



(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) 
1-0019387

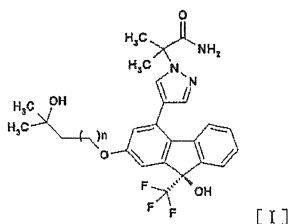
(51)⁷ **C07D 231/12, A61K 31/415, A61P**
11/00, 13/12, 25/00, 27/02, 27/12, 3/00,
3/04, 3/10, 43/00, 9/04, 9/10

(13) **B**

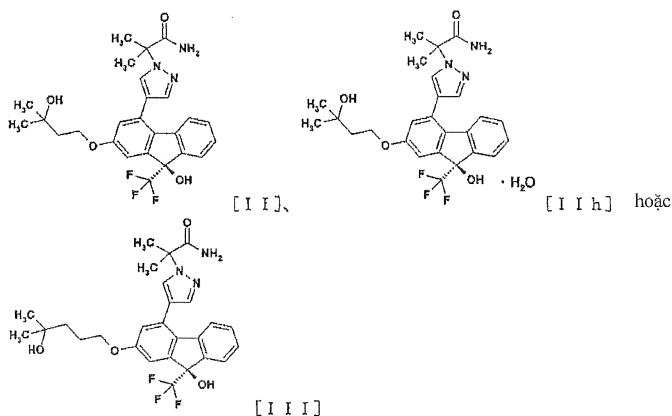
-
- (21) 1-2015-03837 (22) 14.03.2014
(86) PCT/JP2014/056825 14.03.2014 (87) WO2014/142290A1 18.09.2014
(30) 61/791,164 15.03.2013 US
2013-053195 15.03.2013 JP
2013-127318 18.06.2013 JP
(45) 25.07.2018 364 (43) 25.01.2016 334
(73) JAPAN TOBACCO INC. (JP)
2-1, Toranomom 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8422, Japan
(72) MOTOMURA, Takahisa (JP), SHOMI, Gakujun (JP)
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)
-

(54) **HỢP CHẤT PYRAZOL-AMIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY**

(57) **Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức sau:**



trong đó n là 1 hoặc 2,



hoặc muối dược dụng của nó, và dược phẩm chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất pyrazol-amit và dược phẩm chứa hợp chất này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến hợp chất pyrazol-amit hoặc muối được dùng của nó có hoạt tính ức chế pyruvat dehydroaza kinaza (ở đây được viết tắt là PDHK), dược phẩm chứa chúng, thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường chứa chúng (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2 v.v.), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể v.v.), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngạt máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi, hoặc bệnh Alzheimer, và bệnh tương tự.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong các mô, đối với các phản ứng sử dụng năng lượng như sinh tổng hợp, vận chuyển chủ động, co cơ và tương tự, năng lượng được cung cấp bởi sự thủy phân adenosin triphosphat (adenosin triphosphat - ATP). ATP được sản xuất bằng cách oxy hóa nhiên liệu chuyển hóa mà tạo ra nhiều năng lượng, như glucoza và axit béo tự do. Trong mô oxy hóa như cơ, ATP chủ yếu được sản xuất từ axetyl-CoA mà đi vào chu trình axit xitric. Axetyl-CoA được sản xuất bằng cách oxy hóa glucoza thông qua đường phân hoặc sự oxy hóa β của axit béo tự do. Enzym đóng vai trò then

chốt trong việc kiểm soát sự sản xuất axetyl-CoA từ glucoza là pyruvat dehydroaza (sau đây được viết tắt là PDH). PDH làm xúc tác sự khử nicotinamit adenin dinucleotit (NAD) thành NADH, đồng thời với sự oxy hóa của axit pyruvic thành axetyl-CoA và cacbon dioxit (ví dụ, tài liệu phi sáng chế 1, 2).

PDH là phức đa enzym bao gồm ba thành phần enzym (E1, E2 và E3) và vài tiểu đơn vị đặt trong chất nền ty thể. E1, E2 và E3 tương ứng chịu trách nhiệm khử cacboxyl khỏi axit pyruvic, sản xuất axetyl-CoA và khử NAD thành NADH.

Hai loại enzym có chức năng điều biến gắn kết với PDH. Một enzym là PDHK, nó là protein kinaza đặc hiệu với PDH. Vai trò của nó là bất hoạt tiểu đơn vị E1 α của phức bằng sự phosphoryl hóa. Enzym còn lại là PDH phosphataza, là protein phosphataza đặc hiệu mà hoạt hóa PDH thông qua sự khử phosphoryl của tiểu đơn vị E1 α . Tỷ lệ của PDH trong trạng thái hoạt tính của nó (khử phosphoryl) được xác định bằng sự cân bằng hoạt tính của kinaza và phosphataza. Hoạt tính của kinaza được điều biến bằng nồng độ tương đối của chất nền chuyển hóa. Ví dụ, hoạt tính của kinaza được hoạt hóa bằng việc tăng tỷ lệ NADH/NAD, axetyl-CoA/CoA và ATP/adenosin diphosphat (ADP), và được ức chế bằng axit pyruvic (ví dụ, tài liệu phi sáng chế 3).

Trong mô của động vật có vú, 4 loại PDHK isozym được xác định. Cụ thể là, PDHK2 được biểu hiện ở phạm vi lớn các mô bao gồm gan, cơ xương và mô mỡ có trong sự chuyển hóa glucoza. Ngoài ra, vì PDHK2 thể hiện độ nhạy tương đối cao với sự hoạt hóa bằng cách tăng NADH/NAD hoặc axetyl-CoA/CoA và sự ức chế bằng axit pyruvic, sự liên quan trong điều biến ngăn hạn sự chuyển hóa glucoza được đề xuất (ví dụ, tài liệu phi sáng chế 4).

Ngoài ra, PDHK1 được biểu hiện với lượng lớn trong cơ tim, cơ xương, tế bào β tuyến tụy và tương tự. Hơn nữa, vì sự biểu hiện PDHK1 được cảm ứng

thông qua hoạt hóa yếu tố có khả năng cảm ứng giảm oxy huyết (hypoxia inducible factor - HIF) 1 trong trạng thái thiếu máu cục bộ, sự liên quan của nó trong bệnh thiếu máu cục bộ và các bệnh ung thư được đề xuất (ví dụ, tài liệu phi sáng chế 5).

Trong các bệnh như bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin (typ 1), bệnh đái tháo đường không phụ thuộc insulin (typ 2) và bệnh tương tự, sự oxy hóa lipid được thúc đẩy đồng thời với sự giảm việc sử dụng glucoza. Việc giảm sử dụng glucoza này là một trong các yếu tố gây ra bệnh đường huyết cao. Khi sự chuyển hóa glucoza oxy hóa giảm trong các bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2 và bệnh béo phì, hoạt tính của PDH cũng giảm. Điều này đề xuất sự liên quan của hoạt tính PDH bị giảm trong việc sử dụng glucoza giảm trong bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2 (ví dụ, các tài liệu phi sáng chế 6, 7).

Ngược lại, sự tạo glucoza gan được tăng cường trong các bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2, mà cũng tạo ra một yếu tố gây ra bệnh đường huyết cao. Hoạt tính PDH giảm làm tăng nồng độ axit pyruvic mà đổi lại làm tăng sự khả dụng của axit lactic làm chất nền cho việc tạo ra glucoza gan. Việc này đề xuất sự liên quan tiềm năng của hoạt tính PDH giảm trong quá trình tạo ra glucoza gia tăng trong bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2 (ví dụ, các tài liệu phi sáng chế 8, 9). Khi PDH được hoạt hóa bằng cách ức chế PDHK, tỷ lệ oxy hóa glucoza được cho là gia tăng. Kết quả là, việc sử dụng glucoza trong cơ thể được khởi động và việc tạo glucoza gan được chặn lại, nhờ đó đường huyết cao trong bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2 được kỳ vọng cải thiện được (ví dụ, các tài liệu phi sáng chế 10, 11, 12). Yếu tố khác ảnh hưởng đến bệnh đái tháo đường là sự tiết insulin bị suy giảm, mà được biết đến là liên quan đến hoạt tính PDH giảm trong tế bào β tuyến tụy, và giới thiệu về PDHK1, 2 và 4 (ví dụ, các tài liệu phi sáng chế 13, 14). Ngoài ra, đường huyết cao duy trì liên tục do bệnh

đái tháo đường được biết là gây ra các biến chứng như bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường và bệnh tương tự. Thiamin và axit α -lipoic góp phần vào sự hoạt hóa PDH dưới dạng coenzym. Thiamin và axit α -lipoic, hoặc dẫn xuất thiamin và dẫn xuất của axit α -lipoic thể hiện có tác dụng đầy hứa hẹn trong việc điều trị các biến chứng của bệnh đái tháo đường. Do đó, sự hoạt hóa PDH được kỳ vọng là cải thiện các biến chứng của bệnh đái tháo đường (ví dụ, các tài liệu phi sáng chế 15, 16).

Trong các tình trạng thiếu máu cục bộ, sự cung cấp hạn chế oxy làm giảm sự oxy hóa của cả glucoza và axit béo và làm giảm lượng ATP được sinh ra bằng sự phosphoryl hóa oxy hóa trong các mô. Khi không có đủ oxy, lượng ATP được duy trì bằng cách đẩy mạnh quá trình đường phân kỵ khí. Kết quả là, axit lactic tăng và độ pH nội bào giảm. Thậm chí mặc dù cơ thể cố duy trì nội cân bằng ion bằng cách tiêu thụ năng lượng, lượng ATP thấp bất thường và thâm thấu tế bào bị gián đoạn dẫn đến sự chết tế bào. Ngoài ra, kinaza hoạt hóa adenosin monophosphat, được hoạt hóa trong tình trạng thiếu máu cục bộ, sự phosphoryl hóa và do đó bất hoạt axetyl-CoA carboxylaza. Do đó, lượng malonyl-CoA tổng trong giọt mô, hoạt tính carnitine palmitoyltransferaza-I tăng và sự oxy hóa axit béo được ưu tiên hơn sự oxy hóa glucoza bằng cách cho phép sự vận chuyển axyl-CoA vào trong ty thể. Sự oxy hóa glucoza có khả năng thu được nhiều ATP trên phân tử oxy hơn là sự oxy hóa axit béo. Do đó, trong các tình trạng thiếu máu cục bộ, sự chuyển hóa năng lượng trở thành sự oxy hóa glucoza ưu thế hơn nhờ sự hoạt hóa PDH, khả năng duy trì lượng ATP được xem là được tăng cường (ví dụ, tài liệu phi sáng chế 17).

Ngoài ra, vì sự hoạt hóa của PDH gây ra sự oxy hóa axit pyruvic được sản xuất bởi sự đường phân, và giảm sự sản xuất axit lactic, sự tiêu dùng proton thực tế

được giảm trong các mô thiếu máu cục bộ. Theo đó, sự hoạt hóa PDH bằng sự ức chế PDHK được kỳ vọng để đóng vai trò bảo vệ trong bệnh thiếu máu cục bộ như bệnh thiếu máu cục bộ cơ tim (ví dụ, các tài liệu phi sáng chế 18, 19).

Dược chất mà hoạt hóa PDH bằng cách ức chế PDHK được xem là để làm giảm sự sản xuất lactat vì nó khởi động sự chuyển hóa pyruvat. Do đó, dược chất này được kỳ vọng là hữu ích để điều trị bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat như bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể và nhiễm trùng (ví dụ, tài liệu phi sáng chế 20).

Trong các tế bào ung thư, sự biểu hiện PDHK1 hoặc 2 tăng. Hơn nữa, trong các tế bào ung thư, sự sản xuất ATP bằng phosphoryl hóa oxy hóa trong ty thể giảm, và sự sản xuất ATP thông qua quá trình đường phân kỵ khí trong tế bào chất tăng. Sự hoạt hóa PDH bằng cách ức chế PDHK được kỳ vọng để tăng cường sự phosphoryl hóa oxy hóa trong ty thể, và làm tăng sự sản xuất oxy hoạt tính mà sẽ gây ra sự tự chết của các tế bào ung thư. Do đó, sự hoạt hóa PDH bằng cách ức chế PDHK là hữu ích để điều trị các bệnh ung thư (ví dụ, tài liệu phi sáng chế 21).

Bệnh tăng áp phổi đặc trưng bởi huyết áp cao được gây ra bởi sự thu hẹp một phần của động mạch phổi do sự tăng sinh tế bào được tăng cường trong đó. Do đó, trong bệnh tăng áp phổi, sự hoạt hóa PDH trong tế bào động mạch phổi được kỳ vọng để tăng cường sự phosphoryl hóa oxy hóa trong ty thể, tăng sự sản xuất oxy hoạt tính, và gây ra sự tự chết của các tế bào động mạch phổi. Do đó, sự hoạt hóa PDH bằng sự ức chế PDHK được xem là hữu ích để điều trị bệnh tăng áp phổi (ví dụ, tài liệu phi sáng chế 22).

Sự sản xuất năng lượng và sự chuyển hóa glucoza trong não giảm ở bệnh Alzheimer, và hoạt tính PDH giảm dần. Khi hoạt tính PDH giảm dần, sự sản xuất axetyl CoA giảm. Axetyl CoA được sử dụng để sản xuất ATP trong hệ thống vận

chuyển electron qua chu trình axit xitric. Axetyl CoA còn là nguyên liệu khởi đầu cho sự tổng hợp axetylcolin mà là một trong những chất dẫn truyền thần kinh. Do đó, hoạt tính PDH trong não giảm ở bệnh Alzheimer được coi là gây ra sự chết tế bào thần kinh do giảm sự sản xuất ATP. Ngoài ra, xét thấy rằng sự tổng hợp axetylcolin mà là chất dẫn truyền thần kinh tác động kiểu colin bị ức chế gây ra sự suy giảm trí nhớ và tương tự. Sự hoạt hóa PDH trong não được kỳ vọng để tăng cường sự sản xuất năng lượng và sự tổng hợp axetylcolin ở bệnh Alzheimer. Do đó, sự hoạt hóa PDH bằng cách ức chế PDHK được xem là hữu ích trong điều trị bệnh Alzheimer (ví dụ, các tài liệu phi sáng chế 23, 24).

Đã thấy rằng axit dicloaxetic là được chất có hoạt tính hoạt hóa PDH tạo ra hiệu quả hứa hẹn để điều trị bệnh đái tháo đường, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh suy tim, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, bệnh thiếu máu não, bệnh ngạt máu não, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh ung thư, và bệnh tăng áp phổi (ví dụ, các tài liệu phi sáng chế 10, 18, 20, 22, 25, 26, 27).

Từ những phát hiện trên, thuốc ức chế PDHK được xem là hữu ích để phòng và điều trị các bệnh liên quan đến rối loạn sử dụng glucoza, ví dụ, bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2 v.v.), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể v.v.). Ngoài ra, thuốc ức chế PDHK được kỳ vọng là hữu ích trong phòng ngừa và điều trị bệnh gây ra bởi sự cung cấp chất nền năng lượng cho mô bị hạn chế, ví dụ, bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim,

chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não và bệnh ngạt máu não.

Do đó, thuốc ức chế PDHK được cho là hữu ích để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2 v.v.), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể v.v.), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngạt máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi hoặc bệnh Alzheimer.

Danh mục tài liệu

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J Biol Chem.* 1990 Jun 5;265(16):8971-4.

Tài liệu phi sáng chế 2: Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.* 1990 Nov; 4(14):3224-33.

Tài liệu phi sáng chế 3: Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 May; 284(5):E855-62.

Tài liệu phi sáng chế 4: Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov

KM. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J.* 1998 Jan 1; 329 (Pt 1):191-6.

Tài liệu phi sáng chế 5: Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006 Mar; 3(3):177-85.

Tài liệu phi sáng chế 6: Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest.* 2005 Dec; 115(12):3587-93.

Tài liệu phi sáng chế 7: Caterson ID, Fuller SJ, Randle PJ. Effect of the fatty acid oxidation inhibitor 2-tetradecylglycidic acid on pyruvate dehydrogenase complex activity in starved and alloxan-diabetic rats. *Biochem J.* 1982 Oct 15; 208(1):53-60.

Tài liệu phi sáng chế 8: Boden G, Chen X, Stein TP. Gluconeogenesis in moderately and severely hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Jan; 280(1):E23-30.

Tài liệu phi sáng chế 9: Shangraw RE, Fisher DM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of diclofenac in patients with cirrhosis. *Clin Pharmacol Ther.* 1999 Oct; 66(4):380-90.

Tài liệu phi sáng chế 10: Stacpoole PW, Moore GW, Kornhauser DM. Metabolic effects of diclofenac in patients with diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med.* 1978 Mar 9; 298(10):526-30.

Tài liệu phi sáng chế 11: Mayers RM, Leighton B, Kilgour E. PDH kinase inhibitors: a novel therapy for Type II diabetes? *Biochem Soc Trans.* 2005 Apr; 33(Pt 2):367-70.

Tài liệu phi sáng chế 12: Jeoung NH, Rahimi Y, Wu P, Lee WN, Harris RA. Fasting induces ketoacidosis and hypothermia in PDHK2/PDHK4-double-knockout mice. *Biochem J*. 2012 May 1; 443(3):829-39.

Tài liệu phi sáng chế 13: Zhou YP, Berggren PO, Grill V. A fatty acid-induced decrease in pyruvate dehydrogenase activity is an important determinant of beta-cell dysfunction in the obese diabetic db/db mouse. *Diabetes*. 1996 May; 45(5):580-6.

Tài liệu phi sáng chế 14: Xu J, Han J, Epstein PN, Liu YQ. Regulation of PDK mRNA by high fatty acid and glucose in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jun 9; 344(3):827-33.

Tài liệu phi sáng chế 15: Benfotiamine. Monograph. *Altern Med Rev*. 2006 Sep; 11(3):238-42.

Tài liệu phi sáng chế 16: Vallianou N, Evangelopoulos A, Koutalas P. Alpha-lipoic Acid and diabetic neuropathy. *Rev Diabet Stud*. 2009 Winter; 6(4):230-6.

Tài liệu phi sáng chế 17: Ussher JR, Lopaschuk GD. The malonyl CoA axis as a potential target for treating ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 2008 Jul 15; 79(2):259-68.

Tài liệu phi sáng chế 18: Wargovich TJ, MacDonald RG, Hill JA, Feldman RL, Stacpoole PW, Pepine CJ. Myocardial metabolic and hemodynamic effects of diclofenac in coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1988 Jan 1; 61(1):65-70.

Tài liệu phi sáng chế 19: Taniguchi M, Wilson C, Hunter CA, Pehowich DJ, Clanachan AS, Lopaschuk GD. Diclofenac improves cardiac efficiency after ischemia independent of changes in mitochondrial proton leak. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Apr; 280(4):H1762-9.

Tài liệu phi sáng chế 20: Stacpoole PW, Nagaraja NV, Hutson AD. Efficacy of

dicloaxetat as a lactate-lowering drug. *J Clin Pharmacol*. 2003 Jul; 43(7):683-91.

Tài liệu phi sáng chế 21: Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*. 2007 Jan; 11(1):37-51.

Tài liệu phi sáng chế 22: McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, et al. Dicloaxetat prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res*. 2004 Oct 15; 95(8):830-40.

Tài liệu phi sáng chế 23: Saxena U. Bioenergetics breakdown in Alzheimer's disease: targets for new therapies. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2011; 3(2):133-9.

Tài liệu phi sáng chế 24: Stacpoole PW. The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases. *Aging Cell*. 2012 Jun; 11(3):371-7.

Tài liệu phi sáng chế 25: Marangos PJ, Turkel CC, Dziewanowska ZE, Fox AW. Dicloaxetat and cerebral ischaemia therapeutics. *Expert Opin Investig Drugs*. 1999 Apr; 8(4):373-82.

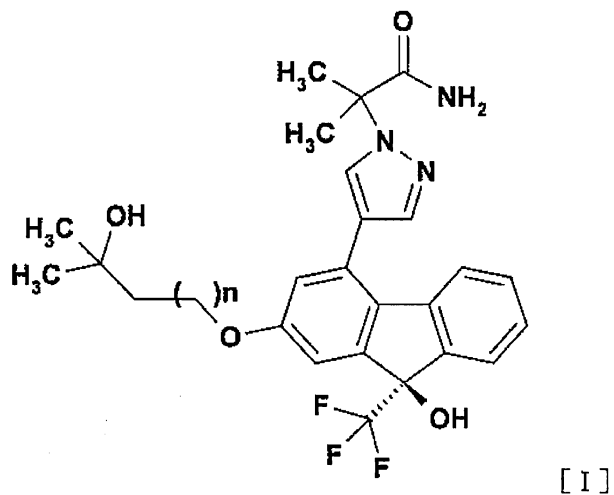
Tài liệu phi sáng chế 26: Calvert LD, Shelley R, Singh SJ, Greenhaff PL, Bankart J, Morgan MD, et al. Dicloaxetat enhances performance and reduces blood lactate during maximal cycle exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 May 15; 177(10):1090-4.

Tài liệu phi sáng chế 27: Flavin DF. Non-Hodgkin's Lymphoma Reversal with Dicloaxetat. *J Oncol*. Hindawi Publishing Corporation Journal of Oncology, Volume 2010, Article ID 414726, 4 pages doi:10.1155/2010/414726.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất:

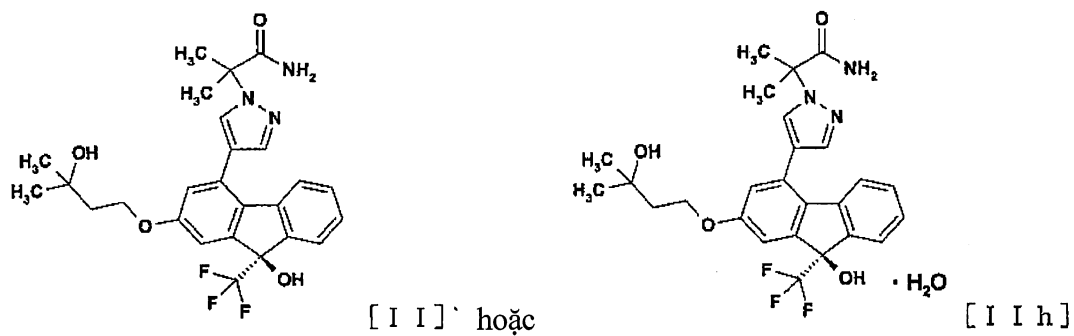
[1] Hợp chất có công thức [I]:



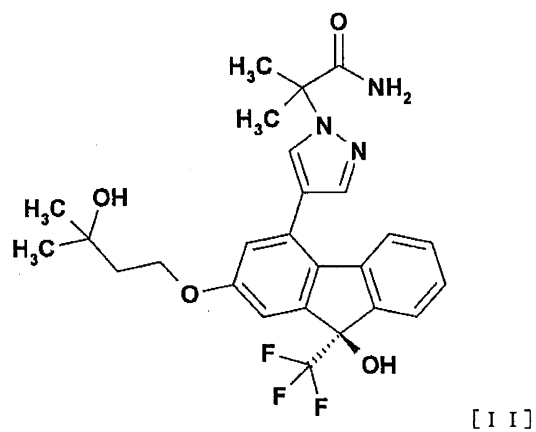
trong đó n là 1 hoặc 2,

hoặc muối được dụng của nó,

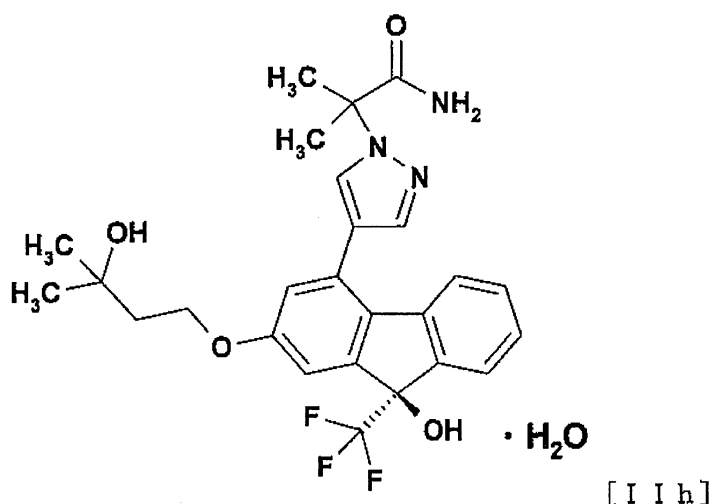
[2] Hợp chất có công thức:



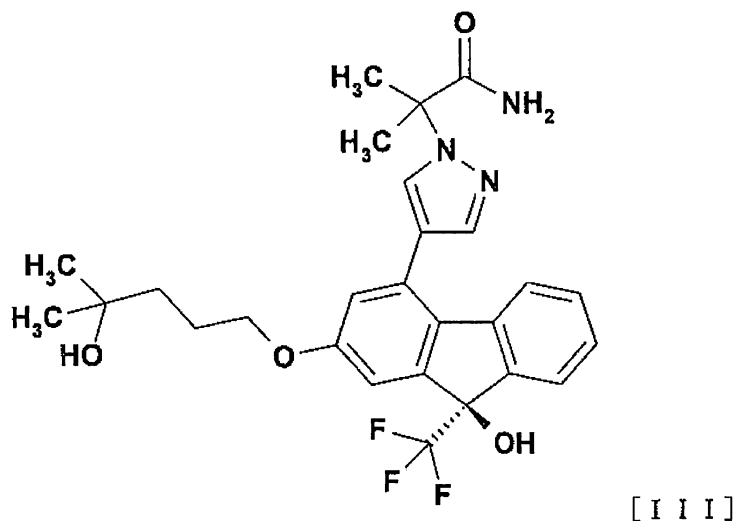
[3] Hợp chất theo mục [2] nêu trên, hợp chất này có công thức [II]:



[4] Hợp chất theo mục[2] nêu trên, hợp chất này có công thức [IIIh]:



[5] Hợp chất có công thức [III]:



[6] Dược phẩm chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối dược dụng của nó, và chất mang dược dụng,

[7] Thuốc ức chế PDHK chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối dược dụng của nó,

[8] Thuốc ức chế PDHK1 chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối dược dụng của nó,

[9] Thuốc ức chế PDHK2 chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối dược dụng của nó,

[10] Thuốc hạ đường huyết chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó,

[11] Dược phẩm làm giảm axit lactic chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó,

[12] Thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường, hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường, bệnh suy tim, bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngạt máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư hoặc bệnh tăng áp phổi, mà chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó,

[12'] Thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường, hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường, bệnh suy tim, bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngạt máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi hoặc bệnh Alzheimer, mà chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó,

[13] Thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh theo mục [12] nêu trên, trong đó đái tháo đường là bệnh đái tháo đường typ 1 hoặc bệnh đái tháo đường typ 2,

[14] Thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh theo mục [12] nêu trên, trong đó các

biến chứng của bệnh đái tháo đường được chọn từ nhóm bao gồm bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường và bệnh đục thủy tinh thể,

[15] Thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh theo mục [12] nêu trên, trong đó bệnh suy tim là bệnh suy tim cấp tính hoặc bệnh suy tim mạn tính,

[16] Dược phẩm chứa:

(a) hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối dược dụng của nó, và

(b) ít nhất một thuốc có hiệu quả phòng ngừa hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngập máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư và bệnh tăng áp phổi,

[16'] Dược phẩm chứa

(a) hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối dược dụng của nó, và

(b) ít nhất một thuốc có hiệu quả phòng ngừa hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo

đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngập máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi và bệnh Alzheimer,

[17] Thuốc hỗn hợp chứa:

(a) hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối dược dụng của nó, và

(b) ít nhất một thuốc có hiệu quả phòng ngừa hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngập máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư và bệnh tăng áp phổi, được sử dụng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp.

[17'] Thuốc hỗn hợp chứa:

(a) hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó, và

(b) ít nhất một thuốc có hiệu quả phòng ngừa hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngạt máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi và bệnh Alzheimer, được sử dụng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp.

[18] Sáng chế mô tả phương pháp ức chế PDHK ở động vật có vú, bao gồm cho động vật có vú này sử dụng một lượng có hiệu quả được hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó,

[19] Sáng chế mô tả phương pháp ức chế PDHK1 ở động vật có vú, bao gồm cho động vật có vú này sử dụng một lượng có hiệu quả được hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó,

[20] Sáng chế mô tả phương pháp ức chế PDHK2 ở động vật có vú, bao gồm cho động vật có vú này sử dụng một lượng có hiệu quả được hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó,

[21] Sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường

(bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngạt máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư hoặc bệnh tăng áp phổi ở động vật có vú, bao gồm cho động vật có vú này sử dụng một lượng có hiệu quả dược hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối dược dụng của nó,

[21'] Sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngạt máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi hoặc bệnh Alzheimer ở động vật có vú, bao gồm cho động vật có vú này sử dụng một lượng có hiệu quả dược hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối dược dụng của nó,

- [22] Sáng chế mô tả phương pháp làm giảm lượng glucoza trong máu ở động vật có vú, bao gồm cho động vật có vú này sử dụng một lượng có hiệu quả được hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó,
- [23] Sáng chế mô tả phương pháp làm giảm lượng lactat ở động vật có vú, bao gồm cho động vật có vú này sử dụng một lượng có hiệu quả được hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó,
- [24] Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó để sản xuất thuốc ức chế PDHK,
- [25] Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó để sản xuất thuốc ức chế PDHK1,
- [26] Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó để sản xuất thuốc ức chế PDHK2,
- [27] Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó để sản xuất được phẩm làm giảm lượng glucoza trong máu,
- [28] Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó để sản xuất được phẩm làm giảm lượng lactat,
- [29] Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó để sản xuất thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim

mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngập máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư hoặc bệnh tăng áp phổi,

[29'] Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], hoặc muối được dụng của nó để sản xuất thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngập máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi hoặc bệnh Alzheimer,

[30] Sáng chế mô tả việc sử dụng theo mục bất kỳ trong các mục [24] đến [29] nêu trên, kết hợp với ít nhất một thuốc có hiệu quả phòng ngừa hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp

tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngập máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư và bệnh tăng áp phổi, và

[30'] Sáng chế mô tả việc sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục [24] đến [29] nêu trên, kết hợp với ít nhất một thuốc có hiệu quả phòng ngừa hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngập máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi và bệnh Alzheimer, và bệnh tương tự.

Hiệu quả của sáng chế

Hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó ức chế hoạt tính PDHK, và hữu ích làm thuốc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đối với bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục

thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngập máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi hoặc bệnh Alzheimer, và bệnh tương tự.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

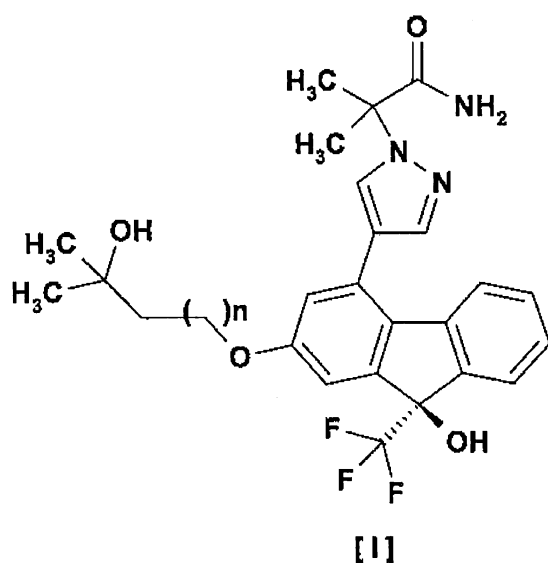
Fig. 1 thể hiện hiệu quả của các hợp chất thử nghiệm đối với hoạt tính PDH ở gan (phần trăm hoạt tính PDH gan hoạt hóa trên tổng hoạt tính PDH gan) ở chuột SD(IGS) không bị bỏ đói (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n=3$)).

Fig. 2 thể hiện hiệu quả của các hợp chất thử nghiệm đối với hoạt tính PDH của mô mỡ (phần trăm của hoạt tính PDH ở mô mỡ hoạt hóa trên tổng hoạt tính PDH mô mỡ) ở chuột SD(IGS) không bị bỏ đói (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n=3$)).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được giải thích chi tiết dưới đây.

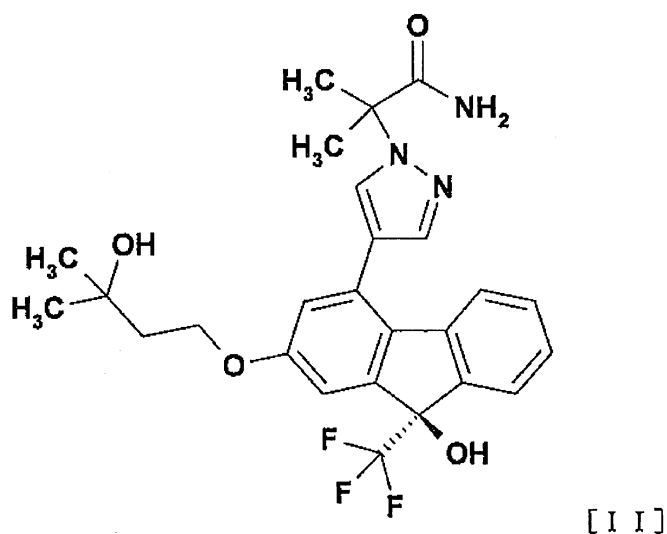
Hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức [I]:



trong đó n là 1 hoặc 2,

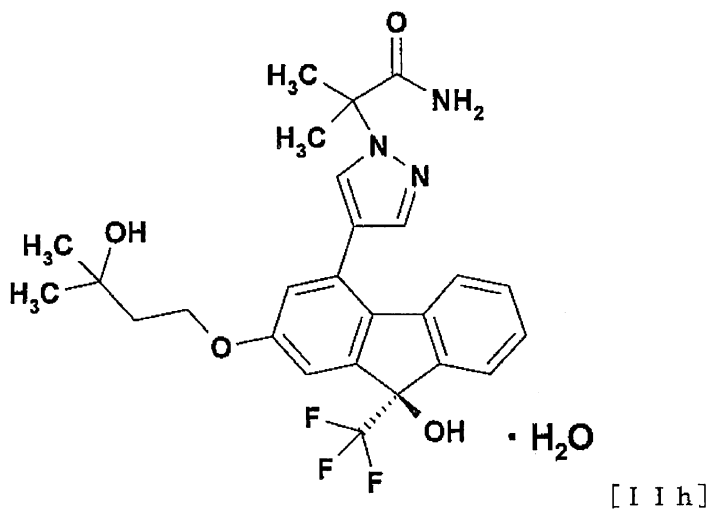
(sau đây còn được gọi là hợp chất (1)), hoặc muối được dựng của nó.

Hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức [II]:



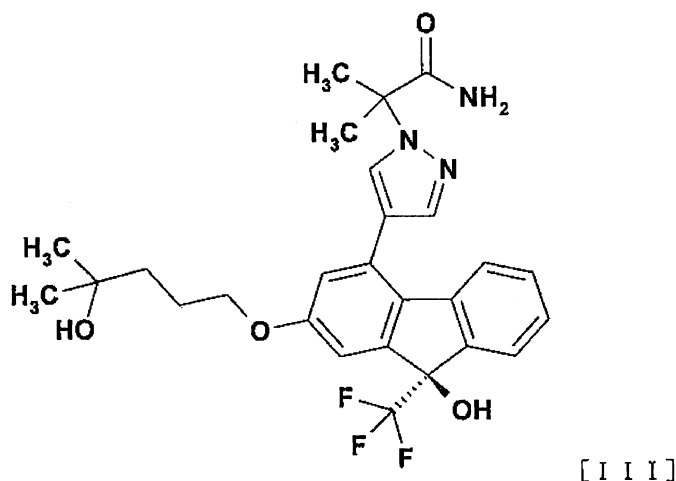
(2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropanamit) (sau đây còn được gọi là hợp chất (2)).

Hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức [IIh]:



(2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropanamit monohydrat) (sau đây còn được gọi là hợp chất (2h)).

Hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức [III]:



(2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(4-hydroxy-4-methylpentyl)oxy]-9-(trifluoromethyl)-9H-fluorene-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-methylpropanamit) (sau đây còn được gọi là hợp chất (3)).

Muối được dụng của hợp chất theo sáng chế có thể là muối bất kỳ miễn là nó tạo ra muối không độc với hợp chất theo sáng chế. Ví dụ của nó bao gồm các muối với axit vô cơ, các muối với axit hữu cơ, các muối với axit amin và các muối tương tự.

Ví dụ về muối với axit vô cơ bao gồm muối với axit clohydric, axit nitric, axit sulfuric, axit phosphoric, axit bromhydric và tương tự.

Ví dụ về muối với axit hữu cơ bao gồm các muối với axit oxalic, axit maleic, axit citric, axit fumaric, axit lactic, axit malic, axit succinic, axit tartaric, axit acetic, axit trifluoacetic, axit gluconic, axit ascorbic, axit metansulfonic, axit benzenesulfonic, axit p-toluensulfonic và tương tự.

Ví dụ về muối với axit amin bao gồm muối với lyzin, arginin, axit aspartic, axit glutamic và tương tự.

Muối được dụng của hợp chất theo sáng chế tốt hơn là muối với axit vô cơ.

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó có thể được đánh dấu bằng chất đồng vị (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{35}S v.v.).

Về hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó, hợp chất (1) hoặc muối được dụng của nó mà mỗi hợp chất trong số chúng về cơ bản được tinh chế. Được ưu tiên hơn là hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó mà mỗi hợp chất trong số chúng được tinh chế đến độ tinh khiết không thấp hơn 80%.

Hợp chất có công thức [I] hoặc muối được dụng của nó có thể tồn tại ở dạng solvat. Thuật ngữ "solvat" để chỉ hợp chất có công thức [I] hoặc muối được dụng của nó mà phân tử dung môi liên kết với nó, và còn bao gồm cả hydrat. Các solvat này tốt hơn là solvat được dụng. Các solvat như vậy bao gồm, ví dụ, hydrat, etanol solvat, dimetylsulfoxit-solvat và solvat tương tự của hợp chất có công thức [I] hoặc muối được dụng của nó. Các ví dụ cụ thể bao gồm hemihydrat, monohydrat, dihydrat hoặc mono(etanol)solvat của hợp chất có công thức [I] hoặc monohydrat của hợp chất có công thức [I], $2/3$ (etanol)solvat của dihydroclorua của hợp chất có công thức [I] và tương tự. Các solvat này có thể được sản xuất theo phương pháp thông thường.

Ví dụ về “được phẩm” bao gồm các chế phẩm dùng qua đường miệng như viên nén, viên nang, dạng hạt, bột, viên ngậm dẹp, xi rô, nhũ tương, huyền phù và dạng tương tự, và thuốc dùng theo đường ngoài tiêu hóa như chế phẩm dùng bên ngoài, thuốc đạn, thuốc tiêm, thuốc nhỏ mắt, chế phẩm dùng qua đường mũi, chế phẩm dùng cho phổi và tương tự.

Được phẩm theo sáng chế được bào chế theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực bào chế được, bằng cách trộn hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó với lượng thích hợp của ít nhất một loại chất mang được dụng và tương tự nếu thích hợp. Trong khi hàm lượng của hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó trong được phẩm thay đổi phụ thuộc vào dạng liều lượng, liều dùng và tương

tự, ví dụ hàm lượng của nó nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100% trọng lượng toàn bộ được phẩm.

Ví dụ về “chất mang dược dụng” bao gồm nhiều chất mang hữu cơ hoặc vô cơ khác nhau thường được sử dụng làm nguyên liệu bào chế, ví dụ, tá dược, chất làm rã, chất dính, chất hóa lỏng, chất làm trơn và chất tương tự cho các chế phẩm rắn, và dung môi, chất hòa tan, chất tạo huyền phù, chất đẳng trương, chất đệm, chất làm dịu và chất tương tự cho chế phẩm lỏng. Ngoài ra, nếu cần, chất phụ gia như chất bảo quản, chất chống oxy hóa, chất tạo màu, chất làm ngọt và chất tương tự được sử dụng.

Ví dụ về “tá dược” bao gồm lactoza, sucroza, D-manitol, D-sorbitol, tinh bột ngô, dextrin, xenluloza vi tinh thể, xenluloza tinh thể, carmeloza, carmeloza canxi, tinh bột natri carboxymetyl, hydroxypropylxenluloza được thế thấp, gồm arabic và chất tương tự.

Ví dụ về “chất làm rã” bao gồm carmeloza, canxi carmeloza, natri carmeloza, tinh bột natri carboxymetyl, natri croscarmeloza, crospovidon, hydroxypropylxenluloza được thế thấp, hydroxypropylmethylxenluloza, xenluloza tinh thể và chất tương tự.

Ví dụ về “chất dính” bao gồm hydroxypropylxenluloza, hydroxypropylmethylxenluloza, povidon, xenluloza tinh thể, sucroza, dextrin, tinh bột, gelatin, natri carmeloza, gồm arabic và chất tương tự.

Ví dụ về “chất hóa lỏng” bao gồm axit silixic khan nhẹ, magie stearat và chất tương tự.

Ví dụ về “chất làm trơn” bao gồm magie stearat, canxi stearat, bột talc và chất tương tự.

Ví dụ về “dung môi” bao gồm nước tinh khiết, etanol, propylen glycol, macrogol, dầu vừng, dầu ngô, dầu ôliu và chất tương tự.

Ví dụ về “chất hòa tan” bao gồm propylen glycol, D-manitol, benzyl benzoat, etanol, trietanolamin, natri cacbonat, natri xitrat và chất tương tự.

Ví dụ về “chất tạo huyền phù” bao gồm benzalkon clorua, carmeloza, hydroxypropylxenluloza, propylen glycol, povidon, metylxenluloza, glyxerol monostearat và chất tương tự.

Ví dụ về “chất đẳng trương” bao gồm glucoza, D-sorbitol, natri clorua, D-manitol và chất tương tự.

Ví dụ về “chất đệm” bao gồm natri hydrophosphat, natri axetat, natri cacbonat, natri xitrat và chất tương tự.

Ví dụ về “chất làm dịu” bao gồm rượu benzyl và chất tương tự.

Ví dụ về “chất bảo quản” bao gồm etyl parahydroxybenzoat, clobutanol, rượu benzyl, natri dehydroaxetat, axit sorbic và chất tương tự.

Ví dụ về “chất chống oxy hóa” bao gồm natri sulfit, axit ascorbic và chất tương tự.

Ví dụ về “chất tạo màu” bao gồm các chất màu thực phẩm (ví dụ, màu đỏ thực phẩm số 2 hoặc 3, màu vàng thực phẩm số 4 hoặc 5 v.v.), β -caroten và chất tương tự.

Ví dụ về “chất làm ngọt” bao gồm natri sacarin, dikali glyxyrrhizinat, aspartam và chất tương tự.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng theo đường miệng hoặc đường ngoài tiêu hóa (ví dụ, dùng cục bộ, trong cơ, dưới da, trong trực tràng, trong tĩnh mạch, v.v.) ở người cũng như các động vật có vú không phải người (ví dụ, chuột nhắt,

chuột cống, chuột đồng, chuột lang, thỏ, mèo, chó, lợn, bò, ngựa, cừu, khí, v.v.). Liều lượng thay đổi phụ thuộc vào đối tượng sử dụng, bệnh, triệu chứng, dạng liều lượng, đường sử dụng và tương tự. Ví dụ, liều lượng hàng ngày để dùng qua đường miệng ở người bệnh trưởng thành (thể trọng: khoảng 60 kg) thường nằm trong khoảng từ 1mg đến 1g tính theo hợp chất (1) làm thành phần hoạt tính. Lượng này có thể được sử dụng trong một hoặc vài phần.

Vì hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó có hoạt tính ức chế PDHK (PDHK1 và/hoặc PDHK2), nên được xem là hữu ích cho việc điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến sự suy giảm sử dụng glucoza, ví dụ, bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2 v.v.), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể v.v.). Ngoài ra, thuốc ức chế PDHK được cho là hữu ích để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh trong đó sự cung cấp chất nền sinh năng lượng cho mô bị hạn chế, ví dụ, bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não và bệnh ngạt máu não. Ngoài ra, thuốc ức chế PDHK được cho là hữu ích để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư bệnh tăng áp phổi hoặc bệnh Alzheimer, và tương tự.

Bệnh đái tháo đường, ví dụ, bệnh đái tháo đường typ 1 hoặc bệnh đái tháo đường typ 2.

Ví dụ về các biến chứng của bệnh đái tháo đường bao gồm bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường và bệnh đục thủy tinh thể.

Bệnh suy tim, ví dụ, bệnh suy tim cấp tính hoặc bệnh suy tim mạn tính.

“Ức chế PDHK” có nghĩa là ức chế chức năng của PDHK và loại bỏ hoặc làm giảm hoạt tính này. “Ức chế PDHK”, tốt hơn là ức chế PDHK người. Về “thuốc ức chế PDHK”, được ưu tiên là “thuốc ức chế PDHK ở người”.

“Ức chế PDHK1” có nghĩa là ức chế chức năng của PDHK1 và loại bỏ hoặc làm giảm hoạt tính này. Ví dụ, thuật ngữ này có nghĩa là ức chế chức năng PDHK1 dựa vào tình trạng bệnh trong ví dụ thử nghiệm 1 được đề cập dưới đây. Đối với “ức chế PDHK1”, ức chế PDHK1 người là được ưu tiên. Về “thuốc ức chế PDHK1”, tốt hơn là “thuốc ức chế PDHK1 ở người”. Tốt hơn nữa là “thuốc ức chế PDHK1 đối với cơ quan đích ở người”.

“Ức chế PDHK2” có nghĩa là ức chế chức năng PDHK2 và loại bỏ hoặc làm giảm hoạt tính này. Ví dụ, thuật ngữ này có nghĩa là ức chế chức năng PDHK2 dựa vào tình trạng bệnh trong ví dụ thử nghiệm 1 được đề cập dưới đây. “Ức chế PDHK2”, tốt hơn là ức chế PDHK2 người. Về “thuốc ức chế PDHK2”, tốt hơn là “thuốc ức chế PDHK2 ở người”. Tốt hơn nữa là “thuốc ức chế PDHK2 đối với cơ quan đích ở người”.

“Hoạt hóa PDH” có nghĩa là hoạt hóa PDH ở cơ quan đích (ví dụ, gan, cơ xương, mô mỡ, tim, não) và tương tự, bệnh ung thư hoặc bệnh tương tự.

“Giảm mức glucoza huyết” có nghĩa là làm giảm nồng độ glucoza trong máu (bao gồm huyết thanh và huyết tương), tốt hơn là làm giảm mức glucoza huyết cao,

tốt hơn nữa là làm giảm mức glucoza huyết về mức bình thường hữu hiệu điều trị cho người.

“Giảm mức axit lactic” có nghĩa là làm giảm nồng độ axit lactic trong máu (bao gồm huyết tương và huyết thanh), tốt hơn là làm giảm mức axit lactic cao, tốt hơn nữa là làm giảm mức axit lactic về mức bình thường hữu hiệu điều trị cho người.

Hợp chất theo sáng chế hoặc muối dược dụng của nó có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều thuốc khác (ở đây còn được gọi là thuốc dùng đồng thời) theo phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực dược (sau đây còn được gọi là sử dụng kết hợp).

Thời gian sử dụng hợp chất theo sáng chế hoặc muối dược dụng của nó, và thuốc dùng đồng thời không bị giới hạn, và đối tượng cần dùng có thể dùng chúng ở dạng chế phẩm hỗn hợp, hoặc cả hai chế phẩm có thể được sử dụng đồng thời hoặc ở các khoảng thời gian định trước. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế và thuốc dùng đồng thời có thể được sử dụng làm thuốc ở dạng kit. Liều lượng của thuốc dùng đồng thời là tương tự với liều lượng được dùng lâm sàng và có thể được chọn thích hợp theo đối tượng sử dụng, bệnh, triệu chứng, dạng liều dùng, cách dùng, thời gian dùng, sự kết hợp và tương tự. Dạng sử dụng của thuốc dùng đồng thời không bị giới hạn cụ thể, và chỉ cần được kết hợp với hợp chất theo sáng chế hoặc muối dược dụng của nó.

Ví dụ về thuốc hỗn hợp bao gồm thuốc điều trị và/hoặc thuốc phòng ngừa bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2 v.v.), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính),

bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngạt máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi hoặc bệnh Alzheimer, và bệnh tương tự, và một hoặc nhiều thuốc trong số đó và hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó có thể được sử dụng kết hợp.

Ví dụ về “thuốc điều trị và/hoặc thuốc phòng ngừa bệnh đái tháo đường” bao gồm chế phẩm insulin, thuốc hạ đường huyết sulfonylurea, metformin, thuốc ức chế DPP-4, dược phẩm cải thiện tính kháng insulin (ví dụ, dẫn xuất thiazolidin), chất chủ vận thụ thể GLP-1 và chất tương tự.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương pháp bào chế hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó được minh họa cụ thể bằng các ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Thậm chí nếu không có sự mô tả nào về phương pháp bào chế này thì các bước có thể được thay đổi để sản xuất có hiệu quả, như việc đưa nhóm bảo vệ vào nhóm chức nếu cần với sự loại nhóm bảo vệ trong bước tiếp theo, sử dụng nhóm chức làm tiền chất trong mỗi bước, sau đó chuyển hóa thành nhóm chức mong muốn ở giai đoạn thích hợp, thay đổi thứ tự của phương pháp bào chế và các bước sản xuất, và tương tự.

Có thể được tiến hành quá trình xử lý sau phản ứng trong mỗi bước bằng phương pháp thông thường, ở đó sự phân tách và tinh chế có thể được tiến hành nếu cần theo phương pháp được chọn thích hợp từ các phương pháp thông thường như kết tinh, tái kết tinh, chưng cất, phân đoạn, sắc ký silicagel, HPLC điều chế và phương

pháp tương tự, hoặc kết hợp các phương pháp này. Tất cả các chất phản ứng và dung môi có chất lượng của sản phẩm hiện có bán trên thị trường, và được sử dụng mà không cần tinh chế.

Phần trăm % là % trọng lượng. Các chữ viết tắt khác được sử dụng trong phần ví dụ này có nghĩa như sau.

s: vạch đơn

d: vạch đôi

t: vạch ba

q: vạch bốn

m: vạch bội

br: rộng

dd: hai vạch đôi

td: ba vạch đôi

ddd: hai vạch đôi kép

J: hằng số ghép

CDCl_3 : cloroform đơteri hóa

DMSO-D_6 : dimetyl sulfoxit đơteri hóa

^1H NMR: phổ cộng hưởng từ hạt nhân

HPLC: sắc ký lỏng hiệu năng cao

DPPA: diphenylphosphoryl azit

Phổ ^1H -NMR được đo trong CDCl_3 hoặc DMSO-D_6 sử dụng tetrametylsilan làm chất chuẩn nội, và tất cả các trị số δ được thể hiện theo ppm (phần triệu).

Dung dịch đệm phosphat 10mM (độ pH 2,0)

Hòa tan natri dihydro phosphat (3,60g) trong nước (3000ml), và điều chỉnh đến độ pH 2,0 bằng axit phosphoric để thu được chất đệm được nêu ở phần đề mục.

Các điều kiện phân tích HPLC

Điều kiện phân tích 1

Thiết bị đo: Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC system SHIMADZU CORPORATION Prominence

Cột: DAICEL CHIRALCEL OD-3R 4,6mm Φ ×150mm

Nhiệt độ cột: 40°C

Pha động: (dung dịch A) đệm phosphat 10mM (độ pH 2,0), (dung dịch B) axetonitril

Chế phẩm của pha động (dung dịch A:dung dịch B) được thay đổi từ 50:50 đến 20:80 trong 20 phút và sau đó được giữ ở 20:80 trong 5 phút.

Lưu lượng: 0,5ml/phút

Dò: UV (220nm)

Điều kiện phân tích 2

Thiết bị đo: hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC system SHIMADZU CORPORATION Prominence

Cột: DAICEL CHIRALCEL OJ-RH 4,6mm Φ ×150mm

Nhiệt độ cột: 40°C

Pha động: (dung dịch A) đệm phosphat 10mM (độ pH 2,0), (dung dịch B) axetonitril

Chế phẩm của pha động (dung dịch A: dung dịch B) được thay đổi từ 70:30 đến 40:60 trong 20 phút và sau đó được giữ ở 40:60 trong 10 phút.

Lưu lượng: 0,5ml/phút

Dò: UV (220 nm)

Điều kiện phân tích 3

Thiết bị đo: hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC system SHIMADZU CORPORATION Prominence

Cột: DAICEL CHIRALPAK AD-3R 4,6mmΦ×150mm

Nhiệt độ cột: 40°C

Pha động: (dung dịch A) đệm phosphat 10 mM (độ pH 2,0), (dung dịch B) axetonitril

Chế phẩm của pha động (dung dịch A:dung dịch B) được thay đổi từ 50:50 đến 20:80 trong 20 phút và sau đó giữ ở 20:80 trong 5 phút.

Lưu lượng: 0,5ml/phút

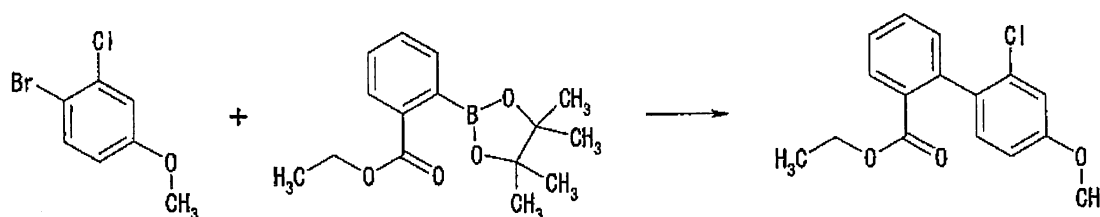
Dò: UV (220nm)

Ví dụ 1

Tổng hợp 2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropanamit (hợp chất (2))

Bước 1

Etyl 2'-clo-4'-metoxybiphenyl-2-carboxylat



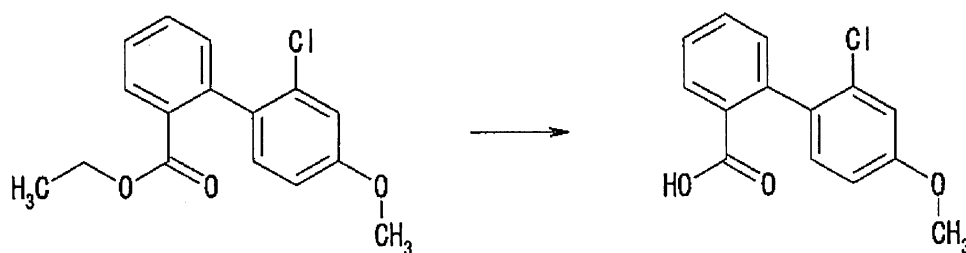
Trong môi trường agon, hòa tan 1-bromo-2-clo-4-metoxybenzen (44,3g) trong toluen (220ml), bổ sung etyl 2-(4,4,5,5-tetrametyl[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)benzoat (60,8g), nước (132ml), natri hydro cacbonat (33,6g) và diclobis(triphenylphosphin)paladi(II) (2,8g), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong bể

dầu là 120°C trong 7 giờ. Bổ sung ethyl 2-(4,4,5,5-tetrametyl[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)benzoat (5,2g) vào hỗn hợp phản ứng, và sau đó khuấy hỗn hợp phản ứng này trong 2 giờ. Làm mát hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, bổ sung toluen (100ml) và nước (200ml), và khuấy hỗn hợp qua đêm. Bổ sung than hoạt tính (3g) vào hỗn hợp phản ứng này, và sau đó khuấy hỗn hợp phản ứng này trong 1 giờ. Lọc bỏ chất không tan qua xelit, và rửa chất không tan bằng toluen (100ml) và nước (200ml). Kết hợp các dịch lọc thu được để phân tách lớp. Rửa lớp hữu cơ thu được bằng nước (100ml), và làm bay hơi dung môi để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (67,7g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 7,88-7,86 (1H, m), 7,63 (1H, td, $J = 7,6, 1,4$ Hz), 7,51 (1H, td, $J = 7,6, 1,4$ Hz), 7,27 (1H, dd, $J = 7,6, 0,9$ Hz), 7,18 (1H, d, $J = 8,6$ Hz), 7,06 (1H, d, $J = 2,6$ Hz), 6,95 (1H, dd, $J = 8,6, 2,6$ Hz), 4,01 (2H, m), 3,80 (3H, s), 0,96 (3H, t, $J = 7,1$ Hz).

Bước 2

Axit 2'-clo-4'-metoxybiphenyl-2-carboxylic

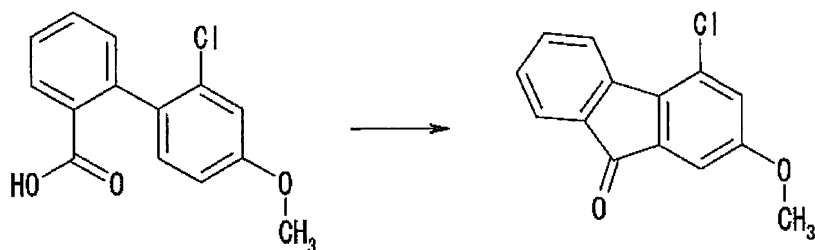


Hòa tan ethyl 2'-clo-4'-metoxybiphenyl-2-carboxylat (67,7g) trong ethanol (100ml), bổ sung dung dịch natri hydroxit 4N (100ml), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong bể dầu là 110°C trong 4,5 giờ. Làm mát hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, bổ sung nước (200ml) và toluen (100ml), và khuấy hỗn hợp qua đêm. Bổ sung than hoạt tính (3,6g) vào hỗn hợp này, và sau đó khuấy hỗn hợp phản ứng

này trong 1 giờ. Lọc bỏ chất không tan qua xelit, và rửa chất không tan bằng toluen (30ml) và nước (300ml). Kết hợp các dịch lọc thu được để phân tách lớp. Rửa lớp nước thu được bằng toluen (100 ml), axit hóa lớp nước bằng axit clohydric đậm đặc (40ml), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc. Chất rắn thu được được làm khô trong không khí trong 3 giờ, và làm khô dưới áp suất giảm ở 60°C qua đêm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (50,2g). $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 12,57 (1H, s), 7,90-7,88 (1H, m), 7,60 (1H, td, $J = 7,6, 1,3$ Hz), 7,49 (1H, td, $J = 7,6, 1,3$ Hz), 7,24 (1H, dd, $J = 7,6, 1,0$ Hz), 7,19 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,06 (1H, d, $J = 2,4$ Hz), 6,95 (1H, dd, $J = 8,5, 2,4$ Hz), 3,81 (3H, s).

Bước 3

4-clo-2-metoxi-9H-floren-9-on



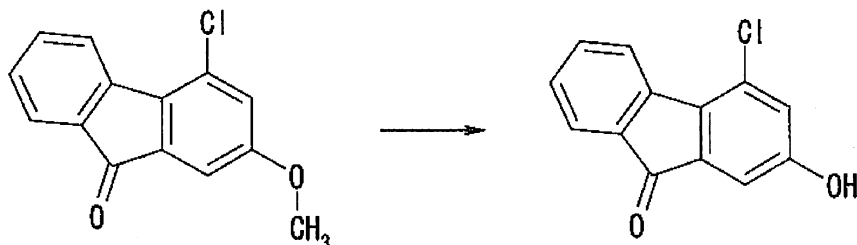
Trong môi trường agon, bổ sung chất phản ứng Eaton (dung dịch phospho pentoxit - axit metansulfonic (tỷ lệ trọng lượng 1:10), 330ml) vào axit 2'-clo-4'-metoxybiphenyl-2-carboxylic (65,4g) và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong bể dầu là 100°C trong 1 giờ. Làm mát hỗn hợp phản ứng này bằng nước đá, bổ sung nhỏ giọt nước một cách từ từ (650ml), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc, và rửa bằng nước (500 ml). Chất rắn thu được được làm khô trong không khí qua đêm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (92,0g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8,01 (1H, d, $J = 7,4$ Hz), 7,64-7,60 (2H, m),

7,36 (1H, td, $J = 7,4, 0,9$ Hz), 7,17 (2H, dd, $J = 8,4, 2,3$ Hz), 3,85 (3H, s).

Bước 4

4-clo-2-hydroxy-9H-floren-9-on

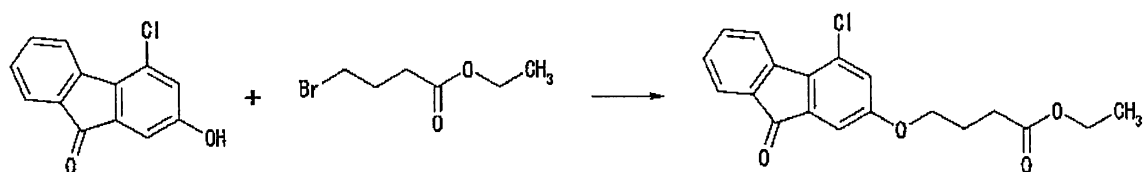


Trong môi trường agon, bổ sung N-metylpyrrolidon (120ml) và pyridin hydroclorua (144g) vào 4-clo-2-metoxi-9H-floren-9-on (92,0g). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong bể dầu là 200°C trong 3 giờ cùng với loại bỏ nước bằng thiết bị Dean-Stark. Làm mát hỗn hợp phản ứng đến 90°C , bổ sung nhỏ giọt nước (600ml), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc, và rửa bằng nước (400ml). Chất rắn thu được được làm khô trong không khí trong 3 ngày, bổ sung hỗn hợp dung môi của hexan và etyl axetat (hexan: etyl axetat 1:1, 300ml), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Thu chất rắn bằng cách lọc, và rửa bằng hỗn hợp dung môi của hexan và etyl axetat (hexan: etyl axetat 1:1, 500ml). Làm khô chất rắn thu được dưới áp suất giảm ở 50°C trong 3 giờ để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (48,6g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 10,56 (1H, s), 7,96 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,61-7,57 (2H, m), 7,32 (1H, td, $J = 7,4, 0,9$ Hz), 6,97 (1H, d, $J = 2,2$ Hz), 6,94 (1H, d, $J = 2,2$ Hz).

Bước 5

Etyl 4-(4-clo-9-oxo-9H-floren-2-yloxy)butyrat

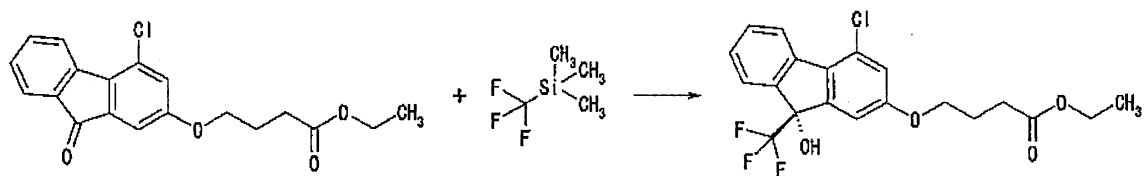


Hòa tan 4-clo-2-hydroxy-9H-floren-9-on (48,6g) trong N,N-dimetylformamit (150ml), bổ sung kali cacbonat (58,3g) và etyl 4-bromobutyrat (33,5ml), và khuấy hỗn hợp này ở 60°C trong 2 giờ. Làm mát hỗn hợp phản ứng đến 40°C, và bổ sung toluen (300ml) và nước (300ml) để phân lớp. Chiết lại lớp nước thu được bằng toluen (100ml). Kết hợp các lớp hữu cơ thu được, rửa hai lần bằng nước (100ml), bổ sung natri sulfat khan và than hoạt tính (2,5g), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Lọc bỏ chất không tan qua xelit, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc. Bổ sung hexan (220 ml) vào phần cặn thu được, và khuấy hỗn hợp ở 50°C trong 10 phút và ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc, và rửa bằng hexan. Làm khô chất rắn thu được dưới áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (66,9g). Ngoài ra, làm bay hơi dung môi trong dịch lọc thu được, bổ sung etyl axetat (5ml) và hexan (20ml) vào phần cặn, và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc, và rửa bằng hexan. Làm khô chất rắn thu được dưới áp suất giảm để tiếp tục thu được hợp chất nêu ở đề mục này (2,5g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8,01 (1H, d, $J = 7,6$ Hz), 7,65-7,61 (2H, m), 7,37 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,17-7,14 (2H, m), 4,13-4,05 (4H, m), 2,47 (2H, t, $J = 7,3$ Hz), 2,02-1,95 (2H, m), 1,19 (3H, td, $J = 7,2, 0,7$ Hz).

Bước 6

Etyl 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyrat



Trong môi trường agon, hòa tan etyl 4-(4-clo-9-oxo-9H-floren-2-yloxy)butyrat (69,4g) trong THF (700ml), và bổ sung N-(4-tert-butylbenzyl)xinchonidi 4-metoxyphenoxit (6,4g). Bổ sung nhỏ giọt trimetyl(triflometyl)silan (52,0ml) trong THF (140ml) ở -16°C vào hỗn hợp phản ứng này, và khuấy hỗn hợp ở cùng nhiệt độ trong 15 phút. Bổ sung liên tục axit axetic (23,0ml) và dung dịch tetrabutylamoni florua/THF 1M (222ml) vào hỗn hợp phản ứng này, và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Làm bay hơi dung môi trong hỗn hợp phản ứng này, và bổ sung toluen (500ml) và natri hydro cacbonat bão hòa trong nước (200ml) vào phần cặn để phân tách lớp. Rửa lớp hữu cơ thu được liên tục bằng natri hydro cacbonat bão hòa trong nước (150ml, hai lần), natri hydroxit trong nước 1N (100ml), nước (100ml), axit clohydric 1N (100ml), nước (100ml) và nước muối bão hòa (100ml). Bổ sung magie sullfat khan và silicagel (150g) vào lớp hữu cơ thu được, và khuấy hỗn hợp trong 10 phút. Lọc bỏ chất không tan, và rửa chất không tan liên tục bằng toluen (300ml) và etyl axetat (800ml). Kết hợp dịch lọc thu được và rửa toluen và làm bay hơi dung môi để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (72,1g). Ngoài ra, làm bay hơi dung môi trong bước rửa bằng etyl axetat, bổ sung silicagel (40 g) và hỗn hợp dung môi của hexan và etyl axetat (etyl axetat:hexan 2:1, 300ml) vào phần cặn thu được, và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng. Lọc bỏ chất không tan, và chất không tan được rửa bằng hỗn hợp dung môi của hexan và etyl axetat (etyl axetat:hexan=2:1, 300ml). Làm bay hơi dung môi trong dịch lọc thu được để thu tiếp hợp chất nêu ở đề mục

này (20,3g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8,14 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,66 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,53 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,42-7,38 (2H, m), 7,14 (2H, s), 4,11-4,05 (4H, m), 2,47 (2H, t, $J = 7,5$ Hz), 2,03-1,96 (2H, m), 1,19 (3H, td, $J = 7,1, 0,8$ Hz).

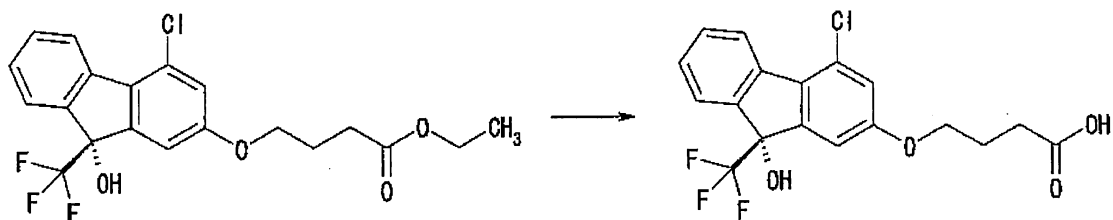
Cấu hình tuyệt đối

Việc xác định cấu hình tuyệt đối của 4-clo-2-metyl-9-(triflometyl)-9H-floren-9-ol trong bước 10 đề cập sau đây đã xác nhận rằng hợp chất nêu ở đề mục này thu được trong bước này là dạng (R). Độ tinh khiết quang học là 52,9%e.e.

Độ tinh khiết quang học được xác định dưới điều kiện phân tích HPLC 1. Thời gian duy trì của dạng (S) là 19,6 phút, thời gian duy trì của dạng (R) là 23,0 phút.

Bước 7

Axit 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyric



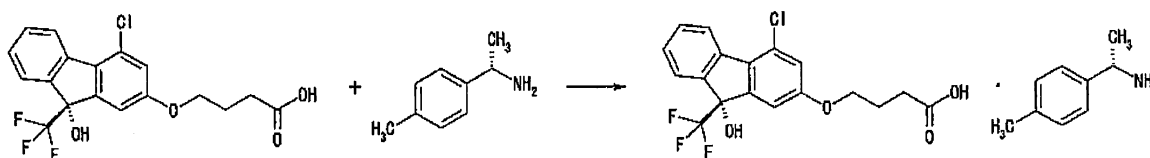
Hòa tan ethyl 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyrat (92,2g) trong ethanol (100ml), bổ sung dung dịch natri hydroxit 4N (100ml), và khuấy hỗn hợp ở 80°C qua đêm. Làm mát hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, bổ sung nước (200ml), và rửa hỗn hợp hai lần bằng toluen (100ml). Trung hòa lớp nước thu được bằng axit clohydric đậm đặc (40ml), và chiết hai lần bằng etyl axetat (300ml). Rửa phần chiết etyl axetat thu được liên tục với nước (100ml, hai lần), và nước muối bão hòa (100ml), bổ sung magie sulfat khan và than hoạt tính (4,2g), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Lọc

bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc. Bổ sung cloroform (80ml) vào phần cặn thu được, và làm nóng hỗn hợp đến 50°C. Bổ sung nhỏ giọt hexan (400ml), và khuấy hỗn hợp ở cùng nhiệt độ trong 30 phút, và ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Chất rắn kết tủa thu được bằng cách lọc, rửa bằng hỗn hợp dung môi của hexan và cloroform (hexan:cloroform =9:1, 50ml), và làm khô dưới áp suất giảm ở 80°C trong 2 giờ để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (72,5g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 12,17 (1H, br s), 8,14 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,66 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,54 (1H, td, $J = 7,7, 1,2$ Hz), 7,42-7,30 (2H, m), 7,18-7,15 (2H, m), 4,09 (2H, t, $J = 6,4$ Hz), 2,41 (2H, t, $J = 7,3$ Hz), 2,00-1,93 (2H, m).

Bước 8

Muối (1S)-1-(4-metylphenyl)etylamin của axit 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyric



Trong môi trường nito, hòa tan (1S)-1-(4-metylphenyl)etylamin (19,5g) trong etyl axetat (720ml), và bổ sung axit 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyric (72,5g). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 60°C trong 2 giờ, và ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc, và rửa bằng etyl axetat (100ml). Làm khô chất rắn thu được dưới áp suất giảm ở 60°C trong 5 giờ để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (68,6g). Ngoài ra, có thể thu được axit 4-[(9S)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyric từ dịch lọc.

Độ tinh khiết quang học

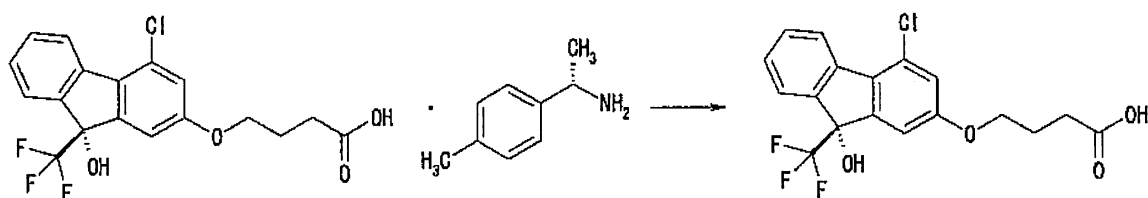
Xác định độ tinh khiết quang học của axit 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-

(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyric trong điều kiện phân tích HPLC 1 (độ tinh khiết quang học 90,2%e.e.). Thời gian duy trì của dạng (R) là 12,9 phút, thời gian duy trì của dạng (S) là 10,4 phút.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8,14 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,66 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,53 (1H, td, $J = 7,6, 1,1$ Hz), 7,40 (1H, td, $J = 7,6, 1,0$ Hz), 7,26 (2H, d, $J = 7,9$ Hz), 7,16-7,10 (4H, m), 4,08 (2H, t, $J = 6,5$ Hz), 4,01 (1H, q, $J = 6,7$ Hz), 2,32 (2H, t, $J = 7,3$ Hz), 2,26 (3H, s), 1,98-1,91 (2H, m), 1,26 (3H, d, $J = 6,7$ Hz).

Bước 9

Axit 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyric

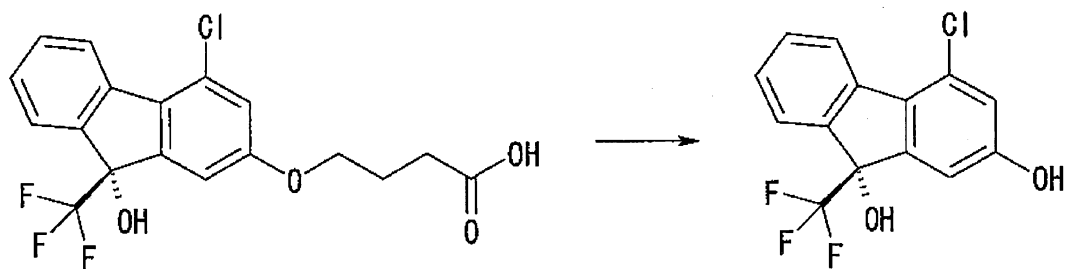


Bổ sung etyl axetat (500ml) và axit clohydric 2N (300ml) vào muối (1S)-1-(4-metylphenyl)etylamin của axit 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyric (68,6g), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Phân lớp hỗn hợp này. Rửa lớp hữu cơ thu được liên tục bằng nước (250ml) và nước muối bão hòa (200ml). Làm khô lớp hữu cơ thu được qua magie sulfat khan, lọc bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (60,0g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 12,17 (1H, br s), 8,14 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,66 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,54 (1H, td, $J = 7,7, 1,2$ Hz), 7,42-7,30 (2H, m), 7,18-7,15 (2H, m), 4,09 (2H, t, $J = 6,4$ Hz), 2,41 (2H, t, $J = 7,3$ Hz), 2,00-1,93 (2H, m).

Bước 10

(9R)-4-clo-9-(triflometyl)-9H-floren-2,9-diol



Bổ sung N-metylpyrrolidon (200ml) và pyridin hydroclorua (298g) vào axit 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyric (50g), và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong bể dầu là 200°C trong 2 ngày. Làm mát hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, pha loãng bằng etyl axetat (500ml), và rửa hai lần bằng nước. Chiết lại lớp nước thu được bằng etyl axetat (300ml). Rửa liên tục lớp hữu cơ kết hợp với nước, axit clohydric 1N và nước muối bão hòa. Bổ sung magie sulfat khan và than hoạt tính (10g) vào lớp hữu cơ thu được, và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng. Lọc bỏ chất không tan qua xelit. Làm bay hơi lớp hữu cơ thu được, bổ sung hexan vào phần cặn, và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc, và làm khô dưới áp suất giảm ở nhiệt độ trong phòng. Hòa tan sản phẩm thô thu được trong etyl axetat (500ml), rửa 3 lần với nước, làm khô trên magie sulfat khan. Lọc bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc. Bổ sung hexan vào phần cặn, và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc, làm khô dưới áp suất giảm ở nhiệt độ trong phòng để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (22,4g).

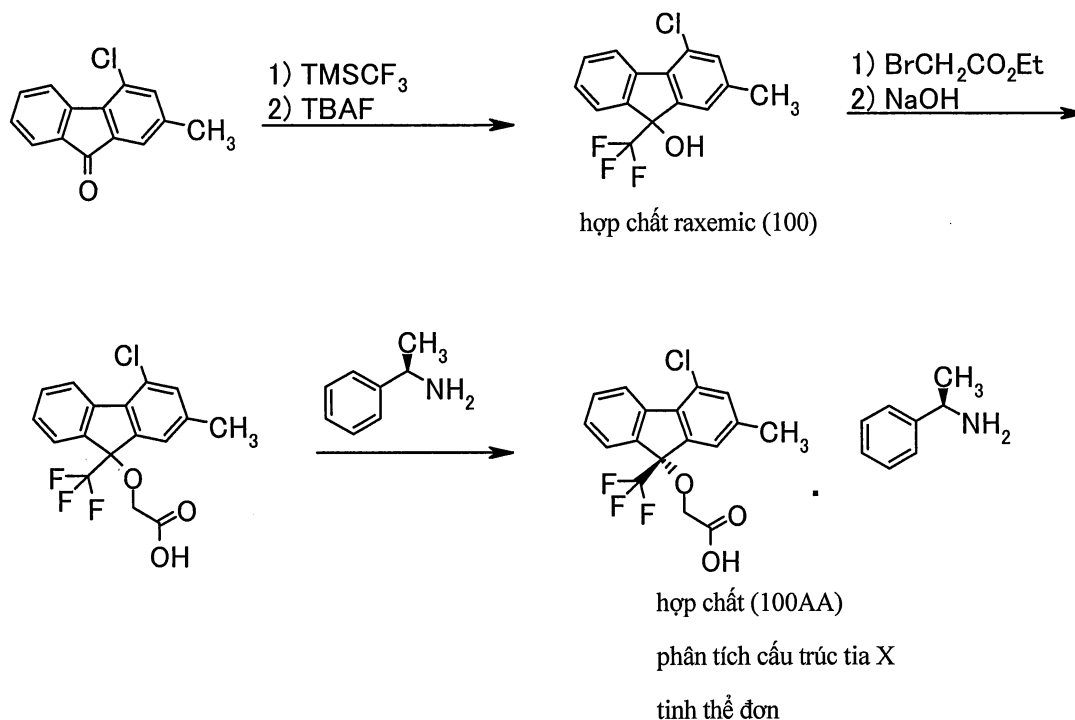
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 10,37 (1H, br s), 8,09 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,63 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,50 (1H, td, $J = 7,6, 1,0$ Hz), 7,36 (1H, td, $J = 7,6, 1,0$ Hz), 7,32 (1H, br s), 7,06 (1H, s), 6,91 (1H, br d, $J = 2,0$ Hz).

Cấu hình tuyệt đối

Cấu hình tuyệt đối của hợp chất nêu ở đề mục này được xác định bằng

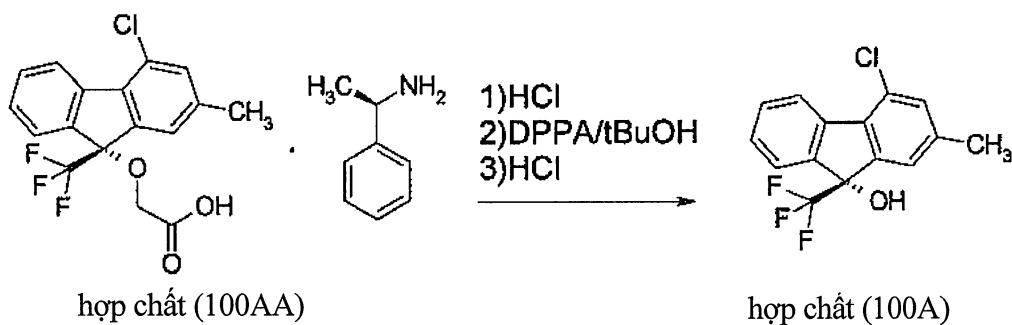
phân tích HPLC sử dụng cột hoạt tính quang học của hợp chất (100A) và hợp chất (100B) được điều chế trong các bước sau (bước A-1 đến bước A-2 và bước B-1).

Bước A-1



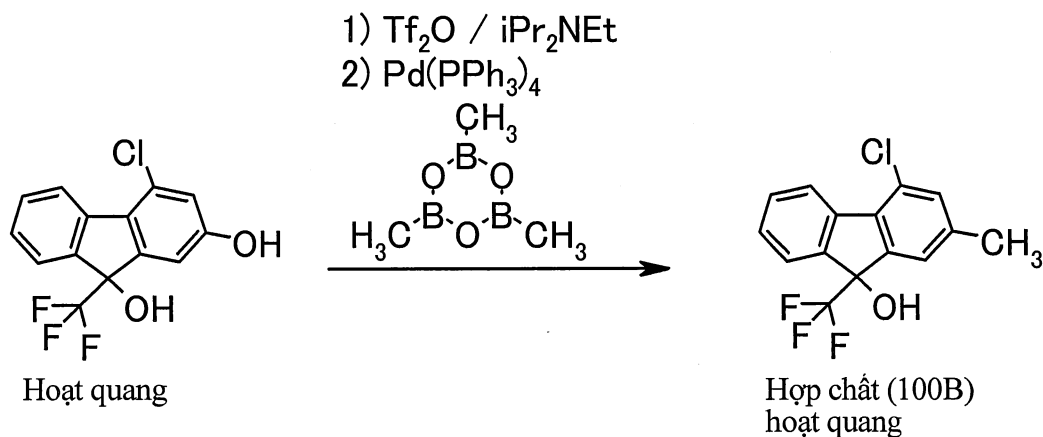
Triflometyl hóa đối với 4-clo-2-metyl-9H-floren-9-on, phản ứng với etyl bromoaxetat, và thủy phân để tạo ra axit [4-clo-2-metyl-9-(triflometyl)-9H-floren-9-yloxy]axetic. Tiến hành phân giải quang học hợp chất này bằng cách sử dụng (1R)-1-phenyletylamin, và cấu hình tuyệt đối được xác định là (R) bằng cách phân tích cấu trúc tinh thể đơn bằng tia X đối với muối (1R)-1-phenyletylamin (100AA) thu được.

Bước A-2



Tổng hợp (9R)-4-clo-2-metyl-9-(triflometyl)-9H-floren-9-ol (hợp chất (100A)) từ hợp chất 100AA bằng quá trình xử lý axit và tương tự.

Bước B-1



Nhóm hydroxyl ở vị trí 2 của 4-clo-9-(triflometyl)-9H-floren-2,9-diol thu được trong bước 10 được chuyển hóa thành nhóm metyl bằng phương pháp nêu trên để tạo ra 4-clo-2-metyl-9-(triflometyl)-9H-floren-9-ol (hợp chất (100B)).

Phân tích HPLC sử dụng cột hoạt quang

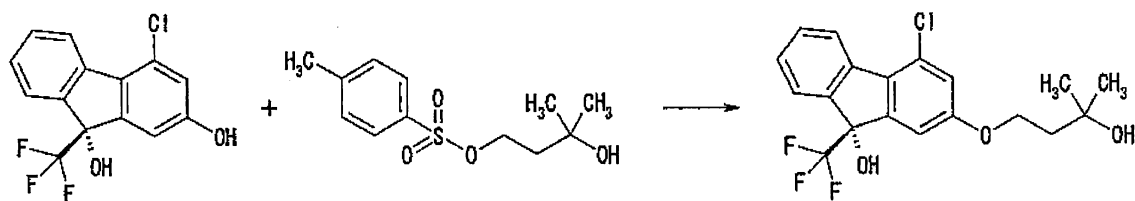
Cả hai chất đồng phân quang học của hợp chất (100) được tách bằng HPLC sử dụng cột hoạt quang (điều kiện phân tích HPLC 3). Phân tích HPLC của hợp chất (100A) đã xác nhận rằng thời gian duy trì của dạng (R) là 18,4 phút, và thời gian duy trì của dạng (S) là 17,0 phút. Hợp chất (100A) và hợp chất (100B) được phân tích dưới điều kiện HPLC để xác định thời gian duy trì thích hợp.

Người ta cho rằng cấu hình tuyệt đối của cacbon không đối xứng không

chuyển hóa trong khi điều chế hợp chất (100A) và hợp chất (100B) nêu trên. Các kết quả đã xác nhận rằng 4-clo-9-(triflometyl)-9H-floren-2,9-diol thu được trong bước 10 có cấu hình tuyệt đối (R).

Bước 11

(9R)-4-clo-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-9-ol



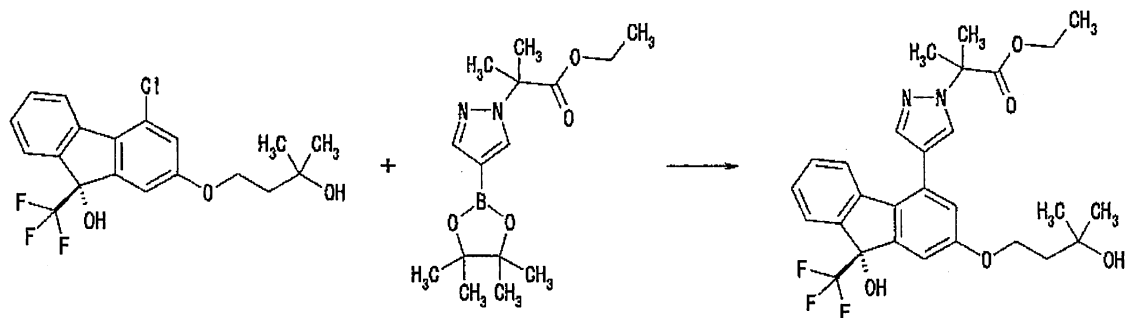
Trong môi trường nito, (9R)-4-clo-9-(triflometyl)-9H-floren-2,9-diol (55,5g) được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (550ml), bổ sung 3-hydroxy-3-metylbutyl toluen-4-sulfonat (49,6g) và kali cacbonat (39,5g) vào, và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong bể dầu là 70°C qua đêm. Hỗn hợp phản ứng này được bổ sung dung dịch chứa 3-hydroxy-3-metylbutyl toluen-4-sulfonat (4,0g) trong N,N-dimetylformamit (5ml), và tiếp tục khuấy hỗn hợp này ở cùng một nhiệt độ trong 9,5 giờ. Làm mát hỗn hợp phản ứng bằng nước đá, bổ sung nước (800ml), và chiết hỗn hợp thu được bằng etyl axetat (900ml). Rửa lớp hữu cơ thu được bằng nước (500ml, 3 lần) và nước muối bão hòa (500ml). Làm khô lớp hữu cơ thu được trên natri sulfat khan, lọc bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc. Tinh chế phần cặn thu được bằng cách sắc ký cột silicagel (sử dụng hỗn hợp hexan và etyl axetat làm dung môi rửa giải, đầu tiên rửa giải với hỗn hợp (hexan:etyl axetat) ở tỷ lệ trộn 3:1, và sau đó với hỗn hợp này ở tỷ lệ trộn 2:1, và tiếp tục với hỗn hợp này ở tỷ lệ trộn 3:2) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (49,5g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8,12 (1H, d, $J = 7,6$ Hz), 7,64 (1H, d, $J = 7,4$

H_z), 7,52 (1H, td, J = 7,6, 0,9 Hz), 7,40-7,36 (2H, m), 7,15-7,13 (2H, m), 4,41 (1H,s), 4,16 (2H, t, J = 7,1 Hz), 1,85 (2H, t, J = 7,1 Hz), 1,17 (6H, s).

Bước 12

Etyl 2-metyl-2-[4-[(9R)-9-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl]-2-metylpropionat



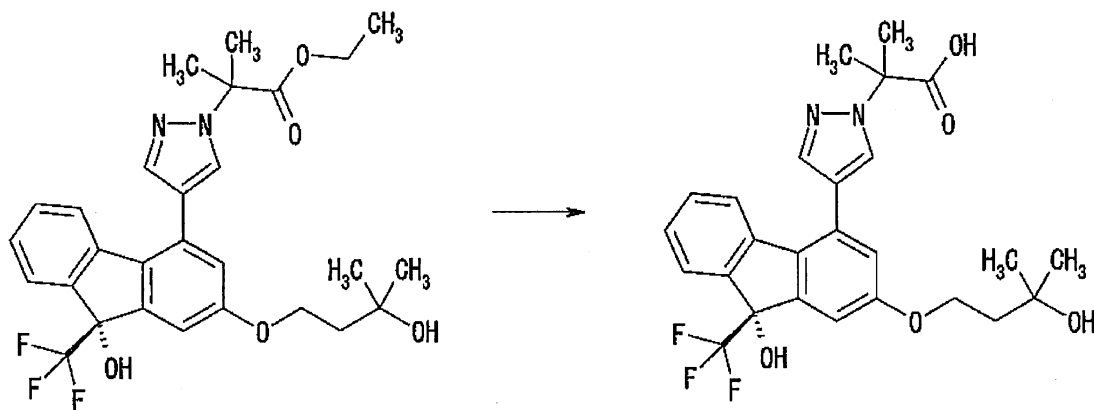
Trong môi trường agon, hòa tan (9R)-4-clo-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-9-ol (49,5g) trong toluen (445ml), bổ sung etyl 2-metyl-2-[4-(4,4,5,5-tetrametyl[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol-1-yl]propionat (59,2g), nước (149ml), trikali phosphat (54,3g), paladi axetat (2,9g) và 2-dixyclohexylphosphino-2',6'-dimetoxybiphenyl (SPhos) (10,5g), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong bể dầu là 100°C trong 3,5 giờ. Làm mát hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, và bổ sung nước (300ml). Lọc bỏ chất không tan qua xelit, và rửa chất không tan bằng toluen (150ml) và nước (50ml). Kết hợp các dịch lọc thu được để phân tách lớp. Rửa lớp hữu cơ thu được liên tục bằng nước (500ml) và nước muối bão hòa (500ml). Làm khô lớp hữu cơ thu được qua natri sulfat khan, lọc bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc. Tinh chế phần cặn thu được bằng cách sắc ký cột silicagel (sử dụng hỗn hợp hexan và etyl axetat làm dung môi rửa giải, đầu tiên rửa giải với hỗn hợp (hexan:etyl axetat) ở tỷ lệ trộn 2:1, và sau đó với hỗn hợp này ở tỷ lệ trộn 1:1, và tiếp tục với hỗn hợp

này ở tỷ lệ trộn 1:2), và tinh chế tiếp bằng cách sắc ký cột silicagel (sử dụng hỗn hợp gồm hexan và axeton làm dung môi rửa giải, đầu tiên rửa giải với hỗn hợp (hexan:axeton) ở tỷ lệ trộn 2:1, và sau đó với hỗn hợp này ở các tỷ lệ trộn 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 2:3, và tiếp theo với hỗn hợp này ở tỷ lệ trộn 1:2) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (68,4g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8,18 (1H, s), 7,65 (1H, s), 7,59-7,57 (1H, m), 7,25-7,21 (4H, m), 7,13 (1H, br d, $J = 1,6$ Hz), 6,84 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), 4,38 (1H, s), 4,16-4,11 (4H, m), 1,86 (2H, t, $J = 7,1$ Hz), 1,84 (6H, s), 1,16 (6H, s), 1,13 (3H, t, $J = 7,0$ Hz).

Bước 13

Axit 2-{4-[(9R)-9-Hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropionic



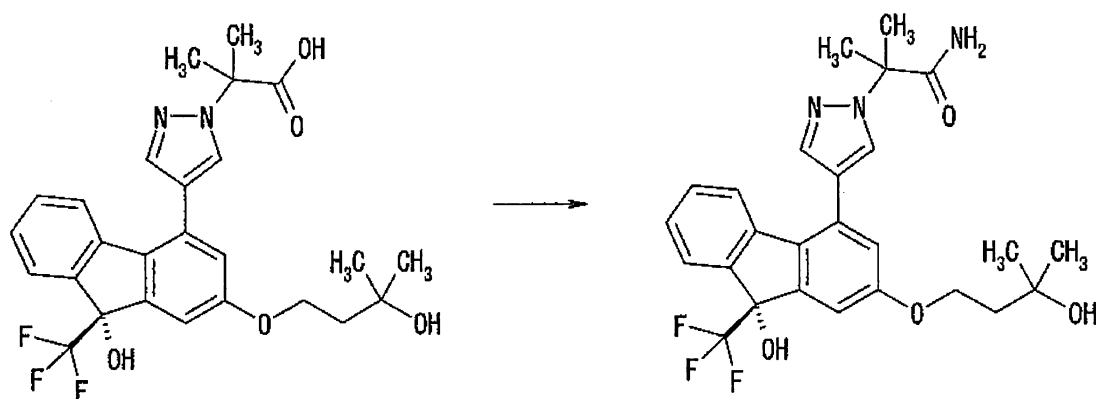
Hòa tan etyl 2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropionat (68,4g) trong ethanol (256ml), bổ sung dung dịch natri hydroxit 4N (128ml), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 2,5 giờ. Làm mát hỗn hợp phản ứng này bằng nước đá, bổ sung nhỏ giọt axit clohydric 2N (333ml), và chiết hỗn hợp này bằng etyl axetat (500ml). Rửa lớp hữu cơ thu được liên tục bằng nước (400ml, hai lần) và nước muối bão hòa (400ml). Làm khô lớp hữu cơ thu được qua natri sulfat khan, lọc bỏ

chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (70,0g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 13,06 (1H, br s), 8,14 (1H, s), 7,62 (1H, s), 7,57 (1H, dd, $J = 6,4, 0,6$ Hz), 7,27-7,19 (4H, m), 7,12 (1H, s), 6,84 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), 4,38 (1H, s), 4,14 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,85 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,82 (3H, s), 1,81 (3H, s), 1,16 (6H, s).

Bước 14

2-{4-[(9R)-9-Hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropanamit (hợp chất (2))



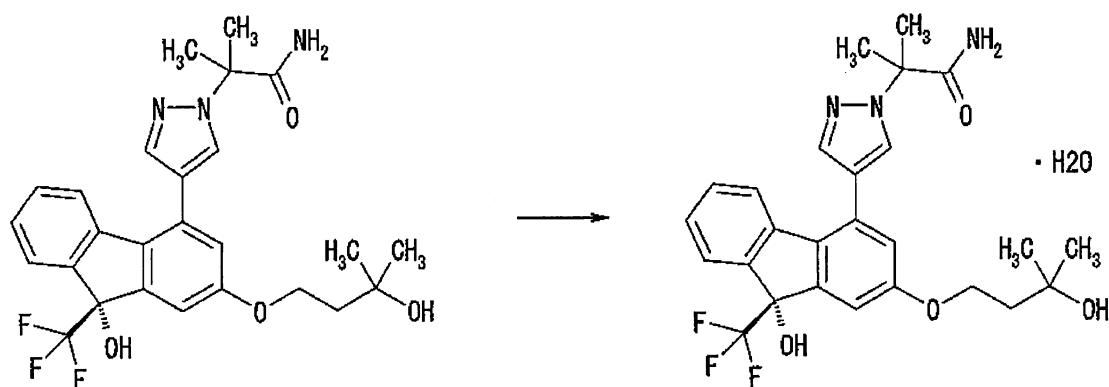
Trong môi trường nitơ, hòa tan axit 2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropionic (66,7g) trong N,N-dimetylformamit (480ml), bổ sung 1-hydroxybenzotriazol (HOBt) 1 hydrat (27,6g), 1-etyl-3-(3'-dimetylaminopropyl)carbodiimitt (WSC) hydroclorua (34,6g) và nước amoniac 28% (24,5 ml), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Làm mát hỗn hợp phản ứng này bằng nước đá, bổ sung nhỏ giọt nước (630ml) và axit clohydric 2N (330ml), và chiết hỗn hợp này bằng etyl axetat (800ml). Chiết lại lớp nước thu được bằng etyl axetat (500ml). Kết hợp các lớp hữu cơ thu được, và rửa liên tục bằng nước (500ml, hai lần), natri hydro cacbonat bão hòa trong nước (500ml), và nước muối bão hòa (500ml). Làm khô

lớp hữu cơ thu được qua natri sulfat khan, lọc bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (60,0g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8,08 (1H, s), 7,66 (1H, s), 7,58-7,56 (1H, m), 7,32-7,30 (1H, m), 7,25-7,22 (4H, m), 7,12 (1H, br s), 6,96 (1H, br s), 6,87 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), 4,38 (1H, s), 4,14 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,85 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,78 (3H, s), 1,78 (3H, s), 1,17 (6H, s).

Bước 15

2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropanamit monohidrat (hợp chất (2h))



Hòa tan 2-{4-[(9R)-9-Hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropanamit (hợp chất (2)) (60,0g) thu được trong bước trước đó trong etyl axetat (109ml), bổ sung nước (2ml), và gia nhiệt hỗn hợp đến 50°C . Bổ sung nhỏ giọt liên tục vào hỗn hợp này hexan (226ml), và hỗn hợp dung môi của hexan và etyl axetat (hexan:etyl axetat 2:1, 150ml), và làm mát hỗn hợp này đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Chất rắn kết tủa thu được bằng cách lọc, và rửa bằng hỗn hợp dung môi của hexan và etyl axetat (hexan:etyl axetat=2:1, 180ml). Làm khô chất rắn thu được dưới áp suất giảm ở nhiệt độ trong phòng qua đêm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (52,2g, độ tinh khiết quang học 98,6%e.e.). Xác định độ tinh khiết quang học dưới

điều kiện phân tích HPLC 2. Thời gian duy trì của dạng (R) là 11,3 phút, thời gian duy trì của dạng (S) là 13,9 phút.

Mức quay quang đặc trưng $[\alpha]_D +37,9^\circ (c=1,01 \text{ MeOH } 25^\circ\text{C})$.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8,08 (1H, s), 7,66 (1H, s), 7,58-7,56 (1H, m), 7,32-7,30 (1H, m), 7,25-7,22 (4H, m), 7,12 (1H, br s), 6,96 (1H, br s), 6,87 (1H, d, $J = 2,3 \text{ Hz}$), 4,38 (1H, s), 4,14 (2H, t, $J = 7,2 \text{ Hz}$), 1,85 (2H, t, $J = 7,2 \text{ Hz}$), 1,78 (3H, s), 1,78 (3H, s), 1,17 (6H, s).

Đo phân tích nguyên tố

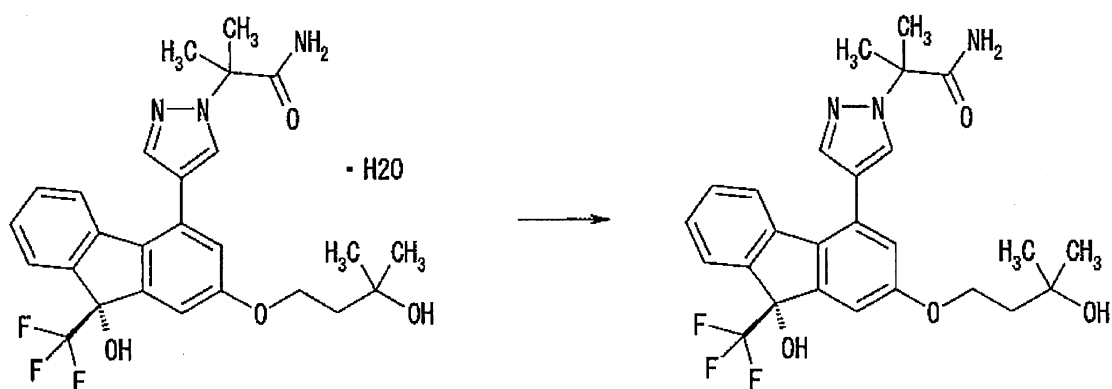
Các kết quả phân tích nguyên tố phù hợp với giá trị lý thuyết của hợp chất (2h) tính được.

Tính toán: C, 59,88; H, 5,80; N, 8,06 (được tính ở dạng monohydrat)

Kết quả: C, 59,86; H, 5,74; N, 8,00.

Bước 16

2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropanamit (hợp chất (2))



Bổ sung toluen (340ml) vào 2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(3-hydroxy-3-metylbutyloxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropanamit monohydrat (hợp chất (2h)) (22,63g) thu được trong bước trước

đó. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong bể dầu là 130°C trong 2 giờ trong môi trường nitơ cùng với loại bỏ nước bằng thiết bị Dean-Stark. Khuấy thêm hỗn hợp phản ứng này ở nhiệt độ trong bể dầu là 70°C trong 1,5 giờ, làm mát đến nhiệt độ trong phòng, và khuấy qua đêm. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc, và rửa bằng toluen (100ml). Làm khô chất rắn thu được dưới áp suất giảm ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày, và tiếp tục làm khô dưới áp suất giảm ở 60°C trong 1 ngày để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (21,5g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8,08 (1H, s), 7,66 (1H, s), 7,58-7,56 (1H, m), 7,32-7,30 (1H, m), 7,25-7,22 (4H, m), 7,12 (1H, br s), 6,96 (1H, br s), 6,87 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), 4,38 (1H, s), 4,14 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,85 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,78 (3H, s), 1,78 (3H, s), 1,17 (6H, s).

Đo phân tích nguyên tố

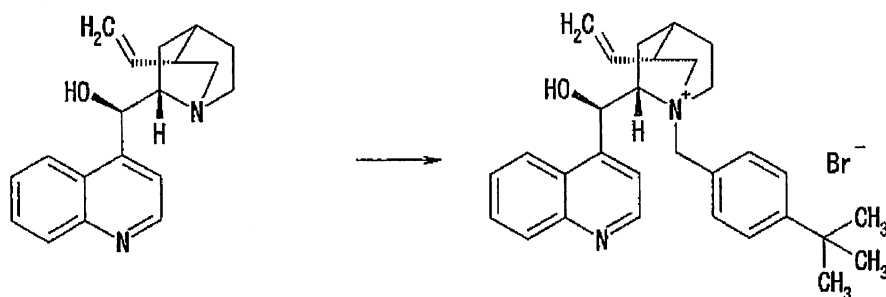
Các kết quả phân tích nguyên tố phù hợp với giá trị lý thuyết của hợp chất (2) được tính toán.

Tính toán: C, 62,02; H, 5,61; N, 8,35 (được tính toán dưới dạng khan)

Kết quả: C, 62,17; H, 5,60; N, 8,47.

Bước C-1

Điều chế N-(4-tert-butylbenzyl)xinchonidi bromua



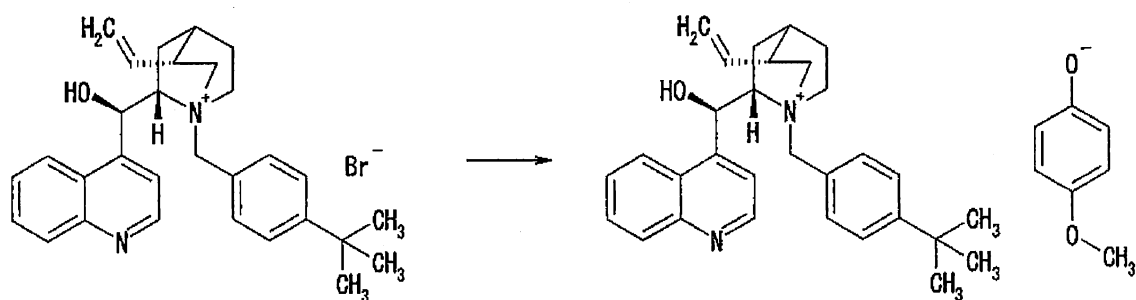
Hòa tan xinchonidin (10,6g) trong tetrahydrofuran (200ml), bổ sung 4-tert-

butylbenzylbromua (10,1g) và tetrabutylamoni iđua (0,66g), và khuấy hỗn hợp ở 70°C qua đđm. Làm mát hỗn hợp phản ứng đđn nhiệt đđ trong phòng, thu chất rắn bằng cách lọc, và rửa bằng etyl axetat (50ml). Làm khô chất rắn thu đđợc dưới áp suất giảm qua đđm đđ thu đđợc hợp chất nêu ở đđ mục này (18,5g).

¹H-NMR (400MHz, DMSO-D₆) δ: 8,99 (1H, d, J = 4,4 Hz), 8,27 (1H, d, J = 8,2 Hz), 8,11 (1H, dd, J = 8,5, 1,0 Hz), 7,89-7,79 (2H, m), 7,78-7,71 (1H, m), 7,63 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,59 (2H, t, J = 8,4 Hz), 6,72 (1H, d, J = 4,2 Hz), 6,57-6,51 (1H, br s), 5,67 (1H, ddd, J = 17,0, 10,4, 6,4 Hz), 5,14 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,08 (1H, d, J = 12,6 Hz), 5,00-4,90 (2H, m), 4,30-4,18 (1H, m), 3,91 (1H, t, J = 8,7 Hz), 3,74-3,64 (1H, m), 3,35-3,18 (2H, m), 2,76-2,65 (1H, m), 2,18-1,94 (3H, m), 1,90-1,78 (1H, m), 1,40-1,22 (1H, m), 1,34 (9H, s).

Bước C-2

Điđu chế N-(4-tert-butylbenzyl)xinchonidđ 4-metoxypheđoxit



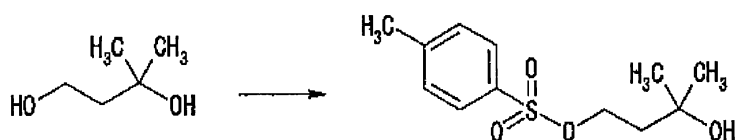
Bổ sung N-(4-tert-butylbenzyl)xinchonidđ bromua (18,5g), AMBERLYST (nhãn hiệđ đđ đđng ký) A26 (nhựa trao đđi ion có tính kiểđ mạnh của styren, nền divinylbenzen) (18,5g) và metanol (280ml), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt đđ trong phòng qua đđm. Lọc bỏ chất không tan qua xelit, và rửa bằng metanol (100ml). Bổ sung vào dịch lọc 4-metoxypheđol (4,8g), và làm bay hơi dung môi. Phần cặn đđợc làm bay hơi đđng sôi 3 lần với toluen (100ml), và bổ sung toluen (20ml). Sau đđ, bổ sung nhỏ giọt diisopropyl ete (200ml), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt đđ trong phòng

trong 3 giờ. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc, rửa bằng diisopropyl ete (50ml) và làm khô hỗn hợp này dưới áp suất giảm ở nhiệt độ trong phòng qua đêm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (21,8g).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8,91 (1H, d, $J = 4,4$ Hz), 8,17 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 8,07 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,89 (1H, d, $J = 4,4$ Hz), 7,79 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,64 (1H, t, $J = 7,5$ Hz), 7,57-7,52 (5H, m), 6,56-6,55 (2H, m), 6,43-6,42 (3H, m), 5,67-5,59 (1H, m), 5,28 (1H, d, $J = 12,1$ Hz), 5,12 (1H, d, $J = 17,2$ Hz), 4,92 (1H, d, $J = 10,6$ Hz), 4,84 (1H, d, $J = 12,1$ Hz), 4,65-4,53 (1H, m), 3,80 (1H, t, $J = 8,8$ Hz), 3,65-3,63 (1H, m), 3,57 (3H, s), 3,25 (1H, t, $J = 11,6$ Hz), 3,10-3,07 (1H, m), 2,67 (1H, br s), 2,07-2,02 (2H, m), 1,95 (1H, br s), 1,79-1,76 (1H, br m), 1,33 (9H, s), 1,16-1,11 (1H, m).

Bước D

Điều chế 3-hydroxy-3-metylbutyl toluen-4-sulfonat



Trong môi trường nitơ, hòa tan 3-metylbutan-1,3-diol (300g) trong pyridin (900ml), và dung dịch chứa 4-metylbenzensulfonyl clorua (500g) trong toluen (900ml) và bổ sung nhỏ giọt axetonitril (125ml) hơn 2 giờ. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ, và bổ sung toluen (500ml) và nước (1800ml) để phân tách lớp. Rửa liên tục lớp hữu cơ thu được bằng dung dịch axit sulfuric và nước (hai lần). Làm bay hơi dung môi trong lớp hữu cơ thu được, và phần cặn được làm bay hơi đồng sôi với toluen (500ml) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (535g).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,81-7,76 (2H, m), 7,36-7,31 (2H, m), 4,20 (2H, td, $J = 6,8$,

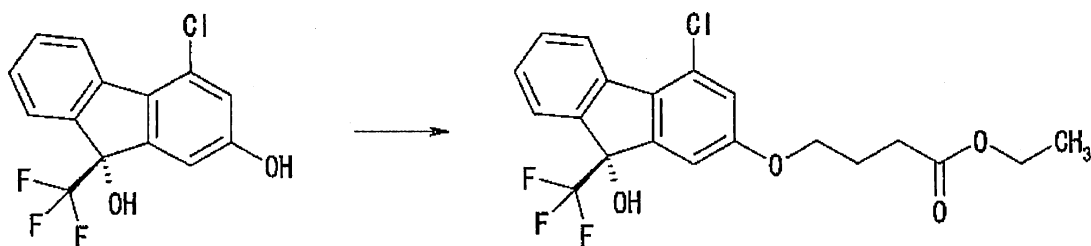
1,6 Hz), 2,44 (3H, s), 1,85 (2H, td, $J = 6,8, 1,6$ Hz), 1,33 (1H, s), 1,21 (6H, s).

Ví dụ 2

Tổng hợp 2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(4-hydroxy-4-methylpentyl-oxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropanamit (hợp chất (3))

Bước 1

Etyl 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyrat

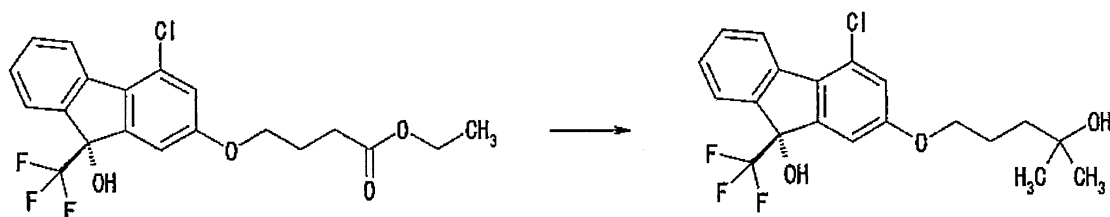


(9R)-4-clo-9-(triflometyl)-9H-floren-2,9-diol (200mg) thu được trong bước 10 ở Ví dụ 1 được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (2ml), bổ sung kali cacbonat (185mg) và etyl 4-bromobutyrat (105 μ l) vào, và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 7 giờ. Hỗn hợp phản ứng được bổ sung nước, và chiết hỗn hợp này hai lần bằng etyl axetat. Rửa liên tục lớp hữu cơ thu được bằng nước (hai lần) và nước muối bão hòa. Làm khô lớp hữu cơ thu được qua magie sulfat khan, lọc bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc. Tinh chế phân cận thu được bằng cách sắc ký cột silicagel (sử dụng hỗn hợp hexan và etyl axetat làm dung môi rửa giải, đầu tiên rửa giải với hỗn hợp này ở tỷ lệ trộn 5:1 (hexan:etyl axetat), sau đó tiếp tục với hỗn hợp ở tỷ lệ trộn 3:1, và sau đó với hỗn hợp ở tỷ lệ trộn 2:1) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (197mg).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8,19 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,66 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,46 (1H, td, $J = 7,6, 1,0$ Hz), 7,32 (1H, td, $J = 7,6, 1,0$ Hz), 7,16 (1H, br s), 6,93 (1H, d, $J = 2,1$ Hz), 4,14 (2H, q, $J = 7,1$ Hz), 4,05 (2H, t, $J = 7,1$ Hz), 2,82 (1H, s), 2,50 (2H, t, $J = 7,1$ Hz), 2,15-2,06 (2H, m), 1,25 (3H, t, $J = 7,1$ Hz).

Bước 2

(9R)-4-clo-2-(4-hydroxy-4-metylpenlyoxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-9-ol

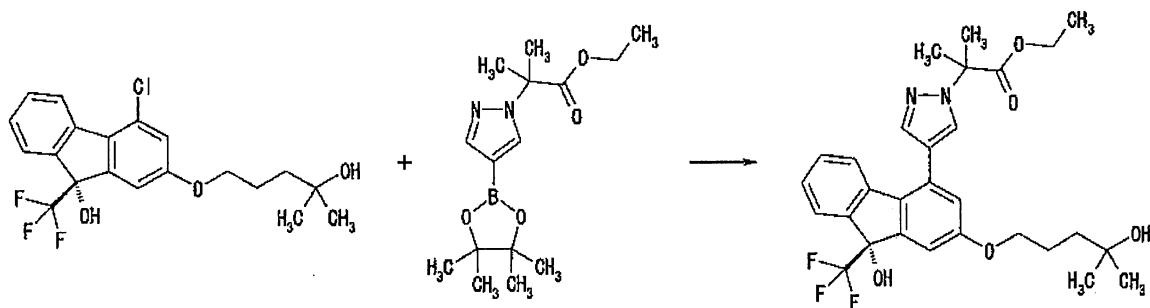


Trong môi trường nitơ, hòa tan etyl 4-[(9R)-4-clo-9-hydroxy-9-(triflometyl)-9H-floren-2-yloxy]butyrat (197mg) trong THF (2ml), và bổ sung nhỏ giọt dung dịch metyllithi/dietyl ete (1,07M, 2,2ml) ở 0°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở cùng nhiệt độ trong 2 giờ, bổ sung nước, và chiết hỗn hợp này bằng etyl axetat (hai lần). Rửa liên tục lớp hữu cơ thu được bằng nước (hai lần) và nước muối bão hòa. Làm khô lớp hữu cơ thu được qua magie sulfat khan, lọc bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc. Tinh chế phần cặn thu được bằng cách sắc ký cột silicagel (sử dụng hỗn hợp hexan và etyl axetat làm dung môi rửa giải, đầu tiên rửa giải với hỗn hợp ở tỷ lệ trộn 3:1 (hexan:etyl axetat), sau đó với hỗn hợp ở tỷ lệ trộn 2:1) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (169mg).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8,19 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,66 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,47 (1H, td, $J = 7,7, 1,0$ Hz), 7,32 (1H, td, $J = 7,7, 1,0$ Hz), 7,17 (1H, br s), 6,93 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), 4,02 (2H, t, $J = 6,4$ Hz), 2,82 (1H, s), 1,92-1,85 (2H, m), 1,65-1,62 (2H, m), 1,26 (3H, s), 1,25 (3H, s).

Bước 3

Etyl 2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(4-hydroxy-4-metylpenlyoxy)-9-(triflometyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metylpropionat

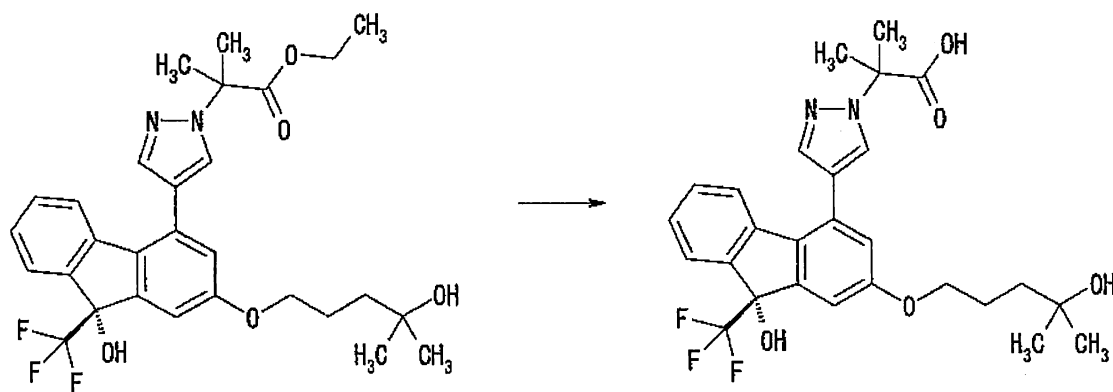


Trong môi trường agon, hòa tan (9R)-4-clo-2-(4-hydroxy-4-methylpentyl)-9-(trifluoromethyl)-9H-fluoren-9-ol (169mg) trong 1,4-dioxan (1,5ml), bổ sung ethyl 2-methyl-2-[4-(4,4,5,5-tetramethyl[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol-1-yl]propionat (194mg), nước (0,5ml), trikali phosphat (178mg), paladi axetat (9mg), và SPhos (33mg), và khuấy hỗn hợp này ở 100°C trong 4,5 giờ. Làm mát hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, bổ sung nước, và chiết hỗn hợp này bằng ethyl axetat (hai lần). Rửa liên tục lớp hữu cơ thu được bằng nước (hai lần) và nước muối bão hòa. Làm khô lớp hữu cơ thu được qua magie sulfat khan, lọc bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc. Tinh chế phần cặn thu được bằng cách sắc ký cột silicagel (sử dụng hỗn hợp hexan và ethyl axetat ở tỷ lệ trộn 1:1 (hexan:ethyl axetat) làm dung môi rửa giải) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (218mg).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 7,69 (1H, s), 7,63-7,62 (2H, m), 7,21-7,19 (4H, m), 6,81 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), 4,21 (2H, q, $J = 7,1$ Hz), 4,04 (2H, t, $J = 6,3$ Hz), 2,82 (1H, s), 1,92 (3H, s), 1,91 (3H, s), 1,89-1,88 (2H, m), 1,66-1,64 (2H, m), 1,26 (6H, s), 1,26-1,23 (3H, m).

Bước 4

Axit 2-{4-[(9R)-9-Hydroxy-2-(4-hydroxy-4-methylpentyl)-9-(trifluoromethyl)-9H-fluoren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-methylpropionic

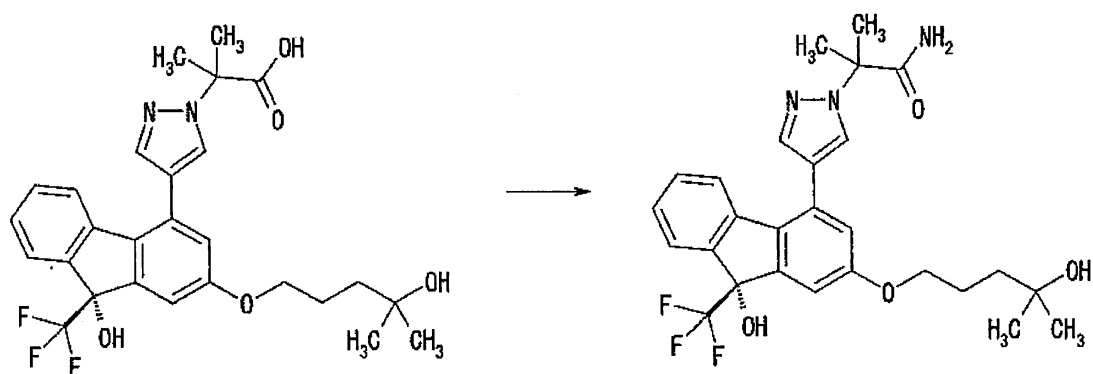


Hòa tan ethyl 2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(4-hydroxy-4-methylpentyl)oxy]-9-(trifluoromethyl)-9H-fluoren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-methylpropanoat (218mg) trong ethanol (2,2ml), bổ sung dung dịch natri hydroxit 4N (320 μ l), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Trung hòa hỗn hợp phản ứng này với axit clohydric 1N, và chiết với ethyl axetat (hai lần). Rửa lớp hữu cơ thu được liên tục bằng nước (hai lần) và nước muối bão hòa. Làm khô lớp hữu cơ thu được qua magie sulfate khan, lọc bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (179mg).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 7,73 (1H, s), 7,68 (1H, s), 7,63-7,62 (1H, m), 7,23-7,09 (4H, m), 6,78 (1H, d, $J = 2,6$ Hz), 4,02 (2H, t, $J = 6,3$ Hz), 1,93 (6H, s), 1,89-1,86 (2H, m), 1,65-1,61 (2H, m), 1,25 (6H, s).

Bước 5

2-{4-[(9R)-9-Hydroxy-2-(4-hydroxy-4-methylpentyl)oxy]-9-(trifluoromethyl)-9H-fluoren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-methylpropanamit (hợp chất (3))



Trong môi trường nito, hòa tan axit 2-{4-[(9R)-9-hydroxy-2-(4-hydroxy-4-methylpentyloxy)-9-(trifluoromethyl)-9H-fluoren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-methylpropionic (89mg) trong N,N-dimetylformamit (1ml), bổ sung amoni clorua (28mg), N,N-diisopropyletylamin (148 μ l) và 1-[bis(dimetylamino)metylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-i 3-oxit hexaflophosphat (HATU) (99mg), và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được bổ sung nước, và chiết hỗn hợp này bằng etyl axetat (hai lần). Rửa liên tục lớp hữu cơ thu được bằng nước muối pha loãng (hai lần) và nước muối bão hòa. Làm khô lớp hữu cơ thu được qua magie sulfat khan, lọc bỏ chất không tan, và làm bay hơi dung môi trong dịch lọc. Tinh chế phần cặn thu được bằng cách sắc ký lớp mỏng silicagel (sử dụng hỗn hợp của cloroform và metanol ở tỷ lệ trộn 9:1 (cloroform:metanol) làm dung môi rửa giải) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (48mg, độ tinh khiết quang học 96,9%e.e.). Xác định độ tinh khiết quang học dưới điều kiện phân tích HPLC 2. Thời gian duy trì của dạng (R) là 13,0 phút, thời gian duy trì của dạng (S) là 14,4 phút.

Mức quay quang đặc trưng $[\alpha]_D +37,5^\circ$ (c=1,04 MeOH 25°C).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8,07 (1H, s), 7,66 (1H, s), 7,57-7,55 (1H, m), 7,34-7,31 (1H, m), 7,24-7,23 (3H, m), 7,18 (1H, s), 7,11 (1H, br s), 6,94 (1H, br s), 6,86 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), 4,16 (1H, s), 4,03 (2H, t, $J = 6,5$ Hz), 1,80 (3H, s), 1,79

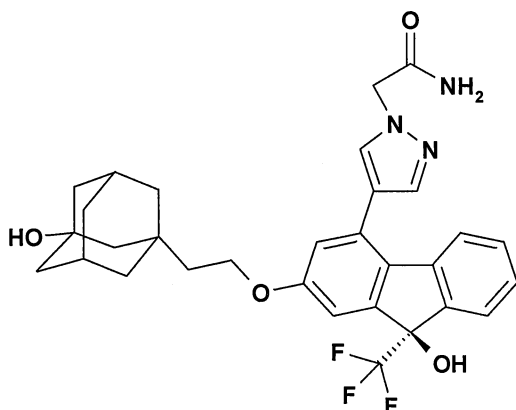
(3H, s), 1,80-1,75 (2H, m), 1,51-1,47 (2H, m), 1,11 (6H, s).

Ví dụ điều chế tinh thể của hợp chất (3)

Hợp chất (3) (40mg) được tổng hợp bằng các bước ví dụ nêu trên được bổ sung hỗn hợp của MeOH và nước (tỷ lệ thể tích 1:3 (0,5mL)). Sau đó, dung dịch này được bổ sung tinh thể (0,5mg) của hợp chất (2h) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Thu chất rắn kết tủa bằng cách lọc để tạo ra tinh thể (41mg) của hợp chất (3).

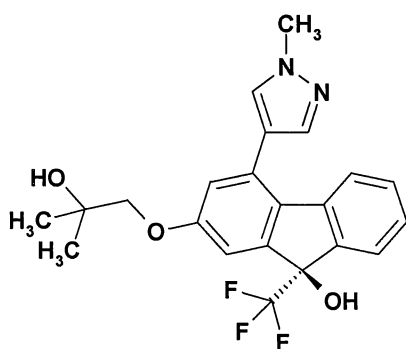
Điều chế các hợp chất (A), (B), (C) và (D)

Hợp chất (A), hợp chất (B), hợp chất (C) và hợp chất (D) mà có các công thức sau đây, mỗi hợp chất này thu được ở dạng hoạt quang theo phương pháp điều chế được mô tả trong WO 2010/041748.



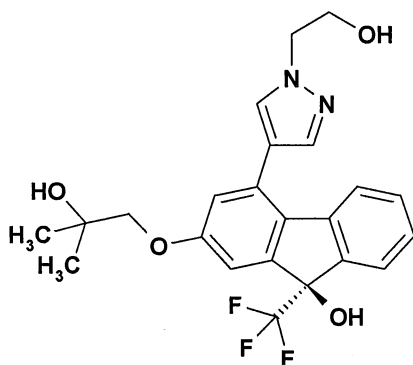
Hợp chất (A)

2-(4-((9R)-9-hydroxy-2-[2-(3-hydroxyadamantan-1-yl)ethoxy]-9-(trifluoromethyl)-9H-floren-4-yl}-1H-pyrazol-1-yl)acetamit



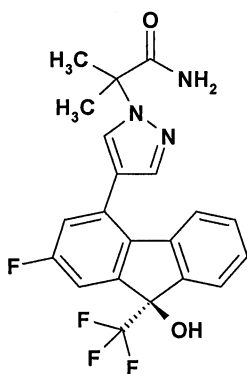
Hợp chất (B)

(9R)-2-(2-hydroxy-2-methylpropoxy)-4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-9-(triflormetyl)-9H-floren-9-ol



Hợp chất (C)

(9R)-4-[1-(2-hydroxyethyl)-1H-pyrazol-4-yl]-2-(2-hydroxy-2-methylpropoxy)-9-(triflormetyl)-9H-floren-9-ol



Hợp chất (D)

2-{4-[(9R)-2-flo-9-hydroxy-9-(triflormetyl)-9H-floren-4-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-methylpropanamit

Về ví dụ bào chế theo sáng chế, có thể đề cập đến chế phẩm sau đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ bào chế này.

Ví dụ bào chế 1 (sản xuất viên nang)

1) hợp chất của ví dụ 1 (hợp chất (2))	30 mg
2) xenluloza vi tinh thể	10 mg
3) lactoza	19 mg
4) magie stearat	1 mg

Các thành phần 1), 2), 3) và 4) được trộn và nạp vào trong viên nang gelatin.

Ví dụ bào chế 2 (sản xuất viên nén)

1) hợp chất của ví dụ 1 (hợp chất (2))	10 g
2) lactoza	50 g
3) tinh bột ngô	15 g
4) carmelloza canxi	44 g
5) magie stearat	1 g

Tổng lượng các thành phần 1), 2), 3) và 30g 4) được ngào trộn với nước, làm khô trong chân không và sàng. Bột đã sàng được trộn với 14g thành phần 4) và 1g thành phần 5), và hỗn hợp này được nén bằng máy đúc viên nén. Theo cách này, thu được 1000 viên nén, mỗi viên nén chứa 10mg hợp chất của ví dụ 1 (hợp chất (2)).

Ví dụ thử nghiệm 1: Tác dụng ức chế hoạt tính PDHK in vitro

Tác dụng ức chế hoạt tính PDHK được đánh giá gián tiếp bằng cách đo hoạt tính PDH còn lại sau phản ứng kinaza với sự có mặt của hợp chất thử nghiệm.

Tác dụng ức chế hoạt tính PDHK1

Trong trường hợp PDHK1 của người (hPDHK1, số đăng ký Genbank L42450.1), mảnh có kích cỡ 1,3kbp mã hóa protein này được phân lập từ ADN bộ

trợ của gan người bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR). hPDHK1 ADN bổ trợ được cải biến trong đó trình tự FLAG-Tag được bổ sung vào đầu N được tạo ra bằng PCR và được tách dòng vào vật truyền (pET17b-Novagen). Cấu trúc tái tổ hợp được biến nạp vào *Escherichia coli* (DH5 α -TOYOBO). Các dòng tái tổ hợp được xác định và ADN plasmid được phân lập và được đem đi phân tích trình tự ADN. Một dòng mà có trình tự axit nucleic mong muốn được chọn để biểu hiện.

Đối với sự biểu hiện hoạt tính hPDHK1, tế bào chủng *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen) được biến nạp với vectơ pET17b chứa hPDHK1 ADN bổ trợ đã được cải biến. *Escherichia coli* được cho tăng trưởng đến mật độ quang học 0,6 (600nmol/L) ở 30°C. Sự biểu hiện protein được gây ra bởi sự bổ sung 500 μ mol/L isopropyl- β -thiogalactopyranosid. *Escherichia coli* được nuôi cấy ở 30°C trong 5 giờ và được thu bằng cách ly tâm. Sự tạo huyền phù của *Escherichia coli* bị phá hủy bởi vi chất hóa lỏng. Protein được gắn FLAG được tinh chế bằng cách sử dụng gel ái lực FLAG (Sigma).

Gel này được rửa sạch bằng axit N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-2-etansulfonic 20mmol/L-natri hydroxit (HEPES-NaOH), natri clorua 500mmol/L, etylen glycol 1%, và copolyme khối của 0,1% polyoxyetylen-polyoxypropylen (Pluronic F-68, độ pH 8,0), và protein gắn kết được rửa giải bằng 20mmol/L HEPES-NaOH, FLAG peptit 100 μ g/mL, natri clorua 500mmol/L, etylen glycol 1%, và Pluronic F-68 0,1% (độ pH 8,0).

Các phân cắt phân đoạn được rửa giải chứa protein được gắn FLAG được thu gom, được thẩm tách dựa vào HEPES-NaOH 20mmol/L, natri clorua 150mmol/L, axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA) 0,5mmol/L, etylen glycol 1%,

và Pluronic F-68 0,1% (độ pH 8,0), và được bảo quản ở -80°C . Khi phân tích, nồng độ enzym hPDHK1 được thiết lập ở nồng độ nhỏ nhất để tạo ra mức ức chế hoạt tính PDH hơn 90%.

PDH 0,05U/mL (phức chất PDH tim lợn, Sigma P7032) và hPDHK1 1,0 $\mu\text{g/mL}$ được trộn trong chất đệm (axit 3-morpholinopropan sulfonic 50mmol/L (độ pH 7,0), dikali hydro phosphat 20mmol/L, kali clorua 60mmol/L, magie clorua 2mmol/L, EDTA 0,4mmol/L, Pluronic F-68 0,2%, dithiothreitol 2mmol/L), và hỗn hợp được ủ ở 4°C qua đêm để thu phức hợp PDH/hPDHK1.

Hợp chất thử nghiệm được pha loãng bằng dimethyl sulfoxit (DMSO). Phức hợp PDH/hPDHK1 (20 μL), hợp chất thử nghiệm (1,5 μL) và ATP 3,53 $\mu\text{mol/L}$ (được pha loãng bằng chất đệm, 8,5 μL) được bổ sung vào vi đĩa trong suốt tia UV có 96 lỗ ở một nửa diện tích (Corning 3679), và phản ứng PDHK được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng trong 45 phút. DMSO (1,5 μL) được bổ sung vào các lỗ đối chứng thay cho hợp chất thử nghiệm. Để xác định tốc độ tối đa của phản ứng PDH, DMSO (1,5 μL) được bổ sung vào lỗ trống thay cho hợp chất thử nghiệm, không có mặt hPDHK1.

Tiếp theo, 10 μL chất nền (5mmol/L natri pyruvat, 5mmol/L Coenzym A, 12mmol/L NAD, 5mmol/L thiamin pyrophosphat, được pha loãng bằng chất đệm) được bổ sung. Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 90 phút, và hoạt tính PDH dư được đo.

Mức hấp thụ ở 340nm trước và sau phản ứng PDH được đo bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa để phát hiện NADH được tạo ra bằng phản ứng PDH. Tỷ lệ ức chế hPDHK1 (%) của hợp chất thử nghiệm được tính theo công thức $\left[\frac{(\text{hoạt tính PDH của hợp chất thử nghiệm} - \text{hoạt tính PDH của mẫu đối chứng})}{\text{hoạt tính}}$

PDH mẫu trắng – hoạt tính PDH của mẫu đối chứng) $\} \times 100]$. Trị số IC_{50} được tính từ nồng độ của hợp chất thử nghiệm ở hai điểm gần mức ức chế 50% hoạt tính hPDHK1.

Kết quả thu được sử dụng hợp chất (2), hợp chất (2h) và hợp chất (3) làm hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Tác dụng ức chế hoạt tính PDHK2

Trong trường hợp PDHK2 của người (hPDHK2, số đăng ký Genbank BC040478.1), hPDHK2 cDNA được cải biến trong đó trình tự FLAG-Tag được bổ sung vào đầu N của chuỗi hPDHK2 ADN bổ trợ (pReceiver-M01/PDK2-GeneCopoeia) được điều chế bằng PCR và được tách dòng vào trong vector (pET17b-Novagen). Cấu trúc tái tổ hợp được biến nạp vào *Escherichia coli* (DH5 α -TOYOBO). Các dòng tái tổ hợp được xác định, và ADN plasmit được phân tách và được đem đi phân tích trình tự ADN. Một dòng mà có trình tự axit nucleic mong muốn được chọn để biểu hiện.

Đối với sự biểu hiện hoạt tính hPDHK2, tế bào chủng *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen) được biến nạp bằng vector pET17b chứa hPDHK2 ADN bổ trợ đã được cải biến. *Escherichia coli* được sinh trưởng đến mật độ quang học 0,6 (600nmol/L) ở 30°C. Sự biểu hiện protein được gây ra bằng cách bổ sung 500 μ mol/L isopropyl- β -thiogalactopyranosid. *Escherichia coli* được nuôi cấy ở 30°C trong 5 giờ và thu lấy bằng cách ly tâm. Dịch huyền phù của bột nhão *Escherichia coli* bị phá hủy bằng vi chất lỏng. Protein được gắn FLAG được tinh chế bằng gel có ái lực FLAG. Rửa gel này với HEPES-NaOH 20mmol/L, natri clorua 500mmol/L, etylen glycol 1%, và Pluronic F-68 0,1% (độ pH 8,0), và protein gắn kết được rửa giải bằng HEPES-NaOH 20mmol/L, FLAG peptit 100 μ g/mL, natri clorua 500mmol/L, etylen glycol 1%, và Pluronic F-68 0,1% (độ pH 8,0). Các phần cắt phân đoạn được rửa giải chứa

protein được gắn FLAG được gom lại, được thẩm tách dựa vào HEPES-NaOH 20mmol/L, natri clorua 150mmol/L, EDTA 0,5mmol/L, etylen glycol 1%, và Pluronic F-68 0,1% (độ pH 8,0), và bảo quản ở -80°C. Khi thử nghiệm, nồng độ enzym hPDHK2 được thiết lập đến nồng độ nhỏ nhất tạo ra mức ức chế hoạt tính PDH trên 90%.

Trộn PDH 0,05U/mL và hPDHK2 0,8µg/mL trong đệm (axit 3-morpholinopropansulfonic 50mmol/L (độ pH 7,0), dikali hydro phosphat 20mmol/L, kali clorua 60mmol/L, magie clorua 2mmol/L, EDTA 0,4mmol/L, và Pluronic F-68 0,2%, dithiothreitol 2mmol/L), và ủ hỗn hợp ở 4°C qua đêm để thu được phức PDH/hPDHK2. Hợp chất thử nghiệm được pha loãng bằng DMSO. Phức PDH/hPDHK2 (20µL), hợp chất thử nghiệm (1,5µL) và ATP 3,53µmol/L (pha loãng bằng dung dịch đệm, 8,5µL) được bổ sung vào vi đĩa trong suốt với tia UV 96 lỗ ở một nửa diện tích, và phản ứng PDHK được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng trong 45 phút. Bổ sung DMSO (1,5µL) vào lỗ đối chứng thay vì hợp chất thử nghiệm. Để xác định hiệu suất phản ứng PDH tối đa, DMSO (1,5µL) được bổ sung vào lỗ trống thay vì hợp chất khi không có mặt hPDHK2. Sau đó, 10µL chất nền (natri pyruvate 5mmol/L, Coenzyme A 5mmol/L, NAD 12mmol/L, và thiamin pyrophosphat 5mmol/L, pha loãng bằng chất đệm) được bổ sung. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 90 phút, và hoạt tính PDH còn lại được đo. Mức hấp thụ ở 340nm trước và sau phản ứng PDH được đo bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa để phát hiện NADH được tạo ra từ phản ứng PDH. Tỷ lệ ức chế hPDHK2 (%) của hợp chất thử nghiệm được tính từ công thức $[(\text{hoạt tính PDH của hợp chất thử nghiệm} - \text{hoạt tính PDH của đối chứng}) / (\text{hoạt tính PDH lỗ trống} - \text{hoạt tính PDH của đối chứng})] \times 100$. Trị số IC_{50} được tính từ các nồng độ của hợp chất thử nghiệm ở hai điểm quanh mức ức

chế 50% hoạt tính hPDHK2.

Kết quả thu được bằng cách sử dụng hợp chất (2), hợp chất (2h), hợp chất (3), hợp chất (A), hợp chất (B), hợp chất (C) và hợp chất (D) làm các hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong bảng 1 sau đây.

Bảng 1

Hợp chất	hPDHK1 IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	hPDHK2 IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
Hợp chất (2)	0,0047	0,0046
Hợp chất (2h)	0,0066	0,0049
Hợp chất (3)	0,0035	0,0042
Hợp chất (A)	- (không được thử nghiệm)	0,0051
Hợp chất (B)	- (không được thử nghiệm)	0,0074
Hợp chất (C)	- (không được thử nghiệm)	0,0067
Hợp chất (D)	- (không được thử nghiệm)	0,0051

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm hoạt tính PDH Ex vivo

Phương pháp thí nghiệm

Hoạt động của hợp chất thử nghiệm đối với hoạt tính PDH ở mô được đánh giá. Sự sản sinh NADH được phát hiện nhờ hệ thống ghép p-iodonitrotetrazolon tím (INT) để đo hoạt tính PDH.

Chuột đực Sprague-Dawley được phân ngẫu nhiên vào nhóm dùng tá dược và nhóm dùng hợp chất thử nghiệm. Tá dược (dung dịch metylxenluloza 0,5%, 5mL/kg) hoặc hợp chất thử nghiệm được cho chuột dùng qua đường miệng. Ở thời điểm 5 hoặc 20 giờ sau khi dùng, chuột được gây mê bằng cách tiêm natri

pentobarbital (60mg/kg) vào trong màng bụng , và các lát cắt của gan và mô mỡ mào tinh hoàn được thu lại.

Bổ sung nhanh 9 lần thể tích chất đệm đồng nhất trong nước đá (sucroza 0,25mol/L, tris(hydroxymetyl)aminometan hydroclorua 5mmol/L (độ pH 7,5), 2mmol/L EDTA) vào các lát gan, và hỗn hợp được đồng nhất hóa bằng cách sử dụng máy đồng nhất hóa Polytron. Chất đồng nhất được ly tâm ở 600×g, 4°C trong 10 phút để thu phần nổi lên trên bề mặt. Phần nổi lên trên bề mặt này (1mL) được ly tâm ở 16.000×g, 4°C trong 10 phút để thu kết tủa. Kết tủa được rửa bằng cách tạo huyền phù trong chất đệm đồng nhất (1mL) và ly tâm theo cách như ở trên. Kết tủa được làm đông lạnh bằng nitơ lỏng và bảo quản ở -80°C dưới dạng các mảnh ty thể gan.

Bổ sung nhanh vào mô mỡ ba lần thể tích chất đệm đồng nhất trong nước đá lạnh, và hỗn hợp được đồng nhất hóa sử dụng máy đồng nhất Polytron. Chất đồng nhất được ly tâm ở 600×g, 4°C trong 10 phút để thu được chất nổi lên trên bề mặt. Chất nổi lên trên bề mặt này được ly tâm ở 16.000×g, 4°C trong 10 phút để thu được kết tủa. Kết tủa được rửa bằng cách tạo huyền phù trong đệm đồng nhất (1mL) và ly tâm theo cách giống như trên. Kết tủa được làm đông lạnh bằng nitơ lỏng và bảo quản ở -80°C dưới dạng các mảnh ty thể mô mỡ.

Rã đông các mảnh ty thể và tạo huyền phù bằng đệm mẫu (sucroza 0,25mol/L, tris(hydroxymetyl)aminometan hydroclorua 20mmol/L (độ pH 7,5), kali clorua 50mmol/L, và 4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)phenyl-polyetylen glycol 1mL/L (Triton X-100)). Hoạt tính PDH hoạt hóa (hoạt tính PDHa) và hoạt tính PDH tổng (hoạt tính PDHt) được xác định để đánh giá hoạt tính của PDH. Để xác định hoạt tính PDHt, các lượng tương đương của dịch huyền phù ty thể và chất

đệm hoạt hóa (sucroza 0,25mol/L, tris(hydroxymetyl)aminometan hydroclorua 20mmol/L (độ pH 7,5), kali clorua 50mmol/L, Triton X-100 1mL/L, canxi clorua 4mmol/L, magie clorua 40mmol/L, natri dicloaxetat 10mmol/L) được trộn, và ủ hỗn hợp ở 37°C trong 10 phút. Bốn mươi microlit huyền phù ty thể được pha loãng với dung dịch đệm mẫu được bổ sung vào vi đĩa có 96 lỗ để xác định hoạt tính và đo mẫu trắng. Sau đó, 180 μ L hỗn hợp phản ứng (chất đệm kali phosphat 0,056mmol/L (độ pH 7,5), DL-carnitin 5,6mmol/L, NAD 2,8mmol/L, thiamin pyrophosphat 0,22mmol/L, Coenzym A 0,11mmol/L, 1,1mL/L Triton X-100, 1,1mmol/L magie clorua, 1,1g/L albumin huyết thanh bò, 0,67mmol/L INT, 7,2 μ mol/L phenazin metosulfat, 28mmol/L natri oxamat) được bổ sung vào mỗi lỗ, và sau đó là 20 μ L natri pyruvat 50mmol/L để đo hoạt tính hoặc nước để đo mẫu trắng được bổ sung. Ủ hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Mức hấp thụ ở 500-750nm, mà có thể góp phần làm giảm INT, chất nhận electron sau cùng, được đo bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa theo thời gian và các sự thay đổi về mức hấp thụ được tính toán. Hoạt tính PDH được tính bằng cách lấy mức thay đổi về sự hấp thụ của lỗ đo hoạt tính trừ đi mức thay đổi về sự hấp thụ ở lỗ trống. Tỷ lệ phần trăm của hoạt tính PDHa so với hoạt tính PDHt được tính và được lấy làm chỉ số hoạt hóa PDH.

Các kết quả thu được bằng cách sử dụng hợp chất (2h), hợp chất (3), hợp chất (A), hợp chất (B), hợp chất (C) và hợp chất (D) làm hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong bảng 2 sau đây, Fig. 1 (gan) và Fig. 2 (mô mỡ). Ngoài ra, các kết quả thu được bằng cách sử dụng hợp chất (2) được thể hiện trong bảng 3 sau đây.

Bảng 2

Hợp chất	Hoạt tính PDHa (% hoạt tính PDHt)							
	Gan				Mô mỡ			
	5 giờ		20 giờ		5 giờ		20 giờ	
	Tá được	3 mg/kg	Tá được	3 mg/kg	Tá được	3 mg/kg	Tá được	3 mg/kg
Hợp chất (2h)	13±3	59±6	13±3	31±5	31±10	59±2	31±10	44±12
Hợp chất (3)	13±3	56±8	13±3	32±9	31±10	70±9	31±10	42±3
Hợp chất (A)	13±3	35±6	13±3	16±10	31±10	32±14	31±10	24±7
Hợp chất (B)	13±3	43±7	13±3	10±3	31±10	59±5	31±10	30±4
Hợp chất (C)	13±3	44±5	13±3	13±3	31±10	53±4	31±10	28±7
Hợp chất (D)	13±3	41±15	13±3	20±1	31±10	43±7	31±10	24±3

Giá trị trung bình ± S.D. (n=3)

Bảng 3

Hợp chất	Hoạt tính PDHa (% hoạt tính PDHt)							
	Gan				Mô mỡ			
	5 giờ		20 giờ		5 giờ		20 giờ	
	Tá được	3 mg/kg	Tá được	3 mg/kg	Tá được	3 mg/kg	Tá được	3 mg/kg
Hợp chất (2)	28±6	74±12	28±6	50±16	42±4	88±11	42±4	61±15

Giá trị trung bình ± S.D. (n=3)

Ví dụ thử nghiệm 3: Hiệu quả của sự sử dụng lặp lại hợp chất thử nghiệm đối với HbA1c ở chuột ZDF

Phương pháp thí nghiệm

Chuột béo Zucker bị mắc bệnh đái tháo đường (giống đực, 7 tuần tuổi,

CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN INC.), mẫu động vật mắc bệnh bệnh đái tháo đường typ 2, được quy định khẩu phần ăn tinh khiết (khẩu phần ăn có 5,9% chất béo, Oriental Yeast Co., Ltd.) được phân vào nhóm dùng tá dược và nhóm dùng hợp chất thử nghiệm sao cho không có sự chênh lệch về các mức insulin và glucoza trong huyết tương, các mức HbA1c và thể trọng. Cho chuột sử dụng được lặp lại theo đường miệng liều dùng hợp chất thử nghiệm dùng (1mg/kg/5mL) một lần mỗi ngày ở khoảng 3 giờ trước khi trời tối. Dung dịch methylxenuloza 0,5% được cho dùng theo đường miệng theo cách giống với chuột trong nhóm tá dược. Ở ngày sử dụng thứ 14, các mẫu máu được thu gom từ tĩnh mạch đuôi và mức HbA1c (%) được đo. Quá trình phân tích thống kê được tiến hành bằng thử nghiệm Dunnett. Giá trị $p < 0,05$ được cho là đáp ứng về mặt thống kê.

Các kết quả thu được bằng cách sử dụng hợp chất (2) và hợp chất (3) làm các hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Hợp chất	HbA1c (%)	
	Tá dược	1mg/kg
Hợp chất (2)	3,6±0,3	3,2±0,1*
Hợp chất (3)	3,7±0,2	3,4±0,1*

ngày sử dụng thứ 14

Giá trị trung bình ± S.D. (n = 10)

* $p < 0,05$ so với nhóm dùng tá dược (thử nghiệm Dunnett)

Ví dụ thử nghiệm 4: Thử nghiệm kẹp giữ toàn bộ tế bào hERG (gen liên quan Ether-a-go-go ở người)

Phương pháp thử nghiệm

Sử dụng các tế bào HEK293 (Cytomyx Limited) được biến nạp gen liên quan ether-a-go-go ở người (hERG), mức độ ảnh hưởng lên dòng hERG được đánh giá theo kỹ thuật kẹp giữ toàn bộ tế bào. Tế bào HEK293 được biến nạp hERG được cho đi qua bằng cách sử dụng máy ủ CO₂ (BNA-111, TABAI ESPEC CORP.) trong điều kiện 37°C, CO₂ 5%, độ ẩm bão hòa. Vật chứa môi trường nuôi cấy được sử dụng là bình thót cổ 75 cm² được phủ collagen loại I (4123-010, AGC TECHNO GLASS CO., Ltd.) và đĩa nuôi cấy 35mm được phủ collagen loại I (4000-010, AGC TECHNO GLASS CO., Ltd.). Môi trường nuôi cấy được sử dụng là E-MEM (Môi trường thiết yếu tối thiểu - Eagle Minimum Essential Medium (Earle's Salts, Nikken biomedical laboratory) được bổ sung FCS 10% (huyết thanh thai bê - Fetal calf serum, BioWest, L.L.C.) và dung dịch axit amin không thiết yếu MEM 1% (NEAA, Invitrogen Corporation). Genetixin để chọn lọc các tế bào biểu hiện gen hERG được bổ sung đến nồng độ 400µg/mL. Khi tế bào được đo, 3×10^4 tế bào HEK293 được biến nạp hERG được cho vào đĩa nuôi cấy 35mm từ 4 đến 7 ngày trước khi đo dòng hERG. Đĩa nuôi cấy được tạo ra cho quá trình đo chứa môi trường nuôi cấy nêu trên mà không có genetixin (Invitrogen Corporation).

Nồng độ đánh giá cao nhất của mỗi hợp chất được xác định từ nồng độ cao nhất ở đó không thấy có sự kết tủa trong dịch lỏng ngoại bào chuẩn (NaCl: 140mmol/L, KCl: 2,5mmol/L, MgCl₂: 2mmol/L, CaCl₂: 2mmol/L, HEPES: 10mmol/L, glucoza: 10mmol/L (được điều chỉnh đến độ pH 7,4 bằng Tris-bazơ)). Về phương pháp phủ, mỗi dung dịch được phủ được phun từ ống chữ Y có đường kính đầu vòi khoảng 0,25mm, gần kề (khoảng 2mm) các tế bào, và được phủ vào các tế bào. Tốc độ phun là khoảng 0,4mL/phút.

Thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng dưới kính hiển vi đảo

pha. Đĩa nuôi cấy 35mm chứa các tế bào được đặt trên thiết bị đo, và dịch ngoại bào chuẩn được phủ liên tục lên các tế bào từ ống chữ Y. Điện cực thủy tinh để đo được nạp đầy dịch nội bào (Kali Gluconat: 130mmol/L, KCl: 20mmol/L, $MgCl_2$: 1mmol/L, ATP-Mg: 5mmol/L, EGTA: 3,5mmol/L, HEPES: 10mmol/L (được điều chỉnh đến độ pH 7,2 bằng Tris-bazo)). Phương pháp kẹp giữ tế bào toàn phần thông thường được sử dụng cho các tế bào, và điện thế duy trì được thiết lập đến -80mV. Dưới điện thế duy trì cố định, dòng tế bào toàn phần được khuếch đại bằng bộ khuếch đại kẹp giữ (AXOPATCH-200B, Axon Instruments, Inc.), và dữ liệu được nạp vào máy tính (IMC-P642400, Intermedical Co., Ltd.) bằng cách sử dụng phần mềm phân tích thu được dữ liệu (pCLAMP 9.2, Axon Instruments, Inc.).

Việc đo dòng hERG được tiến hành theo hai bước. Trong cả hai trường hợp, dòng hERG được khởi động bằng cách tạo ra điện thế lệnh (điện thế duy trì -80mV, tiền xung +20mV, 1,5 giây, xung thử nghiệm -50mV, 1,5 giây).

Bước (1): điện thế lệnh nêu trên được tạo ra ở 0,1 Hz trong 2 phút.

Bước (2): điện thế lệnh nêu trên được đưa đến phép trừ P/3 của pCLAMP 9.2 để loại bỏ dòng điện rò rỉ. Quá trình này được lặp lại ba lần và giá trị trung bình của chúng được lấy làm dòng hERG.

Sau bước (1), bước (2) được tiến hành (khoảng 3 phút), và dòng cực đại ở đuôi thu được bằng cách sử dụng xung thử nghiệm cho dòng hERG thu được bằng phương pháp của bước (2) được lấy làm giá trị dòng hERG. Sau đó, các quá trình của các bước (1) và (2) được lặp lại luân phiên cho đến khi hoàn thành thử nghiệm và giá trị dòng hERG được xác định.

Giá trị dòng hERG ổn định được ghi ba lần (khoảng 10 phút), và dịch ngoại bào chuẩn được trao đổi ngay với từng chất lỏng sử dụng. Giá trị dòng hERG được

đo ba lần (khoảng 10 phút) theo cách giống như vậy trong suốt quá trình tưới chất lỏng sử dụng, và giá trị dòng thu được ở lần đo thứ ba được lấy làm giá trị dòng hERG sau khi tưới chất lỏng sử dụng.

Dữ liệu của mỗi tế bào được chuyển thành giá trị tương đối với giá trị trung bình của ba giá trị dòng hERG ghi được trong khoảng 10 phút trước khi tưới chất lỏng sử dụng (trước giá trị) là 100%. Dữ liệu này được đo đối với hai tế bào, và giá trị trung bình của nó được lấy làm dòng tương đối (%).

$$\text{Dòng tương đối (\%)} = 100 \times A \div B$$

A: giá trị dòng hERG sau khi tưới chất lỏng sử dụng

B: giá trị trung bình của ba giá trị dòng hERG ghi được trong khoảng 10 phút trước khi tưới chất lỏng sử dụng (trước giá trị)

Ngoài ra, tỷ lệ ức chế nhóm DMSO được tính toán theo công thức sau.

$$\text{Tỷ lệ ức chế (\%)} = 100 - (C \div D) \times 100$$

C: giá trị trung bình của dòng tương đối (%) của các nhóm hợp chất thử nghiệm tương ứng

D: giá trị trung bình của dòng tương đối (%) của nhóm DMSO

Các kết quả thu được sử dụng hợp chất (2), hợp chất (3), hợp chất (A), hợp chất (B), hợp chất (C) và hợp chất (D) làm các hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong bảng 5 sau đây.

Bảng 5

Hợp chất thử nghiệm	Nồng độ ^{a)} ($\mu\text{mol/L}$)	Tỷ lệ ức chế (%)	Trị số IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
Hợp chất (2)	30	24,4	>30
Hợp chất (3)	30	27,3	>30
Hợp chất (A)	10	11,8	>10
Hợp chất (B)	1	17,4	3,6
	10	72,9	
Hợp chất (C)	3	11,5	13,2
	30	69,0	
Hợp chất (D)	3	9,4	14,2
	30	67,5	

a): Nồng độ đánh giá cao nhất của từng hợp chất được đặt từ nồng độ cao nhất ở đó không phát hiện thấy sự kết tủa trong dịch ngoại bào chuẩn.

Ví dụ thử nghiệm 5: Thử nghiệm tính ổn định chuyển hóa ở vi thể gan

Phương pháp thử nghiệm

Vi thể gan người (do Xenotech sản xuất, H0620, nồng độ sau cùng (sau khi pha loãng), 0,2mg protein/mL) được tạo huyền phù trong đệm kali phosphat 100mM (độ pH 7,4, chứa β -nicotinamid adenin dinucleotit phosphat: 1,3mM, D-glucoza-6-phosphat: 3,3mM, magie clorua: 3,3mM, glucoza-6-phosphat dehydroaza: 0,45U/mL), và sau đó được trộn với hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong MeCN/DMSO (95/5) (nồng độ cuối cùng 5 μ M). Hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 10 phút và 60 phút, axetonitril chứa axit formic (nồng độ cuối cùng 0,1%) được bổ sung, và hỗn hợp này được ly tâm. Hợp chất thử nghiệm (không được biến đổi) trong phần nổi lên trên bề mặt được đo bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao/khối phổ (LC/MS) (do Waters sản xuất, LC: Acquity UPLC, MS:SQ Detector hoặc TQ Detector). Tỷ lệ dư (%) được tính toán từ các trị số đo thu được.

Các kết quả thu được khi sử dụng hợp chất (2), hợp chất (3), hợp chất (A), hợp chất (B), hợp chất (C) và hợp chất (D) làm các hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong bảng 6 sau đây.

Bảng 6

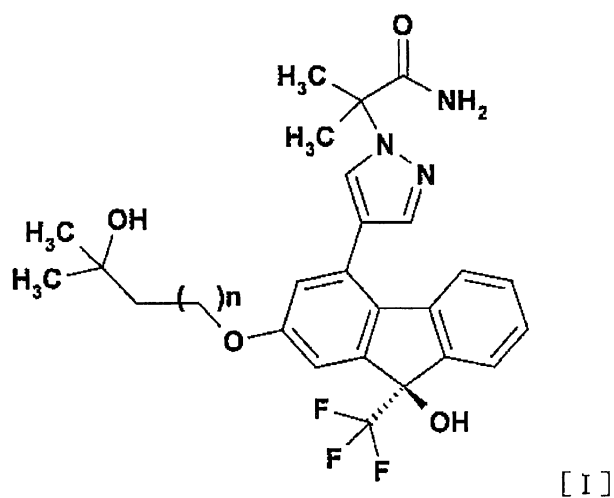
Hợp chất thử nghiệm	Tính ổn định trong vi thể gan (tỷ lệ dư %)			
	Người		Chuột	
	10 phút	60 phút	10 phút	60 phút
Hợp chất (2)	98,8	96,5	98,8	100,0
Hợp chất (3)	98,4	85,9	102,7	95,8
Hợp chất (A)	34,8	0,0	24,8	0,0
Hợp chất (B)	98,0	88,2	101,1	92,1
Hợp chất (C)	94,0	75,1	94,2	85,3
Hợp chất (D)	105,4	101,5	105,2	105,1

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Vì hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó có hoạt tính ức chế PDHK γ , nên hữu ích làm hoạt chất của dược phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường (bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh đái tháo đường typ 2 v.v.), hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường (bệnh thần kinh do đái tháo đường, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh đục thủy tinh thể v.v.), bệnh suy tim (bệnh suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính), bệnh cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh thiếu máu não, bệnh ngạt máu não, bệnh về ty thể, bệnh cơ não ty thể, bệnh ung thư, bệnh tăng áp phổi hoặc bệnh Alzheimer.

YÊU CẦU BẢO HỘ

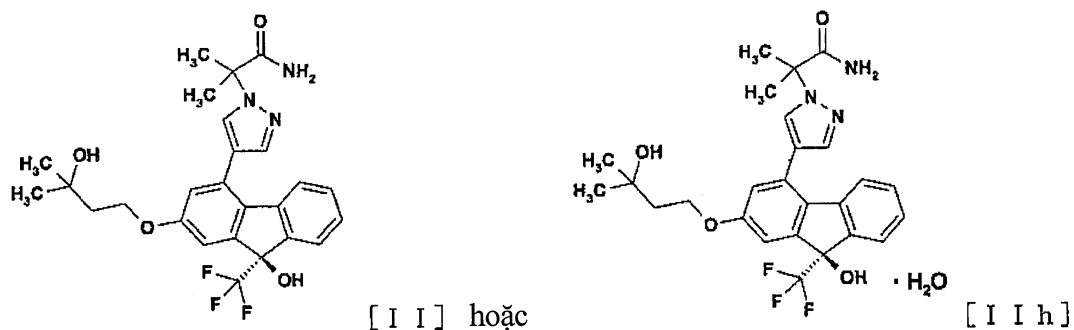
1. Hợp chất có công thức [I]:



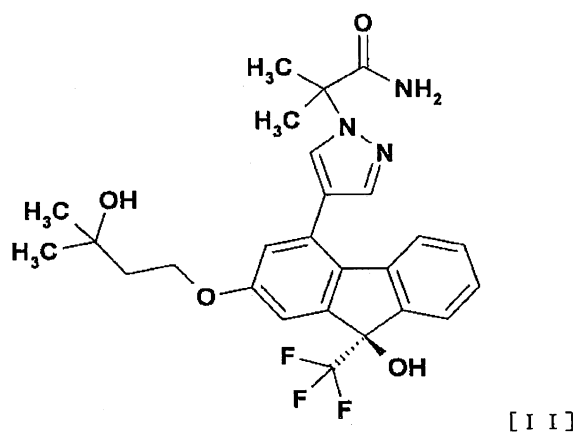
trong đó n là 1 hoặc 2,

hoặc muối được dụng của nó, hoặc solvat của nó.

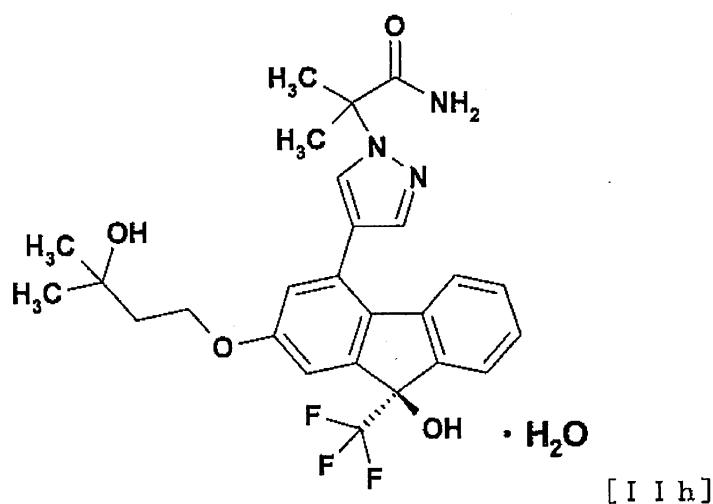
2. Hợp chất theo điểm 1, hợp chất này có công thức:



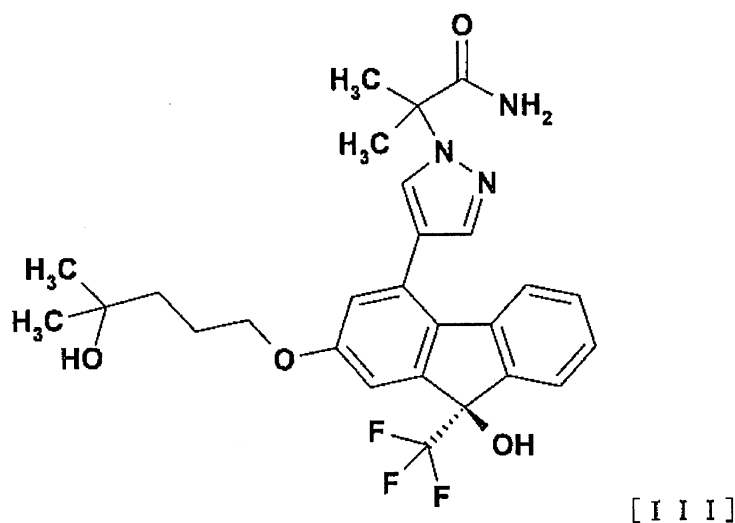
3. Hợp chất theo điểm 2, hợp chất này có công thức [II]:



4. Hợp chất theo điểm 2, hợp chất này có công thức [IIh]:



5. Hợp chất có công thức [III]:



6. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, hoặc muối dược dụng của nó, hoặc solvat của nó và chất mang dược dụng.

7. Thuốc ức chế PDHK chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 hoặc muối dược dụng của nó, hoặc solvat của nó.

8. Thuốc ức chế PDHK1 chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, hoặc muối dược dụng của nó, hoặc solvat của nó.

9. Thuốc ức chế PDHK2 chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1

đến 5, hoặc muối được dụng của nó, hoặc solvat của nó.

10. Dược phẩm hạ đường huyết chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, hoặc muối được dụng của nó, hoặc solvat của nó.

11. Dược phẩm làm giảm axit lactic chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, hoặc muối được dụng của nó, hoặc solvat của nó.

12. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, hoặc muối được dụng của nó, hoặc solvat của nó để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường, hội chứng kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh đường huyết cao, bệnh nhiễm toan huyết do tăng lactat, các biến chứng của bệnh đái tháo đường, bệnh suy tim, bệnh về cơ tim, chứng thiếu máu cục bộ cơ tim, chứng nhồi máu cơ tim, chứng đau thắt ngực, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, chứng đau cách hồi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, chứng thiếu máu não, chứng ngập máu não, bệnh về ty thể, bệnh não ty thể, bệnh ung thư hoặc bệnh tăng huyết áp động mạch phổi.

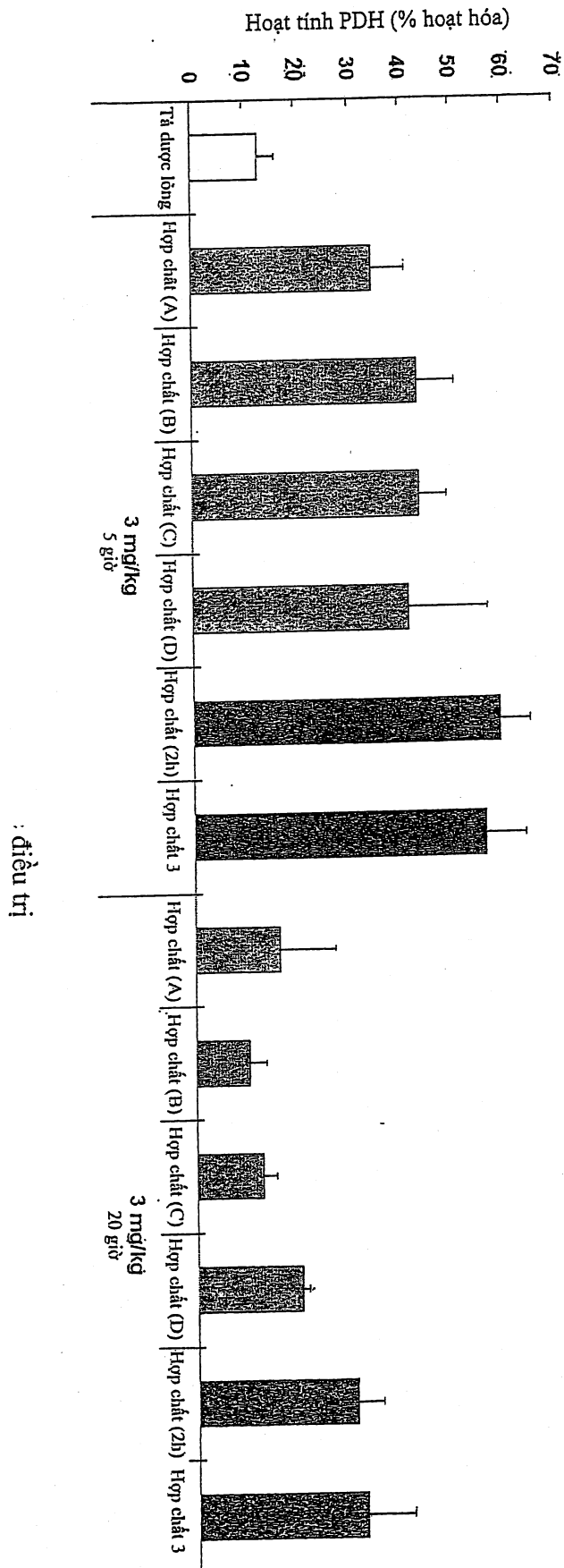


FIG. 1

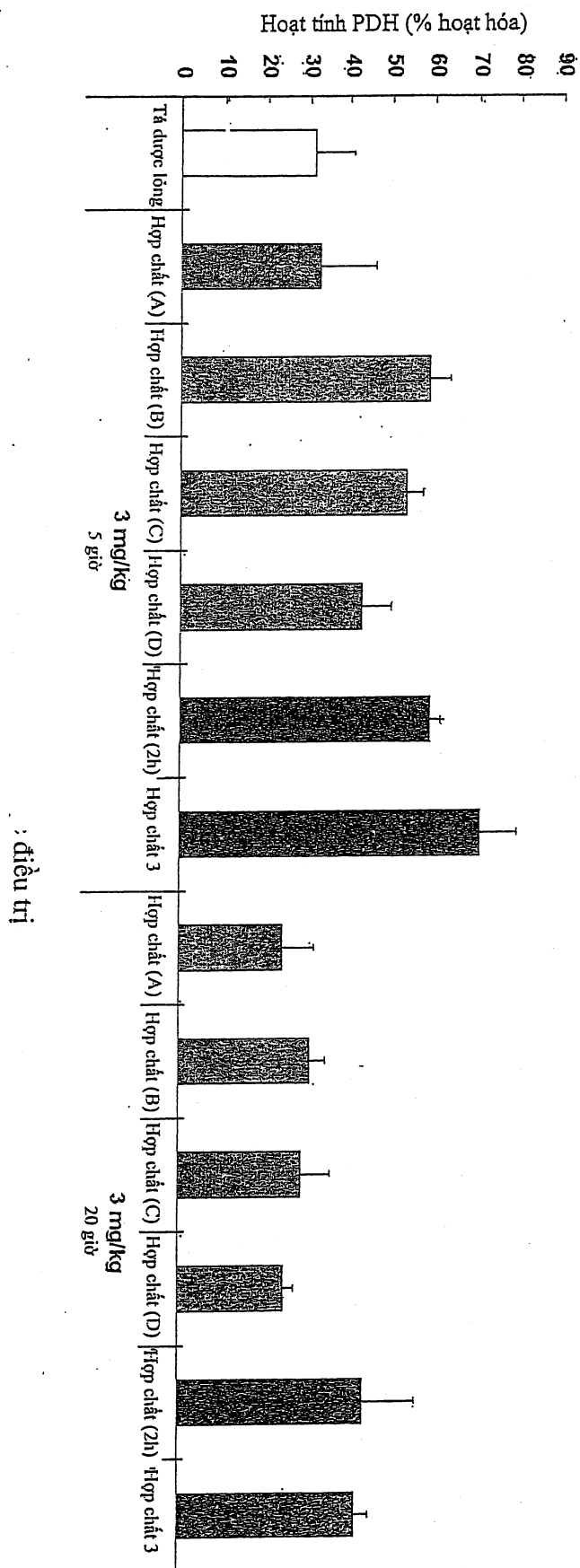


FIG. 2