Thời gian (phút)					
Tmax glucoza	20 $\pm$ 0	32 $\pm$ 5	48 $\pm$ 5	64 $\pm$ 13**	44 $\pm$ 7

Như được thể hiện trên đây trong Bảng 3, bazơ tự do theo Ví dụ 1 làm giảm theo cách phụ thuộc liều mức glucoza không đúng sau khi sử dụng dextroza 50% (Hospira®) liều bolus đường uống ở chuột C57Bl/6 có mức đường huyết bình thường. Bazơ tự do theo Ví dụ 1 cũng làm giảm theo cách phụ thuộc liều diện tích dưới đường cong (area under the curve - AUC) được điều chỉnh theo mốc cơ sở của glucoza trong thử nghiệm OGTT. Ngoài ra, bazơ tự do theo ví dụ 1 làm giảm theo cách phụ thuộc liều nồng độ tối đa trung bình của mức glucoza huyết tương (Cmax) trong thử nghiệm OGTT.

Các giá trị mức glucoza trong thử nghiệm dung nạp thức ăn hỗn hợp ở chuột cống đực mắc bệnh tiểu đường do streptozotocin gây ra

Chuột cống mà đã được cho sử dụng streptozotocin (STZ) phát triển bệnh đái tháo đường. Các chất điều chỉnh mức glucoza ở các động vật này được cho là hữu dụng để điều trị bệnh tiểu đường ở người.

Hợp chất thử nghiệm được bào chế bằng cách bổ sung chất dẫn 1% hydroxyetylxenluloza (HEC), 0,25% Tween® 80 với chất chống tạo bọt 0,05% vào hợp chất thử nghiệm đã cân trước để tạo ra dung dịch 2,5 mg/ml. Hỗn hợp này được siêu âm bằng đầu dò trong khoảng 30 giây. Dung dịch thu được được sử dụng làm dung dịch gốc, từ đó pha chế các dung dịch liều với nồng độ thấp hơn bằng cách pha loãng bản chất chất dẫn. STZ, 45 mg/kg, được bào chế bằng cách hòa tan trong dung dịch đệm xitrat 0,1M trong các phân phần ước 3ml và bảo quản trên nước đá trong bóng tối, khi không được sử dụng. Sử dụng bữa ăn hỗn hợp có hàm lượng chất béo cao (Bio-Serv® Rodent Diet F3282 High Fat) bao gồm lượng calo từ chất béo (60%), lượng calo từ carbohydrat (26%) và lượng từ protein (15%). Chuột cống Sprague Dawley được nhốt từng con một được để cho thích nghi với khí hậu trong khoảng thời gian từ 3 đến 7 ngày.

Để đảm bảo rằng các động vật không mới được cho ăn, STZ được sử dụng vào buổi chiều, khoảng sáu giờ vào chu kỳ sáng (bật đèn 6 giờ sáng, tắt đèn 6 giờ chiều). Các động vật được gây mê bằng isofluran và STZ được tiêm qua tĩnh mạch đuôi. Khi các động vật đã tỉnh lại, chúng được đưa về chuồng và để cho hồi phục trong 7 ngày.

Vài hai ngày ngay trước thử nghiệm dung nạp thức ăn (meal tolerance test - MTT) tất cả các chuột cống được cho ăn lượng nhỏ (2-4g) chế độ ăn F3282, để chúng

trở nên thích nghi với chế độ ăn này trước khi dùng nó trong suốt thử nghiệm. Vào buổi tối trước khi thử nghiệm, các chuột cống được chuyển vào chuồng sạch và không cho ăn. Sáng hôm sau, các động vật được cân và thu mẫu máu bằng cách bấm đuôi để đo mức glucoza (đường kế Abbott AlphaTRAK™: mã 29). Các động vật được chia nhóm n=6 dựa trên thể trọng khi đói và mức glucoza. Bao mười phút sau khi sử dụng hợp chất thử nghiệm đường uống, hai số đo mức glucoza được thu thập. Sau đó, viên thức ăn Bio-Serv® 3282 năm gam được cho sử dụng. Sau 20 phút, thức ăn thừa được lấy đi và được cân. Thu mẫu máu ở các thời điểm 20, 40, 60 và 120 phút để đo mức glucoza.

Bảng 4. Giá trị mức glucoza trong thử nghiệm MTT hỗn hợp ở chuột cống đực mắc bệnh tiểu đường do STZ gây ra.

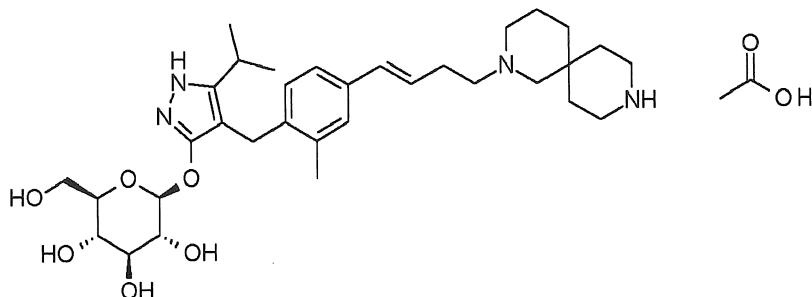
		Giá trị mức glucoza (mg/dl) Các nhóm n=5-6, Trung bình $\pm$ sai số chuẩn					
Điều trị	Liều	0 phút	20 phút	40 phút	60 phút	120 phút	Mốc cơ sở AUC được điều chỉnh
Tá dược		113,6 $\pm$ 12,6	297,2 $\pm$ 26,6	427,6 $\pm$ 41	452,2 $\pm$ 37,3	544,7 $\pm$ 50,1	36429 $\pm$ 3155
Ví dụ 1 (bazơ tự do)	10 mg/kg	139 $\pm$ 16,1	221,2 $\pm$ 26,3	268,7 $\pm$ 29*	330 $\pm$ 36,7	490,8 $\pm$ 39,2	22432 $\pm$ 2234*
Ví dụ 1 (bazơ tự do)	30 mg/kg	137,4 $\pm$ 26,9	195,4 $\pm$ 44,8	232 $\pm$ 52,2* *	263,9 $\pm$ 62,2*	355,3 $\pm$ 73,2*	14649 $\pm$ 3673**
Acarboza	60 mg/kg	124 $\pm$ 16,9	181 $\pm$ 22,8	301,3 $\pm$ 51,2	371,5 $\pm$ 63,9	433,7 $\pm$ 83	23877 $\pm$ 4649*
ANOVA/ Bonferroni 2 chiều *p<0,05, **p<0,01							

Như được thể hiện trong Bảng 4 trên đây, bazơ tự do theo Ví dụ 1 làm giảm đáng kể và theo cách phụ thuộc liều mức glucoza trong thử nghiệm MTT so với đối chứng chất dẫn. Acarboza, đối chứng dương, không làm giảm đáng kể mức glucoza so với đối chứng ở thời điểm bất kỳ. Hơn nữa, có sự giảm AUC của glucoza được điều

chỉnh theo mức cơ sở theo cách phụ thuộc liều có liên quan đến việc điều trị bằng bazơ tự do theo Ví dụ 1. Acarboza làm giảm đáng kể AUC của glucoza đến mức tương tự với hợp chất theo Ví dụ 1 với liều 10mg/kg. Bảng 4 chứng tỏ rằng bazơ tự do theo Ví dụ 1 điều chỉnh mức glucoza ở chuột cống đực.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



hoặc hydrat của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này ở dạng tinh thể và được hydrat hóa.

3. Hợp chất theo điểm 2, trong đó hợp chất này được đặc trưng bởi ít nhất một trong số các thông số sau:

- a. nhiễu xạ đồ bột tia X bằng cách sử dụng bức xạ $\text{CuK}\alpha$ có đỉnh cường độ lớn ở góc nhiễu xạ 2-theta là $5,2^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh cường độ lớn được chọn từ nhóm gồm $7,8^\circ$, $8,0^\circ$, và $10,7^\circ$ (lần lượt $\pm 0,2^\circ$); và
- b. phổ NMR trạng thái rắn ^{13}C chứa các đỉnh được chuẩn hóa đến cộng hưởng cao trường của adamantan ($\delta=29,5$ ppm) ở: 181,8, 161,2, 160,0, 147,6 và 137,4 ppm (lần lượt $\pm 0,2$ ppm);

trong đó thuật ngữ đỉnh cường độ lớn nghĩa là đỉnh có cường độ ít nhất bằng 5% cường độ của đỉnh có cường độ lớn nhất trong phổ hoặc mẫu bột tương ứng.

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hàm lượng nước ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 9% đến 12% khối lượng.

5. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, cùng với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.