



(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)



1-0035837

(51)^{2019.01} C07D 417/14; A61P 25/28; A61K
31/445; A61P 25/00

(13) B

(21) 1-2019-04248

(22) 19/01/2018

(86) PCT/US2018/014331 19/01/2018

(87) WO2018/140299 02/08/2018

(30) 62/451,137 27/01/2017 US

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/10/2019 379A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

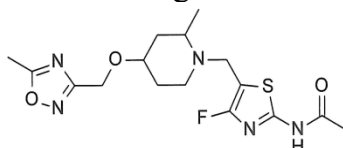
Lilly Corporate Center Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) DREYFUS, Nicolas Jacques Francois (FR); LINDSAY-SCOTT, Peter James (GB).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT N-[4-FLO-5[[[(2S,4S)-2-METYL-4-[(5-METYL-1,2,4-OXADIAZOL-3-
YL)METOXY]-1-PIPERIDYL]METYL]THIAZOL-2-YL]AXETAMIT LÀM
CHẤT ỨC CHẾ O-GLCNACAZA (OGA), DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT
NÀY VÀ QUY TRÌNH BÀO CHẾ DƯỢC PHẨM NÀY

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



Công thức I

hoặc muối dược dụng của nó. Các hợp chất có công thức I này có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn và các bệnh thoái hóa thần kinh, như bệnh Alzheimer. Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa hợp chất này và quy trình bào chế dược phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất 5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl và các dược phẩm chứa các hợp chất này. Các hợp chất này có thể sử dụng để điều trị các rối loạn sinh lý. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình bào chế dược phẩm này.

Sáng chế thuộc lĩnh vực điều trị bệnh Alzheimer, bệnh liệt trên nhân tiến triển (Progressive Supranuclear Palsy - PSP) và các bệnh và các rối loạn khác liên quan đến chứng thoái hóa thần kinh do tau làm trung gian, gọi chung là các bệnh lý tau.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Alzheimer là rối loạn thoái hóa thần kinh hủy hoại, nó ảnh hưởng đến hàng triệu bệnh nhân trên toàn thế giới. Xem xét các chất được phê chuẩn gần đây trên thị trường mà chỉ có lợi nhất thời, về mặt triệu chứng đối với bệnh nhân thấy rằng đang có nhu cầu đáng kể, chưa được đáp ứng trong việc điều trị bệnh Alzheimer.

Sự oligome hóa protein tau kết hợp với vi cấu trúc hình ống thành các cấu trúc dạng sợi như các cặp sợi xoắn (Paired Helical Filament - PHF) và các sợi thẳng hoặc bện lại, chúng tạo ra các đám rối sợi thần kinh (neurofibrillary tangle - NFT) và các sợi vùng kết thần kinh (Neuropil Threads - NT), là một trong số các dấu hiệu bệnh lý xác định bệnh Alzheimer và các bệnh lý tau khác. Đã thấy rằng số lượng NFT trong não của các đối tượng mắc bệnh Alzheimer có liên quan chặt chẽ với mức nghiêm trọng của bệnh, cho thấy rằng tau có vai trò quan trọng trong chứng loạn chức năng thần kinh và chứng thoái hóa thần kinh (Nelson et al., *J Neuropathol Exp Neurol.*, **71**(5), 362-381(2012)). Đã thấy rằng bệnh lý tau có liên quan đến khoảng thời gian mắc bệnh ở PSP; những ca mà bệnh trầm trọng nhanh hơn có mức tau cao hơn những ca có tiến trình bệnh chậm hơn. (Williams et al., *Brain*, **130**, 1566-76 (2007)).

Các nghiên cứu gần đây (Yuzwa et al., *Nat Chem Biol*, **4**(8), 483-490 (2008)) cũng cung cấp thông tin hỗ trợ nhận định rằng các chất ức chế *O-GlcNAcase* (OGA) có

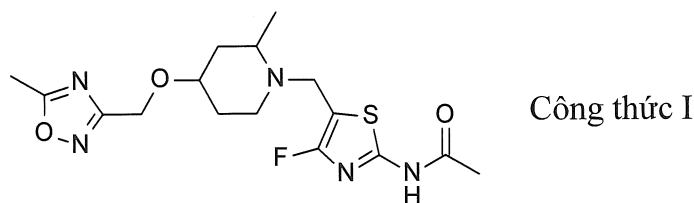
khả năng chữa bệnh bằng việc hạn chế sự phosphoryl tau quá mức và kết tụ thành tau bệnh lý trong điều trị bệnh Alzheimer và các rối loạn thoái hóa thần kinh do tau làm trung gian có liên quan. Cụ thể là, chất ức chế OGA Thiamet-G có liên quan đến việc làm chậm sự mất tế bào thần kinh vận động ở mẫu chuột JNPL3 tau (Yuzwa et al., *Nat Chem Biol*, **8**, 393-399 (2012)) và đến việc giảm bệnh lý tau và các sợi trục loạn dưỡng ở mẫu chuột Tg4510 tau (Graham et al., *Neuropharmacology*, **79**, 307-313 (2014)). Do đó, các chất ức chế OGA được công nhận là phương thức chữa bệnh có hiệu quả để làm giảm sự tích tụ các dạng tau được phosphoryl hóa quá mức, bệnh lý, như các NFT và các NT.

Patent Mỹ số 9,120,781 bộc lộ các dẫn xuất hexahydrobenzooxazol và hexahydrobenzothiazol, chúng có hoạt tính ức chế OGA và cũng được bộc lộ rằng chúng hữu dụng trong điều trị các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự thiếu hụt hoặc biểu hiện quá mức OGA, và/hoặc sự tích tụ hoặc thiếu hụt 2-axetamido-2-deoxy-5 β -D-glucopyranosit (*O-GlcNAc*). Ngoài ra, US 2016/0031871 bộc lộ một số chất ức chế glycosidaza để điều trị bệnh Alzheimer.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

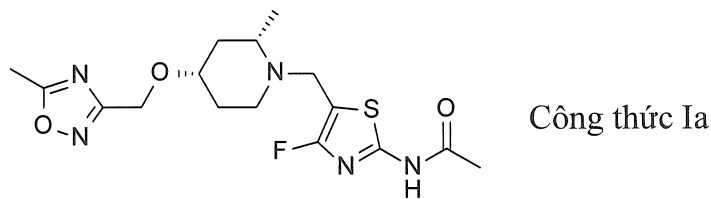
Các chất ức chế OGA mà thẩm qua não được ưu tiên trong điều trị các rối loạn thoái hóa thần kinh do tau làm trung gian, như bệnh Alzheimer và PSP. Sáng chế đề xuất một số hợp chất, là các chất ức chế OGA.

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



hoặc muối dược dụng của nó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức Ia:



hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh Alzheimer cho bệnh nhân cần điều trị này, bao gồm việc cung cấp cho bệnh nhân một lượng hữu hiệu hợp chất có các công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị sự tiến triển của chứng suy giảm nhận thức nhẹ thành bệnh Alzheimer cho bệnh nhân cần điều trị này, bao gồm việc cung cấp cho bệnh nhân một lượng hữu hiệu hợp chất có các công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh liệt trên nhân tiến triển cho bệnh nhân cần điều trị này, bao gồm việc cung cấp cho bệnh nhân một lượng hữu hiệu hợp chất có các công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị các rối loạn thoái hóa thần kinh do tau làm trung gian cho bệnh nhân, bao gồm việc cung cấp cho bệnh nhân cần điều trị này một lượng hữu hiệu hợp chất có các công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất có các công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó để dùng trong trị liệu, đặc biệt là để sử dụng trong điều trị bệnh Alzheimer hoặc để sử dụng trong phòng ngừa sự tiến triển của chứng suy giảm nhận thức nhẹ thành bệnh Alzheimer. Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất có các công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị bệnh liệt trên nhân tiến triển. Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có các công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị các rối loạn thoái hóa thần kinh do tau làm trung gian.

Hơn nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có các công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh Alzheimer hoặc để phòng ngừa sự tiến triển của chứng suy giảm nhận thức nhẹ thành bệnh Alzheimer. Ngoài ra, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có các công thức I hoặc Ia, hoặc muối

được dụng của nó, để sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh liệt trên nhân tiền triển. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng hợp chất có các công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc dùng để điều trị các rối loạn thoái hóa thần kinh do tau làm trung gian.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm, chứa hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó, cùng với một hoặc nhiều tá được, chất pha loãng, hoặc chất mang được dụng. Sáng chế cũng đề xuất quy trình bào chế được phẩm, bao gồm việc trộn lẫn hợp chất có công thức I hoặc Ia, hoặc muối được dụng của nó, với một hoặc nhiều tá được, chất pha loãng, hoặc chất mang được dụng. Phạm vi của sáng chế còn bao hàm các quy trình và các hợp chất trung gian dùng trong việc tổng hợp các hợp chất có công thức I và Ia.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chứng suy giảm nhận thức nhẹ được định nghĩa là giai đoạn tiền triệu chứng tiềm tàng của chứng sa sút trí tuệ đi kèm với bệnh Alzheimer dựa vào biểu hiện lâm sàng và dựa vào sự tiến triển ở các bệnh nhân có biểu hiện chuyển chứng suy giảm nhận thức nhẹ thành chứng sa sút trí tuệ kiểu Alzheimer theo thời gian. Thuật ngữ “ngăn ngừa sự tiến triển của chứng suy giảm nhận thức nhẹ thành bệnh Alzheimer” được dùng để chỉ việc hạn chế, làm chậm, làm ngừng lại, hoặc làm đảo ngược sự tiến triển của chứng suy giảm nhận thức nhẹ thành bệnh Alzheimer ở bệnh nhân.

Như được sử dụng trong bản mô tả, các thuật ngữ “điều trị” hoặc “để điều trị” được dùng để chỉ việc hạn chế, làm chậm, làm ngừng lại, hoặc làm đảo ngược sự tiến triển hoặc mức trầm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn đã mắc.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bệnh nhân" được dùng để chỉ người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được dùng để chỉ lượng hoặc liều của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó mà, khi cho bệnh nhân dùng liều đơn hoặc đa liều, tạo ra hiệu quả mong muốn ở bệnh nhân được chẩn đoán hoặc điều trị.

Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan

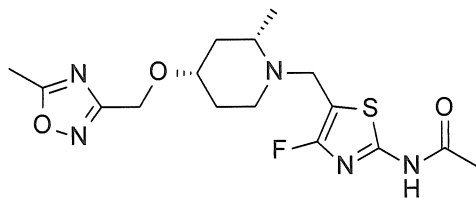
sát kết quả thu được từ những trường hợp tương tự. Khi xác định lượng có hiệu quả cho một bệnh nhân, nhiều yếu tố được cân nhắc bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi: loại bệnh nhân; kích thước, tuổi tác và sức khỏe chung của bệnh nhân; bệnh hoặc rối loạn cụ thể liên quan; mức độ hoặc sự liên quan hoặc mức trầm trọng của bệnh hoặc rối loạn; đáp ứng của từng bệnh nhân; hợp chất cụ thể được sử dụng; phương thức sử dụng; các đặc trưng sinh khả dụng của chế phẩm được sử dụng; phác đồ liều lượng lựa chọn; việc sử dụng thuốc đồng thời; và các yếu tố liên quan khác.

Các hợp chất theo sáng chế nhìn chung có hiệu quả trong một phạm vi liều lượng rộng. Chẳng hạn, liều mỗi ngày thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 15 mg/kg thể trọng. Trong một số trường hợp, mức liều dưới giới hạn dưới của các khoảng nêu trên có thể đã quá đủ, trong khi đó trong một số trường hợp khác, liều lớn hơn vẫn có thể được sử dụng với các tác dụng phụ chấp nhận được, và do đó khoảng liều lượng nêu trên không được dự định để giới hạn phạm vi theo sáng chế theo cách bất kỳ.

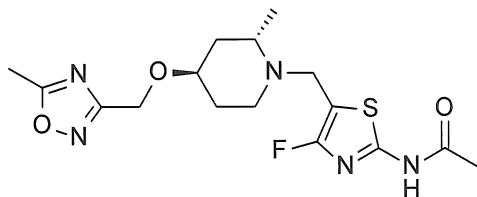
Tốt hơn nếu các hợp chất của sáng chế được bào chế ở dạng dược phẩm để dùng theo đường bất kỳ mà làm cho hợp chất này sinh khả dụng, gồm cả đường miệng và đường qua da. Tốt nhất nếu các dược phẩm này để sử dụng qua đường miệng. Các dược phẩm như vậy và các quy trình bào chế chúng là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (Xem, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, L.V. Allen, Editor, 22nd Edition, Pharmaceutical Press, 2012).

Các hợp chất có các công thức I và Ia, hoặc các muối dược dụng của chúng là đặc biệt hữu dụng trong các phương pháp điều trị của sáng chế, nhưng một số cấu hình là được ưu tiên. Các đoạn dưới đây mô tả các cấu hình được ưu tiên này. Cần hiểu rằng các phương án ưu tiên áp dụng được cho cả các phương pháp điều trị và các hợp chất theo sáng chế.

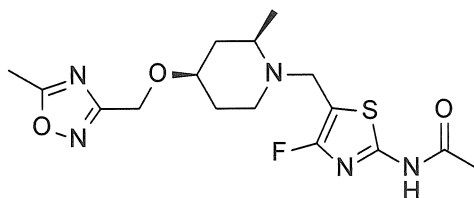
Các hợp chất khác của sáng chế gồm:



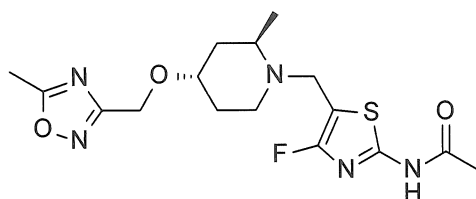
Công thức Ia



Công thức Ib



Công thức Ic



Công thức Id

và muối được dụng của nó.

Hợp chất có công thức I, trong đó các phần tử thay thế methyl và oxy ở vòng piperidin có cấu hình *cis* hoặc *trans*, hoặc muối được dụng của nó, được bao hàm trong phạm vi của sáng chế, với cấu hình *cis* là được ưu tiên. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ thấy rằng methyl ở vị trí 2 có cấu hình tương đối *cis* đối với oxy ở vị trí 4 như thể hiện trong sơ đồ A dưới đây:

N-[4-flu-5-[[[(2S,4S)-2-methyl-4-[(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-1-piperidyl]methyl]thiazol-2-yl]acetamid, và các muối được dụng của chúng; và

N-[4-flu-5-[[[(2S,4S)-2-methyl-4-[(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-1-piperidyl]methyl]thiazol-2-yl]acetamid đặc biệt được ưu tiên.

Dạng tinh thể của N-[4-flu-5-[[[(2S,4S)-2-methyl-4-[(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-1-piperidyl]methyl]thiazol-2-yl]acetamid đặc biệt được ưu tiên. Dạng tinh thể của N-[4-flu-5-[[[(2S,4S)-2-methyl-4-[(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-1-piperidyl]methyl]thiazol-2-yl]acetamid mà được đặc trưng bởi một đỉnh trong phổ nhiễu xạ bột tia X ở góc nhiễu xạ 2-theta là $12,1^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm bao gồm $15,3^\circ$, $21,6^\circ$, $22,2^\circ$, $22,7^\circ$, $23,5^\circ$, $24,3^\circ$, và $26,8^\circ$, với dung sai đối với các góc nhiễu xạ là 0,2 độ, cũng được ưu tiên.

Các chất đồng phân không đối quang, các chất đồng phân đối ảnh, và các chất đồng phân riêng rẽ có thể được tách hoặc phân giải bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này vào thời điểm phù hợp bất kỳ trong quá trình tổng hợp các hợp chất của sáng chế, theo các phương pháp như phương pháp kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký bất đối (xin xem ví dụ, J. Jacques, *et al.*, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, và E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994).

Muối được dụng của các hợp chất theo sáng chế có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách cho bazơ tự do thích hợp của hợp chất theo sáng chế phản ứng với axit được dụng thích hợp trong dung môi thích hợp trong điều kiện tiêu chuẩn đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sự tạo ra các muối này đã được biết rõ và được hiểu rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem trong tài liệu Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, **33**: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*, **4**: 427-435 (2000); và Berge, S.M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **66**: 1-19, (1977).

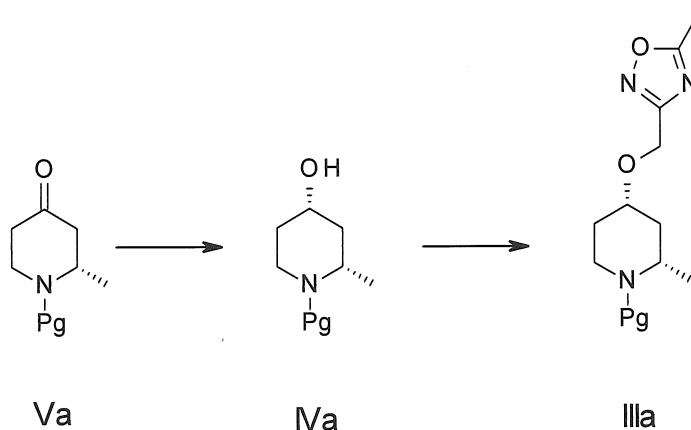
Các hợp chất của sáng chế, hoặc các muối của chúng, có thể được điều chế theo nhiều quy trình khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, một số quy trình trong số các quy trình này được minh họa trong các sơ

đồ, Ví dụ điều chế và các ví dụ dưới đây. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng các bước tổng hợp cụ thể đối với mỗi quy trình được mô tả có thể được kết hợp theo các cách khác nhau, hoặc cùng với các bước từ các sơ đồ khác, để điều chế các hợp chất theo sáng chế, hoặc các muối của chúng. Các sản phẩm của từng bước trong các sơ đồ dưới đây có thể được thu hồi theo các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm chiết, làm bay hơi, tạo kết tủa, sắc ký, lọc, nghiền tinh chế, và kết tinh. Trong các sơ đồ dưới đây, tất cả các phần tử thay thế, trừ khi có quy định khác, là như được định nghĩa ở trên. Các chất phản ứng và các nguyên liệu ban đầu đều sẵn có đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các sơ đồ, các quá trình điều chế và các ví dụ dưới đây được nêu ra nhằm minh họa cho sáng chế và không làm giới hạn phạm vi theo sáng chế. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ thấy rằng các hợp chất có các công thức Ia, Ib, Ic, và Id có thể được điều chế bằng cách sử dụng nguyên liệu ban đầu có cấu hình lập thể hóa học tương ứng mà chúng có thể được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các sơ đồ dưới đây sử dụng các nguyên liệu ban đầu có cấu hình cuối cùng là tương ứng với công thức Ia.

Nói chung, hợp chất có công thức Ia có thể được điều chế từ hợp chất có công thức II (sơ đồ 1). Cụ thể hơn, hợp chất có công thức IIa được alkyl hóa khử bằng N-(4-flo-5-formylthiazol-2-yl)axetamit với sự có mặt của tác nhân khử thích hợp như natri triaxetoxymethylborohydrua trong dung môi thích hợp để tạo ra hợp chất có công thức Ia trong dung môi thích hợp, như etyl axetat. N-(4-flo-5-formylthiazol-2-yl)axetamit có thể được điều chế theo các phương pháp đã biết trong các lĩnh vực kỹ thuật hóa học cũng như các phương pháp được nêu trong các ví dụ và các Ví dụ điều chế dưới đây.

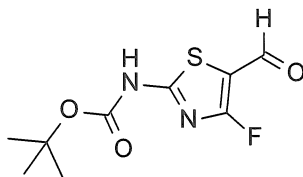
Hợp chất có công thức IIa có thể được điều chế từ hợp chất có công thức IIIa, trong đó Pg là nhóm bảo vệ amin thích hợp. Cụ thể hơn, cho hợp chất có công thức IIa, trong đó Pg là tert-butyl carboxylat (t-BOC) phản ứng với axit như axit clohydric hoặc axit trifloaxetic trong dung môi thích hợp như dioxan hoặc diclometan để tạo ra hợp chất có công thức IIa. Các nhóm bảo vệ amin thích hợp là đã biết trong các lĩnh vực kỹ thuật hóa học và gồm t-BOC và Cbz cũng như các nhóm được trình bày trong T. W. Green, P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis" Wiley-Interscience, New York, 1999.

Sơ đồ 2



Quy trình điều chế 1

Tổng hợp tert-butyl N-(4-flu-5-formyl-thiazol-2-yl)carbamate.

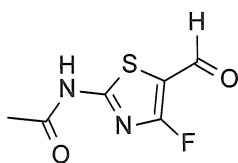


Cho xesi florua (227 g, 1480 mmol) vào dung dịch tert-butyl N-(4-clo-5-formyl-thiazol-2-yl)carbamate (38,8 g, 148 mmol; để điều chế tert-butyl N-(4-clo-5-formyl-thiazol-2-yl)carbamate, xem, ví dụ N. Masuda, et al., *Bioorg Med Chem*, **12**, 6171-6182 (2004)) trong DMSO (776 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong khối gia nhiệt 145 °C có nhiệt độ bên trong là 133 °C trong 48 giờ, sau đó làm lạnh hỗn hợp trong bể đá-nước. Cho dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (500 mL), nước muối (500 mL) và etyl axetat (500 mL) vào hỗn hợp. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, sau đó lọc qua đất diatomit, rửa bằng etyl axetat (500 mL). Chuyển dịch lọc vào phễu tách và tách các lớp, sau đó chiết lớp nước bằng etyl axetat (1 L). Rửa các dịch chiết hữu cơ thu gom được bằng nước muối (1 L), sau đó chiết lớp nước muối bằng etyl axetat (300 mL). Làm khô các dịch chiết hữu cơ thu gom được trên natri sulfat, lọc và cô đặc, thu được một cặn. Cho cặn này qua đệm silica gel (330 g), rửa giải bằng 5% etyl axetat trong diclometan (1,5 L) và cô đặc dịch lọc, thu được một cặn (24,2 g).

Hòa tan cặn này (32,7 g thu gom từ các mẻ, 133 mmol) trong isopropanol (303 mL), lọc và sau đó tinh chế bằng SFC (Supercritical Fluid Chromatography - Sắc ký lỏng siêu tới hạn), sử dụng cột IC (dẫn xuất xenluloza polysacarit: tris (3,5-diclophenylcarbamate, 30 x 250mm, 5 μ) với 10% IPA (không bổ sung chất) ở tốc độ 180 mL/phút với những lần phun 3 mL. Cô đặc các phân đoạn chứa sản phẩm, thu được hợp chất nêu ở đề mục này (16,1 g. MS m/z 247,0 (M+H).

Quy trình điều chế 2

Tổng hợp N-(4-flo-5-formyl-thiazol-2-yl)axetamit (Phương pháp A)



Trong một bình có vỏ bọc, cho một lần kẽm bromua (91,9 g, 408 mmol) vào hỗn hợp tert-butyl N-(4-flo-5-formyl-thiazol-2-yl)carbamate (33,5 g, 136 mmol) và diclometan (503 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ bên trong là 37 °C, sau đó đặt nhiệt độ vỏ bọc ở -10 °C và cho nhỏ giọt tetrahydrofuran (111 mL) vào trong 15 phút, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 6 °C. Sau đó, đặt nhiệt độ vỏ bọc ở -30 °C và cho nhỏ giọt pyridin (110 mL, 1360 mmol) vào trong 5 phút, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 5 °C. Đặt nhiệt độ vỏ bọc ở 0 °C và cho nhỏ giọt anhydrua axetic (116 mL, 1220 mmol) vào trong 5 phút. Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ bên trong là 37 °C, sau đó làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng và cho qua đệm mỏng đất diatomit, rửa giải bằng tetrahydrofuran (500 mL). Chuyển dịch lọc vào một bình và cô đặc hỗn hợp, thu được một cặn, mà được cô đặc từ toluen (50 mL). Cho dung dịch axit xitric monohydrat (57,2 g, 272 mmol) trong nước (400 mL) và 2-metyltetrahydrofuran (400 mL) vào phần cặn và khuấy hỗn hợp ở 40 °C trong 5 phút, sau đó cho qua đệm mỏng đất diatomit, rửa giải bằng 2-metyltetrahydrofuran (100 mL). Chuyển dịch lọc vào phễu tách và tách các lớp. Chiết lớp nước bằng 2-metyltetrahydrofuran (2 x 250 mL) và pha loãng các lớp hữu cơ thu gom được bằng nước (500 mL). Cho từng phần natri bicacbonat rắn vào hỗn hợp trong 5 phút có khuấy cho đến khi ngừng giải phóng khí. Chuyển hỗn hợp vào phễu tách và tách các lớp, sau đó chiết lớp nước bằng 2-metyltetrahydrofuran (200 mL và 100 mL). Làm khô các dịch

chiết hữu cơ thu gom được trên natri sulfat, lọc và cô đặc, thu được một cặn, cặn này được pha loãng bằng 2-metyltetrahydrofuran (100 mL) và cho hỗn hợp qua đệm mỏng silica gel (250 g), rửa giải bằng 2-metyltetrahydrofuran (2,5 L). Cô đặc dịch lọc, thu được một cặn, cặn này được tạo huyền phù trong hỗn hợp 1:1 của diclometan và heptan (202 mL). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút và sau đó lọc. Làm khô chất rắn lọc được bằng áp suất chân không ở 40 °C trong 2 giờ, thu được hợp chất nêu ở đề mục này (18,0 g, 70%). MS m/z 189,0 (M+H).

Quy trình khác để tổng hợp N-(4-flo-5-formyl-thiazol-2-yl)axetamit (Phương pháp B).

Cho diclometan (1325g, 15,6 mol) vào 2-amino-4-clothiazol-5-carbaldehyt (100g, 0,61 mol) và pyridin (194,6 g, 2,46 mol), và làm lạnh xuống 0-5°C. Cho nhỏ giọt anhydrua axetic (188,4 g, 1,85 mol) vào, duy trì nhiệt độ ở 0-5 °C. Sau khi bổ sung xong, điều chỉnh nhiệt độ đến 20-25 °C và khuấy trong 41 giờ. Cô đặc bằng áp suất thấp, sau đó bổ sung HCl 35% trong nước (200 mL) và nước (1,5 L), duy trì nhiệt độ ở thấp hơn 40°C. Làm lạnh xuống 20-25 °C và khuấy trong 18 giờ. Lọc hỗn hợp và rửa chất rắn thu được bằng nước. Làm khô các chất rắn này ở 60-65 °C trong 24 giờ, thu được N-(4-clo-5-formylthiazol-2-yl)axetamit (75 g, 0,4 mol).

Trong khí quyển trơ, cho sulfolan (1000 ml) vào N-(4-clo-5-formylthiazol-2-yl)axetamit (50 g, 0,244 mol, được điều chế trực tiếp trên đây), tetrametylamoni clorua (107,1 g, 0,977 mol), và xesi florua (370,6 g, 2,44 mmol). Gia nhiệt đến 130 °C và khuấy trong 23 giờ. Phân tích HPLC cho thấy chuyển hóa 75% với hiệu suất *in situ* là 45% hợp chất nêu ở đề mục này.

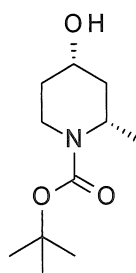
Quy trình khác để tổng hợp N-(4-flo-5-formyl-thiazol-2-yl)axetamit (Phương pháp C).

Cho 2-propanol (150 mL) vào tetrametylamoni florua.tetrahydrat (10,2 g, 109,0 mmol) và cô đặc hỗn hợp còn 2-3 thể tích bằng áp suất chân không với nhiệt độ bên trong được duy trì ở 70 °C để loại bỏ nước. Cho 2-propanol (200mL) vào và cô đặc hỗn hợp còn 2-3 thể tích bằng áp suất chân không. Lặp lại thêm hai lần. Cho DMF (200mL) vào và cô đặc còn 2-3 thể tích bằng áp suất chân không. Cho THF (200 mL) vào và cô đặc còn 2-3 thể tích. Lặp lại thêm hai lần. Nạp N-(4-clo-5-formylthiazol-2-yl)axetamit (1,22 g, 5,96 mmol, được điều chế ở trên theo Phương pháp B) và DMF (12 ml) vào. Gia nhiệt đến 110 °C và khuấy trong 12 giờ. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống 25 °C.

Cho 2-metyltetrahydrofuran (40 mL) và nước (40 mL) vào. Tách các lớp và chiết lớp nước bằng 2-metyltetrahydrofuran (40 mL). Tách các lớp và rửa các lớp hữu cơ thu gom được bằng nước (20 mL). Tách các lớp và cô đặc lớp hữu cơ. Cho etyl axetat (20 mL) và nước (5 mL) vào. Tách các lớp và cô đặc lớp hữu cơ để loại bỏ dung môi. Cho etyl axetat (2mL) và heptan (2 mL) vào và lọc. Làm khô chất rắn lọc được bằng áp suất chân không ở 55 °C trong 18 giờ, thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng hỗn hợp 93% với N-(4-clo-5-formylthiazol-2-yl)axetamit.

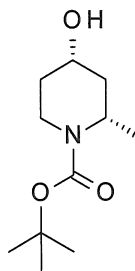
Quy trình điều chế 3

Tổng hợp tert-butyl (2S,4S)-4-hydroxy-2-metyl-piperidin-1-carboxylat.



Cho tert-butyl (2S)-2-metyl-4-oxo-piperidin-1-carboxylat (50g, 234,44 mmol) và tetrahydrofuran (500 mL) vào một bình. Làm lạnh hỗn hợp xuống -65°C trong khí quyển nitơ và cho nhỏ giọt lithi tri(sec-butyl)borohydrua (304,77 mL, 304,77 mmol; 1 M trong tetrahydrofuran) vào trong 45 phút, duy trì nhiệt độ bên trong dưới -60°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, sau đó làm lạnh xuống -30°C. Cho hỗn hợp nước (25,34 mL) và tetrahydrofuran (100,16 mL) vào hỗn hợp phản ứng, duy trì nhiệt độ bên trong dưới -20 °C. Cho nhỏ giọt dung dịch nước hydro peroxit (118,88 mL, 1,17 mol, 30% khối lượng/khối lượng) trong nước (126,70 mL) vào trong 1 giờ, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 10°C. Cho dung dịch nước hydro clorua (46,89 mL, 234,44 mmol, 5 M) và metyl t-butyl ete (1,00 L) vào hỗn hợp và làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ trong phòng. Tách các lớp và khuấy pha hữu cơ với dung dịch natri metabisulfít (222,84 g, 1,17 mol) trong nước (500 mL) trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tách các lớp và làm khô pha hữu cơ trên magie sulfat và cô đặc. Tinh chế phân cận bằng sắc ký nhanh (0-50 % metyl t-butyl ete /isohexan, silica gel) và thu gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc, thu được hợp chất nêu ở đề mục này (40,4 g, 78%). ES/MS (m/e) 238 (M+Na).

Quy trình khác để tổng hợp tert-butyl (2S,4S)-4-hydroxy-2-metyl-piperidin-1-carboxylat.

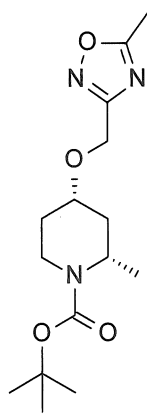


Nạp DMSO (27,4 kg, 1,0 thể tích) và D-(+)-glucoza monohydrat (28,9 kg, 1,25 đương lượng) vào thiết bị phản ứng được lót thủy tinh chứa nước được khử ion (460 L), và kali dihydro phosphat (6,5 kg, 0,41 đương lượng) ở 20 °C. Điều chỉnh nhiệt độ bên trong đến 30 °C, và điều chỉnh độ pH của hỗn hợp phản ứng đến 6,9 bằng cách bổ sung natri hydroxit trong nước (8%, 15 L, 0,28 đương lượng). Nạp tert-butyl (2S)-2-metyl-4-oxo-piperidin-1-carboxylat (24,9 kg, 1,0 đương lượng (99,1%ee)) vào thiết bị phản ứng, và khuấy hỗn hợp ở 30 °C trong 15 phút. Cho trực tiếp ketoreductaza (KRED-130, 250g, 1% khối lượng/khối lượng), glucoza dehydrogenaza (GDH-101, 250 g, 1% khối lượng/khối lượng), và muối NADP natri (63 g, 0,25% khối lượng/khối lượng) vào hỗn hợp phản ứng qua lỗ hở. Duy trì nhiệt độ của hỗn hợp ở 30 °C và độ pH = 7,0 ± 0,2 bằng cách bổ sung NaHCO₃ 8% trong nước. Sau khi khuấy trong 16,5 giờ (mức chuyển hóa là 99,5%), nạp Celite™ (12,5 kg, 50% khối lượng/khối lượng) và toluen (125 L, 5 thể tích) vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi khuấy trong 30 phút ở 30 °C, chuyển hỗn hợp vào thiết bị phản ứng 2000 L khác bằng lọc GAF nối tiếp (4 miếng) trong khoảng thời gian 1 giờ. Để yên hỗn hợp trong 30 phút không khuấy, tách các lớp, và chiết lại lớp nước bằng toluen (2 x 125 L). Lọc các lớp hữu cơ thu gom được (lọc GAF nối tiếp), và rửa hỗn hợp toluen bằng dung dịch natri clorua trong nước (25%, 125 L, 5 thể tích) ở 25 °C. Làm khô bằng dung dịch toluen thu được (mức chân không một phần, nhiệt độ bên trong < 60 °C) đến 0,10% khối lượng/khối lượng nước, và làm lạnh xuống 20 °C. Lọc hỗn hợp phản ứng từ thiết bị phản ứng qua thiết bị lọc hình ống vào các trống sạch trong khí quyển nitơ áp suất dương. Sau đó, chuyển hỗn hợp phản ứng từ các trống vào bình 500 L có lót thủy tinh và cô đặc bằng áp suất chân không (< 60 °C) đến thể tích cạn đích là 56 L (2,25 thể tích). Cho n-heptan (169 kg, 10 thể tích) vào ở 40 °C, và tạo mầm cho

dung dịch bằng 25 g tert-butyl (2S,4S)-4-hydroxy-2-metyl-piperidin-1-carboxylat. Pha loãng dung dịch huyền phù đặc thu được bằng n-heptan (25 L, 1 thể tích) và làm lạnh xuống 16°C trong 4 giờ. Tách sản phẩm bằng cách quay ly tâm, rửa bằng n-heptan (25 L mỗi lần quay; cần 4 lần quay), thu được 20,3 kg (81%; >99,9% ee) sau khi làm khô trong 11 giờ trong thiết bị làm khô dạng khay ở 30 °C. ES/MS (m/e) 238 (M+Na).

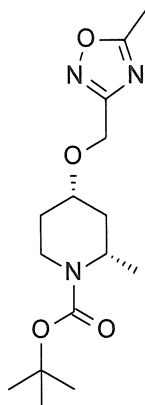
Quy trình điều chế 4

Tổng hợp tert-butyl (2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]piperidin-1-carboxylat.



Cho 3-(clometyl)-5-metyl-1,2,4-oxadiazol (43,5 g, 301 mmol) vào dung dịch tert-butyl (2S,4S)-4-hydroxy-2-metyl-piperidin-1-carboxylat (29,5 g, 137 mmol) trong axetonitril (590 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong bể đá-nước và cho từng phần natri tert-butoxit (54,3 g, 548 mmol) vào trong 10 phút, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 10°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong bể đá-nước ở nhiệt độ bên trong là 5°C trong 9 giờ, sau đó từ từ làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng trong bể đá-nước và cho dung dịch amoni clorua bão hòa trong nước (200 mL) vào trong 5 phút, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 10°C trong quá trình bổ sung. Sau đó, pha loãng hỗn hợp bằng nước (100 mL) và làm ấm đến nhiệt độ trong phòng. Chiết hỗn hợp bằng metyl tert-butyl ete (2 × 300 mL) và rửa các dịch chiết hữu cơ thu gom được bằng nước muối (300 mL). Làm khô các dịch chiết hữu cơ thu gom được trên natri sulfat, lọc và cô đặc, thu được một cặn. Cho phần cặn này qua nhanh đệm silicagel (300 g), rửa giải bằng metyl tert-butyl ete (1 L) và cô đặc dịch lọc, thu được hợp chất nêu ở đề mục này (46,5 g, 109%). MS m/z 334,0 (M+Na).

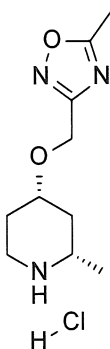
Quy trình khác để tổng hợp tert-butyl (2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]piperidin-1-carboxylat.



Cho từng phần natri tert-butoxit (0,35 g, 3,5mmol) vào dung dịch tert-butyl (2S,4S)-4-hydroxy-2-metyl-piperidin-1-carboxylat (0,25g, 1,16 mmol) và 3-(clometyl)-5-metyl-1,2,4-oxadiazol (0,308g, 2,32 mmol) trong N,N-dimetylformamit (3mL) trong nitơ ở 0 °C trong 5 phút. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, sau đó ở 40 °C trong 12 giờ. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng, sau đó ngừng phản ứng bằng nước (10mL). Tách các lớp và chiết pha nước bằng metyl tert-butyl ete (2×10mL). Rửa các dịch chiết hữu cơ thu gom được bằng dung dịch lithi clorua trong nước (5%), làm khô trên magie sulfat, lọc và cô đặc bằng áp suất thấp, thu được hợp chất nêu ở đề mục này (0,49 g, 0,7 mmol, hiệu suất 81%, độ tinh khiết 60%) ở dạng dầu màu nâu. MS m/z 334,0 (M+Na).

Quy trình điều chế 5

Tổng hợp 5-metyl-3-[[[(2S,4S)-2-metyl-4-piperidyl]oxymetyl]-1,2,4-oxadiazol hydroclorua.



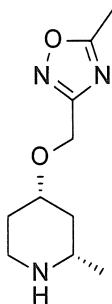
Dìm bình chứa tert-butyl (2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]piperidin-1-carboxylat (4,03 g, 12,9 mmol) trong bể đá-nước. Cho nhỏ giọt dung dịch axit clohydric 4 M trong 1,4-dioxan (25,9 mL, 104 mmol) vào bình này trong 5 phút có khuấy, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 20 °C trong quá trình bổ sung. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, sau đó cô đặc, thu được hợp chất nêu ở đề mục này (3,56 g, hiệu suất 92% trên cơ sở độ tinh khiết 83% như được xác định bởi ^1H NMR. MS m/z 212,0 (M+H).

Quy trình khác để tổng hợp 5-metyl-3-[[[(2S,4S)-2-metyl-4-piperidyl]oxymetyl]-1,2,4-oxadiazol hydroclorua.

Cho metanol (50 mL) vào tert-butyl (2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]piperidin-1-carboxylat (12,9 g, 0,041 mol). Làm lạnh hỗn hợp xuống 0 °C. Cho nhỏ giọt dung dịch axit clohydric 4M trong metanol (80 mL) vào hỗn hợp được làm lạnh này, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 20 °C. Sau đó, khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Sau đó, cô đặc hỗn hợp để loại bỏ dung môi. Cho axeton (10 mL) vào và khuấy hỗn hợp trong 20 phút. Cho tetrahydrofuran (40 mL) vào và khuấy hỗn hợp trong 3 giờ. Thu gom chất rắn bằng cách lọc trong nitơ và rửa bánh lọc rắn bằng tetrahydrofuran. Sau đó, làm khô chất rắn lọc được bằng áp suất chân không ở 45 °C trong 2 giờ, thu được hợp chất nêu ở đề mục này với độ tinh khiết 90%. Việc tái kết tinh sử dụng axeton có thể làm tăng độ tinh khiết của hợp chất nêu ở đề mục này đến 95%.

Quy trình điều chế 6

Tổng hợp 5-metyl-3-[[[(2S,4S)-2-metyl-4-piperidyl]oxymetyl]-1,2,4-oxadiazol.



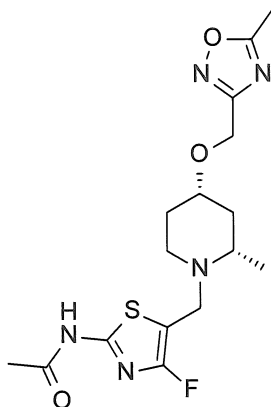
Cho axit trifloaxetic (1,8 mL, 23 mmol) vào dung dịch tert-butyl (2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]piperidin-1-carboxylat (0,49g, 1,6

mmol) trong diclometan (10mL) trong nitơ. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Cô đặc hỗn hợp bằng áp suất thấp, thu được dầu màu vàng. Hòa tan phần cặn trong metanol (5mL) và rót vào ống trao đổi cation, rửa giải bằng metanol (2×10mL), sau đó là dung dịch amoniac 2 M trong metanol (10mL). Cô đặc dịch lọc bằng áp suất thấp, thu được hợp chất nêu ở đề mục này (0,3g, 1,4 mmol, 91%). MS m/z 212,0 (M+H).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Tổng hợp N-[4-flo-5-[[[(2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)metoxy]-1-piperidyl]metyl]thiazol-2-yl]axetamit.



Cho N-(4-flo-5-formyl-thiazol-2-yl)axetamit (28,3 g, 150 mmol) vào 5-metyl-3-[[[(2S,4S)-2-metyl-4-piperidyl]oxymetyl]-1,2,4-oxadiazol hydroclorua (48,7g, 185 mmol, độ tinh khiết 94%) trong etyl axetat (707 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng và cho nhỏ giọt N,N-diisopropyletylamin (34,1mL, 195 mmol) vào trong 1 phút, sau đó cho một lần natri triaxetoxymetoborohydrua (98,5 g, 451 mmol) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong khối gia nhiệt 31 °C qua đêm với nhiệt độ bên trong là 30 °C, sau đó làm lạnh trong bể đá-nước đến nhiệt độ bên trong là 5 °C. Cho dung dịch axit clohydric 2 M trong nước (226 mL) vào hỗn hợp trong 15 phút, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 10°C. Cho nước (250 mL) vào hỗn hợp và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Tách các lớp và chiết lớp hữu cơ bằng hỗn hợp dung dịch axit clohydric 2 M trong nước (28 mL) trong nước (50 mL). Khuấy lớp nước đầu tiên trong bể đá-nước và cho nhỏ giọt dung dịch natri hydroxit 50% trong nước (25,7 mL) vào trong 10 phút, duy trì nhiệt độ bên trong dưới 10 °C. Pha loãng hỗn hợp bằng

dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (100 mL), sau đó khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút và sau đó chiết bằng etyl axetat (3×400 mL). Làm khô các dịch chiết hữu cơ thu gom được trên natri sulfat, lọc và cô đặc, thu được một cặn. Pha loãng lớp nước thứ hai từ quá trình chiết bằng axit clohydric trong nước bằng 2-metyltetrahydrofuran (200 mL) và cho hỗn hợp qua đệm mỏng đất diatomit. Chuyển dịch lọc vào phễu tách và tách các lớp. Khuấy lớp nước trong bể đá-nước và cho nhỏ giọt dung dịch natri hydroxit 50% trong nước (3,15 mL) vào trong 5 phút, duy trì nhiệt độ bên trong dưới $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pha loãng hỗn hợp bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (10 mL), sau đó khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút và sau đó chiết bằng etyl axetat (3×40 mL) và 10% isopropanol trong etyl axetat (100 mL). Làm khô các dịch chiết hữu cơ thu gom được trên natri sulfat, lọc và cô đặc, thu được một cặn, kết hợp cặn này với cặn từ phần đầu tiên của quá trình xử lý. Cho cặn thu gom được qua đệm silica gel (350 g), rửa giải bằng etyl axetat (3,5 L) và cô đặc dịch lọc, thu được một cặn (45,8 g).

Tinh chế cặn này (47,5 g thu gom từ các mẻ, 123,9 mmol) bằng sắc ký nhanh, rửa giải bằng 50-100% etyl axetat trong heptan. Cô đặc các phân đoạn chứa sản phẩm thành một cặn, tạo huyền phù cặn này trong hỗn hợp 1:1 của metyl-tert-butyl ete và heptan (448 mL). Khuấy hỗn hợp khối gia nhiệt $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút ở nhiệt độ bên trong là $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, sau đó làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ có khuấy. Lọc hỗn hợp, rửa chất rắn này bằng hỗn hợp 1:1 của metyl-tert-butyl ete và heptan (30 mL). Làm khô chất rắn lọc được bằng áp suất chân không ở $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ qua đêm, thu được hợp chất nêu ở đề mục này (28,5 g). MS m/z 384,0 (M+H);

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +33,4\text{ }^{\circ}$ (C=0,26, metanol).

Quy trình khác để tổng hợp N-[4-flo-5-[(2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)metoxy]-1-piperidyl]metyl]thiazol-2-yl]axetamit.

Cho N,N-diisopropyletylamin (0,1 mL, 0,57 mmol) và natri triaxetoxyborohydrua (0,12g, 0,57 mmol) vào dung dịch N-(4-flo-5-formyl-thiazol-2-yl)axetamit (0,05g, 0,28 mmol) và 5-metyl-3-[(2S,4S)-2-metyl-4-piperidyl]oxymetyl-1,2,4-oxadiazol (0,04g, 0,19mmol) trong diclometan (10 mL) trong khí quyển nitơ. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Rót hỗn hợp phản ứng vào dung dịch natri bicacbonat

bão hòa trong nước (10mL). Tách các lớp và chiết pha nước bằng diclometan (2×10mL). Làm khô các dịch chiết hữu cơ thu gom được trên magie sulfat, lọc và cô đặc bằng áp suất thấp, thu được dầu màu da cam.

Hòa tan phần cặn trong metanol (đến tổng thể tích là 9,8 ml), lọc và tinh chế bằng HPLC điều chế (Phenomenex Gemini-NX 10 Micron 50*150mm C-18) (CH₃CN & Water với amoni bicacbonat 10 mM được điều chỉnh độ pH đến 9 bằng amoni hydroxit, từ 15 % đến 100% CH₃CN trong 10 phút ở tốc độ 110ml/phút) (1 lần nạp) (271/204 nm), thu được hợp chất nêu ở đề mục này (0,02g, 0,05 mmol, 28%). MS m/z 384,2 (M+H).

Ví dụ 1A

N-[4-flo-5-[[[(2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)metoxy]-1-piperidyl]metyl]thiazol-2-yl]axetamit ở dạng tinh thể.

Tạo huyền phù N-[4-flo-5-[[[(2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)metoxy]-1-piperidyl]metyl]thiazol-2-yl]axetamit thô (29,9g) trong 448 mL metyl tert butyl ete 50% trong heptan ở 46 °C trong 30 phút. Khuấy hỗn hợp và làm lạnh xuống 19 °C trong hai giờ trước khi lọc, sau đó rửa bằng metyl tert butyl ete 50% trong heptan, thu được hợp chất nêu ở đề mục này (28,5g, hiệu suất 95%).

Nhiều xạ bột tia X (X-Ray Powder Diffraction - XRPD) của hợp chất của ví dụ 1A

Thu được các nhiễu xạ đồ XRPD của các chất rắn tinh thể bằng cách sử dụng máy nhiễu xạ bột tia X Bruker D4 Endeavor, có lắp nguồn CuK α ($\lambda = 0,154060$ nm (1,54060 Å)) và thiết bị dò Vantec, vận hành ở 35 kV và 50 mA. Mẫu được quét trong khoảng góc nhiễu xạ 2θ từ 4 đến 40°, với bước góc nhiễu xạ 2θ là 0,0087° và tốc độ quét là 0,5 giây/bước, và với độ phân kỳ là 0,6 mm, bộ chống tán xạ cố định 5,28mm, và khe dò 9,5 mm. Bột khô được đưa vào bộ chứa mẫu bằng thạch anh và tạo bề mặt trơn bằng cách sử dụng con trượt thủy tinh. Đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì cường độ tương đối của các đỉnh nhiễu xạ có thể thay đổi do sự định hướng được ưu tiên xuất phát từ các yếu tố như hình thái tinh thể hoặc dạng tinh thể. Khi xuất hiện tác động của sự định hướng được ưu tiên, thì cường độ đỉnh bị thay đổi, nhưng các vị trí đỉnh đặc trưng của dạng đa hình là không thay đổi. (xin

xem, ví dụ, The U. S. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35 Chapter 941 Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official May 1, 2015). Ngoài ra, cũng đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì các vị trí đỉnh ở góc có thể thay đổi một chút. Ví dụ, các vị trí đỉnh có thể bị dịch chuyển do sự thay đổi nhiệt độ hoặc độ ẩm mà tại đó mẫu được phân tích, sự dịch chuyển mẫu hoặc sự có mặt hay không có mặt của chất nội chuẩn. Trong trường hợp này, sai khác vị trí đỉnh về góc nhiễu xạ 2θ là $\pm 0,2$ thì sẽ tính đến khả năng do các biến đổi nêu trên mà không ảnh hưởng đến việc xác định một cách rõ ràng dạng tinh thể được phân tích. Việc khẳng định dạng tinh thể có thể được thực hiện dựa vào tổ hợp duy nhất bất kỳ gồm các đỉnh khác biệt (theo đơn vị $^{\circ}2\theta$), điển hình là các đỉnh nổi bật hơn. Các nhiễu xạ đồ dạng tinh thể, được thu thập ở nhiệt độ môi trường xung quanh và độ ẩm tương đối, được điều chỉnh theo các đỉnh tiêu chuẩn NIST 675 ở góc nhiễu xạ 2θ là 8,85 và 26,77 độ.

Mẫu N-[4-flo-5-[[[(2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-1-piperidyl]metyl]thiazol-2-yl]axetamit tinh thể được điều chế được đặc trưng hóa bằng nhiễu xạ đồ XRPD, sử dụng nguồn phát xạ CuK α có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2-theta) như được mô tả trong Bảng 1 dưới đây. Cụ thể là, nhiễu xạ đồ chứa đỉnh ở 12,1 $^{\circ}$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm gồm có 15,3 $^{\circ}$, 21,6 $^{\circ}$, 22,2 $^{\circ}$, 22,7 $^{\circ}$, 23,5 $^{\circ}$, 24,3 $^{\circ}$, và 26,8 $^{\circ}$ với dung sai đối với các góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Bảng 1: Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của N-[4-flo-5-[[[(2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-1-piperidyl]metyl]thiazol-2-yl]axetamit tinh thể, hợp chất của ví dụ 1A.

Đỉnh	Góc (2-Theta $^{\circ}$) $\pm 0,2^{\circ}$	Cường độ tương đối (% của đỉnh có cường độ lớn nhất)
1	7,7	9
2	10,1	9
3	12,1	100
4	15,3	50
5	18,3	11

6	19,3	13
7	21,6	16
8	22,2	16
9	22,7	16
10	23,5	30
11	24,3	35
12	26,8	27

Thử nghiệm enzym OGA người *in vitro*

Tạo các protein OGA

Trình tự nucleotit ghi mã *O-GlcNAc- β -N-acetylglucosaminidaza* có chiều dài đầy đủ của người (NM_012215) được chèn vào vectơ pFastBac1 (Invitrogen) có nhãn poly-histidin (HIS) đầu cuối N. Việc tạo baculovirus được thực hiện theo hướng dẫn của hệ thống biểu hiện Baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen). Các tế bào Sf9 được chuyển nhiễm ở nồng độ $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL, sử dụng 10 mL virus *PI* trên 1 của môi trường nuôi cấy và ủ ở 28°C trong 48 giờ. Các tế bào được quay ra, rửa bằng PBS và các viên được bảo quản ở -80°C.

Protein OGA (His-OGA) trên được tinh chế như sau: 4 L tế bào được phân giải trong 200 mL dung dịch đệm chứa 50 mM Tris, độ pH=8,0, NaCl 300 mM, glycerol 10%, Imidazol 10 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM, TritonTM X-100 0,1%, 4 viên nén chất ức chế proteaza (hoàn toàn không chứa EDTA, Roche) trong 45 phút ở 4°C. Sau đó, dịch phân giải tế bào được quay trong 40 phút ở 16500 vòng/phút ở 4°C, và dịch nổi trên mặt được ủ với 6 mL nhựa Ni-NTA (axit nicken-nitrilotriaxetic) trong 2 giờ ở 4°C.

Sau đó, chèn nhựa vào cột và rửa bằng 50 mM Tris, độ pH=8,0, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM imidazol, 0,1% TritonTM X-100, 1 mM DTT, sau đó bằng 50 mM Tris, độ pH=8,0, 150 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10% glycerol, 1 mM DTT. Các protein này được rửa ra bằng 50 mM Tris, độ pH=8,0, 150 mM NaCl, 300 mM imidazol, 10% glycerol, 1 mM DTT. Cô đặc các phân đoạn chứa His-OGA thu gom được đến 6 ml và nạp vào Superdex75 (16/60). Protein này được rửa ra bằng 50 mM Tris, độ

pH=8,0, 150 mM NaCl, 10% glyxerol, 2 mM DTT. Các phân đoạn chứa His-OGA được thu gom và nồng độ protein được xác định bằng BCA (Bradford Colorimetric Assay).

Thử nghiệm enzym OGA

Enzym OGA xúc tác cho quá trình loại bỏ *O-GlcNAc* ra khỏi các protein nhân tế bào chất. Để xác định hoạt tính này, floresxein di-N-axetyl- β -N-axetyl-D-glucosaminid (*FD-GlcNAc*, Kim, Eun Ju; Kang, Dae Ook; Love, Dona C.; Hanover, John A. Carbohydrate Research (2006), 341(8), 971-982) được sử dụng làm cơ chất ở nồng độ cuối là 10 μ M (ở phương cách thử nghiệm dùng 96 lỗ) hoặc 6,7 μ M (ở phương cách thử nghiệm dùng 384 lỗ). Cơ chất sinh huỳnh quang này phát huỳnh quang khi cắt bởi OGA, nên có thể xác định hoạt tính enzym bằng việc tăng phát huỳnh quang nhận biết được ở 535 nm (kích thích ở 485nm).

Dung dịch đệm thử nghiệm được chuẩn bị sao cho có nồng độ cuối là 50 mM $\text{H}_2\text{NaPO}_3\text{-HNa}_2\text{PO}_3$, 0,01% anbumin huyết thanh bò và 0,01% Triton™ X-100 trong nước, ở độ pH=7. Nồng độ enzym cuối là 3 nM (ở phương cách thử nghiệm 96 lỗ) hoặc 3,24 nM (ở phương cách thử nghiệm 384 lỗ). Cả hai phương cách thử nghiệm này cho kết quả về cơ bản là tương đương.

Các hợp chất thử nghiệm được pha loãng trong dimetyl sulfoxit tinh khiết (DMSO), sử dụng đường cong đáp ứng nồng độ gồm mười điểm. Nồng độ tối đa của hợp chất trong hỗn hợp phản ứng là 30 μ M. Các hợp chất ở nồng độ thích hợp được ủ trước với enzym OGA trong 30 phút trước khi phản ứng bắt đầu nhờ bổ sung cơ chất. Cho các phản ứng xảy ra trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, không dừng phản ứng lại, mà xác định mức phát huỳnh quang. Các giá trị IC_{50} được tính toán bằng cách lập đồ thị log của hợp chất theo dữ liệu được chuẩn hóa và ghép dữ liệu vào theo log bốn thông số.

Hợp chất của ví dụ 1 được thử nghiệm về cơ bản như được mô tả trên đây và có IC_{50} là $2,36 \text{ nM} \pm 0,786$ (n=8). Dữ liệu này chứng tỏ rằng hợp chất của ví dụ 1 ức chế hoạt tính enzym *in vitro*.

Thử nghiệm toàn bộ tế bào để xác định sự ức chế hoạt tính enzym OGA

Cấy tế bào vào đĩa:

Dùng các điều kiện tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, các tế bào TRex-293 được cải biến cho việc biểu hiện cảm ứng của dạng P301S-1N4R của protein tau kết hợp với vi cấu trúc hình ống được tạo và bảo quản trong môi trường sinh trưởng, gồm có DMEM mức glucoza cao (Sigma# D5796), được bổ sung 10 % huyết thanh thai bò không chứa tetracyclin (Fetal Bovine Serum - FBS, Sigma F2442), 20 mM HEPES, 5 µg/mL blasticidin (Life Technologies# A11139-03) và 200 µg/mL Zeocin (Life Technologies# R250-01). Đối với các thử nghiệm này, các tế bào được cấy vào đĩa trong môi trường sinh trưởng với lượng 10000-14000 tế bào trên đĩa trong đĩa Corning Biocoat (356663) 384 lỗ được phủ poly-D-Lysin, và ủ trong 20-24 giờ trong thiết bị ủ tế bào ở 37°C/5% CO₂. Các thử nghiệm này được thực hiện mà không gây cảm ứng sự biểu hiện Tau.

Điều trị bằng hợp chất:

Các hợp chất thử nghiệm được pha loãng theo loạt 1/3 trong DMSO tinh khiết, sử dụng các đường cong đáp ứng nồng độ mười điểm và pha loãng tiếp bằng môi trường sinh trưởng. 20-24 giờ sau khi cấy vào đĩa, các tế bào được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm trong môi trường sinh trưởng; nồng độ tối đa của hợp chất là 15 µM (0,15% DMSO). Sự ức chế tối đa được xác định bằng các trị số lặp lại thu được từ việc xử lý bằng 15 µM Thiamet G và sự ức chế tối thiểu được xác định bằng các trị số lặp lại thu được từ việc xử lý bằng 0,15% DMSO. Các tế bào được đưa lại vào thiết bị ủ ở 37°C/5% CO₂ trong 20-24 giờ. Các hợp chất được thử nghiệm lặp lại một lần đối với mỗi đĩa.

Nhuộm miễn dịch:

Sau 20-24 giờ xử lý bằng hợp chất, môi trường được lấy ra khỏi đĩa thử nghiệm và cho 25 µL dung dịch formaldehyt 3,7 % (Sigma # F1635) trong DPBS (Sigma #D8537) vào mỗi lỗ và ủ trong 30 phút. Sau đó, các tế bào được rửa một lần bằng DPBS và sau đó cho thấm 0,1% Triton™ X-100 (Sigma# T9284). Sau 30 phút, các tế bào được rửa hai lần bằng DPBS và sau đó cho dung dịch phong bế (1% BSA/DPBS/0,1% Triton™ X-100) vào mỗi lỗ và ủ trong 60 phút. Lấy dung dịch phong bế ra và cho 0,40-0,33 µg/mL dung dịch kháng thể protein *O-GlcNAc* (dòng RL2, Thermo, MA1072) trong dung dịch phong bế vào các tế bào và để yên qua đêm ở 2-8 °C. Ngày hôm sau, các tế bào được rửa hai lần bằng DPBS và cho kháng thể thứ cấp, Alexa Fluor 488 IgG

kháng chuột của dê (Life Technologies # A11001) ở 2 ug/mL trong DPBS vào mỗi lỗ và để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 90 phút. Lấy kháng thể thứ cấp ra, các tế bào được rửa hai lần bằng DPBS và lần lượt cho dung dịch DAPI (Sigma #D9564) và ARNaza (Sigma, R6513) trong DPBS ở nồng độ 1 và 50 ug/mL vào mỗi lỗ. Đĩa được bật lại, ủ trong một giờ và phân tích bằng Acumen eX3 hci (TTP Labtech). Tất cả các công đoạn ủ và các bước rửa nêu trên được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng, ngoại trừ đối với kháng thể sơ cấp.

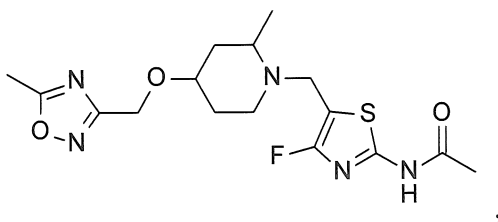
Phân tích và kết quả:

Các đĩa được phân tích bằng thiết bị Acumen eX3, sử dụng các máy phát lượng tử ánh sáng kích thích ở 488 và 405 nm và hai máy lọc phát xạ FL2 (500-530 nm) và FL1 (420-490 nm). Máy lọc FL2 là tín hiệu tương ứng với kháng thể protein O-*GlcNAc* (RL2 clone) và máy lọc FL1 là tín hiệu tương ứng với nhân tế bào (DAPI). Tỷ số Tổng FL2/Tổng FL1 (Tổng mức phát huỳnh quang của mỗi lỗ không có đối tượng hoặc không chọn lọc quần thể) được sử dụng để phân tích dữ liệu. Dữ liệu được định chuẩn đến mức ức chế tối đa bằng cách tham chiếu đến việc xử lý bằng 15 μ M Thiamet G và mức ức chế tối thiểu như đạt được bằng việc xử lý bằng 0,15% DMSO. Dữ liệu được khớp vào ứng dụng khớp đường cong không tuyến tính (hàm logistic 4 thông số) và các trị số IC_{50} được tính toán và báo cáo.

Hợp chất của ví dụ 1 được thử nghiệm về cơ bản như được mô tả trên đây và có IC_{50} là $21,9 \text{ nM} \pm 7,3$ ($n=5$). Dữ liệu này cho thấy rằng hợp chất của ví dụ 1 ức chế hoạt tính enzym OGA trong thử nghiệm tế bào.

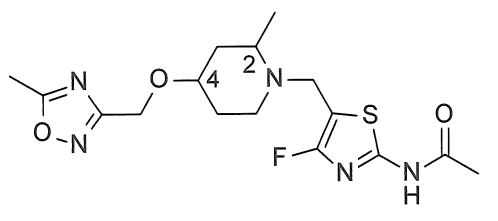
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó methyl ở vị trí 2 có cấu hình *cis* đối với oxy ở vị trí 4 trên vòng piperidin:



hoặc muối được dụng của nó.

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó hợp chất này là N-[4-flo-5-[(2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-1-piperidyl]metyl]thiazol-2-yl]axetamit, hoặc muối được dụng của nó.

4. Hợp chất theo điểm 3, trong đó hợp chất này là N-[4-flo-5-[(2S,4S)-2-metyl-4-[(5-metyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-1-piperidyl]metyl]thiazol-2-yl]axetamit.

5. Hợp chất theo điểm 4, trong đó hợp chất này ở dạng tinh thể.

6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó hợp chất này được đặc trưng bởi đỉnh trong phổ nhiễu xạ bột tia X có góc nhiễu xạ 2-theta là $12,1^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm bao gồm $15,3^\circ$, $21,6^\circ$, $22,2^\circ$, $22,7^\circ$, $23,5^\circ$, $24,3^\circ$, và $26,8^\circ$, với dung sai đối với các góc nhiễu xạ là $0,2^\circ$.

7. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, hoặc muối được dụng của nó, cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng, hoặc chất mang được dụng.

8. Quy trình bào chế dược phẩm, trong đó quy trình này bao gồm bước trộn lẫn hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, hoặc muối dược dụng của nó, cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng, hoặc chất mang dược dụng.