



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0035914

(51)⁷ C07D 239/48; A61K 31/505; A61P 1/14 (13) B

(21) 1-2019-00787

(22) 04/08/2017

(86) PCT/CN2017/095999 04/08/2017

(87) WO 2018/028517 15/02/2018

(30) PCT/CN2016/094833 12/08/2016 CN

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/11/2019 380A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

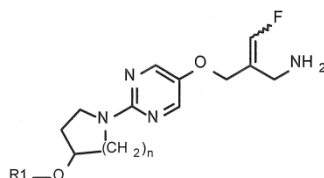
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) David Andrew COATES (US); Luo Heng QIN (CN); Yi WEI (CN); Jingye ZHOU (CN).

(74) CÔNG TY LUẬT TRÁCH NHIỆM HỮU HẠN AMBYS HÀ NỘI (AMBYS HANOI)

(54) HỢP CHẤT AMINO PYRIMIDIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức dưới đây, hoặc muối dược dụng của hợp chất này,



trong đó n và R1 được định nghĩa rõ trong sáng chế, và dược phẩm chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất pyrimidin amin, các muối dược dụng của các hợp chất này, và việc sử dụng các hợp chất và muối đã nêu trong chữa bệnh.

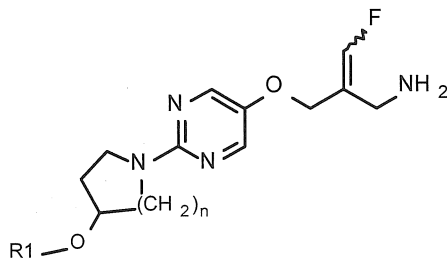
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Amino oxidaza nhạy với semicacbazit (semicarbazide-sensitive amino oxidase)/protein bám dính mạch máu-1 (vascular adhesion protein-1) (SSAO)/VAP-1) là enzym thuộc họ oxidaza amin nhạy với semicacbazit. SSAO/VAP-1 còn được nhắc đến là VAP-1 hoặc SSAO. SSAO/VAP-1 là enzym có cả liên kết màng và isoform hòa tan được; chủ yếu enzym này thu được từ bề mặt tế bào nội mô, cơ trơn mạch máu và các tế bào mỡ. SSAO/VAP-1 tham gia vào nhiều quy trình thuộc tế bào bao gồm việc dung nạp glucoza, các đáp ứng viêm và bổ sung bạch cầu. Các mức hoạt động cao của enzym này có liên quan đến bệnh đái tháo đường, chứng xơ vữa động mạch, bệnh đột quỵ, bệnh thận mãn tính và bệnh Alzheimer, trong số các chứng rối loạn khác. Gần đây SSAO/VAP-1 có liên quan đến sự phát sinh bệnh của các bệnh về gan như bệnh gan nhiễm mỡ. Tham khảo tài liệu J Neural. Transm. 2011, 118, 1055-1064. của tác giả Weston, C.J. và cộng sự. Bệnh gan nhiễm mỡ (fatty liver disease -FLD) bao gồm một loạt các chứng bệnh trong đó chất béo tích tụ trong gan với lượng quá mức và kèm theo viêm nhiễm. FLD có thể dẫn đến bệnh gan nhiễm mỡ không do cồn (non-alcoholic fatty liver disease- NAFLD), mà được đặc trưng bởi sự kháng insulin. NAFLD không được kiểm soát tiến triển thành phản ứng viêm dai dẳng hoặc viêm gan nhiễm mỡ không do cồn (non-alcoholic steatohepatitis -NASH), chứng xơ gan tăng dần và cuối cùng tiến triển thành bệnh xơ gan. Hiện nay, cần phải cung cấp các liệu pháp điều trị thay thế cho các bệnh về gan như NAFLD và/hoặc NASH.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế cho rằng chất ức chế SSAO/VAP-1 sẽ làm giảm chứng viêm gan và chứng xơ hóa và do đó cung cấp cách điều trị cho các bệnh về gan, cụ thể là cách điều trị cho NAFLD và/hoặc NASH. Sáng chế đề xuất các hợp chất mà ức chế enzym SSAO/VAP-1 và có thể giải quyết một hoặc nhiều đòi hỏi trên.

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức 1:



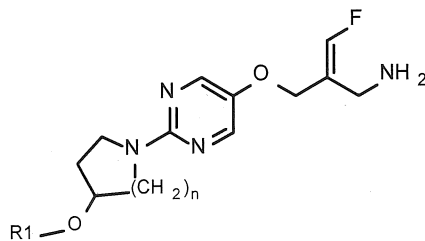
1

trong đó n là 1 hoặc 2; và R_1 là H hoặc $-CH_3$; hoặc muối được dụng của các hợp chất này.

Sự liên kết với flo, được minh họa là $\sim$, biểu thị rằng nguyên tử flo và nhóm metoxypyrimidin có thể hoặc là Z (*zusammen*, cùng phía) hoặc là E (*entgegen*, ngược phía) với nhau (xem tài liệu tham khảo “Graphical Representation of Stereochemical Configuration”, Pure and Appl. Chem, 2006, 78(10) 1897, at 1959 của tác giả Brecher, J., và cộng sự). Cấu trúc được minh họa bởi công thức 1 bao gồm các hợp chất với cấu trúc hóa học lập thể Z, cấu trúc hóa học lập thể E, hoặc hỗn hợp các hợp chất với các cấu trúc hóa học lập thể E và Z. Các hợp chất ưu tiên của sáng chế có cấu trúc hóa học lập thể E.

Theo một dạng, sáng chế đề xuất các hợp chất có công thức 1 như bazơ tự do. Theo dạng khác, sáng chế đề xuất các hợp chất có công thức 1 như các muối cộng axit, như (các) muối cộng một phân tử HCl hoặc hai phân tử HCl hoặc muối sunfonat, tốt hơn là 4-metylbenzensulfonat (muối tosylat).

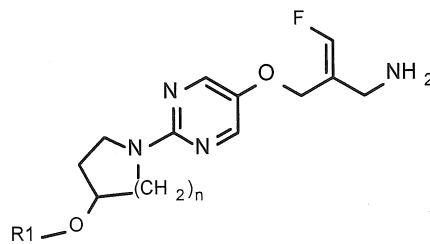
Theo một dạng, sáng chế đề xuất các hợp chất có công thức 2:



2

trong đó n là 1 hoặc 2; và R_1 là H hoặc $-CH_3$; hoặc muối được dụng của các hợp chất này.

Theo dạng khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức 3:



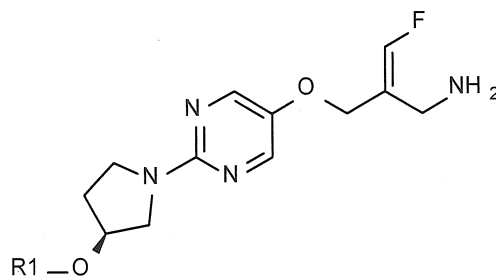
3

trong đó n là 1 hoặc 2; và R_1 là H hoặc $-\text{CH}_3$; hoặc muối được dụng của các hợp chất này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất theo một trong số các công thức 1, 2 và 3 trong đó n là 1, hoặc muối được dụng của hợp chất này. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo một trong số các công thức 1, 2, và 3 trong đó n là 2, hoặc muối được dụng của hợp chất này.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo một trong số các công thức 1, 2, và 3 trong đó R_1 là H, hoặc muối được dụng của hợp chất này. Vẫn theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo một trong số các công thức 1, 2, và 3 trong đó R_1 là $-\text{CH}_3$, hoặc muối được dụng của hợp chất này.

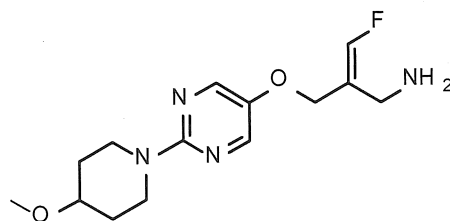
Theo dạng khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức 4:



4

trong đó R_1 là H hoặc $-\text{CH}_3$, hoặc muối được dụng của hợp chất này.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức 5:

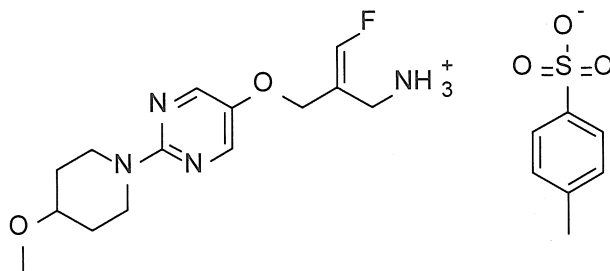


5

hoặc muối được dụng của hợp chất này. Theo một phương án, hợp chất có công thức 5 được đề xuất như muối cộng axit. Tốt hơn là muối cộng axit là muối cộng một phân tử HCl hoặc hai phân tử HCl hoặc muối sulfonat, như muối cộng axit metylsulfonic hoặc muối cộng axit 4-metylbenzensulfonic để cung cấp muối mesylat hoặc muối 4-metylbenzensulfonat (tosylat).

Theo dạng khác, sáng chế đề xuất chế phẩm được phẩm chứa hợp chất theo công thức bất kỳ trong số các công thức từ 1 đến 5, hoặc muối được dụng của chế phẩm này, và chất mang được dụng, chất làm loãng hoặc tá dược. Theo một phương án, chế phẩm được phẩm chứa hợp chất theo công thức 5, hoặc muối được dụng của chế phẩm này. Tốt hơn là, (các) anion dùng được trong được phẩm cho muối là một nguyên tử clorua hoặc hai nguyên tử clorua, mesylat hoặc 4-metylbenzensulfonat (tosylat).

Theo dạng khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức 6, là muối (2E)-3-Flo-2-([2-(4-metoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl]oxy)metyl)prop-2-en-1-amin 4-metylbenzensulfonat (1:1).



6

Theo một phương án, muối (2E)-3-Flo-2-([2-(4-metoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl]oxy)metyl)prop-2-en-1-amin 4-metylbenzensulfonat (1:1) được cung cấp ở dạng tinh thể đặc trưng bởi mẫu nhiễu xạ bột tia X thu được từ nguồn CuK α ($\lambda=1,54056\text{\AA}$), mà có đỉnh tại: a) 18,6, 19,1, 21,0, 21,9, và 22,4 $\pm 0,2^\circ$ theo 2 theta, hoặc b) 17,6, 11,0, 16,8, 18,6, 19,1, 21,0, 21,9, 22,4 và 26,1 $\pm 0,2^\circ$ theo 2 theta.

Theo dạng khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo bất kỳ một trong số các công thức từ 1 đến 6, hoặc muối được dụng của hợp chất này, để sử dụng trong cách điều trị bệnh. Theo các phương án được ưu tiên, cách điều trị bệnh dùng cho chứng rối loạn chức năng gan. Tốt hơn là, cách điều trị bệnh dùng cho chứng rối loạn chức năng gan được chọn từ: chứng xơ gan, chứng xơ hóa gây ra bởi cồn, chứng nhiễm mỡ gây ra bởi

còn, bệnh gan nhiễm mỡ không do cồn và bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do cồn. Theo một phương án, cách điều trị bệnh dùng cho việc điều trị chứng xơ gan. Theo phương án khác, cách điều trị bệnh dùng cho bệnh gan nhiễm mỡ không do cồn. Vẫn trong phương án khác, cách điều trị bệnh dùng cho bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do cồn.

Theo dạng khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo bất kỳ một trong số các công thức từ 1 đến 6, hoặc muối được dụng của hợp chất này, để sử dụng trong việc điều trị chứng rối loạn chức năng gan. Theo một phương án, chứng rối loạn chức năng gan được chọn từ: chứng xơ gan, chứng xơ hóa gây ra bởi cồn, chứng nhiễm mỡ gây ra bởi cồn, bệnh gan nhiễm mỡ không do cồn, và bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do cồn. Theo phương án khác, chứng rối loạn chức năng gan là bệnh gan nhiễm mỡ không do cồn hoặc bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do cồn. Theo phương án được ưu tiên cụ thể, chứng rối loạn chức năng gan là bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do cồn (NASH).

Vẫn theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo công thức bất kỳ trong số các công thức từ 1 đến 6 để sản xuất được phẩm điều trị chứng rối loạn chức năng gan. Theo các phương án được ưu tiên, chứng rối loạn chức năng gan được chọn từ: chứng xơ gan, chứng xơ hóa gây ra bởi cồn, chứng nhiễm mỡ gây ra bởi cồn, bệnh gan nhiễm mỡ không do cồn, và bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do cồn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “muối được dụng” như được sử dụng ở đây đề cập đến muối của hợp chất theo sáng chế được xem là chấp nhận được để sử dụng lâm sàng và/hoặc trong thú y. Các ví dụ về muối được dụng và phương pháp luận chung để điều chế các muối được dụng này có thể tìm thấy trong tài liệu tham khảo “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use” của tác giả P. Stahl, và cộng sự, bản được chỉnh sửa lần 2, Wiley-VCH, 2011 và S.M. Berge, và cộng sự, trong tài liệu tham khảo "Pharmaceutical Salts", trên Tạp chí Khoa học Dược phẩm, 1977, 66(1), 1-19.

Các chế phẩm dược phẩm cho sáng chế có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phụ gia được dụng. Thuật ngữ “(các) phụ gia được dụng” được sử dụng ở đây cho các chế phẩm dược phẩm, đề cập đến một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, và tá dược tương thích với các phụ gia khác của các chế phẩm hoặc công thức điều chế và không độc với người bệnh. Các ví dụ về các chế phẩm dược phẩm và các quy trình để

điều chế các chế phẩm này có thể tìm thấy trong tài liệu tham khảo “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, của tác giả Loyd, V., và cộng sự. Eds., 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012. Các ví dụ không giới hạn của các chất mang được dụng, các chất làm loãng và các tá dược bao gồm các chất sau: dung dịch muối, nước, tinh bột, đường, manitol và các dẫn xuất của silic đioxit; các tác nhân liên kết như cacboxymetyl xenluloza và các dẫn xuất của xenluloza, axit alginic, gelatin và polyvinyl-pyrrolidon; caolin và bentonit; các polyetyl glycol.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hiệu quả” đề cập đến lượng chính là liều dùng mà có hiệu quả trong việc điều trị chứng rối loạn chức năng; như bệnh về gan bao gồm: viêm gan, chứng xơ hóa, và bệnh viêm gan nhiễm mỡ. Thầy thuốc chữa bệnh, là người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, có thể xác định dễ dàng lượng hiệu quả bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường và bằng các kết quả quan sát thu được dưới các tình huống tương tự. Trong việc xác định lượng hiệu quả hoặc liều dùng hiệu quả của hợp chất, số các yếu tố được xem xét, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở hợp chất hoặc muối của hợp chất đó, sẽ được áp dụng, việc cùng áp dụng các tác nhân khác, nếu được sử dụng: loài động vật có vú: kích thước, tuổi và thể trạng chung của loài động vật này; mức độ phức tạp và nghiêm trọng của chứng rối loạn, sự đáp ứng của riêng đối tượng bị bệnh, phương thức dùng thuốc, các đặc tính sinh khả dụng của việc điều chế được sử dụng; chế độ liều dùng được chọn; việc sử dụng dược phẩm đi kèm khác; và tình huống có liên quan khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “cách điều trị”, “điều trị”, hoặc “việc điều trị”, bao gồm làm chậm, làm giảm hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc sự trầm trọng của triệu chứng hiện tại, chứng rối loạn chức năng, tình trạng, hoặc bệnh tật, mà có thể bao gồm việc điều trị bệnh về gan, như viêm gan, chứng xơ gan và bệnh viêm gan nhiễm mỡ.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “đối tượng bị bệnh” đề cập đến động vật có vú, gia cầm hoặc cá. Tốt hơn là, đối tượng bị bệnh là con người hoặc động vật có vú gần gũi, như chó hoặc mèo hoặc động vật có vú được thuần hóa khác, như bò, lợn, ngựa, cừu, thỏ và dê.

Thuật ngữ thầy thuốc điều trị, thầy thuốc thú y, hoặc người làm nghề y khác sẽ có thể xác định lượng hiệu quả của hợp chất để điều trị đối tượng bị bệnh khi cần. Các

ché phẩm được phẩm ưu tiên có thể được tạo thành như thuốc viên hoặc viên nang để uống qua đường miệng, dung dịch để uống qua đường miệng, hoặc dung dịch tiêm được. Thuốc viên, viên nang hoặc dung dịch có thể chứa hợp chất thuộc sáng chế với lượng hiệu quả để điều trị đối tượng bị bệnh khi cần điều trị.

Những chữ viết tắt được sử dụng trong bản mô tả được xác định theo tác giả Daub G.H., và cộng sự trong tài liệu tham khảo “The Use of Acronyms in Organic Chemistry” *Aldrichimica Acta*, 1984, 17(1), 6-23. Những chữ viết tắt khác được xác định như sau: “ACN” đề cập đến axetonitri; “AUC” đề cập đến diện tích dưới đường cong; “Boc” biểu diễn *tert*-butoxycacbonyl; “DCM” đề cập đến diclometan; “DIPEA” đề cập đến N,N-diisopropyletylamin; “DMF” đề cập đến dimetylformamit; “DMSO” đề cập đến dimetylsulfoxit; “EDTA” đề cập đến axit etylenediamintetraaxetic; “EGTA” đề cập đến axit etylen glycol tetraaxetic; “ES/MS” đề cập đến quang phổ khối; “EtOAc” đề cập đến etyl axetat; “HEPES” đề cập đến axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic; “HPLC” đề cập đến sắc ký lỏng hiệu năng cao; “hr hoặc hrs” đề cập đến giờ; “HRP” đề cập đến peroxidaza cải ngựa; “IC₅₀” đề cập đến nồng độ của tác nhân mà tạo ra 50% đáp ứng ức chế tối đa có thể có cho tác nhân đó (IC₅₀ tương đối), hoặc nồng độ của tác nhân mà tạo ra 50% sự kìm hãm của hoạt tính mục tiêu so với việc kiểm soát giả dược (IC₅₀ tương đối); “MAOa và MAOb” lần lượt đề cập đến monoamin oxidaza a và isoform b; “MeOH” đề cập đến rượu metyl hoặc metanol; “min” đề cập đến phút; “MS” đề cập đến khối phổ; “PE” đề cập đến ete dầu mỏ; “R_t” đề cập đến thời gian lưu; “SSAO” đề cập đến amino oxidaza nhạy với semicacbazit; và “hSSAO” đề cập đến SSAO của người.

Các hợp chất thuộc sáng chế, hoặc các muối của các hợp chất này, có thể được điều chế bằng nhiều phương thức, một số phương thức được minh họa trong mục bước điều chế, và mục các ví dụ thực hiện sáng chế bên dưới. (Các) sản phẩm của từng bước trong phương thức dưới đây có thể được thu hồi bằng các phương pháp thông thường bao gồm chiết xuất, làm bay hơi, kết tủa, sắc ký, lọc, nghiền, tinh thể hóa. Trừ khi được lưu ý theo cách khác, các chất phản ứng và các vật liệu là đã sẵn có.

Trong các chất điều chế được mô tả ở đây, các chức năng của nhóm hydroxyl và amin có thể được bảo vệ để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tổng hợp các hợp chất được mô tả ở đây. Các ví dụ về các chức năng bảo vệ có thể được tìm thấy trong tài

liệu tham khảo “Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis,” của tác giả Wuts, P.G.M., và cộng sự, Eds. 5th Ed., John Wiley and Sons, 2014. Các nhóm chức khác mà có thể dễ dàng chuyển đổi thành nhóm hydroxyl hoặc nhóm amin có thể được tìm thấy trong tài liệu tham khảo “Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations” bởi tác giả Larock. R.C., Wiley VCH, 1999 và trong tài liệu tham khảo “March’s Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure,” Smith, M.B., Ed., 7th Ed., Wiley-Interscience, 2013.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các bước điều chế và các ví dụ sau đây còn minh họa sáng chế và biểu diễn sự tổng hợp đặc trưng của các hợp chất thuộc sáng chế.

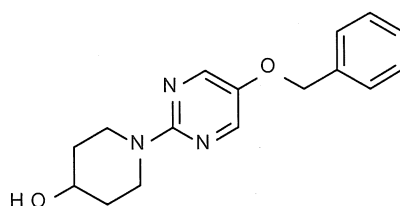
Bước điều chế 1: *tert*-Butyl (3S)-3-metoxypyrrolidin-1-cacboxylat

Bổ sung iodometan với lượng bằng (0,398g, 2,80mmol) vào hỗn hợp gồm *tert*-butyl (3S)-3-hydroxypyrrolidin-1-cacboxylat với lượng bằng (0,500g, 2,67mmol) và natri hydrua (bằng 60% khối lượng trong dầu khoáng) với lượng bằng (0,160g, 4,01mmol) trong DMF (5mL). Khuấy trộn hỗn hợp thu được trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Ngừng phản ứng bằng dung dịch NH₄Cl bão hòa (30mL) và chiết xuất bằng EtOAc (3×30mL). Loại bỏ lớp dung dịch nước. Hòa hợp các dịch chiết hữu cơ và rửa bằng nước muối, làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và làm bay hơi phần lọc đến khô để thu được hợp chất mong muốn với lượng bằng (475mg, 0.475g, 88,4%). Vật liệu thô có thể được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần làm sạch thêm. Quang phổ khối ES/MS (m/z): 224,2 (M+Na).

Bước điều chế 2: (3S)-3-Metoxypyrrolidin

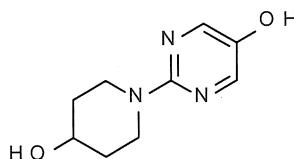
Khuấy trộn dung dịch gồm *tert*-butyl (3S)-3-metoxypyrrolidin-1-cacboxylat với lượng bằng (475mg, 2,36mmol) và axit trifloaxetic với lượng bằng (1mL, 13,23mmol) trong DCM (3mL) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Cô đặc hỗn hợp phản ứng dưới điều kiện chân không để thu được hợp chất mong muốn với lượng bằng (240mg, 2,35mmol, 99.5%), có thể được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần làm sạch thêm.

Bước điều chế thứ 3: 1-(5-Benzoyloxypyrimidin-2-yl)piperidin-4-ol



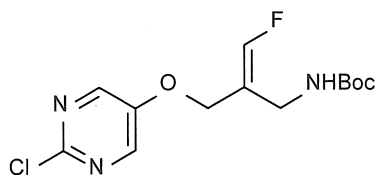
Khuấy trộn hỗn hợp gồm 5-benzyloxy-2-clo-pyrimidin với lượng bằng (2,30g, 9,90mmol), piperidin-4-ol với lượng bằng (1,23g, 11,9mmol) và DIPEA với lượng bằng (3,88mL, 29,7mmol) trong DMF (30mL, 388mmol) ở nhiệt độ 100°C dưới điều kiện khí quyển chứa N₂ trong 17 giờ. Hòa tan hỗn hợp với nước (200mL) và chiết xuất bằng EtOAc (3×50mL). Hòa hợp các dịch chiết hữu cơ; rửa bằng nước muối (3×50mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô đặc dịch lọc. Đưa phần chất còn rửa giải qua sắc ký cột nhanh gel silic đioxit với hỗn hợp gồm EtOAc chiếm 60% và PE chiếm 40% để thu được hợp chất mong muốn với lượng bằng (2,00g, 6,31mmol, 63,7%) là chất rắn màu trắng. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1,40-1,60 (m, 2H), 1,90-1,99 (m, 2H), 3,17-3,29 (m, 2H), 3,85-3,95 (m, 1H), 4,25-4,39 (m, 2H), 5,09 (s, 2H), 7,38-7,52 (m, 5H), 8,14 (s, 2H).

Bước điều chế 4: 2-(4-Hydroxy-1-piperidinyl)pyrimidin-5-ol



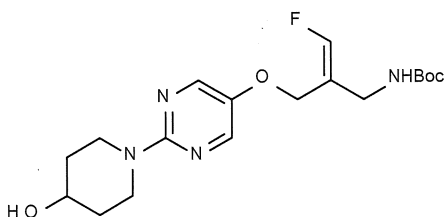
Bổ sung paladi với lượng bằng (10% khối lượng theo cacbon, 600mg, 0,564mmol) vào 1-(5-benzyloxypyrimidin-2-yl)piperidin-4-ol với lượng bằng (2,00g, 6,31mmol) trong MeOH (40mL, 989mmol). Khuấy trộn hỗn hợp thu được trong 2 giờ ở nhiệt độ 15°C dưới điều kiện khí quyển chứa hydro (áp suất bằng 103kPa). Lọc hỗn hợp thu được qua đất diatomit. Cô đặc dịch lọc để thu được hợp chất mong muốn với lượng bằng (0,70g, 3,59mmol, 56,8%) là chất rắn màu vàng. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1,23-1,38 (m, 2H), 1,60-1,77 (m, 2H), 2,65-2,90 (m, 2H), 3,00-3,25 (m, 2H), 3,50-3,70 (m, 2H), 4,05-4,16 (m, 1H), 7,90 (s, 2H).

Bước điều chế 5: *tert*-Butyl N-[(E)-2-[(2-clopyrimidin-5-yl)oxymetyl]-3-flo-
alyl]cacamat



Bổ sung K_2CO_3 với lượng bằng (5,71g, 41,3mmol) vào dung dịch gồm 2-clopyrimidin-5-ol với lượng bằng (5,01g, 38,3mmol) và *tert*-butyl N-[(E)-2-(bromometyl)-3-flo-allyl]cacbamat với lượng bằng (3,67g, 13,7mmol) trong DMF (25mL). Khuấy trộn dung dịch thu được trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng. Ngừng phản ứng bằng cách bổ sung nước (80mL) và EtOAc (100mL). Phân tách pha dung dịch nước và pha hữu cơ. Chiết xuất pha dung dịch nước bằng EtOAc (3×100mL). Hóa hợp tất cả các dịch chiết hữu cơ. Làm khô dịch chiết hữu cơ được hóa hợp bằng Na_2SO_4 , lọc, và cô đặc dịch lọc trong điều kiện chân không để thu được phần chất còn lại. Đưa phần chất còn lại rửa giải qua sắc ký nhanh gel silic đioxit với hỗn hợp gồm EtOAc chiếm 30% trong hexan để thu được hợp chất mong muốn là chất rắn màu trắng với lượng bằng (4,15g, 13,1mmol, hiệu suất 96%). Quang phổ khối ES/MS (m/z): 340 ($M+Na$).

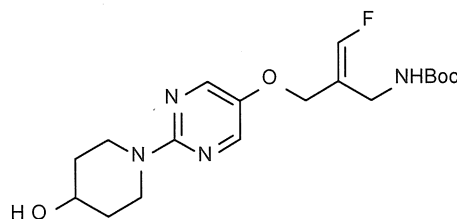
Bước điều chế 6: *tert*-Butyl N-[(Z)-3-flo-2-[[2-(4-hydroxy-1-piperidyl)pyrimidin-5-yl]oxymethyl]allyl]cacbamat



Khuấy trộn hỗn hợp gồm 2-(4-hydroxy-1-piperidyl)pyrimidin-5-ol với lượng bằng (400mg, 2,05mmol), *tert*-butyl N-[(Z)-2-(bromomethyl)-3-flo-allyl]cacbamat với lượng bằng (1,10g, 4,02mmol) và K_2CO_3 với lượng bằng (0,858g, 6,15mmol) trong DMF (10mL) trong 3 giờ ở nhiệt độ 60°C. Hòa tan hỗn hợp thu được bằng EtOAc (50mL). Rửa liên tục hỗn hợp với nước (100mL) sau đó rửa bằng nước muối (2×50mL). Làm khô pha hữu cơ bằng Na_2SO_4 , lọc và cô đặc dịch lọc để thu được phần chất còn lại. Đưa phần chất còn lại rửa giải qua sắc ký cột nhanh gel silic đioxit với gradien của EtOAc trong PE thay đổi từ 65 đến 75% để thu được hợp chất mong muốn với lượng bằng (558mg, 1,46mmol, 71,2%) là chất gồm màu vàng. 1H NMR

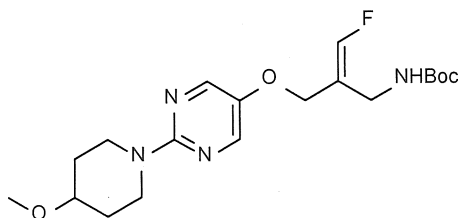
(400MHz, CDCl₃) δ 1,25 (s, 9H), 1,40-1,65 (m, 4H), 1,89-1,98 (m, 2H), 3,23-3,30 (m, 2H), 3,91 (s, 1H), 3,89-3,97 (m, 1H), 4,36-4,40 (m, 2H), 4,64 (s, 2H), 4,76 (br, 1H), 6,62 (d, $J = 84.0$ Hz, 1H) 8,10 (s, 2H).

Bước điều chế 7: *tert*-Butyl N-[(E)-3-F-2-[[2-(4-hydroxy-1-piperidyl)pyrimidin-5-yl]oxymethyl]allyl]cacbamat



Hóa hợp *tert*-butyl N-[(E)-2-[(2-clopyrimidin-5-yl)oxymethyl]-3-flo-allyl]cacbamat với lượng bằng (21,3g, 67,0mmol), piperidin-4-ol (25,0g, 235mmol), và DIPEA với lượng bằng (41mL, 235mmol) trong 1,4-dioxan (200mL). Gia nhiệt hỗn hợp thu được đến nhiệt độ 105°C dưới khí quyển chứa N₂ trong 7 giờ. Cô đặc hỗn hợp và phân chia giữa nước (100mL) và EtOAc (150mL), sau đó phân tách các pha. Chiết xuất pha dung dịch có nước với EtOAc (100mL). Hóa hợp tất cả các pha hữu cơ. Rửa với nước muối (100mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và cô đặc dịch lọc để thu được phần chất còn lại. Hòa tan phần chất còn lại bằng EtOAc (21mL), và sau đó bổ sung nhỏ giọt heptan (126mL). Khuấy trộn hỗn hợp thu được trong 20 giờ ở nhiệt độ phòng. Lọc hỗn hợp để thu gom chất rắn, rửa chất rắn bằng EtOAc/heptan (tỉ lệ 5:1, 21mL). làm khô chất rắn trong điều kiện chân không để thu được hợp chất mong muốn với lượng bằng (23,5g, 61,5mmol, 91,7%). Quang phổ khối ES/MS (m/z): 383 ($M+H$).

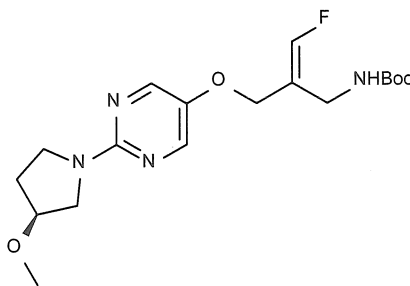
Bước điều chế 8: *tert*-Butyl N-[(E)-3-flo-2-[[2-(4-methoxy-1-piperidyl)pyrimidin-5-yl]oxymethyl]allyl]cacbamat



Chia *tert*-butyl N-[(E)-2-[(2-clopyrimidin-5-yl)oxymethyl]-3-flo-allyl]cacbamat với lượng bằng (4,10g, 12,9mmol) thành 2 phần bằng nhau (2,05g + 2,05g) và đặt từng phần vào trong lọ chịu được sóng ngắn riêng rẽ (20mL). Trong từng lọ, bổ sung 4-

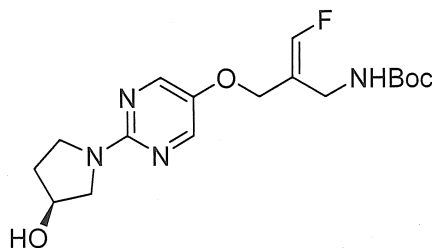
metoxypiperidin với lượng bằng (431g, 37,3mmol), 1,4-đioxan (30mL, 15mL) và DIPEA (6mL, 34,4mmol, 3mL). Bơm khí N₂ vào các lọ, đậy kín, và gia nhiệt đến nhiệt độ 120°C trong 12 giờ bởi sóng ngắn. Hóa hợp hai hỗn hợp phản ứng và cô đặc dưới điều kiện chân không để thu được phần chất còn lại. Đưa phần chất còn lại rửa giải qua sắc ký nhanh gel silic đioxit với hỗn hợp gồm EtOAc chiếm 30% trong hexan để thu được hợp chất mong muốn là dầu màu vàng với lượng bằng (4,24g, 10,2mmol, 79%). Quang phổ khối ES/MS (m/z): 397 (M+H).

Bước điều chế 9: *tert*-Butyl N-[(E)-3-flo-2-[[2-[(3S)-3-metoxypyrrolidin-1-yl]pyrimidin-5-yl]oxymetyl]alyl]cacbamat



Bổ sung *tert*-butyl N-[(E)-2-[(2-clopyrimidin-5-yl)oxymetyl]-3-flo-allyl]cacbamat với lượng bằng (400mg, 1,26mmol) vào hỗn hợp gồm (3S)-3-metoxypyrrolidin với lượng bằng (240mg, 2,37mmol) và K₂CO₃ với lượng bằng (0,696g, 5,04mmol) trong 1,4-đioxan (5mL). Khuấy trộn hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 120°C trong điều kiện có sóng ngắn trong 12 giờ. Cô đặc hỗn hợp dưới điều kiện chân không để thu được hỗn hợp mong muốn làm vật liệu thô, mà có thể được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần làm sạch thêm với lượng bằng (481mg, 1,26mmol, 99,9%). Quang phổ khối ES/MS (m/z): 383,2 (M+H).

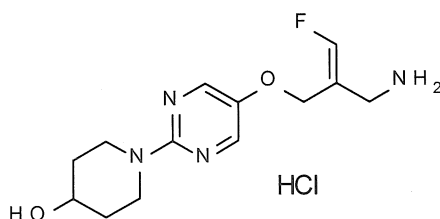
Bước điều chế 10: *tert*-Butyl N-[(E)-3-flo-2-[[2-[(3S)-3-hydroxypyrrolidin-1-yl]pyrimidin-5-yl]oxymetyl]alyl]cacbamat



Hòa tan *tert*-butyl N-[(E)-2-[(2-clopyrimidin-5-yl)oxymetyl]-3-flo-allyl]cacbamat (594,3mg, 1,87mmol) và (3S)-pyrrolidin-3-ol (488,9mg, 5,61mmol)

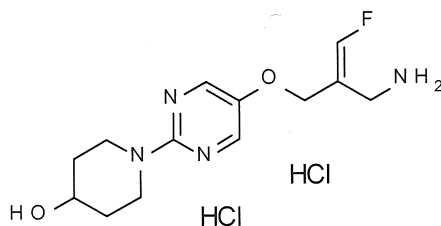
trong 1,4-đioxan (15mL) và DIPEA (3mL, 17,2mmol). Bơm khí N₂ vào dung dịch, làm kín bình chứa và gia nhiệt hỗn hợp đến 120°C trong 12 giờ bằng sóng ngắn. Cô đặc hỗn hợp thu được dưới điều kiện chân không để thu được phần chất còn lại. Đưa phần chất còn lại rửa giải qua sắc ký nhanh gel silic đioxit với gradien của EtOAc trong hexan thay đổi từ 80 đến 90% để thu được hợp chất mong muốn là bột màu vàng với lượng bằng (608,8mg, 1,57mmol, 84%). Quang phổ khối ES/MS (m/z): 369 (M+H).

Ví dụ 1: 1-[5-[(Z)-2-(Aminometyl)-3-fluor-allyloxy]pyrimidin-2-yl]piperidin-4-ol hydroclorit



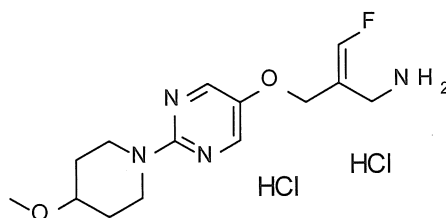
Bổ sung *tert*-butyl N-[(Z)-3-fluor-2-[[2-(4-hydroxy-1-piperidyl)pyrimidin-5-yl]oxymethyl]allyl]cacbamat với lượng bằng (558mg, 1,46mmol) vào HCl (4mol/L) và MeOH (10mL). Khuấy trộn hỗn hợp thu được trong 1,5 giờ ở nhiệt độ 10°C. Cô đặc hỗn hợp dưới áp suất được làm giảm để thu được phần chất còn lại. Đưa phần chất còn lại rửa giải qua cột HPLC điều chế: (Phenomenex Synergi C18 150 30mm, 4μm) với gradien của dung dịch HCl 0,05% trong ACN thay đổi từ 10 đến 15%; tốc độ dòng: 25mL/phút, R_t: 5,95 phút để thu được hợp chất mong muốn với tỉ lệ Z:E lớn hơn 20:1 với lượng bằng (456mg, 1,43 mmol, 98,0%) là chất rắn màu vàng. Quang phổ khối ES/MS (m/z): 283,1 (M+H), ¹H NMR (400MHz, d₄-MeOD) δ 1,56-1,78 (m, 2H), 1,92-2,13 (m, 2H), 3,61-3,72 (m, 2H), 3,75 (s, 2H), 3,95-4,06 (m, 1H), 4,11-4,25 (m, 2H), 4,89-4,93 (m, 2H), 7,19 (d, J = 80,4 Hz, 1H), 8,47 (s, 2H).

Ví dụ 2: 1-[5-[(E)-2-(Aminometyl)-3-fluor-allyloxy]pyrimidin-2-yl]piperidin-4-ol đihydroclorit



Hóa hợp *tert*-butyl N-[(E)-3-flo-2-[[2-(4-hydroxy-1-piperidyl)pyrimidin-5-yl]oxymethyl]alyl]cacbamat với lượng bằng (31g, 81,07mmol), MeOH (20mL, 494mmol), và HCl trong MeOH (120mL, 4mol/L, 486,4mmol). Khuấy trộn hỗn hợp thu được trong 30 giờ dưới điều kiện khí quyển chứa N₂ ở nhiệt độ phòng. Bổ sung EtOAc (250mL) kiểu nhỏ giọt và khuấy trộn hỗn hợp trong 30 phút. Lọc hỗn hợp để gom chất rắn, rửa chất rắn bằng EtOAc (20mL), và làm khô chất rắn dưới điều kiện chân không để thu được hợp chất mong muốn với tỉ lệ E:Z lớn hơn 20:1 với lượng bằng (26,4g, 72,8mmol, 89,8%). Quang phổ khối ES/MS (m/z): 283 (M+H), ¹H NMR (500MHz, d₆-DMSO) δ 1,28-1,36 (m, 2H), 1,73-1,76 (m, 2H), 3,18-3,25 (m, 2H), 3,55-3,60 (m, 2H), 3,68-3,75 (m, 1H), 4,18 (dt, J = 13,5, 4,5 Hz, 2H), 4,65 (d, J = 3,0 Hz, 2H), 6,55-7.10 (br, 2H), 7,27 (d, J = 82,0 Hz, 1H), 8,27 (s, 2H), 8,32-8,45 (br, 3H), ¹⁹F NMR (500 MHz, d₆-DMSO) δ 122,2 (s).

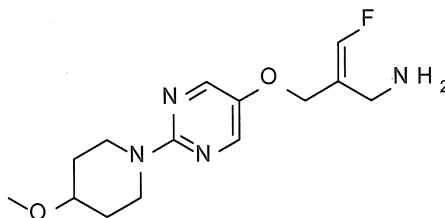
Ví dụ 3: (E)-3-Flo-2-[[2-(4-metoxi-1-piperidyl)pyrimidin-5-yl]oxymethyl]prop-2-en-1-amin, dihydroclorit



Hòa tan *tert*-butyl N-[(E)-3-flo-2-[[2-(4-metoxi-1-piperidyl)pyrimidin-5-yl]oxymethyl]alyl]cacbamat với lượng bằng (4,2374g, 10,69mmol) trong HCl bằng MeOH (100mL, 50mmol, 0,5mol/L). Gia nhiệt dung dịch sạch thu được đến nhiệt độ 60°C trong 4 giờ. Cô đặc hỗn hợp dưới điều kiện chân không để thu được phần chất còn lại với lượng bằng (3,95g). Tạo thể rắn phần chất còn lại trong MeOH (7mL) và hồi lưu hỗn hợp để thu được dung dịch sạch. Làm nguội dung dịch đến nhiệt độ phòng để thu được các tinh thể hình kim, và sau đó làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ -20°C. Lọc hỗn hợp để gom chất rắn, rửa chất rắn với MeOH lạnh để thu được hợp chất mong muốn là các tinh thể màu vàng nhạt với lượng bằng (2,73g, 7,01mmol, 66%). Các tinh thể màu vàng thu được có thể được làm sạch thêm thông qua việc kết tinh lại với cùng quy trình như được mô tả ở trên để thu được hợp chất mong muốn là vật liệu dạng tinh thể, nhạt màu với tỉ lệ E:Z lớn hơn 20:1, quang phổ khối ES/MS (m/z): 297 (M+H), ¹H NMR (500MHz, d₆-DMSO) δ 1,33-1,40 (m, 2H), 1,84-1,89 (m, 2H), 3.26 (dt, J = 13,5,

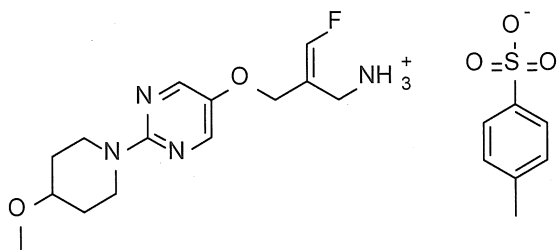
9,5 Hz, 2H), 3,27 (s, 3H), 3,40-3,45 (m, 1H), 3,56-3,62 (m, 2H), 4,11 (dt, $J = 13,5, 5,0$ Hz, 2H), 4,62 (d, $J = 3,0$ Hz, 2H), 5,26-5,94 (br, 1H), 7,27 (d, $J = 82,0$ Hz, 1H), 8,26 (s, 2H), 8,21-8,31 (br, 3H), ^{19}F NMR (500MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 122,1 (s).

Ví dụ 4: (E)-3-flo-2-[[2-(4-metoxi-1-piperidyl)pyrimidin-5-yl]oxymetyl]prop-2-en-1-amin



Hòa tan N-[(E)-3-Flo-2-[[2-(4-metoxi-1-piperidyl)pyrimidin-5-yl]oxymetyl]alyl] cacbamat với lượng bằng (167,0mg, 0,42mmol) trong dung dịch HCl có nồng độ 0,95M bằng 18mL EtOAc/MeOH (tỉ lệ theo thể tích bằng 10:1). Khuấy trộn hỗn hợp qua đêm. Cô đặc huyền phù thu được dưới điều kiện chân không và hòa tan phần chất còn lại trong nước. Đưa phần chất còn lại qua hệ thống sắc ký điều chế; cột sắc ký: XBridge® C18 $30 \times 15\text{mm}$ $5\mu\text{m}$; rửa giải với gradien của dung dịch nước chứa NH_4HCO với nồng độ 10mM trong ACN thay đổi từ 14 đến 24% trong khoảng thời gian từ 0 đến 11 phút; nhiệt độ cột bằng nhiệt độ phòng; tốc độ dòng: 35mL/phút, $R_t = 7,8$ phút dừng sau 17 phút, theo dõi bởi bộ phát hiện UV. Gom và cô đặc các phân thích hợp để thu được phần chất còn lại là dầu. Phần chất còn lại được hòa tan trong nước và được làm khô lạnh để thu được hợp chất mong muốn là chất rắn màu trắng với tỉ lệ E:Z lớn hơn 20:1 với lượng bằng (97mg, 0,31mmol, 74%, độ tinh khiết 95%). Quang phổ khối ES/MS (m/z): 297 ($\text{M}+\text{H}$), ^1H NMR (500MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 1,33-1,41 (m, 2H), 1,52-1,69 (br, 1H), 1,83-1,89 (m, 2H), 3,23-3,29 (m, 4H), 3,27 (s, 3H), 3,30-3,35 (br, 1H), 3,38-3,44 (m, 1H), 4,11 (dt, $J = 13,5, 4,5$ Hz, 2H), 4,55 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H), 6,93 (d, $J = 85,0$ Hz, 1H), 8,22 (s, 2H), ^{19}F NMR (500 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 131,8 (s).

Ví dụ 4a: (2E)-3-Flo-2-([2-(4-metoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl]oxy)methyl)prop-2-en-1-amin 4-metylbenzensulfonat (1:1)



Hòa tan (E)-3-flo-2-[[2-(4-metoxi-1-piperidyl)pyrimidin-5-yl]oxymetyl]prop-2-en-1-amin với lượng bằng (2,316g, 7,81mmol) bằng metyl axetat (3mL) và khuấy trộn với tốc độ 1000 vòng trên phút ở nhiệt độ phòng để thu được dung dịch màu vàng nhạt. Bổ sung axit 4-toluenesulfonic ngâm một nước với lượng bằng (1,62g, 8,43mmol) trong dung dịch gồm metyl axetat (4mL). Hỗn hợp trở thành vẩn đục và huyền phù đặc màu vàng nhanh chóng tạo thành. Lọc chất rắn bằng phương pháp lọc chân không qua giấy lọc. Rửa bã lọc bằng metyl axetat (4mL) để thu được bã lọc màu trắng. Làm khô chất rắn dưới dòng khí trong môi trường chân không trong 10 phút và sau đó làm khô trong lò chân không qua đêm ở nhiệt độ phòng qua để thu được hợp chất mong muốn với lượng bằng (3,00g, 81,8%).

Nhiều xạ bột tia X của ví dụ 4a,

Mẫu nhiễu xạ bột tia X (X-ray powder diffraction -XRD) của (2E)-3-flo-2-([2-(4-metoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl]oxy)metylprop-2-en-1-amin 4-metylbenzensulfonat kết tinh thu được trên máy nhiễu xạ bột tia X hiệu Bruker D4 Endeavor, được trang bị nguồn CuK α ($\lambda = 1,54060\text{\AA}$) và bộ phát hiện Vantec, vận hành ở 35kV và 50mA. Mẫu được quét giữa 4 và 40° theo 2 θ , với kích thước bước bằng 0,009° theo 2 θ và tốc độ quét bằng 0,5 giây/bước, và với độ lệch bằng 0,6mm, sự chống tán xạ cố định bằng 5,28 và các khe của bộ phát hiện bằng 9,5mm. Bột khô được đặt trên vật đựng mẫu bằng thạch anh và bề mặt nhẵn thu được bằng cách sử dụng lam kính thủy tinh. Các mẫu nhiễu xạ dạng tinh thể được gom ở nhiệt độ môi trường xung quanh và độ ẩm tương đối. Đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật về tinh thể học rằng, đối với bất kỳ dạng tinh thể đã định nào, các cường độ tương đối của các đỉnh nhiễu xạ có thể thay đổi do sự định hướng ưu tiên do các nhân tố như hình thái học tinh thể và cách tạo thành dạng tinh thể. Trong đó, các tác động của sự định hướng ưu tiên là có tồn tại, các cường độ đỉnh được hiệu chỉnh, nhưng các vị trí đỉnh đặc trưng của chất đa hình là không thay đổi. Xem, ví dụ, tài liệu tham khảo Dược

điển Mỹ #23, Danh mục quốc gia #18, các trang 1843-1844, 1995. Hơn nữa, đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật về tinh thể học rằng đối với bất kỳ dạng tinh thể đã định nào, các vị trí đỉnh thuộc góc có thể thay đổi một chút. Ví dụ, các vị trí đỉnh có thể di chuyển do sự biến thiên của nhiệt độ hoặc độ ẩm mà tại điều kiện đó mẫu được phân tích, sự thay thế mẫu, hoặc việc có hoặc không có tiêu chuẩn dùng trong thuốc. Trong trường hợp này, độ biến thiên của vị trí đỉnh là $\pm 0,2$ theo 2θ sẽ tính đến những biến đổi tiềm tàng này mà không gây trở ngại cho việc nhận biết rõ ràng dạng tinh thể đã biểu thị. Việc xác nhận dạng tinh thể có thể được thực hiện dựa trên bất kỳ sự kết hợp độc đáo nào của các đỉnh phân biệt (tính theo đơn vị $^\circ 2\theta$), điển hình là các đỉnh nổi bật hơn. Gồm các mẫu nhiễu xạ dạng tinh thể ở nhiệt độ môi trường xung quanh và độ ẩm tương đối và điều chỉnh dựa trên các đỉnh tiêu chuẩn NIST 675 tại 8,853 và 26,774 theo độ 2-theta.

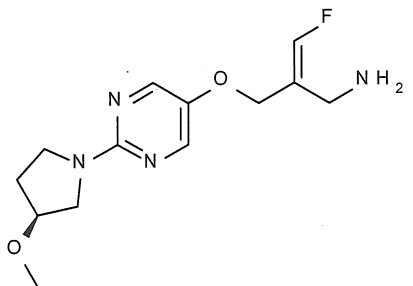
Mẫu được điều chế gồm (2E)-3-flo-2-([2-(4-metoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl]oxy)methylprop-2-en-1-amin 4-methylbenzensulfonat được đặc trưng bởi mẫu XRD sử dụng sự phát xạ CuK α vì có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số theo 2-theta) như được mô tả trong bảng 1 dưới đây, và cụ thể, có các đỉnh tại 18,6 kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ 22,4, 19,1 và 21,0; với dung sai cho các góc nhiễu xạ bằng $\pm 0,2^\circ$ theo 2 theta, một cách thay thế, muối có thể được đặc trưng bởi mẫu XRD có một hoặc nhiều đỉnh tại 18,6, 19,1, 21,0, 21,9 và 22,4 $\pm 0,2^\circ$ theo 2 theta, hoặc 17,6, 11,0, 16,8, 18,6, 19,1, 21,0, 21,9, 22,4 và 26,1 $\pm 0,2^\circ$ theo 2 theta.

Bảng 1

Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của (2E)-3-flo-2-([2-(4-metoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl]oxy)methylprop-2-en-1-amin 4-methylbenzensulfonat

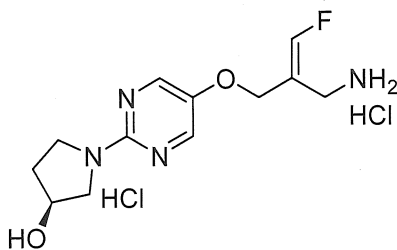
Đỉnh	Góc (theo $^\circ 2\text{-Theta}$) $\pm 0,2^\circ$	Cường độ tương đối (% của đỉnh cực đại)
1	7,4	17,6%
2	11,0	23,4%
3	12,7	5,2%
4	16,8	10,1%
5	18,6	100,0%
6	19,1	42,2%
7	21,0	41,9%
8	21,9	31,6%
9	22,4	77,5%
10	26,2	18,6%

Ví dụ 5: (E)-3-Flo-2-[[2-[(3S)-3-metoxypyrrolidin-1-yl]pyrimidin-5-yl]oxymetyl]prop-2-en-1-amin



Khuấy trộn dung dịch gồm *tert*-butyl N-[(E)-3-flo-2-[[2-[(3S)-3-metoxypyrrolidin-1-yl]pyrimidin-5-yl]oxymetyl]alyl]cacbamat với lượng bằng (481mg, 1,26mmol) và axit trifloaxetic với lượng bằng (1mL, 13,23mmol) trong DCM với lượng bằng (3mL) ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Cô đặc hỗn hợp dưới điều kiện chân không. Cho phần chất còn lại vào hệ thống HPLC điều chế: cột LC: XBridge® C18 30 × 150mm 5μm; rửa giải bằng dung dịch nước chứa NH₄HCO₃ với nồng độ 10mM chiếm 5% trong ACN trong khoảng thời gian từ 0 đến 2 phút, sau đó gradien dung dịch nước chứa NH₄HCO₃ với nồng độ bằng 10mM trong ACN thay đổi từ 6 đến 11% trong khoảng thời gian từ 2 đến 12 phút; dừng tại 18 phút; nhiệt độ cột bằng nhiệt độ phòng; tốc độ dòng bằng 35mL/phút, R_t = 10,6 phút; giám sát bằng bộ phát hiện UV để thu được hợp chất mong muốn với lượng bằng (226mg, 61,7%) là chất rắn màu trắng với tỉ lệ E:Z lớn hơn 20:1. Quang phổ khối ES/MS (m/z): 283,1 (M+H), ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,12-1,78 (br, 2H), 2,07-2,16 (m, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,53-3,68 (m, 6H), 4,07 (m, 1H), 4,44 (s, 2H), 6,57 (d, J = 83,0 Hz, 1H), 8,12 (s, 2H).

Ví dụ 6: (3S)-1-[5-[(E)-2-(Aminometyl)-3-flo-alyloxy]pyrimidin-2-yl]pyrrolidin-3-ol; dihydroclorit



Hòa tan *tert*-butyl N-[(E)-3-flo-2-[[2-[(3S)-3-hydroxypyrrolidin-1-yl]pyrimidin-5-yl]oxymetyl] alyl] cacbamat với lượng bằng (605,9mg, 1,65mmol) vào trong hỗn hợp gồm HCl trong MeOH với lượng bằng (30mL, 15mmol, 0,5mol/L) và

HCl trong nước với lượng bằng (5mL, 60mmol, 12mol/L). Khuấy trộn hỗn hợp sạch thu được qua đêm. Cô đặc hỗn hợp phản ứng dưới điều kiện chân không để thu được phần chất còn lại. Đưa phần chất còn lại vào hệ thống HPLC điều chế với cột LC: XBridge® C18 30 × 150mm 5µm; NH₄HCO₃ với nồng độ 10nM trong H₂O, ở nhiệt độ phòng; rửa giải bằng ACN 2% trong khoảng thời gian từ 0 đến 2 phút, sau đó gradient ACN thay đổi từ 2 đến 10% trong khoảng thời gian từ 2 đến 10 phút, với tốc độ dòng bằng 35mL/phút, R_t = 8,0 phút (được giám sát thông qua việc phát hiện UV); dừng tại 16 phút. Gom các phân thích hợp và cô đặc để thu được chất gốc tự do của hợp chất mong muốn. Hòa tan hợp chất gốc tự do bằng HCl với nồng độ 0,5M trong MeOH (15mL). Cô đặc dung dịch, bổ sung nước, và sau đó làm đông khô để thu được sản phẩm mong muốn là chất rắn màu vàng nhạt với tỉ lệ E:Z lớn hơn 20:1 (352,7mg, 0,982mmol, 59%). Quang phổ khối ES/MS (m/z): 269 (M+H), ¹H NMR (500MHz, d₆-DMSO) δ 1,87-1,94 (m, 1H), 1,98-2,05 (m, 1H), 3,44 (d, J = 11,5 Hz 1H), 3,51-3,61 (m, 5H), 4,39-4,42 (m, 1H), 4,66 (d, J = 3,0 Hz, 2H), 5,33-5,90 (br, 2H), 7,28 (d, J = 82,0 Hz, 1H), 8,35 (s, 2H), 8,35-8,44 (br, 3H), ¹⁹F NMR (500 MHz, d₆-DMSO) δ 121,9 (s).

Bước điều chế thay thế của ví dụ 6

Hòa tan *tert*-butyl N-[(E)-3-flo-2-[[2-[(3S)-3-hydroxypyrrolidin-1-yl]pyrimidin-5-yl]oxymetyl] alyl] cacbammat với lượng bằng (1,1601g, 3,15mmol) trong dung dịch gồm HCl trong EtOAc với lượng bằng (50mL, 50mmol, 1,0mol/L) (được trộn trước với HCl có nồng độ bằng 0,5mol/L trong 5ml MeOH). Khuấy trộn dung dịch thu được qua đêm. Cô đặc thể vẫn màu trắng dưới điều kiện chân không để thu được bột màu trắng. Hòa tan bột màu trắng trong nước và làm đông khô dung dịch để thu được các hợp chất mong muốn là chất rắn màu vàng nhạt với lượng bằng (860,7mg, 2,42mmol, 77%).

Nguyên liệu được điều chế như trong ví dụ 6 được hòa tan trong nước (5mL) và được hóa hợp với nguyên liệu thuộc ví dụ thay thế 6 trong nước (5mL). Làm đông khô hỗn hợp để thu được hợp chất mong muốn với tỉ lệ E:Z lớn hơn 20:1 với lượng bằng (1,151g, 3,27mmol). Quang phổ khối ES/MS m/z: 269 (M+H), ¹H NMR (500MHz, d₆-DMSO) δ 1,87-1,94 (m, 1H), 1,98-2,05 (m, 1H), 3,44 (d, J = 11,5 Hz 1H), 3,51-3,61 (m, 5H), 4,39-4,42 (m, 1H), 4,66 (d, J = 3,0 Hz, 2H), 5,33-5,90 (br,

2H), 7,28 (d, $J = 82,0$ Hz, 1H), 8,35 (s, 2H), 8,35-8,44 (br, 3H), ^{19}F NMR (500 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 121,9 (s).

Các xét nghiệm sinh vật học

Hoạt tính *In vitro* với SSAO/VAP-1

Hoạt tính oxidaza amin của các isoform SSAO, MAOa, và MAOb tái tổ hợp được đo bằng cách sử dụng bộ xét nghiệm MAO-Glo™ của Promega (V1402). Các hợp chất kiểm tra (với DMSO là chất pha với lượng bằng 0,5% tính theo thể tích đối với SSAO) và enzym được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng trước khi bổ sung chất nền phát quang. Nồng độ chất nền là $10\mu\text{M}$ đối với SSAO tái tổ hợp của người. Các xét nghiệm được tiến hành trong đệm có pH bằng 7,4 (50mM HEPES, 120mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl_2 , 1,4mM MgCl_2 , 0,001% Tween-20) trong tấm giếng cấy. Việc oxy hóa chất nền được tiến hành trong 2 giờ trước khi bổ sung thuốc thử phát hiện theo quy trình của nhà sản xuất. Trị số IC_{50} của các hợp chất được kiểm tra được tính toán bằng cách vẽ theo đường cong đáp ứng liều lượng sử dụng chương trình hồi quy không tuyến tính 4 tham số. Các trị số IC_{50} cho các hợp chất thuộc các ví dụ 3, 5 và 6 được liệt kê trong bảng 2.

Bảng 2

Ví dụ	IC_{50} tương đối kìm hãm hSSAO (nM)
3	12 ± 1 , n=5
5	32 ± 7 , n=4
6	52 ± 5 , n=7

Dữ liệu được biểu diễn là giá trị trung bình $\pm$ SEM (SEM=sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình) cho số lượng các thí nghiệm (n).

Các hợp chất thuộc các ví dụ đã thể hiện trị số IC_{50} đối với hSSAO là nhỏ hơn 60nM. Các hợp chất thuộc các ví dụ đã thể hiện trị số IC_{50} đối với hMAOa và hMAOb lần lượt lớn hơn $50\mu\text{M}$ và $200\mu\text{M}$, biểu thị rằng các hợp chất thuộc các ví dụ là có chọn lọc với hSSAO hơn là với hoặc hMAOa hoặc hMAOb.

Ước định mục tiêu cho SSAO

Hoạt tính của SSAO trong huyết tương và các mô gan của chuột được đo bằng cách sử dụng bộ thí nghiệm MAO-Glo™ của Promega (V1402). Hoạt tính còn lại của SSAO trong các con chuột sau khi điều trị bằng hợp chất được ước tính bằng việc đo

tổng hoạt tính của oxidaza amin trong huyết tương hoặc dịch thủy phân của gan mà không nhạy với sự có mặt của chất ức chế MAO Clogyline và Pargyline. Các con chuột được cung cấp các hợp chất thuộc ví dụ 2 với liều lượng 15, 3, 0,6, 0,12, 0,025, 0,005mg/kg. Nhóm kiểm soát được cung cấp với cùng thể tích (2ml/kg) của chất pha liều lượng (hydroxyetyl xenluloza 1% khối lượng/thể tích, 0,25% Tween 80). Huyết tương và gan tại 2 hoặc 24 giờ sau khi điều trị bằng hợp chất được thu và bảo quản ở nhiệt độ -78 °C cho đến khi phân tích. Các dịch thủy phân của mô được chuẩn bị bằng sự đồng nhất hóa trong đệm ly giải (20mM HEPES, pH 7,4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100 và 1 viên thuốc ức chế proteaza của Roche Complete). Các hạt mô được loại bỏ bằng việc ly tâm với tốc độ 12,000 vòng/phút tại nhiệt độ 4°C trong thời gian 30 phút. 40µl huyết tương hoặc dịch thủy phân của gan được ủ với Clogyline (10µM) và Pargyline (10µM) trong 20 phút ở nhiệt độ phòng trước khi bổ sung chất nền phát quang (50µM) trong 60 phút. Sản phẩm được tạo ra được lượng tử hóa theo cách thức của nhà sản xuất. Phần hoạt tính mà nhạy với sự có mặt của các chất ức chế MAO được sử dụng như chất thay thế cho hoạt tính còn lại của SSAO. Hợp chất thuộc ví dụ 2 đã được đánh giá trong quy trình về cơ bản như được mô tả ở trên được cung cấp với các liều lượng khác nhau. Kết quả được liệt kê trong bảng 3.

Bảng 3
Ước định mục tiêu SSAO cho ví dụ 2

Liều lượng (mg/kg)	Hoạt tính của SSAO (%)		
	Huyết tương		Gan
	2 giờ	24 giờ	24 giờ
Chất pha	100±7	100±9	100±11
0,005	31±3	70±7	75±18
0,025	21±1	55±9	68±14
0,12	7±1	35±4	45±8
0,6	4,3±0,8	16,3±2,6	16,2±2,9
3	3,6±1,0	8,8±1,3	7,1±1,7
15	-0,6±0,3	6,6±1,8	9,6±2,6

Dữ liệu được biểu diễn là giá trị trung bình ± SEM, n=6

Các kết quả biểu thị rằng hợp chất thuộc ví dụ 2 ức chế hoạt tính của SSAO phụ thuộc vào liều lượng trong cả huyết tương và gan của chuột.

Mô hình chuột của NASH và chứng xơ hóa gây ra bởi chế độ ăn 3H

Chuột đực C57BL/6N được cấp chế độ ăn D09100301 (các chế độ ăn theo nghiên cứu, chất béo 40%, cholesterol 2%, fructoza 24% (“chế độ ăn 3H” chất béo cao, cholesterol cao và fructoza cao) trong 150 ngày. Từng con chuột sau đó được nhốt riêng sau 5 ngày cho thời kỳ thích nghi môi trường. Aminotransferaza alanin (alanine aminotransferase -ALT) của huyết tương và cytokeratin 18 (CK18) được đo. Sau một tuần hồi phục, các con chuột được chọn ngẫu nhiên thành 5 nhóm dựa trên các trị số ALT, các trị số CK18, và khối lượng cơ thể của chúng. Các con vật thuộc từng nhóm được cung cấp hoặc chất pha (0,5% methylxenluloza (MC) + 0,25% Tween 80 trong nước cất) hoặc hợp chất thuộc ví dụ 6 (với liều lượng 0,06, 2, 6 và 20mg/kg) một lần trong ngày theo thể tích bằng 5ml/kg trong 11 tuần.

Máu được thu từ những con chuột được xử lý với hợp chất thuộc ví dụ 6 trong 76 ngày lấy sau 2 giờ sau liều lượng cuối cùng. Các mức độ của hợp chất trong huyết tương được phân tích bằng khối phổ. Các kết quả được liệt kê trong bảng 4 dưới đây. Những con chuột được điều trị thể hiện việc tăng lên phụ thuộc vào liều dùng của các mức hợp chất trong huyết tương. Tất cả các nhóm chuột được điều trị với ví dụ 6 thể hiện việc giảm đáng kể về ALT, biểu thị sự thương tổn gan đã giảm xuống trong các con vật này. Các con vật được điều trị với liều lượng 6 và 20mg/kg bằng hợp chất thuộc ví dụ 6 cũng thể hiện mức độ giảm triglycerit trong máu.

Khi hoàn thành nghiên cứu, các con vật bị giết và lấy gan của chúng. Hai lát cắt thùy não trái và thùy não phải được đặt trong formalin 10% được đệm trung tính. Các lam kính mang mô gan được nhuộm màu với hematoxylin và eosin (H&E), Kit nhuộm màu Sirius red, và Masson's Trichrome để chuẩn bị các lam kính cho việc phân tích bệnh lý. Tất cả các mẫu vật được kiểm tra bằng kính hiển vi và được chấm điểm như điểm hoạt tính theo hệ thống điểm Brunt được biến đổi. Các điểm dựa trên sơ đồ phân loại và các điểm cuối cùng như được mô tả trong tài liệu tham khảo “Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease,” World J. of Gastroenterol, 2010, 16(42), 5286-5296 của tác giả Brunt E. M, và cộng sự. Nhóm các giá trị trung bình sau đó được tính toán cho từng điểm cuối cùng riêng rẽ. Các điểm cuối cùng tiếp theo được sử dụng để

định rõ đặc điểm của chế độ ăn béo của NASH trong các con chuột như được biến đổi từ các điểm cuối cùng của NASH (Xem tài liệu tham khảo “Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease,” Clin Liver Dis., 2009, 13, 533-544 của tác giả Brunt, E. M. và tài liệu tham khảo “Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions”, Am J Gastroenterology, 1999, 94(9), 2467-2474 của tác giả Brunt, E. M, và cộng sự.

Phân tích mô bệnh học của gan từ các con chuột được điều trị với hợp chất thuộc ví dụ 6 được cung cấp trong bảng 4. Các kết quả cho thấy rằng có sự giảm đáng kể trong chứng viêm gan, gan nhiễm mỡ, và xơ gan trong các con chuột mà được điều trị bằng hợp chất thuộc ví dụ 6 với liều lượng bằng 20mg/kg.

Bảng 4

Các kết quả có hiệu quả cho hợp chất thuộc ví dụ 6

Liều lượng (mg/kg)	Số lượng động vật	Mức độ của hợp chất trong huyết tương (ng/ml)	ALT (IU/L) ¹	Huyết tương TG (mg/dL) ¹
Chất pha	12	-	713±43	69±4
0,6	13	66.±5	530±45*	55±6
2	13	163±21	483±44**	70±11
6	11	560±29	495±25*	46±4*
20	11	2117±219	466±37***	45±5*

Mô hình ¹MIXED được áp dụng để so sánh những thay đổi lần đo từ đường nền được điều chỉnh bởi đường nền giữa nhóm điều trị bằng hợp chất và nhóm chất pha, (Xem tài liệu tham khảo “Generalized, Linear, and Mixed Models,” của tác giả McCulloch, C.E., và Searle, S.R., Eds. John Wiley and Sons, 2000 và tài liệu tham khảo “Mixed-Effects Models in S and S-PLUS”, của tác giả Pinheiro J.C., và Bates, D. M., Eds. Springer, 2000.) Dữ liệu được biểu diễn là giá trị trung bình ±SEM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Bảng 5

Phân tích mô bệnh học gan cho hợp chất thuộc ví dụ 6

Liều lượng (mg/kg)	Điểm (0-3) ¹					
	Viên gan		Gan nhiễm mỡ		Xơ hóa gan	
	Trái	Phải	Trái	Phải	Trái	Phải
Chất pha	2,8±0,1	2,7±0,1	2,8±0,1	2,8±0,1	2,5±0,2	2,3±0,1
0,6	2,6±0,1	2,5±0,1	2,5±0,1	2,6±0,1	2,4±0,2	1,9±0,2
2	2,5±0,1	2,6±0,1	2,5±0,1	2,7±0,1	2,5±0,2	1,8±0,2
6	2,5±0,2	2,6±0,2	2,9±0,1	2,7±0,1	2,6±0,2	2,1±0,3
20	2,1±0,1**	2,1±0,1*	2,4±0,2	2,3±0,1*	1,9±0,2	1,5±0,2*

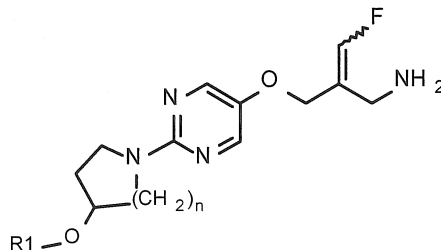
¹ Phép kiểm định phi tham số được áp dụng để so sánh các điểm giữa các nhóm điều trị bằng hợp chất và nhóm chất pha. Các điểm cho các phần trên trái và bên phải được so sánh riêng rẽ.

Dữ liệu được biểu diễn là giá trị trung bình±SEM.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức sau:

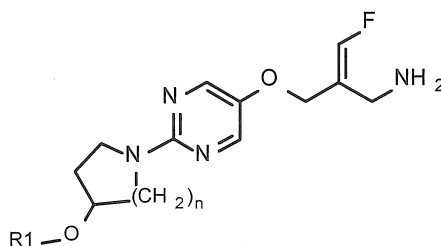


trong đó n là 1 hoặc 2; và

R1 là H hoặc -CH₃;

hoặc muối được dụng của hợp chất này.

2. Hợp chất có công thức sau:



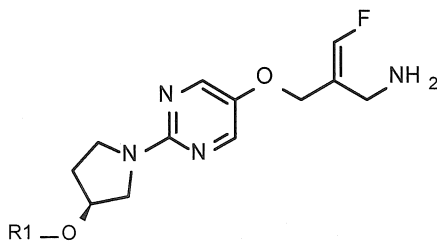
trong đó n là 1 hoặc 2; và

R1 là H hoặc -CH₃;

hoặc muối được dụng của hợp chất này.

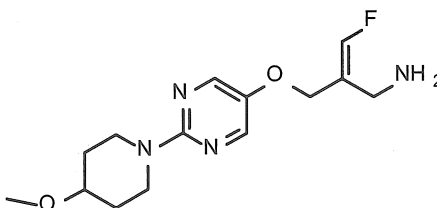
3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó n là 1, hoặc muối được dụng của hợp chất này.
4. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó n là 2, hoặc muối được dụng của hợp chất này.
5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó R1 là H, hoặc muối được dụng của hợp chất này.
6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó R1 là -CH₃, hoặc muối được dụng của hợp chất này.

7. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, có công thức:



hoặc muối được dụng của hợp chất này.

8. Hợp chất có công thức sau:



hoặc muối được dụng của hợp chất này.

9. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó hợp chất này ở dạng muối cộng mono hoặc di hydroclorua, muối cộng axit metylsulfonic hoặc muối cộng axit 4-metylbenzensulfonic.

10. Hợp chất theo điểm 8, trong đó hợp chất này là (2E)-3-flo-2-([2-(4-metoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl]oxy)methyl)prop-2-en-1-amin 4-metylbenzensulfonat.

11. Hợp chất theo điểm 8, trong đó hợp chất này là (E)-3-flo-2-[[2-(4-metoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl]oxymethyl]prop-2-en-1-amin dihydroclorua.

12. Hợp chất (2E)-3-flo-2-([2-(4-metoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-5-yl]oxy)methyl)prop-2-en-1-amin 4-metylbenzensulfonat ở dạng tinh thể được đặc trưng bởi mẫu nhiễu xạ bột tia X thu được từ nguồn CuK α ($\lambda=1,54056\text{\AA}$), mà có các đỉnh tại:

a) 18,6, 19,1, 21,0, 21,9, và 22,4 $\pm$ 0,2 $^\circ$ theo 2 theta, hoặc

b) 17,6, 11,0, 16,8, 18,6, 19,1, 21,0, 21,9, 22,4 và 26,1 $\pm$ 0,2 $^\circ$ theo 2 theta.

13. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, hoặc muối dược dụng của hợp chất này, và chất mang dược dụng, chất pha loãng hoặc tá dược.