



(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)



1-0028830

(51)⁷ C07H 19/04; A61K 31/7042

(13) B

(21) 1-2016-01115

(22) 28/10/2014

(86) PCT/US2014/062548 28/10/2014

(87) WO2015/065956 07/05/2015

(30) 61/898,494 01/11/2013 US

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/08/2016 341A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

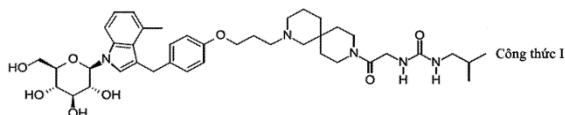
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) FIELDS, Todd (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT URE VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

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



hoặc muối dược dụng của hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất ure, được phẩm chứa hợp chất này, các hợp chất trung gian và quy trình hữu dụng trong tổng hợp các hợp chất đã nêu. Các hợp chất đã nêu là hữu dụng để điều trị các rối loạn sinh lý.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

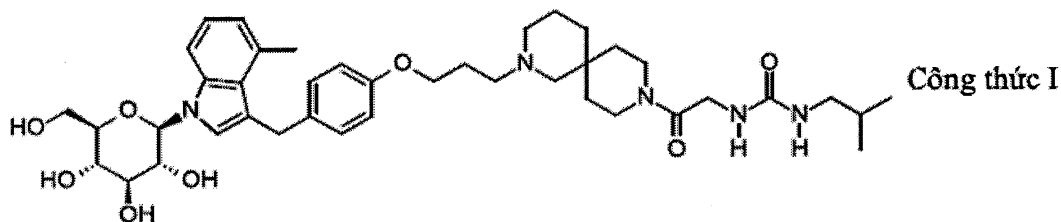
Sáng chế thuộc về lĩnh vực điều trị bệnh tiểu đường và các bệnh và rối loạn khác kết hợp với chứng tăng glucoza huyết. Tiểu đường là một nhóm bệnh đặc trưng bởi các mức đường glucoza trong máu tăng cao. Bệnh này ảnh hưởng đến gần 25 triệu người tại Mỹ và cũng là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 7 ở Mỹ căn cứ theo dữ liệu của National Diabetes Fact Sheet năm 2011 (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention). Chất đồng vận chuyển glucoza - natri (Natri-coupled glucose cotransporters - SGLT's) là một trong số các chất vận chuyển đã biết chịu trách nhiệm về hấp thu hydrat cacbon, như glucoza. Cụ thể hơn nữa, SGLT1 chịu trách nhiệm về vận chuyển glucoza qua màng bờ bàn chải của ruột non. Sự ức chế SGLT1 có thể dẫn đến giảm hấp thu glucoza ở ruột non, do đó tạo ra phương pháp hữu dụng để điều trị bệnh tiểu đường.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2008/0139484 A1 bộc lộ về các hợp chất dị vòng chứa nitơ được thế tại 1-(β -D-glycopyranosyl)-3 có hoạt tính ức chế SGLT1 và/hoặc SGLT2, các hợp chất này được bộc lộ thêm là hữu dụng trong phòng ngừa hoặc điều trị bệnh kết hợp với chứng tăng glucoza huyết, như bệnh tiểu đường. Ngoài ra, patent Mỹ số 7,851,617 bộc lộ về các dẫn xuất indol, các dẫn xuất này là chất ức chế SGLT và được bộc lộ thêm là hữu dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tiểu đường và các tình trạng bệnh liên quan.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nhu cầu cần phải tìm ra các thuốc thay thế và phương pháp điều trị bệnh tiểu đường. Sáng chế đề cập đến một số hợp chất ức chế SGLT1 mới có thể thích hợp trong điều trị bệnh tiểu đường.

Do đó, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I:



hoặc muối dược dụng của hợp chất này.

Bản mô tả cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh tiểu đường ở đối tượng bị bệnh bao gồm bước sử dụng cho đối tượng bị bệnh cần được điều trị một lượng hiệu quả của hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của hợp chất này. Bản mô tả mô tả thêm về phương pháp điều trị bệnh tiểu đường typ 1 ở đối tượng bị bệnh bao gồm bước sử dụng cho đối tượng bị bệnh cần được điều trị một lượng hiệu quả của hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của hợp chất này. Ngoài ra, bản mô tả mô tả phương pháp điều trị bệnh tiểu đường typ 2 ở đối tượng bị bệnh bao gồm bước sử dụng cho đối tượng bị bệnh cần được điều trị một lượng hiệu quả của hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của hợp chất này. Bản mô tả cũng mô tả phương pháp điều trị rối loạn dung nạp glucoza (IGT), rối loạn dung nạp glucoza lúc đói (IFG), hoặc hội chứng chuyển hóa ở đối tượng bị bệnh bao gồm bước sử dụng cho đối tượng bị bệnh cần được điều trị một lượng hiệu quả của hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của hợp chất này.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc muối dược dụng của hợp chất này để sử dụng trong điều trị, đặc biệt là trong điều trị bệnh tiểu đường. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc muối dược dụng của hợp chất này để sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường typ 1. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc muối dược dụng của hợp chất này để sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường typ 2. Sáng chế còn đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc muối dược dụng của hợp chất này để sử dụng trong điều trị rối loạn dung nạp glucoza (IGT), rối loạn dung nạp glucoza lúc đói (IFG), hoặc hội chứng chuyển hóa. Bản mô tả này cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của hợp chất này, trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh tiểu đường. Ngoài ra, bản mô tả này mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của hợp chất này, trong sản xuất

thuốc để điều trị bệnh tiểu đường typ 1. Bản mô tả này cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của hợp chất này, trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh tiểu đường typ 2. Bản mô tả cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của hợp chất này, trong sản xuất thuốc để điều trị IGT, IFG, hoặc hội chứng chuyển hóa.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của hợp chất này, cùng với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng. Sáng chế này cũng đề cập đến các hợp chất trung gian mới và quy trình tổng hợp hợp chất có công thức I.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều trị” hoặc “để điều trị” bao gồm việc kìm chế, làm chậm, làm dừng hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ trầm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn hiện hữu.

Theo sử dụng ở đây, thuật ngữ “đối tượng bị bệnh” dùng để chỉ động vật có vú, như chuột nhỏ, chuột lang, chuột cống, chó hoặc người. Có thể hiểu rằng, đối tượng bị bệnh tốt hơn là người.

Theo sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hiệu quả” dùng để chỉ lượng hoặc liều lượng của hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của hợp chất này mà, khi sử dụng ở dạng đơn liều hoặc đa liều cho đối tượng bị bệnh, tạo ra tác dụng mong muốn ở đối tượng bị bệnh đang được chẩn đoán hoặc điều trị.

Lượng hiệu quả có thể được xác định một cách dễ dàng bởi thầy thuốc chẩn đoán với tư cách là một người có kỹ năng trong lĩnh vực, nhờ sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được trong các tình huống tương tự. Để xác định lượng hiệu quả cho đối tượng bị bệnh, bác sỹ chẩn đoán sẽ xem xét nhiều yếu tố, bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi: loài động vật có vú; kích thước, tuổi và sức khỏe toàn thân; bệnh hoặc rối loạn cụ thể liên quan; mức độ hoặc mức độ liên quan hoặc mức độ trầm trọng của bệnh hoặc rối loạn; đáp ứng của từng đối tượng bị bệnh riêng biệt; hợp chất cụ thể được sử dụng; phương thức sử dụng; các đặc tính sinh khả dụng của chế phẩm sử dụng; phác đồ liều lượng lựa chọn; việc sử dụng thuốc đồng thời; và các tình huống liên quan khác.

Hợp chất có công thức I thường có hiệu quả trong một phạm vi liều lượng rộng. Ví dụ, liều lượng mỗi ngày thông thường nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30mg/kg thể trọng. Trong một số tình huống, mức liều lượng thấp hơn giới hạn dưới của phạm vi nêu trên có thể thích hợp hơn, trong khi ở những tình huống khác, liều lượng cao hơn có thể được sử dụng mà không gây ra bất kỳ tác dụng phụ có hại nào và do đó, phạm vi liều lượng ở trên không nhằm mục đích giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Hợp chất theo sáng chế tốt hơn được bào chế thành dược phẩm để dùng theo đường bất kỳ mà đường dùng này tạo cho hợp chất có khả dụng sinh học. Tốt nhất, dược phẩm như vậy là để dùng theo đường uống. Dược phẩm nêu trên và quy trình điều chế chúng đã biết trong lĩnh vực. (Ví dụ, xem trong tài liệu của tác giả Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition., Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

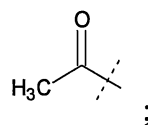
Theo khía cạnh khác của sáng chế, hợp chất theo sáng chế được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân điều trị, như tác nhân chống tiểu đường. Việc sử dụng kết hợp bao gồm việc sử dụng đồng thời hoặc tuần tự. Ngoài ra, việc sử dụng đồng thời hỗn hợp có thể ở dạng liều đơn kết hợp hoặc các liều lượng riêng biệt của mỗi một tác nhân điều trị. Ví dụ về tác nhân chống tiểu đường bao gồm metformin; chất ức chế DPPIV, như sitagliptin hoặc linagliptin; sulfonylure, như glimepiride; thiazolidinedione, như pioglitazone; insulin cơ bản, như glargine; insulin tác dụng nhanh, như HUMALOG hoặc NOVOLOG; chất chủ vận GLP-1, như exenatide hoặc liraglutide; chất ức chế SGLT2, như dapagliflozin hoặc empagliflozin; chất đối kháng thụ thể glucagon, như LY2409021; và tác nhân tương tự.

Hợp chất có công thức I được điều chế như minh họa trong phần ví dụ điều chế, ví dụ và sơ đồ dưới đây. Chất phản ứng và nguyên liệu khởi đầu có thể dễ dàng kiếm được đối với một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Tất cả các phần tử thế, trừ khi được xác định theo cách khác, đều được xác định trước. Có thể hiểu rằng, các sơ đồ, chế phẩm và ví dụ không dự định để giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ về phương pháp tách phân giải bao gồm kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký không đối xứng. (Ví dụ, xem trong tài liệu của tác giả J. Jacques, et al., "Enantiomers,

Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, và tài liệu của tác giả E.L. Eliel and S.H. Wilen," Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Ngoài ra, rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực là, kỹ thuật tách và phân lập, bằng phương pháp sắc ký, sắc ký không đối xứng hoặc kết tinh chọn lọc, của các chất đồng phân không đối quang hoặc chất đồng phân dị hình riêng biệt có công thức I hoặc các chất đồng phân không đối quang hoặc chất đồng phân dị hình riêng biệt của hợp chất trung gian dẫn tới công thức I, có thể xuất hiện tại thời điểm thích hợp bất kỳ trong quá trình tổng hợp.

Theo sử dụng ở đây, ký hiệu "δ" dùng để chỉ phần triệu theo chiều giảm dần so sánh với tetrametylsilan; "min" dùng để chỉ phút; "hr" dùng để chỉ giờ; "THF" dùng để chỉ tetrahydrofuran; "EtOAc" dùng để chỉ ethyl axetat; "MeOH" dùng để chỉ metanol hoặc rượu metylic; "EtOH" dùng để chỉ ethanol hoặc rượu etylic; "TFA" dùng để chỉ axit trifloaxetic; "DPPA" dùng để chỉ diphenylphosphoryl azit; "HATU" dùng để chỉ O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'tetrametyluron hexaflophosphat; "CDI" dùng để chỉ 1,1'-cacbonyldiimidazol; "DDQ" dùng để chỉ 2,3-diclo-5,6-dixyano-1,4-benzoquinon; "Xphos" dùng để chỉ 2-dixyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl; "MTBE" dùng để chỉ metyl tert-butyl ete; "HPLC" dùng để chỉ phương pháp sắc ký lỏng tính năng cao; "Ac" dùng để chỉ nhóm thế axetyl có công thức cấu trúc sau:

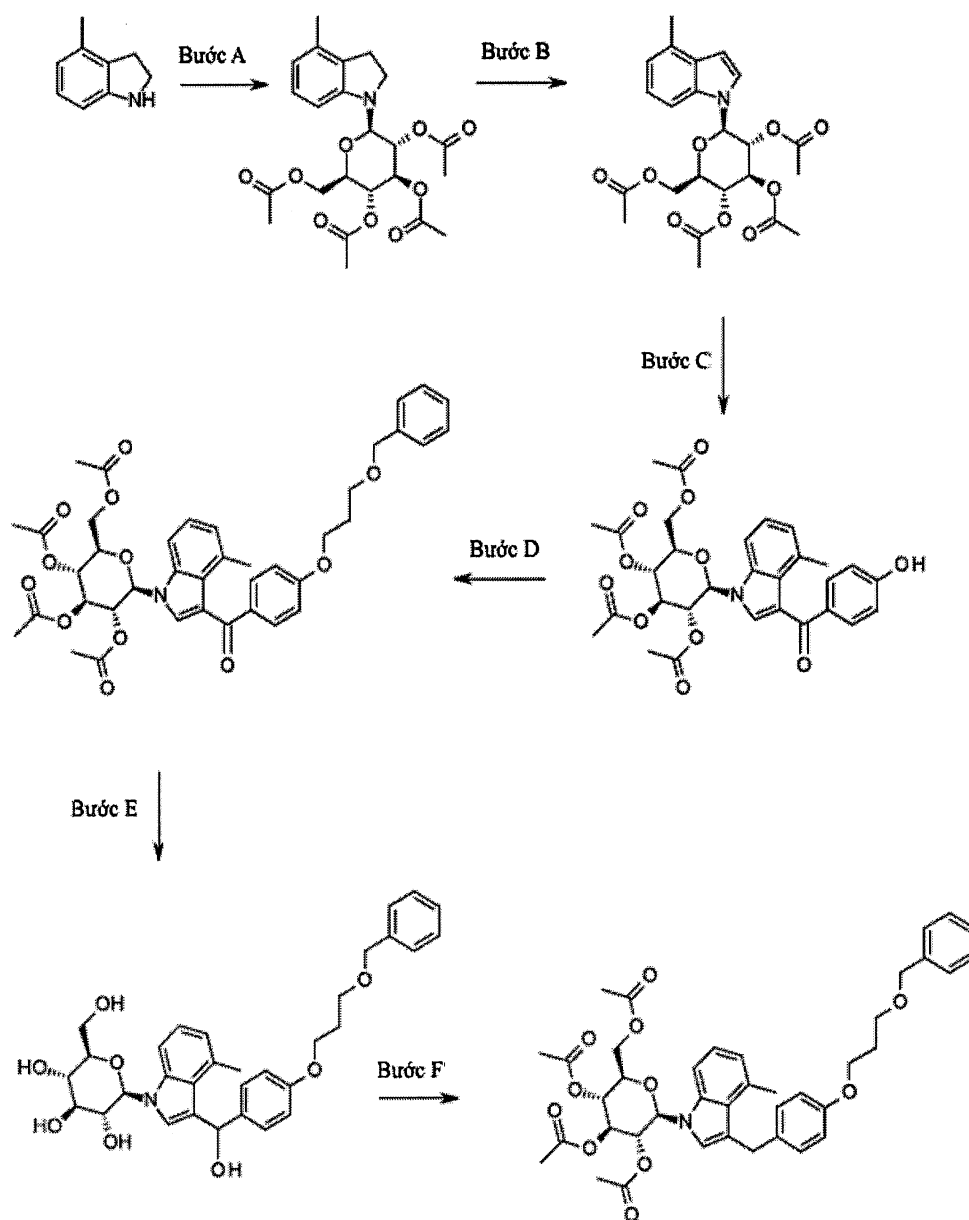


và thuật ngữ "BOC" dùng để chỉ nhóm bảo vệ t-butyloxycarbonyl.

Muối được dụng và phương pháp chung để điều chế các muối này đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, xem trong tài liệu của tác giả Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); tài liệu của tác giả Bastin et al. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000); và tài liệu của tác giả S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977. Một người có kỹ năng trong lĩnh vực tổng hợp sẽ nhận thức được rằng, hợp chất có công thức I ở dạng amin là kiềm hữu cơ và chúng dễ

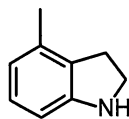
dùng được chuyển hóa thành và được tách phân lập ở dạng muối được dùng nhờ sử dụng các kỹ thuật và điều kiện đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Sơ đồ I



Ví dụ thực hiện sáng chế**Ví dụ điều chế 1**

4-metylinđolin

**Phương pháp A**

Nạp 4-metyl-1H-indol (500g; 1,0 đương lượng; 3,811mol) và axit axetic (2000mL) vào bình thót cổ thể tích 20L ở nhiệt độ trong phòng. Làm lạnh dung dịch xuống nhiệt độ 0°C (nhiệt độ bên trong) và sau đó, bổ sung natri xyanobohydrua (359,2g; 1,5 đương lượng; 5,71mol) theo 5 phần bằng nhau, trong khi không để cho nhiệt độ hỗn hợp phản ứng cao hơn 10°C. Khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ 0°C và bổ sung nước đá (5Kg) vào đó. Bổ sung dung dịch làm lạnh sơ bộ (5°C) chứa natri hydroxit (4M) thật từ từ để đạt tới độ pH của hỗn hợp phản ứng bằng 14. Chiết hỗn hợp phản ứng bằng etyl axetat (2X10L). Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng nước (1 X 10L) và nước muối (1 X 10L). Sấy khô trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (460g, hiệu suất 90%): phổ khối (m/z): 134 (M+1).

Phương pháp B

Nạp axit trifloaxetic (7,62mol; 576,42mL) vào bình 3 cổ thể tích 2000mL, có trang bị nhiệt kế, máy khuấy từ, đường dẫn nitơ và phễu nhỏ giọt. Đặt bình thót cổ vào trong chậu nước đá / nước và làm mát hỗn hợp xuống nhiệt độ 13°C (nhiệt độ bên trong). Bổ sung 4-metyl-1H-indol (762,33mmol; 94,25mL; 100,00g) trong thời gian 3 phút trong khi không để cho nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng vượt trên 25°C. Khuấy hỗn hợp trong thời gian khoảng 1 phút sau khi hoàn thành việc bổ sung, nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng đạt tới 20°C, sau đó lấy bình thót cổ ra khỏi chậu nước đá và khuấy trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 20°C. Bổ sung trietylsilan (876,68mmol; 140,47mL; 101,94g) từng giọt vào phản ứng trong thời gian 41 phút, để nhiệt độ gia tăng lên tới 25°C, sau đó duy trì nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C nhờ sử dụng chậu nước làm lạnh

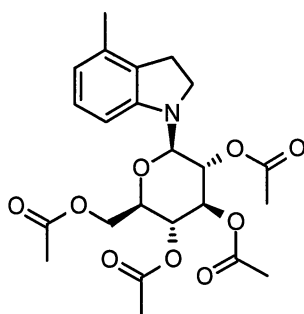
khi cần thiết. Khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp phản ứng trong thời gian 80 phút. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ 10°C, sau đó rót vào hỗn hợp của nước đá (1000g), axit clohydric 5M (800mL) và MTBE (2000mL) cùng với khuấy. Lưu ý rằng, điều quan trọng là phải làm ngừng hệ hai pha để tránh sự hình thành tạp chất. Tách pha nước và chiết các phần hữu cơ bằng axit clohydric (400mL; 2M), sau đó bằng axit clohydric (2 x 200mL; 2M). Kết hợp các phần chiết nước và làm lạnh trong nước đá. Bổ sung NaOH 50% trọng lượng/trọng lượng để đạt được độ pH>10 trong khi duy trì nhiệt độ dưới 30°C. Chiết hỗn hợp nước bằng MTBE (1000ml, sau đó bằng 200mL). Kết hợp các phần chiết hữu cơ, sấy khô trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (73g; hiệu suất 68%); phổ khối (m/z): 134 (M+1).

Phương pháp C

Bổ sung dung dịch chứa 4-metyl-1H-indol, (114,35mmol; 15,00g) trong tetrahydrofuran (75,00mL) vào dung dịch chứa axit p-toluensulfonic monohydrat (137,22mmol; 23,63g) trong nước (75,00mL) cùng với khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung platin 5% trên cacbon (Johnson Matthey Type 103; 1,50g) trong điều kiện được phủ bằng cacbon dioxit. Để hỗn hợp trong điều kiện khí quyển hydro (4,2 bar) và lắc ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng natri hydroxit (dung dịch nước 2M; 148,65mmol; 74,33mL) và khuấy với MTBE (150,00mL). Lọc hỗn hợp qua đất diatome và rửa đệm lọc bằng MTBE (50mL). Tách phần dịch lọc và chiết phần nước bằng MTBE (100mL). Kết hợp các phần hữu cơ, sấy khô trên magie sulfat khan, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (14,80g; hiệu suất 97,17%); phổ khối (m/z): 134 (M+1).

Ví dụ điều chế 2

[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxi-6-(4-metylinolin-1-yl)tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat



Phương pháp A

Sơ đồ I, bước A: Làm ẩm D-glucosa (180,2mmol) bằng nước (25mL) và sau đó, bổ sung 4-metylindolin, (180,2mmol) trong etanol (200mL). Làm sạch hỗn hợp bằng nito và gia nhiệt tới nhiệt độ hồi lưu trong điều kiện khí quyển nito trong thời gian qua đêm. Sau đó, làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và cô trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung diclometan (200mL), N,N-dimetylaminopyridin (9,0mmol) và pyridin (2,5mol) vào phần cặn tạo ra. Làm lạnh hỗn hợp trong một chậu nước đá và sau đó, bổ sung anhydrit axit axetic (1,1mol) từng giọt vào đó trong thời gian 30 phút. Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm, pha loãng phần cặn bằng etyl axetat (500mL) và rửa hỗn hợp bằng axit xitric (dung dịch nước bão hòa; 50mL) trong nước (500mL). Rửa bằng nước muối (500mL), sấy khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung etanol (500mL) và trộn kết hợp ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 10 phút. Làm nguội hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng và sau đó, trong nước đá / nước. Lọc hỗn hợp tạo ra và sấy khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (32g; hiệu suất 38,32%); phổ khối (m/z): 464,2 (M+1).

Phương pháp B

Sơ đồ I, bước A: Nạp dung dịch chứa 4-metylindolin (1000g; 7,51mol) trong etanol: nước (8000ml: 1000mL) và D-glucosa (1480g; 8,25mol) vào bình thót cổ 3 cổ thể tích 20L. Gia nhiệt hỗn hợp trong thời gian 6 giờ ở nhiệt độ 80°C. Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm và hòa tan phần cặn trong pyridin : diclometan (8000ml : 8000ml). Bổ sung dimetylaminopyridin (91,79g; 0,75mol) và làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ 10°C (nhiệt độ bên trong). Bổ sung anhydrit axit axetic (9000mL) từng giọt vào đó. Khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp phản ứng trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 45°C và sau đó, khuấy trong thời gian qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung etyl axetat (20L) và nước (10L) vào phần cặn.

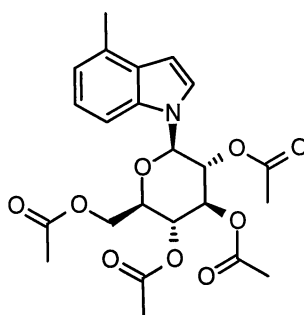
Tách lớp hữu cơ và chiết lớp nước bằng etyl axetat (2 X 10L). Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng dung dịch bão hòa chứa axit xitric (5Kg) trong nước. Sấy khô lớp hữu cơ trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Kết tinh phần cặn từ ethanol để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (3205,5g; hiệu suất 92,11%): phổ khối (m/z): 464,2 (M+1).

Phương pháp C

Sơ đồ I, bước A: Làm ẩm D-glucosa (517,30mmol; 93,20g) bằng nước (66mL) và sau đó, bổ sung 4-metylindolin, (65,62g; 492,67mmol) trong ethanol (394mL). Làm sạch hỗn hợp bằng nitơ và gia nhiệt tới nhiệt độ hồi lưu trong điều kiện khí quyển nitơ trong thời gian qua đêm. Sau đó, làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và cô trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung diclometan (394mL), trietylamin (2,82mol; 393,72mL); và N,N-dimetyl- 4-pyridinamin, (24,63mmol; 3,01g) vào phần cặn thu được. Làm lạnh hỗn hợp trong một chậu nước đá và sau đó, bổ sung anhydrit axit axetic (3,94mol; 372,57mL) từng giọt trong thời gian 30 phút. Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm, pha loãng phần cặn bằng etyl axetat (984mL) và rửa hỗn hợp bằng axit xitric (dung dịch nước bão hòa; 50mL) trong nước (200mL). Tách các lớp và chiết lớp nước bằng etyl axetat (600mL, sau đó 300mL). Kết hợp các lớp hữu cơ, rửa bằng nước muối (600mL) và cô trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung ethanol (656mL) và trộn kết hợp ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 10 phút. Làm nguội hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng và sau đó, trong nước đá / nước. Lọc hỗn hợp tạo ra và sấy khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (112,2g; hiệu suất 49,14%): phổ khối (m/z): 464,2 (M+1).

Ví dụ điều chế 3

[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-(4-metylindol-1-yl)tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat



Phương pháp A

Sơ đồ I, bước B: Nạp [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-(4-metylindolin-1-yl)tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (60,4mmol) vào bình thót cổ 500mL. Bổ sung 1,4 dioxan (250mL) và làm lạnh dung dịch xuống nhiệt độ 10°C. Bổ sung DDQ (63,4mmol) vào đó theo một phần. Làm ấm hỗn hợp tới nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian 2 giờ. Lọc hỗn hợp phản ứng và rửa phần rắn bằng 1,4-dioxan (3X50mL). Cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm và lọc qua nút silicagel (200g), rửa bằng EtOAc 10%/diclometan (300mL). Rửa bằng dung dịch bão hòa chứa natri bicacbonat (2 X 200mL) sau đó bằng nước (200mL). Sấy khô trên natri sulphat khan, lọc, cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (27,5g; hiệu suất 98,6%): phổ khối (m/z): 462,5 (M+1).

Phương pháp B

Sơ đồ I, bước B: Nạp [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-(4-metylindolin-1-yl)tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (4200g; 9,08mol) vào bình thót cổ thể tích 20L. Bổ sung 1,4 dioxan (42000mL) vào đó và làm lạnh dung dịch xuống nhiệt độ 10°C. Bổ sung DDQ (2057g; 9,08mol) vào đó theo 5 phần bằng nhau, duy trì ở nhiệt độ 10°C. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, làm ấm hỗn hợp tới nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian 2 giờ. Lọc hỗn hợp phản ứng và rửa phần rắn bằng 1,4-dioxan (3 lần). Cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế phần cặn bằng phương pháp sắc ký cột, giải hấp bằng etyl axetat 0% đến 20% trong hexan. Kết hợp các phần tinh khiết cùng với lô nguyên liệu riêng biệt được điều chế theo cách tương tự khởi đầu từ 2500g [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-(4-metylindolin-1-yl)tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hòa tan phần cặn trong etyl axetat (50L) và rửa bằng dung dịch bão hòa chứa natri bicacbonat (2 X 20L), sau đó bằng nước (1 X 10L). Sấy khô trên natri sulphat khan, lọc, cô trong điều kiện áp suất giảm, và kết tinh từ etanol (10L) để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (4,632Kg; hiệu suất 69%): phổ khối (m/z): 462,5 (M+1).

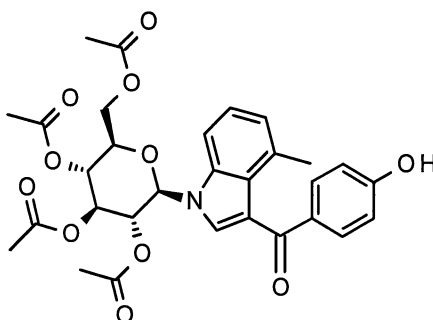
Phương pháp C

Sơ đồ I, bước B: Hòa tan [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-(4-metylindolin-1-yl)tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (112,2g; 242,08mmol) trong 1,4-dioxan (1,68L) ở nhiệt độ trong phòng. Làm lạnh hỗn hợp trong chậu nước đá/nước, sau đó bổ sung 4,5-

diclo-3,6-dioxo-xyclohexa-1,4-dien-1,2-dicacbonitril (244,50mmol; 55,50g) theo từng phần, duy trì nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng thấp hơn 15°C. Khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp trong thời gian 5 phút, sau đó lấy ra khỏi chậu nước đá và khuấy trong thời gian 5 phút nữa. Lọc hỗn hợp và rửa phần rắn bằng 1,4-dioxan (561,00mL). Cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm, sau đó bổ sung etanol (561,00mL) vào phần cặn và khuấy ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 20 phút. Làm lạnh hỗn hợp trong nước đá nước trong thời gian 15 phút, lọc và rửa phần rắn thu được bằng etanol lạnh (100mL). Sấy khô phần rắn trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (82,5g; hiệu suất 73,9%): phổ khối (m/z): 462,0 (M+1).

Ví dụ điều chế 4

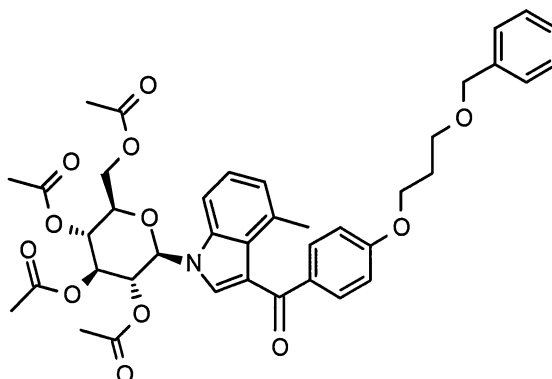
[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-(4-hydroxybenzoyl)-4-metyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat



Sơ đồ I, bước C: Nạp vào bình thót cổ đáy tròn được khuấy thể tích 0,5L, làm sạch bằng nitơ, theo thứ tự: [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-(4-metylindol-1-yl)-tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (29,5mmol), diclometan (100mL), và 4-bromobenzoyl clorua (30,9mmol). Làm lạnh hỗn hợp trong chậu nước đá và bổ sung nhôm triclorea (88,4mmol). Sau khi khuấy kết hợp làm lạnh trong thời gian 1,5 giờ, rót hỗn hợp phản ứng lên nước đá và pha loãng bằng nước (100mL) và cloroform (100mL). Tách pha hữu cơ và rửa pha nước bằng cloroform (100mL). Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng dung dịch natri bicacbonat đặc (200mL) và nước muối (200mL). Sấy khô trên natri sulphat, lọc và cô. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh trên silicagel (330g), giải hấp bằng EtOAc 5 đến 25%/cloroform để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (7,9g; hiệu suất 46,09%): phổ khối (m/z): 582,4 (M+1), 580,4 (M-H).

Ví dụ điều chế 5

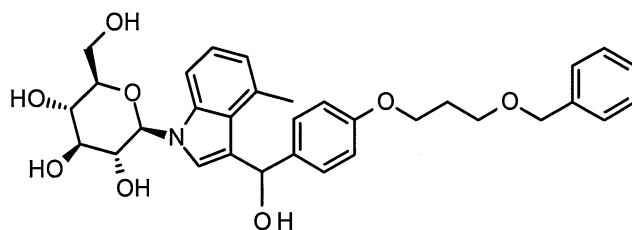
[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[4-(3-benzyloxypropoxy)benzoyl]-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat



Sơ đồ I, bước D: Nạp vào bình thót cổ đáy tròn được khuấy thể tích 0,5L, làm sạch bằng nitơ, theo thứ tự: [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-(4-hydroxybenzoyl)-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (13,58mmol), axetonitril (250mL) và kali cacbonat (67,92mmol). Bổ sung 3-bromopropoxymetylbenzen (27,2mmol) vào dung dịch được khuấy này ở nhiệt độ trong phòng và gia nhiệt ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 16 giờ trong môi trường nitơ. Pha loãng bằng EtOAc (200mL) và lọc. Cô phần dịch lọc và tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (330g silicagel), giải hấp bằng EtOAc 2 đến 40%/cloroform. Cô sản phẩm chứa các phần để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (9,0g, hiệu suất 90,79%): phổ khối (m/z): 730,4 (M+H).

Ví dụ điều chế 6

(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[3-[[4-(3-benzyloxypropoxy)phenyl]-hydroxy-metyl]-4-methyl-indol-1-yl]-6-(hydroxymetyl)tetrahydropyran-3,4,5-triol

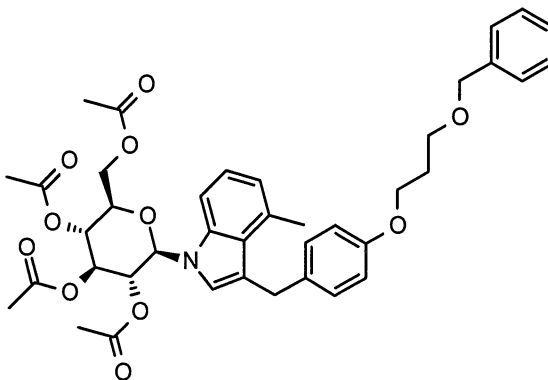


Sơ đồ I, bước E: Bình thót cổ đáy tròn được khuấy thể tích 0,5L, làm sạch bằng nitơ, được nạp [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[4-(3-benzyloxypropoxy)benzoyl]-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (12,33mmol), THF (50mL), và etanol (100mL). Bổ sung natri tetrahydroborat (37,0mmol) và khuấy ở nhiệt

độ trong phòng trong thời gian 6 giờ. Axit hóa bằng cách bổ sung từng giọt HCl 5N, sau đó pha loãng bằng nước (200mL) và diclometan (200mL). Tách riêng các phần hữu cơ và rửa bằng nước muối (200mL). Sấy khô trên natri sulphat, lọc và cô đặc để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục là hỗn hợp của các chất đồng phân không đối quang với độ tinh khiết đủ để được sử dụng không cần tinh chế thêm trong bước tiếp theo (7,2g thô): phổ khối (m/z): 546,4 (M+1-18).

Ví dụ điều chế 7

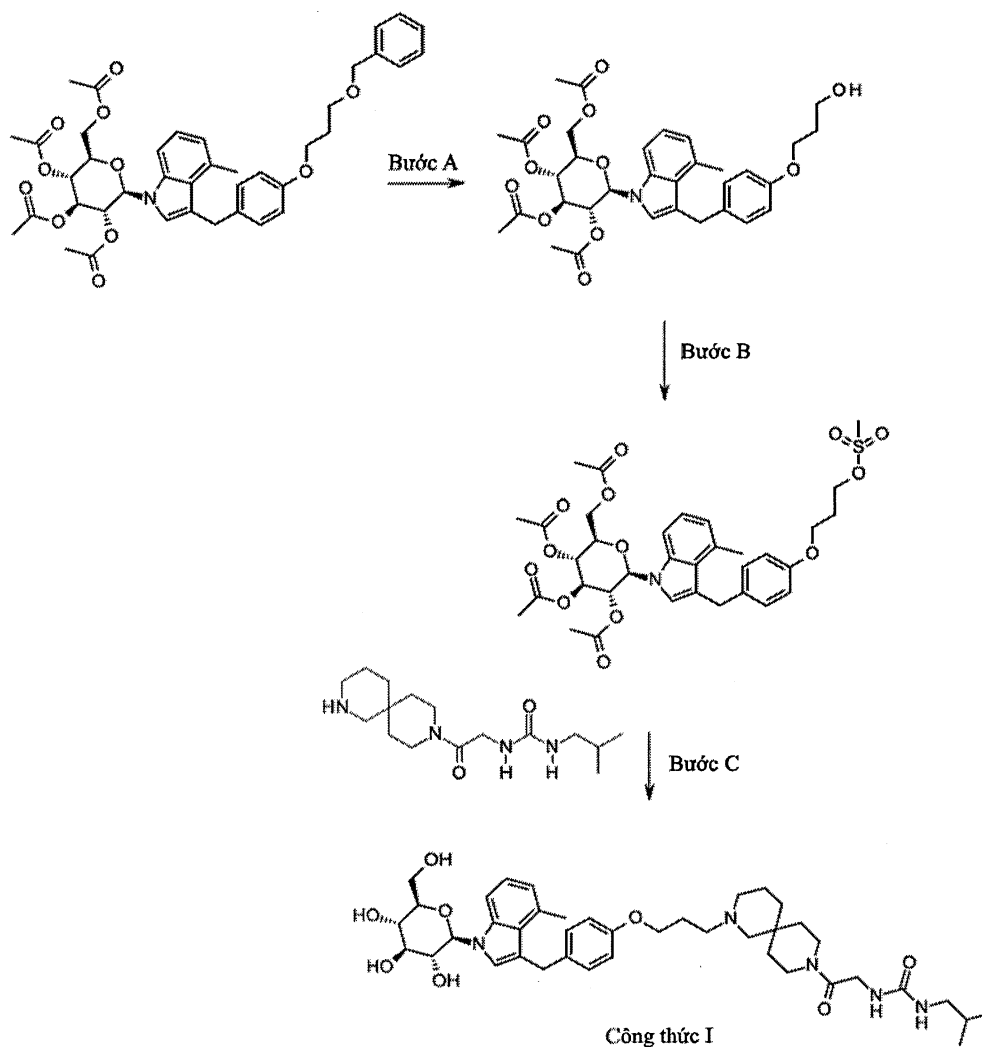
[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[[4-(3-benzyloxypropoxy)phenyl]metyl]-4-metyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat



Sơ đồ I, bước F: Bình thốt cổ đáy tròn thể tích 0,5L trong môi trường nitơ được nạp (2R,3R,4S,5S,6R)-2-[3-[[4-(3-benzyloxypropoxy)phenyl]-hydroxy-metyl]-4-metyl-indol-1-yl]-6-(hydroxymetyl)tetrahydropyran-3,4,5-triol (7,2g, thô), sau đó axetonitril (50mL) và sau đó, diclometan (100mL). Làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ 0°C. Bổ sung triethylsilan (63,87mmol), tiếp theo bằng cách bổ sung từng giọt bo triflorua eterat (51,10mmol). Khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp phản ứng trong chậu nước đá trong thời gian 5 phút, sau đó được làm dừng bằng cách bổ sung từng giọt dung dịch natri bicacbonat (20mL). Pha loãng bằng nước (200mL) và EtOAc (500mL). Tách các lớp, rửa pha hữu cơ bằng nước muối (200mL), và cô trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung pyridin (50mL), diclometan (50mL) và N,N-dimetylaminopyridin (0,41mmol) vào đó. Làm lạnh trong một chậu nước đá và bổ sung anhydrit axetic (127,74mmol) vào đó. Làm ấm tới nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian 16 giờ. Cô trong điều kiện áp suất giảm, sau đó bổ sung EtOAc (500mL). Rửa bằng dung dịch axit xitric (200mL), tiếp theo bằng nước (200mL) và nước muối (200mL). Sấy khô trên natri sulphat, lọc và cô.

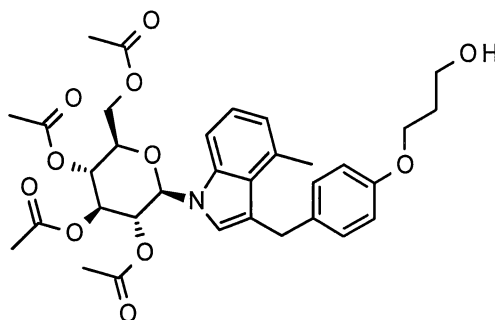
Tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (330g silicagel), giải hấp bằng EtOAc 5 - 5 đến 20%/diclometan để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (7,5g, 82,03%): phổ khối (m/z): 716,3 (M+1).

Sơ đồ II



Ví dụ điều chế 8

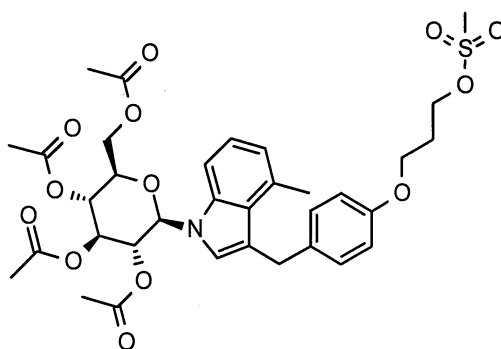
[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[[4-(3-hydroxypropoxy)phenyl]methyl]-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat



Sơ đồ II, bước A: Bình thốt cổ đáy tròn thể tích 0,5L được bổ sung [(2R,3R,4S,-5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[[4-(3-benzyloxypropoxy)phenyl]metyl]-4-metyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (10,34mmol) và etyl axetat (80mL). Bổ sung Pd 5%/C được làm ẩm trước bằng etyl axetat (20mL) vào dung dịch này. Trong khi khuấy, làm sạch chân không hỗn hợp bằng hydro (3X), sau đó khuấy trong điều kiện môi trường hydro trong thời gian 16 giờ. Lọc qua đất diatome và rửa bằng etyl axetat (100mL). Cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục với độ tinh khiết đủ để sử dụng trong bước tiếp theo (6,5g): phổ khối (m/z): 626,4 (M+1).

Ví dụ điều chế 9

[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[4-metyl-3-[[4-(3-metylsulfonyloxypropoxy)-phenyl]metyl]indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat

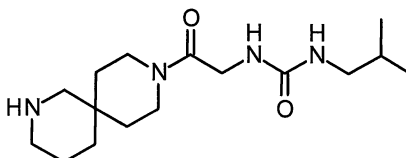


Sơ đồ II, bước B: Bình thốt cổ đáy tròn thể tích 0,5L được bổ sung [(2R,3R,4S,-5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[[4-(3-hydroxypropoxy)phenyl]metyl]-4-metyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (6,5g, thô), diclometan (100mL), và trietylamin (25,97mmol). Làm lạnh trong một chậu nước đá và bổ sung metansulfonyl clorua (12,47mmol) từng giọt trong thời gian 10 phút. Làm ấm tới nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian 1 giờ. Pha loãng bằng diclometan (100mL) và rửa bằng nước

(200mL) và nước muối (200mL). Sấy khô các phần hữu cơ trên natri sulfat, lọc và cô đặc trong môi trường chân không để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục với độ tinh khiết đủ để sử dụng trong bước tiếp theo (7,2g): phổ khối (m/z): 704,4 (M+1).

Ví dụ điều chế 10a

1-[2-(4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-yl)-2-oxo-etyl]-3-isobutyl-ure



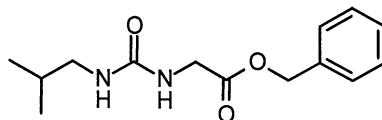
Bình thót cổ đáy tròn được bổ sung tert-butyl 4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-cacboxylat hydroclorua (1,38mmol), axit 2-(isobutylcacbamoylamino)axetic (1,15mmol), dimetylformamit (3,8mL), trietylamin (1,72mmol) và HATU (1,26mmol. Khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ, sau đó pha loãng bằng nước (50mL) và etyl axetat (50mL). Rửa pha hữu cơ bằng amoni clorua đặc (50mL) và nước muối (50mL). Sấy khô các phần hữu cơ trên natri sulfat, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế sản phẩm trung gian bằng phương pháp sắc ký nhanh (40g cột silicagel), giải hấp bằng metanol 0 đến 10% trong etyl axetat để tạo ra tert-butyl 9-[2-(isobutylcacbamoylamino)axetyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4-cacboxylat (0,38g, 0,93mmol): MS (m/z): 411,2 (M+H).

Bổ sung HCl 4M trong 1,4-dioxan (8,77mmol) vào dung dịch chứa tert-butyl 9-[2-(isobutylcacbamoylamino)axetyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4-cacboxylat (0,38g, 0,93mmol) trong 1,4-dioxan (1,75mL). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 giờ, sau đó cô trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phần cặn bằng cách hòa tan trong metanol và nạp lên cột SCX (trao đổi ion). Rửa cột đã nạp bằng metanol (3X25mL), sau đó xối rửa cột bằng amoniac 2N trong metanol. Kết hợp và cô dịch rửa amoniac để tạo ra hợp chất nêu ở phần đề mục (0,25g, 0,81mmol): MS (m/z): 311,0 (M+H).

Ví dụ điều chế 10b

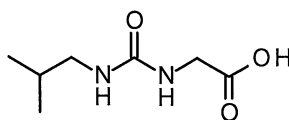
Điều chế 1-[2-(4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-yl)-2-oxo-etyl]-3-isobutyl-ure theo cách khác.

Điều chế benzyl 2-(isobutylcabamoylamino)axetat.



Nạp axit 3-metylbutanoic (106,36g), toluen (800mL) và trietylamin (126,46g) vào trong bình thót cổ 3 cổ (R1). Gia nhiệt R1 tới nhiệt độ 90°C. Bổ sung dung dịch chứa DPPA (289,3g) trong toluen (400mL) một cách từ từ vào đó (cẩn thận: giải phóng N₂). Khuấy R1 ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 30 đến 60 phút, sau đó làm nguội xuống nhiệt độ 20 đến 30°C. Trong một bình thót cổ riêng biệt (R2) được nạp benzyl 2-aminoaxetat hydroclorua (200g), trietylamin (150,54g), và toluen (1000mL) và khuấy ở nhiệt độ 20 đến 30°C trong thời gian 1 đến 2 giờ. Bổ sung hỗn hợp R1 vào R2 từ từ từng giọt qua một phễu bổ sung ở nhiệt độ 20 đến 30°C và khuấy trong thời gian 1 đến 2 giờ. Bổ sung từ từ hỗn hợp phản ứng vào nước (2000mL) kết hợp khuấy mạnh. Tách riêng phần hữu cơ và chiết lớp nước bằng EtOAc (2 x 1000mL). Kết hợp các lớp hữu cơ và rửa bằng axit clohydric 1N (1000mL), sau đó bằng dung dịch nước NaHCO₃ 7% (1000mL), sau đó bằng nước (1000mL), sau đó bằng nước muối 15% (1000mL). Cô trong điều kiện áp suất giảm. Tạo huyền phù đặc phần cặn còn lại bằng heptan (1000mL), sau đó lọc phần rắn. Sấy khô bánh lọc trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ thấp hơn 40°C để thu được benzyl 2-(isobutylcabamoylamino)axetat (218g; phân tích 98,1%; hiệu suất 81,5%).

Điều chế axit 2-(isobutylcabamoylamino)axetic.



Nạp benzyl 2-(isobutylcabamoylamino)axetat (200g; phân tích 98,1%), Pd/C khô (20g; 10% trọng lượng/trọng lượng), và rượu isopropyl (2000mL) vào trong một nồi hấp. Khử khí trong môi trường chân không và làm sạch bằng hydro ba lần. Khuấy ở nhiệt độ 60°C trong điều kiện áp suất 50 đến 60 psi của H₂ trong thời gian 4 giờ. Làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ 20 đến 30°C và lọc qua đất diatome và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 45 đến 50°C còn 1 đến 2Vol. Bổ sung axetonitril (1000mL) và cô trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 45 đến 50°C còn 2 đến 3Vol. Làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ 5 đến 10°C và lọc. Sấy khô bánh lọc trong điều kiện áp suất giảm ở

nhệt độ 45 đến 50°C để thu được axit 2-(isobutylcabamoylamino)axetic (112g; phân tích 95,2%; hiệu suất 82,5%).

Điều chế hợp chất nêu ở phần đề mục sau cùng.

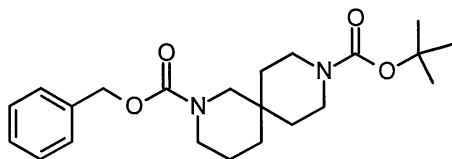
Bình thót cổ đáy tròn được bổ sung tert-butyl 4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-cacboxylat hydroclorua (1,38mmol), axit 2-(isobutylcabamoylamino)axetic (1,15mmol), dimetylformamit (3,8mL), trietylamin (1,72mmol), và HATU (1,26mmol). Khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ, sau đó pha loãng bằng nước (50mL) và etyl axetat (50mL). Rửa pha hữu cơ bằng amoni clorua đặc (50mL) và nước muối (50mL). Sấy khô các phần hữu cơ trên natri sulfat, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế sản phẩm trung gian bằng phương pháp sắc ký nhanh (40g cột silicagel), giải hấp bằng metanol 0 đến 10% trong etyl axetat để tạo ra tert-butyl 9-[2-(isobutylcabamoylamino)axetyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4-cacboxylat (0,38g, 0,93mmol): MS (m/z): 411,2 (M+H).

Bổ sung HCl 4M trong 1,4-dioxan (8,77mmol) vào dung dịch chứa tert-butyl 9-[2-(isobutylcabamoylamino)axetyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4-cacboxylat (0,38g, 0,93mmol) trong 1,4-dioxan (1,75mL). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 giờ, sau đó cô trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế phân cận bằng cách hòa tan trong metanol và nạp lên cột SCX (trao đổi ion). Rửa cột đã nạp bằng metanol (3X25mL), sau đó xối rửa cột bằng amoniac 2N trong metanol. Kết hợp và cô dịch rửa amoniac để tạo ra hợp chất nêu ở phần đề mục sau cùng, 1-[2-(4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-yl)-2-oxo-etyl]-3-isobutyl-ure (0,25g, 0,81mmol): MS (m/z): 311,0 (M+H).

Ví dụ điều chế 10c

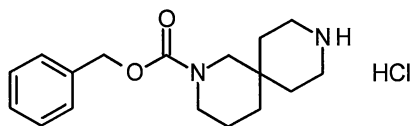
Điều chế 1-[2-(4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-yl)-2-oxo-etyl]-3-isobutyl-ure theo cách khác

Điều chế O4-benzyl O9-tert-butyl 4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4,9-dicacboxylat



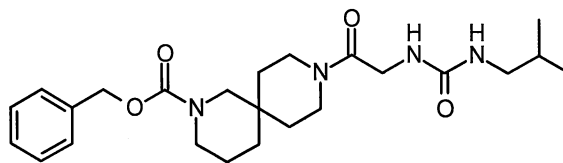
Bình phản ứng kiểm soát nhiệt độ thể tích 20L được nạp tert-butyl 4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat hydroclorua (2,06mol; 600,00g), tiếp theo bằng diclometan (6,00L), sau đó trietylamin (4,33mol; 604mL) được bổ sung vào đó. Thiết đặc nhiệt độ của vỏ bình phản ứng ở 0°C. Khi nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng đạt tới 5°C, bổ sung benzyl cloroformat (2,10mol; 311mL) trong thời gian 20 phút, duy trì nhiệt độ bên trong thấp hơn 20°C. Khi hoàn thành việc bổ sung, làm ấm vỏ bình phản ứng tới nhiệt độ trong phòng và khuấy hỗn hợp trong thời gian qua đêm. Rót hỗn hợp phản ứng vào nước (4L) và tách riêng hỗn hợp. Cô các phần hữu cơ trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (838g; độ tinh khiết giả định 95,65% và hiệu suất 100% cho mục đích tính toán trong phản ứng tiếp theo) phổ khối (m/z): 411,2 (M+23).

Điều chế benzyl 4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4-carboxylat hydroclorua



Bình phản ứng kiểm soát nhiệt độ thể tích 20L có vỏ được hiệu chỉnh ở nhiệt độ 0°C, bổ sung dung dịch chứa O4-benzyl O9-tert-butyl 4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4,9-dicacboxylat (2,06mol; 838,00g; độ tinh khiết 95,65%) trong 1,4-dioxan (19,63mol; 1,68L). Khi nhiệt độ của dung dịch bằng 5°C, bổ sung hydro clorua (4M trong 1,4-dioxan; 10,32mol; 2,58L) với tốc độ sao cho, nhiệt độ không gia tăng trên 20°C. Khi hoàn thành việc bổ sung, làm ấm dung dịch tới nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian qua đêm. Cô hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm để thu được huyền phù đặc. Bổ sung MTBE (3,35L) và lắc hỗn hợp trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 40°C. Để hỗn hợp nguội xuống nhiệt độ trong phòng và lọc phần kết tủa. Rửa phần kết tủa bằng MTBE (838mL). Để phần kết tủa sấy khô trên thiết bị lọc và sau đó, chuyển sang tủ sấy chân không sấy khô thêm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (638g; hiệu suất 95%) phổ khối (m/z): 289 [M (kiểm tự do) +1].

Điều chế benzyl 9-[2-(isobutylcabamoylamino)axetyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4-carboxylat



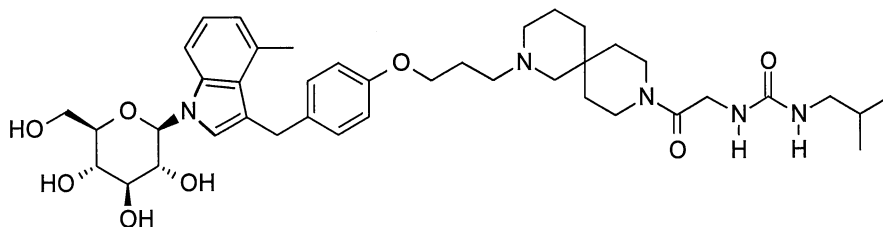
Bổ sung 1,1'-cacbonyldiimidazol (700,40mmol; 113,57g) theo các phần vào axit 2-(isobutylcacbamoylamino)axetic (667,05mmol; 116,20g) trong diclometan (1,16L). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Đánh dấu hỗn hợp này là A. Trong một bình riêng biệt, bổ sung benzyl 4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4-cacboxylat hydroclorua (700,40mmol; 413,68g), diclometan (581mL) và trietylamin (1,33mol; 186mL) vào đó. Khuấy hỗn hợp. Đánh dấu hỗn hợp này là B. Rót hỗn hợp A vào hỗn hợp B trong thời gian 2 phút. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng. Sau thời gian 3 giờ, bổ sung nước (1000mL) vào đó. Tách pha hữu cơ và cô trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung etyl axetat (581,00mL) và lắc hỗn hợp trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 40°C, sau đó làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng, sau đó bằng nước đá trong thời gian 20 phút. Lọc phần kết tủa và sấy khô thêm trong tủ sấy chân không để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục. (137,1g; hiệu suất 46,23%) phổ khối (m/z): 445,2 (M+1). Sau khi để yên phần dịch lọc, chất kết tủa tạo ra. Lọc phần kết tủa này và sấy khô thêm trong một tủ sấy chân không để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục. (9,30g; hiệu suất 3,14%).

Điều chế hợp chất nêu ở phần đề mục cuối cùng

Tạo huyền phù benzyl 9-[2-(isobutylcacbamoylamino)axetyl]-2,9-diazaspiro[5.5]-undecan-2-cacboxylat (239,78mmol; 106,60g) trong etanol (852,80mL) và xyclohexen (1,20mol; 121,90mL), và bổ sung paladi 5% trên than (24g; lượng độ ẩm 55,4%). Gia nhiệt hỗn hợp tới nhiệt độ hồi lưu và khuấy trong thời gian 45 phút. Làm nguội hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng, lọc qua đệm bằng đất diatome, rửa phần chất rắn bằng etanol và cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục cuối cùng, 1-[2-(4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-yl)-2-oxo-etyl]-3-isobutyl-ure (79,2g; độ tinh khiết 94%; hiệu suất 100%) phổ khối (m/z): 311,2 (M+1).

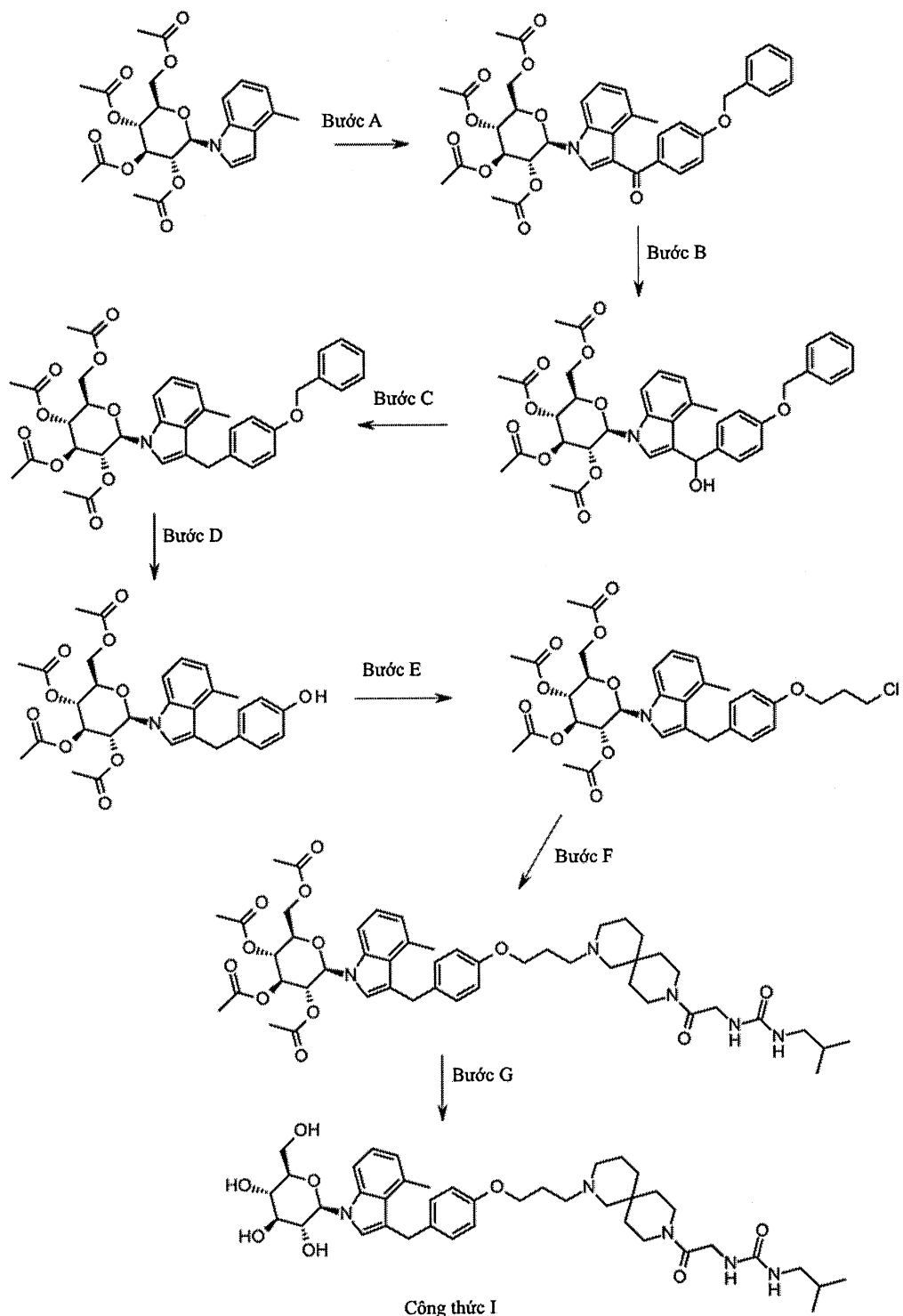
Ví dụ 1a

1-isobutyl-3-[2-[4-[3-[4-[[4-methyl-1-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydropyran-2-yl]indol-3-yl]methyl]phenoxy]propyl]-4,9-diazaspiro[5.5]-undecan-9-yl]-2-oxo-ethyl]urea



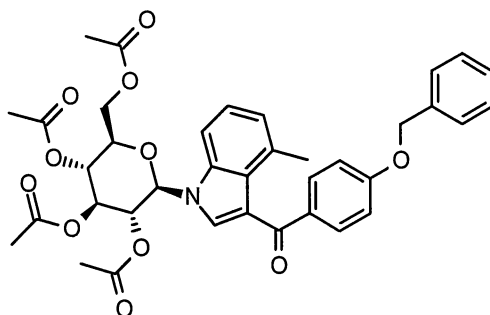
Sơ đồ II, bước C: Bổ sung [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[4-methyl-3-[[4-(3-methylsulfonyloxypropoxy)phenyl]methyl]indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]methyl axetat (7,2g, thô), 1-[2-(4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-yl)-2-oxo-ethyl]-3-isobutyl-ure (12,28mmol), axetonitril (100mL) và diisopropyletylamin (40,92mmol) vào bình thót cổ đáy tròn thể tích 0,25L. Gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 16 giờ, sau đó cô trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung metanol (50mL) và natri metoxit (20,46mmol, dung dịch 30% trong MeOH) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Làm dừng phản ứng bằng cách bổ sung miếng nước đá khô nhỏ. Cô trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh pha đảo (400g cột C18), giải hấp bằng 5 đến 80% nước (axit formic 0,1%) trong axetonitril (axit formic 0,1%) theo ba phần. Cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở phần đề mục ở dạng muối axit formic chứa ít tạp chất. Hòa tan muối vào amoniac 7N trong metanol (20mL), sau đó cô để tạo ra kiềm tự do. Tinh chế kiềm tự do bằng phương pháp sắc ký nhanh (330g cột silicagel), giải hấp bằng amoniac 5% 7N trong metanol/diclometan. Cô các phần sản phẩm trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở phần đề mục (1,75g, 22,81%): MS (m/z): 746,6 (M+H). ^1H NMR (400,31 MHz, CD_3OD): δ 7,28 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,03 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,02 (s, 1H), 6,97 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 6,69 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 5,37 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 4,15 (s, 2H), 3,95 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,91 (d, J = 1,6 Hz, 2H), 3,87 – 3,80 (m, 2H), 3,65 (dd, J = 11,6, 5,6 Hz, 1H), 3,57 – 3,38 (m, 5H), 3,31 (bm, 2H), 2,90 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 2,46 – 2,13 (m, 8H), 1,88 (pentet, J = 6,8 Hz, 2H), 1,68 (septet, J = 6,8 Hz, 1H), 1,61 – 1,28 (m, 8H), 0,86 (d, J = 6,8, 6H).

Sơ đồ III



Ví dụ điều chế 11

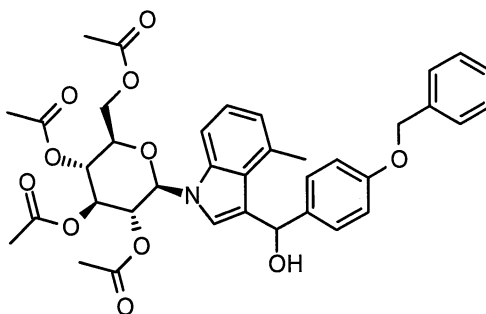
[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-(4-benzyloxybenzoyl)-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat



Sơ đồ III, bước A: Bình phản ứng kiểm soát nhiệt độ thể tích 20L được nạp: diclometan (7,00L), [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-(4-metylindol-1-yl)tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (1,52mol; 700,00g) và 4-benzyloxybenzoyl clorua (1,67mol; 411,63g). Hiệu chỉnh nhiệt độ vỏ ngoài bình phản ứng ở -30°C, cho phép làm lạnh các lượng chứa trong bình phản ứng và bổ sung thiếc tetraclorea (1,97mol; 513,74g) trong thời gian 30 phút, duy trì nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ -5 đến -10°C. Khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ khoảng -9°C. Rót hỗn hợp phản ứng lạnh lên 20L nước đá nghiền. Tách riêng lớp hữu cơ và chiết lớp nước bằng diclometan. Kết hợp các phần chiết hữu cơ và cô trong điều kiện áp suất giảm còn khoảng 2L. Bổ sung 7L MTBE vào đó và rửa bằng axit clohydric (1M; 2X8L), sau đó bằng nước (8L), sau đó bằng natri hydro cacbonat (dung dịch nước bão hòa), sau đó bằng nước muối. Sấy khô trên MgSO₄, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục, hợp chất này chứa ~17% trọng lượng/trọng lượng MTBE (1377g; độ tinh khiết giả định 74% và hiệu suất 100% cho mục đích tính toán trong phản ứng tiếp theo) phổ khối (m/z): 672,2 (M+1).

Ví dụ điều chế 12

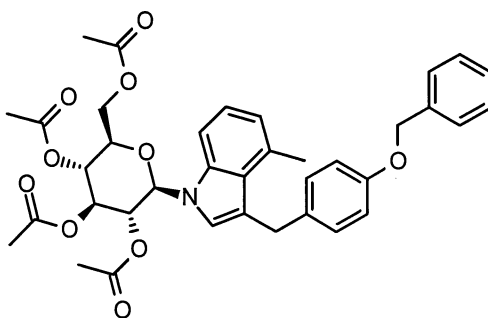
[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[(4-benzyloxyphenyl)-hydroxy-metyl]-4-metyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat



Sơ đồ III, bước B: Nạp vào bình phản ứng kiểm soát nhiệt độ được khuấy bằng xeri (III) clorua heptahydrat (4,55mol; 1,12kg) trong etanol (4,96L) và khuấy để tạo ra dung dịch. Bổ sung [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-(4-benzyloxybenzoyl)-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (1,52mol; 1,38kg) và tetrahydrofuran (7,57L) vào đó. Làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ +2°C và bổ sung natri tetrahydroborat (4,55mol; 172,18g) theo các phần trong thời gian 3 giờ, duy trì nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ 0 đến +5°C trong khi bổ sung. Khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 5°C trong thời gian 1 giờ. Bổ sung thêm natri tetrahydroborat (687,24mmol; 26,00g) và khuấy hỗn hợp trong thời gian 30 phút. Bổ sung natri tetrahydroborat bổ sung (0,45 đương lượng; 687,24mmol; 26,00g) và khuấy hỗn hợp trong thời gian qua đêm. Rót hỗn hợp vào trong MTBE (5L) và nước (10L). Bổ sung từ từ axit clohydric (2N) cùng với khuấy cho tới khi hỗn hợp trở thành axit nhẹ trên giấy thử độ pH. Tách riêng lớp hữu cơ, rửa bằng nước muối, sấy khô trên MgSO₄, lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu ở phần đề mục với độ tinh khiết chấp nhận được để sử dụng trong bước tiếp theo (1547g; độ tinh khiết giả định 66% và hiệu suất 100% cho mục đích tính toán trong phản ứng tiếp theo) phổ khối (m/z): 656,4 (M+1-18).

Ví dụ điều chế 13

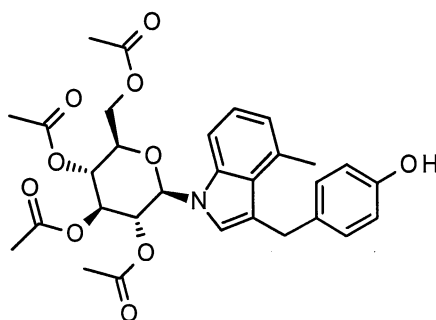
[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[(4-benzyloxyphenyl)metyl]-4-metyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat



Sơ đồ III, bước C: làm lạnh hỗn hợp của [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[(4-benzyloxyphenyl)-hydroxy-metyl]-4-metyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (1,52mol; 1,55kg) trong axetonitril (6,19L) và diclometan (6,19L) trong chậu nước muối/nước đá cho tới khi nhiệt độ bên trong bằng -5°C , sau đó bổ sung triethylsilan (3,79mol; 607mL) trong thời gian 2 phút. Bổ sung bo triflorua eterat (3,79mol; 479mL) từng giọt trong khi duy trì nhiệt độ bên trong dưới $+5^{\circ}\text{C}$. Khuấy hỗn hợp trong chậu nước đá trong thời gian 30 phút. Bổ sung cẩn thận hỗn hợp của NaHCO_3 (dung dịch nước bão hòa; 5L) và nước (4L) vào đó. Tách pha hữu cơ và rửa bằng nước, sau đó bằng nước muối, sau đó sấy khô trên MgSO_4 , lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hỗn hợp của hợp chất nêu ở phần đề mục và các hợp chất bị mất một hoặc nhiều nhóm axetyl. Hòa tan phần cặn trong diclometan (1,86L) và bổ sung anhydrit axit axetic (7,58mol; 716mL) và N,N-dimetyl-4-pyridinamin, (75,78mmol; 9,26g). Làm ấm hỗn hợp tới nhiệt độ 40°C và lắc nhẹ nhàng để trợ giúp hòa tan, sau đó khuấy hỗn hợp trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm và tạo huyền phù đặc đối với phần còn lại trong MTBE (6L) trong thời gian qua đêm. Tập hợp phần rắn bằng cách lọc và sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 60°C trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (692,8g; hiệu suất 70%) phổ khối (m/z): 658,3 (M+1) và 680,2 (M+23).

Ví dụ điều chế 14

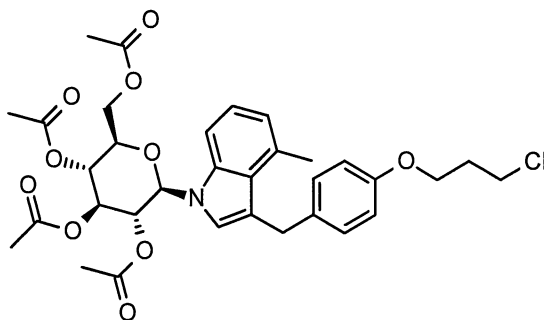
[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[(4-hydroxyphenyl)metyl]-4-metyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat



Sơ đồ III, bước D: Bổ sung amoni format (5,27mol; 332,10g) vào hỗn hợp của [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[(4-benzyloxyphenyl)methyl]-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat (1,00 đương lượng; 1,05mol; 692,80g), metanol (85,59mol; 3,46L; 2,74kg) và tetrahydrofuran (42,57mol; 3,46L; 3,07kg). Làm sạch bình phản ứng bằng nitơ và bổ sung paladi 5% trên than (69,30g; loại Johnson Matthey 87L, lượng độ ẩm 57,8%) ở dạng huyền phù đặc trong rượu isopropyl. Gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ 38 đến 42°C trong thời gian 15 phút (quan sát thấy sỏi bột vừa phải). Loại bỏ bình gia nhiệt và khuấy hỗn hợp phản ứng trong thời gian 15 phút trong khi làm lạnh. Lọc hỗn hợp qua đất diatome và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm. Phân chia phần cặn còn lại thành etyl axetat (7,5L) và nước (1L). Tách riêng lớp hữu cơ và rửa bằng nước muối, sau đó sấy khô trên MgSO_4 . Lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (594g; hiệu suất 99%) phổ khối (m/z): 568,2 (M+1) và 590,2 (M+23).

Ví dụ điều chế 15

[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[[4-(3-clopropoxy)phenyl]methyl]-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]metyl axetat

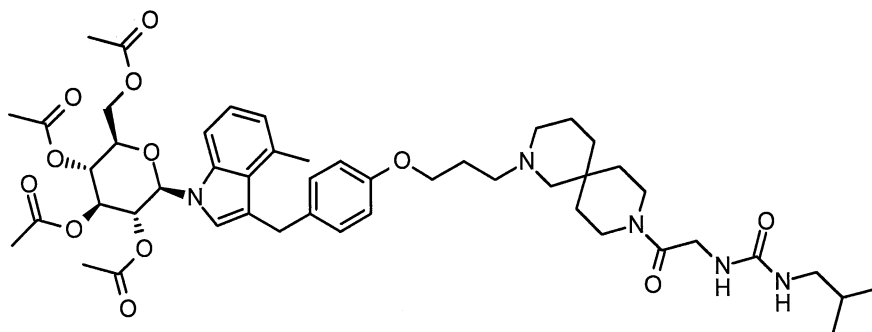


Sơ đồ III, bước E: Bổ sung 1-bromo-3-clo-propan, (180,76mmol; 17,88mL) và kali cacbonat (301,27mmol; 41,64g) vào hỗn hợp của [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tri-

axetoxy-6-[3-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]methyl axetat (150,64mmol; 85,50g) và axetonitril (855,00mL). Đặt hỗn hợp vào trong môi trường nitơ và gia nhiệt hỗn hợp để hồi lưu nhẹ nhàng trong thời gian 2 ngày. Bổ sung thêm 1-bromo-3-clo-propan, (45,19mmol; 4,47mL) và tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp trong thời gian qua đêm. Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm và phân chia phần cặn còn lại thành etyl axetat và nước. Tách riêng lớp hữu cơ và rửa bằng nước muối, sấy khô trên MgSO_4 , lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục với độ tinh khiết đầy đủ cho bước tiếp theo. (124,4g; độ tinh khiết giả định 78% và hiệu suất 100% cho mục đích tính toán trong phản ứng tiếp theo) phổ khối (m/z): 644,2/646,2 ($\text{M}+1$).

Ví dụ điều chế 16

[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[[4-[3-[9-[2-(isobutylcabamoylamino)axetyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4-yl]propoxy]phenyl]methyl]-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]methyl axetat

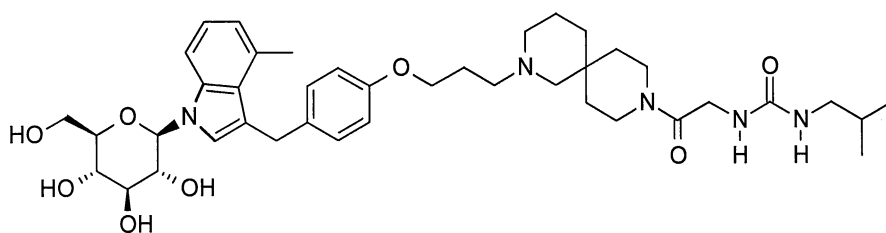


Sơ đồ III, bước F: Bổ sung 1-[2-(3,8-diazaspiro[5.5]undecan-3-yl)-2-oxo-etyl]-3-isobutyl-ure (143,38mmol; 47,35g), kali cacbonat (286,75mmol; 39,63g), và kali iodua (143,38mmol; 23,80g) vào dung dịch được khuấy chứa [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[[4-(3-clopropoxy)phenyl]methyl]-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]methyl axetat (143,38mmol; 118,40g) trong axetonitril (829mL). Gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ hồi lưu trong môi trường nitơ trong thời gian qua đêm. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và bổ sung anhydrit axit axetic (1,43mol; 135,53mL) và N,N-dimetyl-4-pyridinamin (14,34mmol; 1,75g) vào đó. Khuấy hỗn hợp trong thời gian 1 giờ. Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm và phân chia phần cặn còn lại thành nước và EtOAc. Tách riêng lớp hữu cơ và rửa bằng nước muối, sấy khô trên MgSO_4 , lọc và cô

đặc trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn còn lại được kết hợp với mẻ khác được điều chế theo cách tương tự, khởi đầu từ [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[[4-(3-clopropoxy)phenyl]methyl]-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]methyl axetat (6,2mmol). Tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silicagel (1,5kg), giải hấp bằng EtOAc:triethylamin tỷ lệ 99:1 (1cv), EtOAc (3cv's) và EtOAc:MeOH:triethylamin tỷ lệ 190:10:1 (5cv's) để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (68,2g; hiệu suất 49%) phổ khối (m/z): 918,6 (M+1).

Ví dụ 1b

Điều chế theo cách khác đối với 1-isobutyl-3-[2-[4-[3-[4-[[4-methyl-1-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydropyran-2-yl]indol-3-yl]methyl]-phenoxy]propyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-9-yl]-2-oxo-ethyl]urea



Sơ đồ III, bước G: làm lạnh hỗn hợp của [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triaxetoxy-6-[3-[[4-[3-[9-[2-(isobutylcacbamoylamino)axetyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecan-4-yl]-propoxy]phenyl]methyl]-4-methyl-indol-1-yl]tetrahydropyran-2-yl]methyl axetat (74,28mmol; 68,20g) và metanol (341,00mL) trong chậu nước đá. Bổ sung natri metoxit (111,43mmol; 6,02g) vào đó. Khuấy hỗn hợp trong thời gian 10 phút. Rót hỗn hợp vào nước (3,5L), sau đó lọc hỗn hợp. Rửa phần rắn bằng nước, sấy khô trên đá nung và sấy khô thêm trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 60°C để thu được hợp chất nêu ở phần đề mục (49,8 g, hiệu suất 89%) phổ khối (m/z): 750,6 (M+1).

Thử nghiệm về chất vận chuyển glucoza phụ thuộc natri 1 (SGLT1) và SGLT2

SGLT1 người mã hóa cho ADN bổ trợ (cDNA) (slc5a1, NM_000343) và SGLT1 chuột (slc5a1, NM_019810,4) lần lượt mua từ công ty Openbiosystems, Invitrogen và Openbiosystems. ADN bổ trợ được tách dòng thành pcDNA3.1+ để biểu hiện ở động vật có vú và is stably cấy chuyển vào các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO)-K1 sử dụng các phương thức cấy chuyển chuẩn ở động vật có vú. Dòng phụ biểu hiện SGLT của mỗi một dòng tế bào biểu hiện quá mức được chọn dựa vào tính kháng

neomycin (Geneticin, Invitrogen) và hoạt tính trong thử nghiệm hấp thu ^{14}C - α -metyl-D-glucopyranosit (^{14}C -AMG) (xem dưới đây). Tế bào biểu hiện SGLT được duy trì nhờ sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào chuẩn.

Hoạt tính SGLT được xác định là sự hấp thu ^{14}C -AMG phụ thuộc natri trong các dòng tế bào nêu trên được mô tả như sau. 100 μL môi trường nuôi cấy chứa 30000 tế bào được cấy vào mỗi một lỗ của đĩa BioCoat poly-D-lysine 96 lỗ (Becton Dickinson) và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thời gian qua đêm. Môi trường nuôi cấy được hút ra và tế bào được rửa hai lần bằng 200 μL dung dịch đệm phản ứng (140mM NaCl, 2mM KCl, 1mM CaCl_2 , MgCl_2 , và 14mM axit N-2-hydroethylpiperazin-N'-2-etansulfonic (Hepes), pH=7,5). Dung dịch đệm dư được rút ra trên khăn giấy. 35 μL dung dịch đệm phản ứng được bổ sung vào mỗi một lỗ. 5 μL dimethylsulfoxit 10% (DMSO) trong dung dịch đệm phản ứng chứa các nồng độ khác nhau của hợp chất thử nghiệm hoặc không có hợp chất nào làm đối chứng, được phân tán vào trong mỗi một lỗ. Phản ứng được khởi đầu bằng cách bổ sung 10 μL ^{14}C -AMG trong dung dịch đệm phản ứng để tạo ra nồng độ cuối bằng 4 μM . Đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 125 phút. Phản ứng được kết thúc bằng cách hút dung dịch đệm phản ứng ra và sau đó, rửa ba lần bằng 200 μL dung dịch đệm phản ứng làm lạnh bằng nước đá. Việc hút thủ công được áp dụng để bảo đảm lấy ra hết dung dịch đệm phản ứng. 10 μL NaOH 0,1N được bổ sung vào mỗi một lỗ và sau đó, 100 μL dung dịch đếm nhấp nháy Supermix (PerkinElmer) được bổ sung vào đó. Sau khi trộn kết hợp, tín hiệu nhấp nháy trên đĩa được đếm bằng dụng cụ MicroBeta (PerkinElmer). Đường cong đáp ứng 10 liều được lắp vào phương thức 4 thông số thực nghiệm sử dụng ActivityBase (ID Business Solution) để xác định nồng độ ức chế tại mức nồng độ ức chế tối đa một nửa (half-maximal inhibition - IC_{50}).

Hợp chất trong ví dụ 1 ở đây được thử nghiệm cơ bản như mô tả ở trên và thể hiện nồng độ IC_{50} đối với SGLT1 người bằng $35,2 \pm 14,1\text{nM}$ ($n=5$) và IC_{50} đối với SGLT1 chuột bằng $14,9 \pm 10,4\text{nM}$ ($n=5$). Dữ liệu này chứng tỏ rằng, hợp chất trong ví dụ 1 ức chế SGLT1 của người và chuột in vitro.

Tác dụng làm giảm glucoza trong thử nghiệm dung nạp glucoza uống (OGTT)

Hợp chất thử nghiệm được bào chế bằng cách bổ sung chất mang hydroxyethyl-xenluloza 1%, Tween® 80 0,25% trọng lượng/ chất chống tạo bọt 0,05% vào hợp chất thử nghiệm được cân trước để tạo ra dung dịch 1mg/ml. Hỗn hợp được nghiền siêu âm

đầu dò trong thời gian khoảng 1 phút. Thanh khuấy được bỏ sung, và huyền phù tạo ra được khuấy liên tục trong suốt thời gian định liều.

Hai nhóm riêng biệt gồm các chuột C57Bl/6 nuôi riêng biệt được sử dụng để chứng minh tác dụng làm giảm glucoza trong thử nghiệm OGTT. Nhóm chuột thứ nhất tiếp nhận OGTT 18 giờ sau khi sử dụng hợp chất, nhóm thứ hai 8 giờ sau khi sử dụng hợp chất. Nhóm động vật thứ nhất được cân và thể trọng được sử dụng để xác định nhóm nghiên cứu ($n=5$), nằm trong phạm vi làm việc từ 26 đến 30g. Sau khi phân nhóm, chuột được dùng theo đường miệng qua xông dạ dày với lượng 10ml/kg của chế phẩm hợp chất thử nghiệm hoặc chất mang, cứ mỗi 30 giây. Sau đó, cả hai nhóm chuột thiết đặt dùng OGTT tại 18 và 8 giờ, sau đó chuột được để nhịn ăn trong thời gian qua đêm bằng cách loại bỏ đường tiếp cận đến thức ăn, tới tận cuối chiều trước ngày thử nghiệm. Buổi sáng ngày tiếp theo, chuột sử dụng OGTT 8 giờ được cân và lấy máu (bằng cách cắt đuôi) để xác định glucoza. Các nhóm nghiên cứu ($n=5$) được xác định nhờ sử dụng các giá trị glucoza khi đói, trong phạm vi hoạt động từ 80 đến 100mg/dl. Sau khi phân nhóm, chuột được sử dụng theo đường uống qua xông dạ dày bằng hợp chất, cứ mỗi 30 giây. Sau đó, các chuột này tiếp nhận OGTT 8 giờ sau khi dùng hợp chất.

Lần lượt 8 và 18 giờ sau khi mỗi một thao tác xử lý hợp chất được khởi đầu, mẫu máu cơ sở được lấy để xác định lượng glucoza (từ động vật đầu tiên). Sau đó, động vật được sử dụng ngay liều uống bằng dextroza 50% (Hospira®) với lượng 3g/kg. Các mẫu máu được lấy để xác định glucoza, chính xác cứ mỗi 30 giây, qua tĩnh mạch đuôi, sao cho máu được tập hợp ở mỗi một động vật tại thời điểm 20, 40, và 60 phút sau khi dùng liều dextroza.

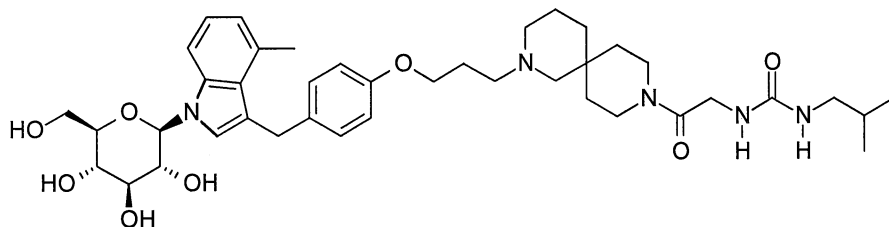
Bảng 1. Tác dụng làm giảm glucoza trong thử nghiệm OGTT

Kết quả của thử nghiệm về dung nạp glucoza uống Giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn (Mean $\pm$ SEM)				
Phương pháp phân tích phương sai một chiều/Dunnett (1 way ANOVA/Dunnett) so sánh với chất mang, **p<0,01				
	Chất mang @ 8 giờ sau phân liều	Ví dụ 1 10mg/kg @ 8 giờ sau phân liều	Chất mang @ 18 giờ sau phân liều	Ví dụ 1 10mg/kg @ 18 giờ sau phân liều
Glucoza (mg/dl)				
0 Phút	83,3 $\pm$ 5,10	75,8 $\pm$ 2,48	79 $\pm$ 1,17	79,2 $\pm$ 4,51
20 Phút	203,4 $\pm$ 23,3	114 $\pm$ 3,36**	257,8 $\pm$ 19,1	121,4 $\pm$ 5,16**
40 Phút	168,5 $\pm$ 6,58	131 $\pm$ 6,81**	202,8 $\pm$ 5,38	127 $\pm$ 9,78**
60 Phút	142,6 $\pm$ 5,58	125,8 $\pm$ 7,52	154,7 $\pm$ 5,32	125 $\pm$ 7,27**
AUC hiệu chỉnh theo đường cơ bản	4699 $\pm$ 602	2370 $\pm$ 315**	6809 $\pm$ 419	2258 $\pm$ 252**
Glucoza (mg/dl)				
Glucoza Cmax	205,7 $\pm$ 22,2	132,9 $\pm$ 6,68**	261,1 $\pm$ 16,3	134,2 $\pm$ 6,72**
Thời gian (phút)				
Glucoza Tmax	28 $\pm$ 4,9	44 $\pm$ 7,48	24 $\pm$ 4	44 $\pm$ 7,48

Như được thể hiện trong bảng 1, hợp chất trong ví dụ 1 phân phối giảm glucoza khi liều lượng lớn dextroza 50% (Hospira®) được sử dụng cho chuột C57Bl/6 glucoza huyết bình thường 8 hoặc 18 giờ sau khi dùng. Ví dụ 1 cũng chứng minh rằng, có sự giảm ở vùng dưới đường cong (AUC) về glucoza hiệu chỉnh theo đường cơ sở trong cả hai nhóm OGTT. Ngoài ra, ví dụ 1 làm giảm nồng độ tối đa trung bình của glucoza huyết tương (Cmax) trong các nhóm OGTT trong khi làm tăng thời gian trung bình mà nó hấp thu glucoza để đạt tới nồng độ tối đa (Tmax).

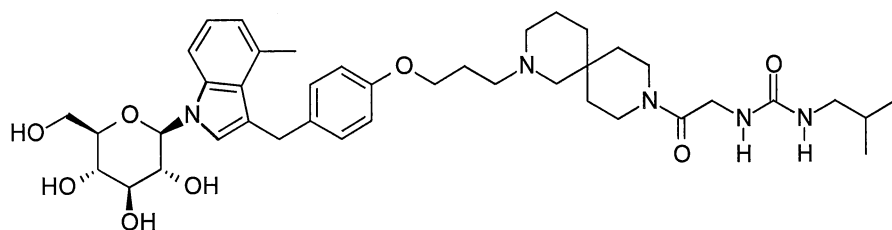
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



hoặc muối được dụng của hợp chất này.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là:



3. Dược phẩm chứa hợp chất hoặc muối theo điểm 1 hoặc điểm 2 cùng với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.