



(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

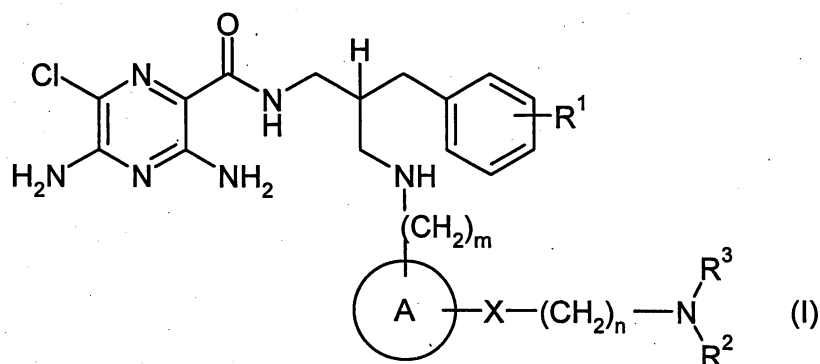
(11) 
1-0020210

(51)⁷ **C07D 401/06, 241/28, A61K 31/497,** (13) **B**
A61P 11/00

-
- (21) 1-2016-03902 (22) 17.03.2015
(86) PCT/GB2015/050765 17.03.2015 (87) WO2015/140527 24.09.2015
(30) 61/954,674 18.03.2014 US
(45) 25.12.2018 369 (43) 27.02.2017 347
(73) ASTRAZENECA AB (SE)
SE-151 85 Sodertalje, Sweden
(72) BERGLUND Susanne Elisabeth (SE), CONNOLLY Stephen (GB), HEMMERLING
Martin (SE), HOSSAIN Nafizal (SE), KRISTOFFERSSON Anna (GB), LUNDKVIST
Johan Rune, Michael (GB), NIKITIDIS Grigorios (SE), RIPA Lena Elisabeth (SE),
SHAMOVSKY Igor (SE)
(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)
-

(54) **HỢP CHẤT PYRAZIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ**

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



hoặc muối được dụng của nó; quy trình điều chế hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất pyrazin có hoạt tính được và được phẩm chứa các hợp chất này .

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc hydrat hóa biểu mô đường khí phổi sẽ đảm bảo cho chức năng lông mao một cách hiệu quả, và việc thanh thải niêm mạc có mao (mucociliary clearance: MCC) là cơ chế bảo vệ bẩm sinh quan trọng hàng đầu cho đường khí. Thất bại trong việc thanh thải dịch nhầy thích hợp sẽ tạo ra tình trạng ứ đọng dịch nhầy và nguy cơ tắc đường khí và ảnh hưởng đến tình trạng nhiễm vi khuẩn mạn tính. Sự tăng tiết dịch nhầy, làm đặc thêm dịch nhầy và tốc độ thanh thải niêm mạc có mao giảm là những đặc tính được hình thành của cả bệnh lý xơ hóa nang (Cystic Fibrosis: CF) và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (Chronic Obstructive Lung Disease: COPD), và góp phần đáng kể vào sự hoành hành và tỷ lệ chết của bệnh. Mức độ MCC kém sẽ dẫn đến sự tắc đường khí do sự ứ đọng dịch nhầy, sự ứ đọng này sẽ tác động đến chức năng của phổi và chính là nguồn gây ra nhiễm trùng tạo thuận lợi cho tập đoàn vi khuẩn và dẫn đến tỷ lệ và mức độ trầm trọng bệnh gia tăng.

Bệnh lý của bệnh CF là được đặc trưng bởi và được gây ra bởi sự đột biến ở gen điều hòa độ dẫn màng xơ hóa nang (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: CFTR) dẫn đến sự mất nước của đường khí, và vẫn còn là một trong số các rối loạn di truyền gây chết thường gặp nhất trên thế giới. Mặc dù CF là một bệnh của nhiều cơ quan kết hợp, sự hoành hành của bệnh và tỷ lệ chết của bệnh được xác định chủ yếu bởi bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính mà bắt nguồn từ dịch nhầy khởi phát sớm bịt kín đường khí nhỏ, tình trạng viêm đường khí do bạch cầu trung tính mạn tính và nhiễm vi khuẩn.

Bệnh lý của bệnh COPD là phức tạp và được hiểu biết một cách nghèo nàn. Những hướng dẫn lâm sàng hiện nay mô tả COPD là một tình trạng bệnh được đặc trưng bởi sự giới hạn của luồng khí mà không được đảo ngược một cách đầy đủ. Tình

trạng giới hạn của luồng khí thường thường tiến triển và liên quan đến đáp ứng viêm bất bình thường của phổi với các hạt và khí độc hại. Nguồn đóng góp quan trọng nhất các hạt và khí này là khói thuốc lá. Các bệnh nhân COPD có nhiều triệu chứng, bao gồm ho, khó thở, và sự tiết quá mức đờm dãi; các triệu chứng này gia tăng do sự rối loạn chức năng của một số khoang tế bào, bao gồm các tế bào bạch cầu trung tính, đại thực bào, và tế bào biểu mô.

Việc hydrat hóa đường khí vừa đủ là điều quan trọng để duy trì MCC và lượng nước thích hợp của dịch nhầy. Việc điều hòa sự hydrat hóa đường khí có liên quan mật thiết đến chất điện phân và sự dịch chuyển của nước qua lớp tế bào biểu mô. Dịch lỏng quanh lông (periciliary liquid: PCL) trên bề mặt biểu mô đường khí xung quanh lông mao sẽ phân tách lớp dịch nhầy nhớt ra khỏi bề mặt biểu mô và tạo điều kiện thuận lợi cho lông mao hoạt động. Thể tích/độ sâu của PLC được thấy là yếu tố quyết định chính của tốc độ MCC.

ENaC (Epithelial Natri Channel: Kênh natri biểu mô) là kênh ion có cổng nhạy với amilorua, không có điện thế được biểu thị rộng rãi trong biểu mô của hệ hô hấp, hệ tiết niệu, hệ tiêu hóa, hệ sinh sản và da. Về mặt hệ thống, ENaC đóng vai trò quan trọng trong quá trình nội cân bằng chất điện phân và cân bằng thể tích lỏng bằng cách điều hòa sự vận chuyển Na^+ qua biểu mô thận.. Thông qua sự kiểm soát vận chuyển natri, ENaC sẽ kiểm soát gradien thẩm thấu qua biểu mô đường khí và nhờ đó điều hòa thể tích PCL. Sự ức chế vận chuyển natri gây ra qua trung gian ENaC sẽ làm giảm gradien thẩm thấu qua biểu mô, dẫn đến sự giữ lại được nước trên bề mặt đường khí (thể tích PLC gia tăng), và làm tăng mức độ hydrat hóa dịch nhầy và tốc độ MCC.

Vai trò của ENaC đóng vai trò làm chất điều hòa chủ chốt thể tích dịch lỏng xung quanh bề mặt đường khí (airway surface liquid: ASL) và thanh thải niêm mạc có mao (MCC) in vivo đã được biết trong tài liệu chuyên ngành. Các nghiên cứu lần lượt trên chuột α - β - và γ -ENaC (-/-) cho thấy vai trò chủ chốt của chức năng ENaC trong việc thanh thải dịch lỏng của phổi chu sinh (Barker et al., J. Clin. Invest., 1998. 102(8):1634; Bonny and Hummler, Kidney Int., 2000. 57(4):1313; Pradervand et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1999. 96(4):1732). Chuột chuyển gen biểu hiện quá mức phân tử phụ ENaC β thể hiện sự hấp thụ Na^+ trong đường khí gia tăng, suy giảm

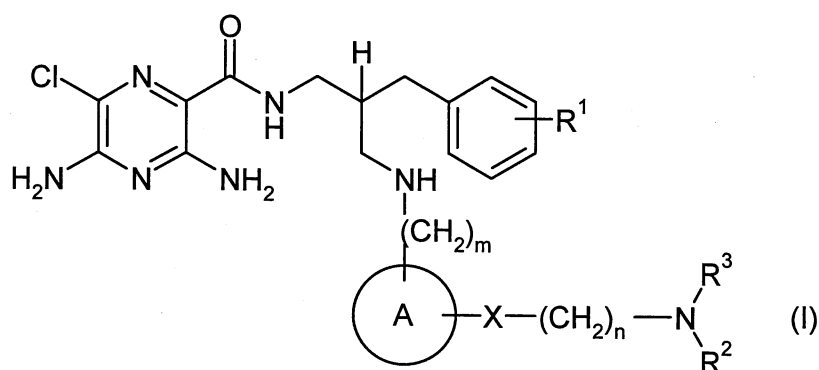
thể tích ASL, khử hydrat hóa dịch nhầy và MCC trì hoãn. Chuột mắc phải bệnh phổi nặng có các dấu hiệu lâm sàng tương tự với CF và COPD, bao gồm tắc nghẽn dịch nhầy, dị sản tế bào hình đài, viêm bạch cầu trung tính, thanh thải vi khuẩn khiếm khuyết và tràn khí (Mall et al., *Nature Med.*, 2004. 10:487; Mall et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2007. 177:730). Tỷ lệ tử vong trong số các con chuyển gen trong vòng 20 ngày đầu tiên của cuộc đời là khoảng 50% do dịch nhầy quá mức bít kín đường khí dẫn đến trạng thái ngạt, nhưng tỷ lệ chết được làm giảm đáng kể nếu dùng amilorua cho phổi của chuột 14 ngày sau khi sinh (Mall et al., *ATS Poster abstract #G55*, 2008).

Ngoài ra, những người bị hiện tượng giảm aldosteron 1 giả (PHA1), một bệnh gây ra bởi sự đột biến mất chức năng ở các gen mã hóa α - β - và γ -ENaC, cho thấy thể tích ASL gia tăng và điều hòa tăng MCC (Kerem et al., *N. Engl. Med.*, 1999. 341:156). Việc điều trị cho đối tượng bình thường bị phong bế kênh ENaC bằng hợp chất amilorua sẽ làm tăng thể tích ASL và tốc độ MCC (Sood et al., *Am. J. Crit. Care Med.*, 2003. 167:158).

Amilorua và benzamil là dẫn xuất pyrazin có hoạt tính được đã biết để làm phong bế kênh natri biểu mô.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế, theo một khía cạnh, là đề xuất hợp chất có công thức (I):



trong đó:

R^1 được chọn từ hydro hoặc C_{1-4} alkyl;

m là 1 hoặc 2;

A được chọn từ phenyl hoặc heterocyclyl;

X được chọn từ $-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^4-$ hoặc $-O-C(=O)-NR^5-$;

n là 2 hoặc 3;

R^2 được chọn từ hydro hoặc C_{1-8} alkyl;

R^3 là C_{5-6} alkyl-OH, trong đó nhóm C_{5-6} alkyl nêu trên còn được thế thêm bằng 3 hoặc 4 nhóm -OH nữa; và

R^4 và R^5 được chọn từ hydro hoặc C_{1-4} alkyl;

hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Sáng chế còn đề cập đến hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, để sử dụng trong điều trị.

Sáng chế còn đề cập đến hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh gây ra qua trung gian ENaC.

Sáng chế còn đề cập đến hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong việc sản xuất thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh gây ra qua trung gian ENaC.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh gây ra qua trung gian ENaC ở động vật có vú mắc phải, hoặc có nguy cơ bị bệnh nêu trên, phương pháp này bao gồm việc dùng cho động vật có vú cần điều trị một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các khía cạnh khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sau khi đọc bản mô tả.

Hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại ở dạng muối hoặc dạng không phải muối (tức là dưới dạng bazơ tự do), và sáng chế bao hàm cả các dạng muối và dạng không phải muối.

Hợp chất được mô tả trong bản mô tả này có thể tạo ra muối cộng axit. Nói chung, muối cộng axit có thể được điều chế bằng cách sử dụng các axit vô cơ hoặc hữu cơ khác nhau. Các muối này có thể được tạo ra bằng cách, ví dụ, trộn hợp chất với axit (ví dụ một lượng tỷ lệ của axit) bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Bước trộn này có thể xảy ra trong nước, dung môi hữu cơ (ví dụ ete, etyl axetat, etanol, metanol, isopropanol, hoặc axetonitril), hoặc hỗn hợp nước/hữu cơ.

Theo phương án khác của sáng chế, muối cộng axit là, ví dụ, trifloaxetat, format, axetat hoặc clohydric.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ các nguyên tắc chung và kỹ thuật để điều chế muối được dụng, như muối được mô tả trong, ví dụ, tài liệu Berge et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Hợp chất và muối được mô tả trong sáng chế này có thể bao gồm một hoặc nhiều tâm bất đối (tức là không đối xứng).

Hợp chất và muối được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm một hoặc nhiều tâm bất đối (tức là không đối xứng). Đối với phạm vi của cấu trúc hoặc tên hóa học trong bản mô tả này không thể hiện tính không đối xứng, cấu trúc hoặc tên được dự định bao hàm chất đồng phân lập thể đơn bất kỳ (tức là chất đồng phân không đối xứng đơn bất kỳ) tương ứng với cấu trúc hoặc tên, cũng như hỗn hợp bất kỳ của các chất đồng phân lập thể (ví dụ raxemat). Theo một số phương án, chất đồng phân lập thể đơn thu được bằng cách phân tách nó ra khỏi hỗn hợp các chất đồng phân (ví dụ raxemat) bằng cách sử dụng, ví dụ, phân tách sắc ký bất đối. Theo phương án khác, chất đồng phân lập thể đơn thu được bằng cách tổng hợp trực tiếp từ, ví dụ, nguyên liệu đầu không đối xứng.

Khi ở dạng tinh thể rắn, hợp chất có công thức (I) có thể ở dạng đồng tinh thể với thực thể hóa học khác và sáng chế bao hàm tất cả các dạng đồng tinh thể này.

Hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại dưới dạng solvat hóa (như hydrat) cũng như dạng không được solvat hóa, và sáng chế bao hàm tất cả các dạng solvat này.

Hợp chất và muối được mô tả trong bản mô tả này có thể tồn tại ở nhiều dạng tautome khác nhau và sáng chế bao hàm tất cả các dạng tautome này. Thuật ngữ “tautome” là chỉ các chất đồng phân về mặt cấu trúc mà tồn tại ở dạng cân bằng là kết quả từ sự di chuyển của nguyên tử hydro.

Hợp chất và muối được mô tả trong bản mô tả này có thể được đánh dấu đồng vị (hoặc “đánh dấu phóng xạ”). Trong trường hợp này, một hoặc nhiều nguyên tử được thay thế bằng nguyên tử có khối lượng nguyên tử hoặc số khối khác với khối lượng nt hoặc số khối thường thấy trong tự nhiên. Ví dụ về chất nuclit phóng xạ có thể được đưa vào bao gồm ^2H (còn được viết là “D” đối với deuteri), ^3H (còn được viết là “T” đối với triti), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O và ^{36}Cl . Nuclit phóng xạ mà được sử dụng sẽ tùy thuộc vào ứng dụng cụ thể của dẫn xuất được đánh dấu phóng xạ này. Ví dụ, đối với các thử nghiệm đánh dấu phóng xạ và cạnh tranh in vitro, ^3H hoặc ^{14}C là thường được sử dụng. Đối với ứng dụng chụp ảnh phóng xạ, ^{11}C thường được sử dụng. Theo một số phương án, nuclit phóng xạ là ^3H . Theo một số phương án, nuclit phóng xạ là ^{14}C . Theo một số phương án, nuclit phóng xạ là ^{11}C .

Các nhóm và các gốc alkyl là mạch thẳng hoặc mạch nhánh, ví dụ C_{1-8} alkyl, C_{1-6} alkyl, C_{1-4} alkyl hoặc C_{5-6} alkyl. Ví dụ về các nhóm alkyl là metyl, etyl, n-propyl, iso-propyl, n-butyl, t-butyl, n-pentyl, n-hexyl, n-heptyl và n-octyl, như metyl hoặc n-hexyl.

Heteroxyclyl là vòng không thơm có 5 hoặc 6 cạnh chứa 1 hoặc 2 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ nitơ, oxy hoặc lưu huỳnh; hoặc N-oxit của nó, hoặc S-oxit hoặc S-dioxit của nó. Ví dụ về heteroxyclyl là vòng không thơm có 5 hoặc 6 cạnh chứa 1 hoặc 2 nguyên tử nitơ; hoặc N-oxit của nó, hoặc S-oxit hoặc S-dioxit của nó, ví dụ, pyrrolidinyl hoặc piperidinyl, như piperidin-4-yl. Để tránh nghi ngờ, các phần tử thể trên vòng heteroxyclyl có thể được liên kết qua nguyên tử cacbon hoặc nguyên tử khác loại.

Thuật ngữ “được dụng” được sử dụng ở đây là để chỉ nhóm (ví dụ muối, dạng liều hoặc tá dược) là thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân dự định.

Theo một khía cạnh cụ thể, R^1 được thế vào nhóm phenyl ở vị trí 2 tương ứng với điểm gắn của phần còn lại của hợp chất có công thức (I).

Theo khía cạnh khác, R^1 là C_{1-4} alkyl.

Theo khía cạnh khác, R^1 là methyl.

Theo khía cạnh khác, m là 1.

Theo khía cạnh khác nữa, A được chọn từ phenyl hoặc piperidinyl.

Theo khía cạnh khác, A là phenyl.

Theo khía cạnh khác, A là piperidinyl.

Theo khía cạnh khác, X là $-C(=O)-NR^4-$.

Theo khía cạnh khác, X là $-C(=O)-NH-$.

Theo một khía cạnh, khi nhóm X là $-C(=O)-NR^4-$, thì nhóm cacbonyl của X được liên kết với A và nhóm amino của X được liên kết với $(CH_2)_n$. Theo khía cạnh khác, khi nhóm X là $-C(=O)-NR^4-$, thì nhóm amino của X được liên kết với A và nhóm cacbonyl của X được liên kết với $(CH_2)_n$.

Theo một khía cạnh, khi nhóm X là $-O-C(=O)-NR^5-$, thì ete oxy của X được liên kết với A và nhóm amino của X được liên kết với $(CH_2)_n$. Theo khía cạnh khác, khi nhóm X là $-O-C(=O)-NR^5-$, thì nhóm amino của X được liên kết với A và ete oxy của X được liên kết với $(CH_2)_n$.

Theo khía cạnh khác, nhóm X được thế với nhóm A ở vị trí 4 tương ứng với điểm liên kết với phần còn lại của hợp chất có công thức (I).

Theo khía cạnh khác, n là 2.

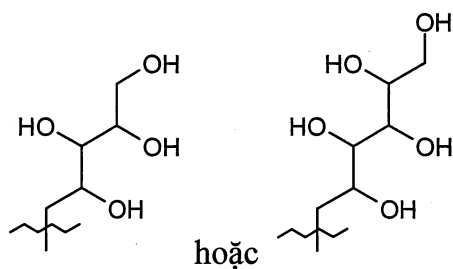
Theo khía cạnh khác, R^2 là C_{1-8} alkyl.

Theo khía cạnh khác nữa, R^2 là n-hexyl.

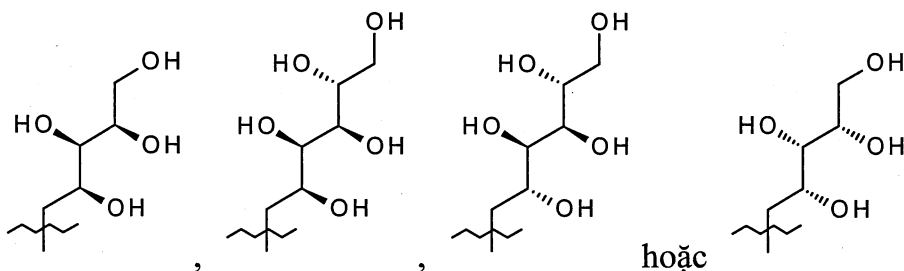
Theo khía cạnh khác, R^3 là C_5 alkyl-OH, trong đó nhóm C_5 alkyl nêu trên còn được thế thêm bằng 3 nhóm -OH nữa.

Theo khía cạnh khác, R^3 là C_6 alkyl-OH, trong đó nhóm C_6 alkyl nêu trên còn được thế thêm bằng 4 nhóm -OH nữa.

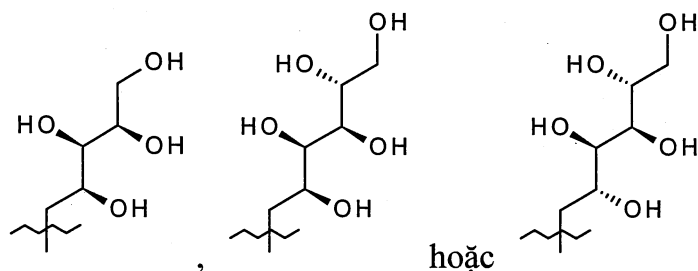
Theo khía cạnh khác, R^3 được chọn từ chất sau đây:



Theo khía cạnh khác, R^3 được chọn từ chất sau đây:



Theo khía cạnh khác, R^3 được chọn từ chất sau đây:



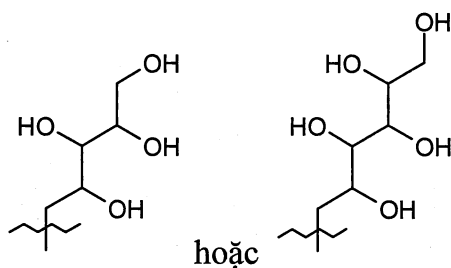
Theo khía cạnh khác, R^3 được chọn từ (2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl, (2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl, (2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl hoặc (2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl.

Theo khía cạnh khác, R^3 được chọn từ (2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl, (2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl hoặc (2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl.

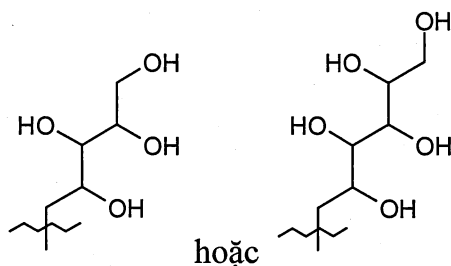
Theo khía cạnh khác, R^5 là hydro.

Theo khía cạnh khác, R^1 là C_{1-4} alkyl; m là 1 hoặc 2; A là phenyl hoặc piperidinyl; X được chọn từ $-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^4-$ hoặc $-O-C(=O)-NR^5-$; n là 2 hoặc 3; R^2 là hydro hoặc C_{1-8} alkyl; R^3 là C_{5-6} alkyl-OH, trong đó nhóm C_{5-6} alkyl nêu trên còn được thể thêm bằng 3 hoặc 4 nhóm -OH nữa; và R^4 và R^5 đều là hydro.

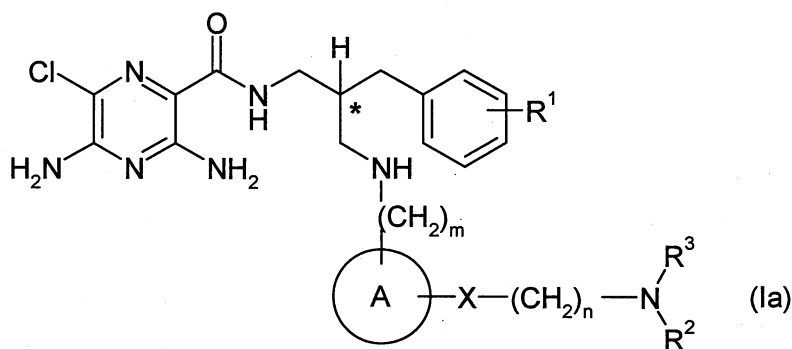
Theo khía cạnh khác, R^1 là C_{1-4} alkyl; m là 1; A là phenyl hoặc piperidinyl; X là $-C(=O)-NH-$; n là 2; R^2 là C_{1-8} alkyl; R^3 được chọn từ chất sau đây:



Theo khía cạnh khác, R^1 là C_{1-4} alkyl; m là 1; A là phenyl; X là $-C(=O)-NH-$; n là 2; R^2 là C_{1-8} alkyl; và R^3 được chọn từ chất sau đây:



Theo khía cạnh khác của sáng chế hợp chất theo sáng chế có hóa học lập thể R ở tâm cacbon được đánh dấu bằng dấu hoa thị (*) trong công thức (Ia) dưới đây:



Ví dụ về hợp chất theo sáng chế là:

3,5-diamino-6-clo-N-(2-(2-methylbenzyl)-3-(((1-(3-((2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methyl)amino)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-(((4-((2-(hexyl(2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((1-(2-(hexyl(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbamoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((1-(3-(hexyl(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((1-(3-(hexyl(2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((1-(4-(hexyl(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(2-(2-methylbenzyl)-3-((1-(3-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexylamino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((1-(3-(hexyl(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

4-((3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propylamino)methyl)phenyl 2-(hexyl(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl(2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl(2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-(3-(2-(hexyl(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

hoặc muối được dụng của nó.

Ví dụ thêm về hợp chất theo sáng chế là:

3,5-diamino-6-clo-N-(2-(2-methylbenzyl)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methyl)amino)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((1-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((1-(4-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(2-(2-methylbenzyl)-3-((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexylamino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((1-(3-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

4-((3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propylamino)methyl)phenyl 2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbamate;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-((4-((2-(hexyl((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-(3-(3-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

hoặc muối được dụng của nó.

Ví dụ thêm về hợp chất theo sáng chế là:

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-2-(2-methylbenzyl)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methyl)amino)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(4-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-2-(2-methylbenzyl)-3-((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexylamino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

4-(((R)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propylamino)methyl)phenyl 2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((S)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((S)-3-((4-((2-(hexyl((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

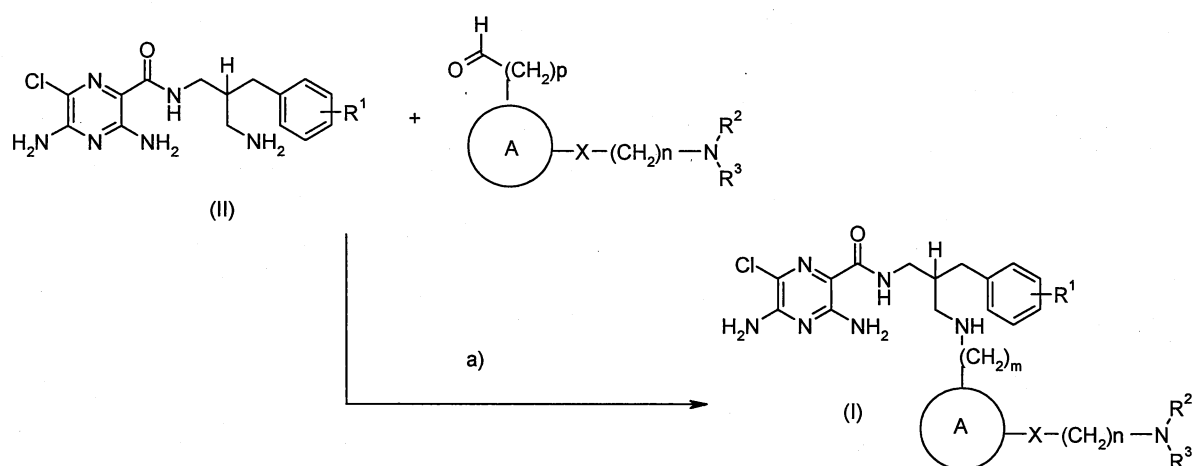
3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-(3-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbamoyl)phenethylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

hoặc muối được dụng của nó.

Dấu hiệu khác của sáng chế là phương án bất kỳ được mô tả trên đây với điều kiện là các hợp chất của các Ví dụ cụ thể không được bảo hộ. Ví dụ, dấu hiệu khác là phương án bất kỳ được mô tả trên đây với điều kiện là hợp chất bất kỳ được chọn từ danh sách trên đây là ví dụ về hợp chất theo sáng chế không được bảo hộ.

Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức (I) ngoại trừ ít nhất một hợp chất được nêu trong phần Ví dụ dưới đây. Để minh họa theo các phương án này, hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức (I) ngoại trừ hợp chất được mô tả trong Ví dụ X, trong đó X có thể là 1, 2, 3, v.v... Theo phương án khác, hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức (I) ngoại trừ hợp chất được mô tả trong các Ví dụ Y, trong đó Y có thể là tổ hợp của 1, 2, 3, v.v...

Hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế từ hợp chất có công thức (II) theo Sơ đồ 1, trong đó R^1 , R^2 , R^3 , A, X, m và n là như được xác định trong công thức (I), và trong đó $p = m-1$.

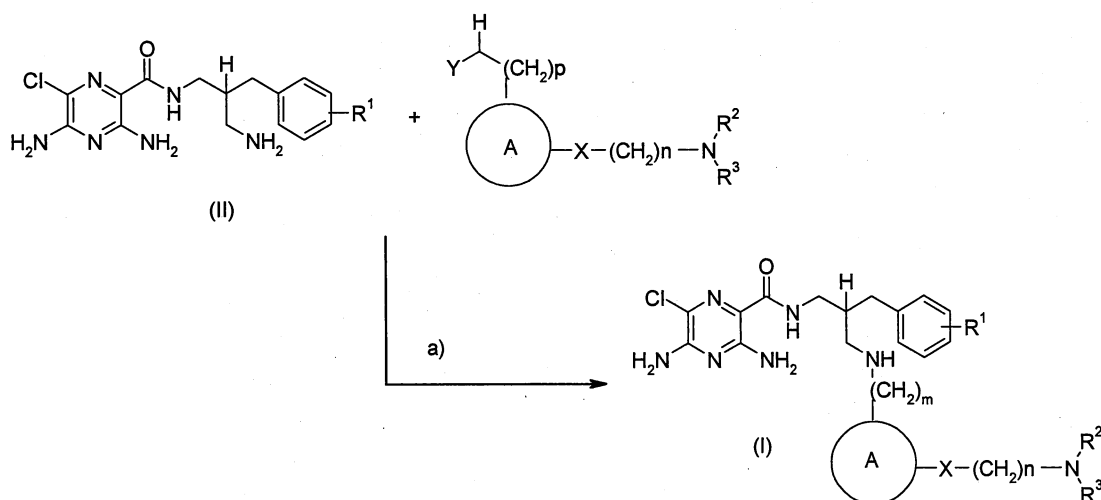


Sơ đồ 1:

a) $\text{NaH}(\text{OAc})_3$, AcOH, THF hoặc NaBH_4 , MeOH

Theo cách khác, hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế theo cách

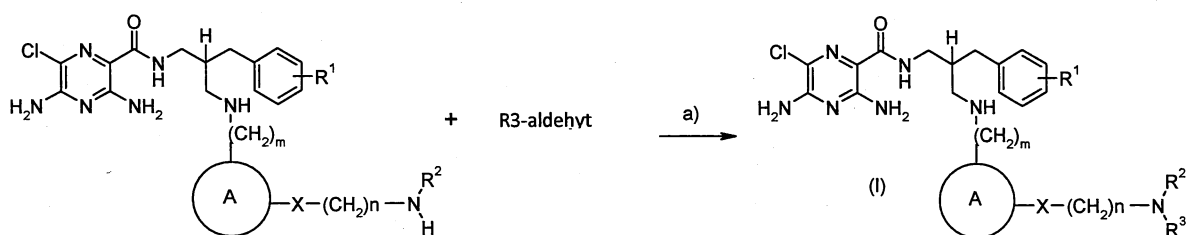
được mô tả trong Sơ đồ 2 trong đó R^1 , R^2 , R^3 , A, X, m và n là như được xác định trong công thức (I), và trong đó Y là halogen, ví dụ, clo, brom hoặc iot và $p = m-1$.



Sơ đồ 2:

a) NaH hoặc K_2CO_3 hoặc Cs_2CO_3 hoặc DIEA, DMF.

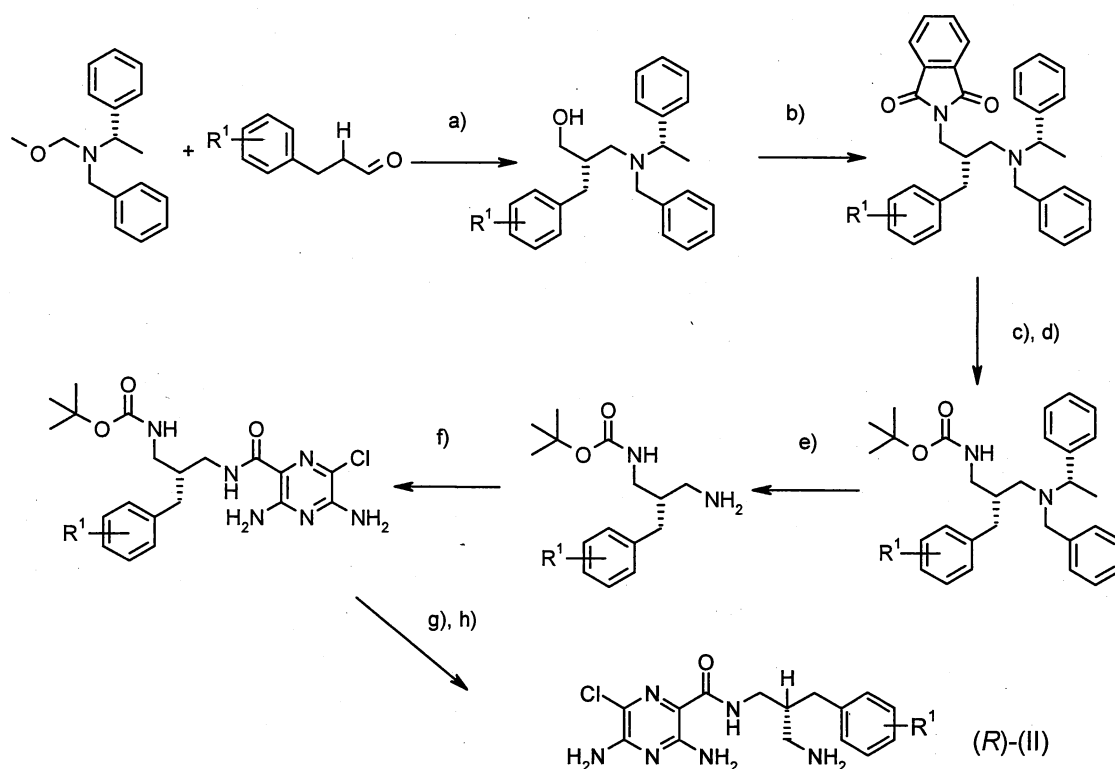
Theo cách khác, hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế bằng cách đưa R^3 vào bước cuối cùng bằng cách alkyl hóa khử alkylaldehyt được polyhydroxylat hóa thích hợp như hexoza hoặc pentoza (R^3 -aldehyt), như được mô tả trong Sơ đồ 3, và trong đó R^1 , R^2 , R^3 , A, X, m và n là như được xác định trong công thức (I). Mạch polyhydroxyalkyl có mặt trong R^3 có thể được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ rượu thích hợp bất kỳ, ví dụ như được mô tả trong tài liệu P. G. M. Wuts, Th. W. Greene, Greene's Protective Groups in organic Synthesis, Wiley-Interscience, New York, 2006. Ngoài ra, như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, và như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế ở đây, các nhóm amino bổ sung có mặt trong hợp chất có công thức (II) có thể được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ amino bất kỳ, ví dụ như được mô tả trong tài liệu của Wuts và Greene (trên đây), như bằng các nhóm bảo vệ di-tertbutyl dicacbonat (Boc) hoặc florenylmetyloxycarbonyl (FMoc).



Sơ đồ 3:

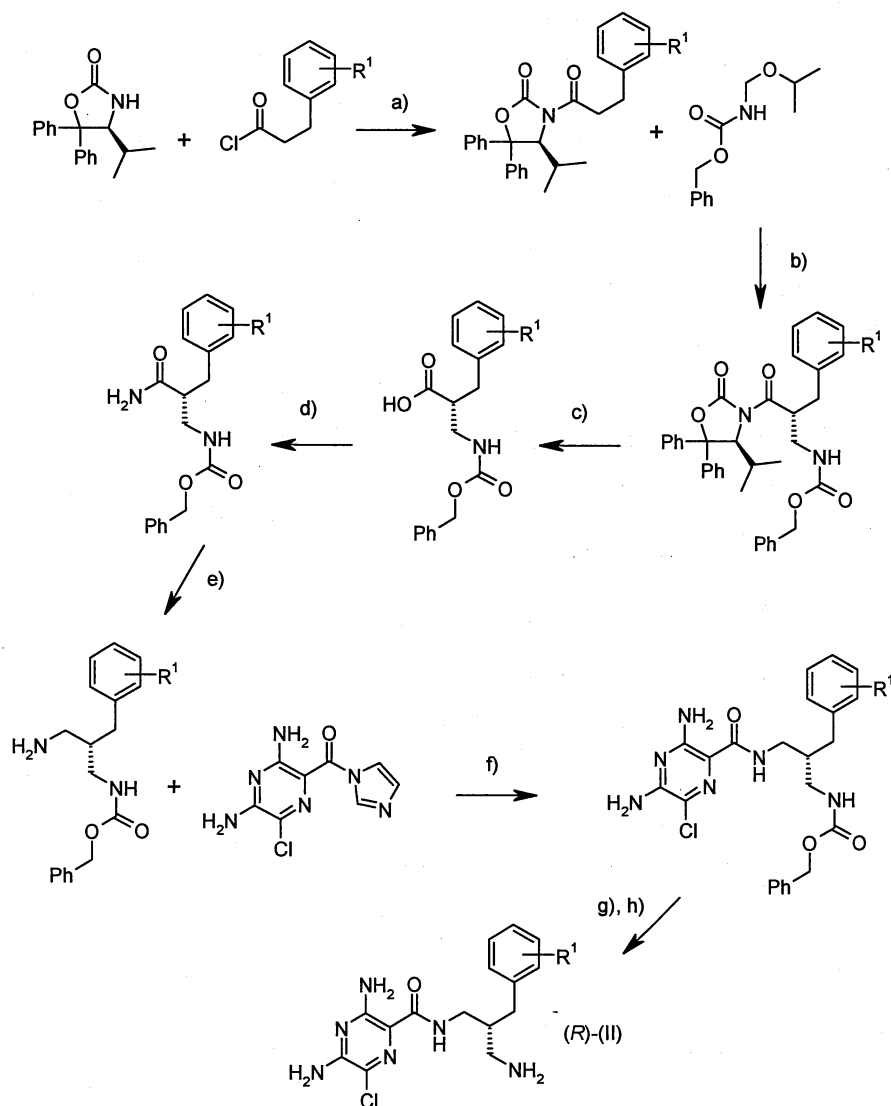
a) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ hoặc NaBH_3CN , AcOH , THF hoặc NaBH_4 , MeOH

Hợp chất có công thức (II) có thể được điều chế chọn lọc về mặt đối ảnh bằng các phương pháp như được mô tả trong Sơ đồ 5 (J. C. D. Müller-Hartwig, L. La Vecchia, H. Meyer, A. K. Beck, D. Seebach, *Org. Synth.* 85 (2008), 295.) hoặc bằng phương pháp được thể hiện trong các Sơ đồ 4, và 6, trong đó R^1 là như được xác định trong công thức (I).



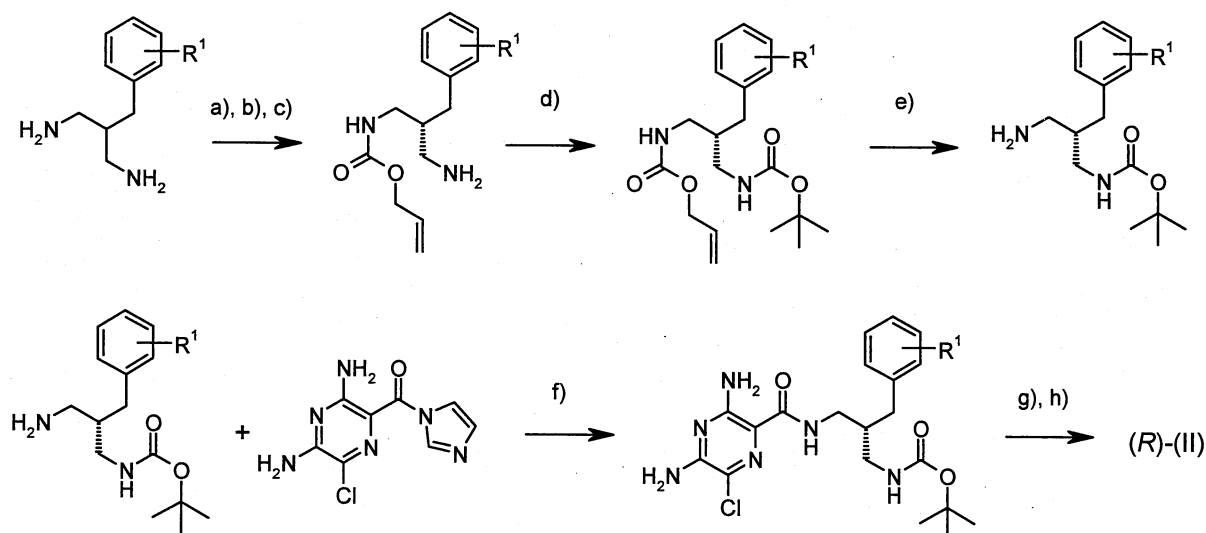
Sơ đồ 4:

a) i) L-prolin, DMF, ii) NaBH_4 , MeOH ; b) Phtalimit, PPh_3 , DEAD, THF; c) CH_3NH_2 , EtOH , d) Boc_2O , DCM, TEA; e) $\text{Pd}(\text{OH})_2$, H_2 , MeOH , 70psi; f) (3-clo-5-(1H-imidazol-1-ylcacbonyl)pyrazin-2,6-diamin, DIPEA, NMP; g) TFA, DCM; h) NaOH , THF.



Sơ đồ 5:

a) BuLi, THF; b) TiCl₄, TEA, DCM; c) LiOH, H₂O₂, THF, H₂O; d) (COCl)₂, NH₄OH, DCM; e) BH₃*THF; f) NMP; g) TFA, DCM; h) NaOH, THF.

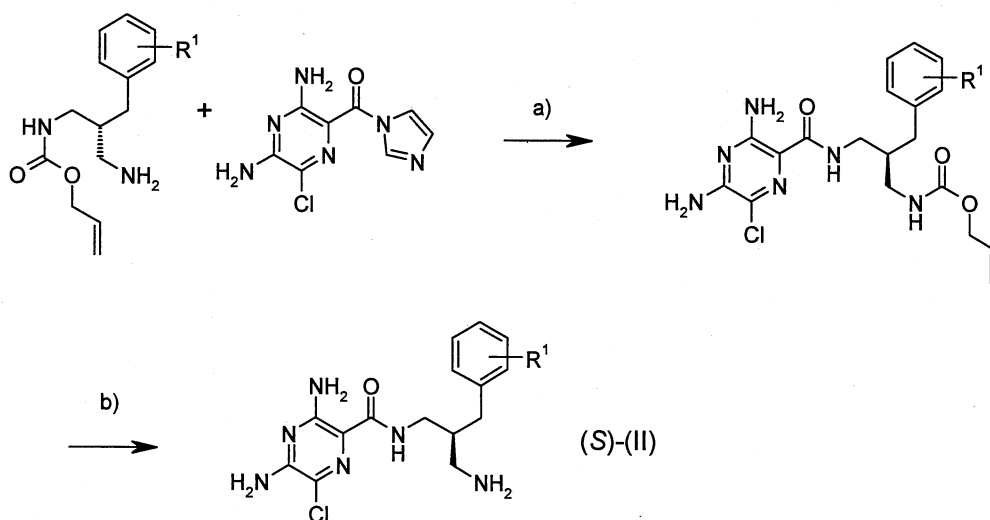


Sơ đồ 6:

a) Dialylcacbonat, Lipaza PS-C Amano II, MTBE; b) Axit (ví dụ D-tartrat), tái kết tinh; c) 10M NaOH, MTBE; d) (BOC)₂O, MTBE; e) LiBH₄, Pd(PPh₃)₄, THF; f) CDI; iPrOAc; g) TFA, DCM; h) NaOH, THF.

Sơ đồ 4, 5 và 6 mô tả phương pháp thu được chất đồng phân đối ảnh (R) của hợp chất có công thức (II). Các phản ứng được mô tả trong các sơ đồ này có thể được áp dụng cho phương pháp đạt được chất đồng phân (S) có liên quan bằng cách sử dụng nguyên liệu ban đầu có cấu hình tuyệt đối nghịch đảo hoặc enzyme có tính đặc hiệu lập thể khác nhau.

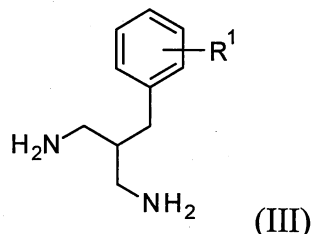
Theo cách khác, hợp chất có công thức (II) có cấu hình (S) có thể được điều chế như được thể hiện trong Sơ đồ 7.



Sơ đồ 7:

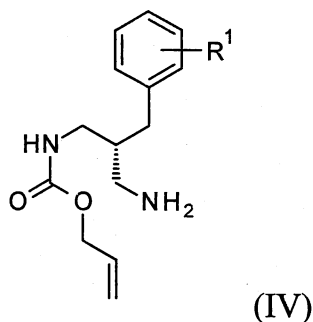
a) CDI; iPrOAc; b) LiBH₄, Pd(PPh₃)₄, THF.

Phương pháp được mô tả ở Bước (a) của Sơ đồ 6 bao gồm bước làm mất đối xứng diamin (III) quan trung gian enzym bằng cách sử dụng dialylcacbonat.



Enzym thích hợp cho phản ứng này bao gồm lipaza, cụ thể là lipaza mà có nguồn gốc từ *Candida Antarctica* hoặc *Pseudomonas Cepacia*. Enzym thích hợp bao gồm IMM CALB (*Candida Antarctica* Lipaza B), IMM CALBY (*Candida Antarctica* Lipaza B), Novozym 435 (*Candida Antarctica* Lipaza B), Amano Lipaza PS-C1 (*Pseudomonas Cepacia* Lipaza), Amano Lipaza PS-IM (*Pseudomonas Cepacia* Lipaza) và Amano Lipaza PS-D (*Pseudomonas Cepacia* Lipaza), như Amano Lipaza PS-C1, Amano Lipaza PS-D và Amano Lipaza PS-IM. Phản ứng này có thể được thực hiện trong phạm vi dung môi phân cực và dung môi không phân cực, và hỗn hợp của nó, bao gồm tert-butyl dimetyl ete (TBME), tetrahydrofuran (THF), metyl-THF (MeTHF, ví dụ 2-metyl-THF), heptan, xyclohexan và toluen, như MeTHF. Phản ứng này có thể được thực hiện ở một khoảng nhiệt độ, ví dụ từ 0°C đến 50°C, ví dụ từ 15°C đến 35°C, ví dụ khoảng 30°C. Lượng dư đồng phân đối ảnh của sản phẩm thô tạo thành có thể được gia tăng tùy ý bằng quá trình phân giải mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, ví dụ bằng cách kết tinh từ muối tartrat.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức (IV), trong đó R¹ là như được xác định trên đây (như hợp chất (R)-allyl-(3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbamate):



quy trình này bao gồm bước làm mất đối xứng diamin (III) gây ra qua trung gian enzym với sự có mặt của diallylcarbonat, và sau đó tùy ý thực hiện bước phân giải đồng phân đối ảnh. Theo khía cạnh khác, enzym được chọn từ loại mà có nguồn gốc từ *Candida Antarctica* hoặc *Pseudomonas Cepacia*, như IMM CALB (*Candida Antarctica* Lipaza B), IMM CALBY (*Candida Antarctica* Lipaza B), Novozym 435 (*Candida Antarctica* Lipaza B), Amano Lipaza PS-C1 (*Pseudomonas Cepacia* Lipaza), Amano Lipaza PS-IM (*Pseudomonas Cepacia* Lipaza) và Amano Lipaza PS-D (*Pseudomonas Cepacia* Lipaza). Theo khía cạnh khác, enzym được chọn từ Amano Lipaza PS-C1, Amano Lipaza PS-D và Amano Lipaza PS-IM, như Amino Lipaza PS-IM.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất (R)-allyl-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate.

Quy trình cụ thể để điều chế hợp chất theo sáng chế sẽ được mô tả kỹ hơn trong phần Ví dụ dưới đây.

Hợp chất và muối được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị các rối loạn bệnh khác nhau ở động vật, cụ thể là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm người.

Hợp chất theo sáng chế, và muối được dụng của nó, có hoạt tính làm được chất, cụ thể là làm chất điều biến ENaC, và có thể được sử dụng trong việc điều trị bệnh đường hô hấp, bệnh xương và khớp, và các rối loạn tự miễn và dị ứng khác.

Tình trạng bệnh mà có thể được điều trị bằng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh về đường hô hấp, như: bệnh đường khí tắc nghẽn bao gồm: bệnh hen, bao gồm bệnh hen phế quản, hen dị ứng, hen do các yếu tố nội lai, hen do các yếu tố ngoại lai, hen do luyện tập, hen do thuốc gây ra (bao gồm aspirin và gây ra bởi NSAID) và bệnh hen do bụi gây ra, cả

không liên tục và liên tục và tất cả tình trạng nghiêm trọng, và các nguyên nhân khác của đáp ứng tăng của đường khí; bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease: COPD); viêm phế quản, bao gồm viêm phế quản do lây và viêm phế quản ưa eosin; tràn khí; giãn phế quản; xơ hóa nang; bệnh sáo; bệnh phổi và bệnh có liên quan đến người trồng trọt; bệnh viêm phổi tăng cảm; xơ hóa phổi, bao gồm viêm xơ phế nang vô căn, viêm phổi nội tại tự phát, xơ hóa phổi tự phát, liệu pháp chống khối u biến chứng xơ hóa và lây nhiễm mạn tính, bao gồm bệnh lao và nhiễm vi nấm và các dạng lây nhiễm nấm khác; biến chứng của phép cấy ghép phổi; rối loạn viêm mạch máu và chứng huyết khối của hệ mạch máu phổi, và bệnh cao huyết áp do bệnh phổi; có hoạt tính chống ho bao gồm điều trị chứng ho mạn tính kèm theo tình trạng viêm và tiết dịch của đường khí đạo, và ho gây ra do điều trị bệnh; viêm mũi cấp và mạn tính bao gồm viêm mũi do dùng thuốc, và viêm mũi vì vỡ mạch máu; viêm mũi dị ứng tái diễn và theo mùa bao gồm bệnh viêm mũi tinh thần (bệnh sốt mùa cỏ khô); bệnh polyp mũi; lây nhiễm virus cấp bao gồm chứng cảm thường, và nhiễm khuẩn do virus hợp bào hô hấp (virus RSV - respiratory syncytial virus), bệnh cúm, coronavirut (bao gồm SARS) và adenovirut; tổn thương phổi cấp tính; hoặc hội chứng suy hô hấp ở người lớn (Adult Respiratory Distress Syndrome: ARDS).

Theo khía cạnh khác của sáng chế, bệnh về đường hô hấp mà có thể được điều trị bằng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó, bao gồm: bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD); viêm phế quản, bao gồm viêm phế quản do lây và viêm phế quản ưa eosin; giãn phế quản; xơ hóa nang; hoạt tính chống ho bao gồm điều trị chứng ho mạn tính kèm theo tình trạng viêm và tiết dịch của đường khí, và ho gây ra do điều trị bệnh; bệnh hen, bao gồm bệnh hen phế quản, hen dị ứng, hen do các yếu tố nội lai, hen do các yếu tố ngoại lai, hen do luyện tập, hen do thuốc gây ra (bao gồm aspirin và Gây ra bởi NSAID) và bệnh hen do bụi gây ra, cả không liên tục và liên tục và tất cả tình trạng nghiêm trọng, và các nguyên nhân khác của đáp ứng tăng của đường khí.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, tình trạng bệnh mà có thể được điều trị bằng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó, bao gồm bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), xơ hóa nang, bệnh hen, viêm phế quản mạn tính và giãn phế quản.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, tình trạng bệnh mà có thể được điều trị bằng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, là bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, để điều trị bệnh COPD.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong việc sản xuất thuốc để điều trị bệnh COPD.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa COPD ở động vật có vú mắc phải, hoặc có nguy cơ bị bệnh nêu trên, phương pháp này bao gồm việc dùng cho động vật có vú cần điều trị một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, tình trạng bệnh mà có thể được điều trị bằng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, là tình trạng xơ hóa nang (CF).

Theo một khía cạnh sáng chế còn mô tả hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, để điều trị bệnh CF.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn mô tả hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong việc sản xuất thuốc để điều trị bệnh CF.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa CF ở động vật có vú mắc phải, hoặc có nguy cơ bị bệnh nêu trên, phương pháp này bao gồm việc dùng cho động vật có vú cần điều trị một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Khi hợp chất hoặc muối được mô tả trong bản mô tả này được dùng để điều trị rối loạn, “lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị” là lượng đủ để làm giảm hoặc loại bỏ hoàn toàn các triệu chứng hoặc các tác dụng có hại khác của rối loạn; chữa trị rối loạn; làm đảo ngược, chấm dứt hoàn toàn, hoặc làm chậm lại quá trình tiến triển của rối loạn; hoặc làm giảm rủi ro của rối loạn khi trở nên tồi tệ hơn.

Theo một số phương án trong đó liệu pháp kết hợp được sử dụng, lượng hợp chất hoặc muối được mô tả trong bản mô tả này và lượng tác nhân được tính khác khi

được sử dụng kết hợp, là lượng hữu hiệu để điều trị cho rối loạn đích ở đối tượng động vật. Trong bản mô tả này, lượng kết hợp là “lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị”, khi được sử dụng kết hợp, nếu chúng đủ để làm giảm hoặc loại bỏ hoàn toàn các triệu chứng hoặc các tác dụng có hại khác của rối loạn; chữa trị rối loạn; làm đảo ngược, chấm dứt hoàn toàn, hoặc làm chậm lại quá trình tiến triển của rối loạn; hoặc làm giảm rủi ro của rối loạn khi trở nên tồi tệ hơn. Thông thường, lượng này có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này xác định, ví dụ, bằng cách bắt đầu bằng khoảng liều được mô tả trong bản mô tả này đối với hợp chất hoặc muối và được chấp nhận hoặc khoảng liều công bố khác của hợp chất được hoạt tính khác.

Để sử dụng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, để điều trị cho động vật có vú, như người, thành phần nêu trên thường được bào chế thành dược phẩm theo được thực tiễn tiêu chuẩn. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm mà chứa hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó (hoạt chất), và tá được, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình bào chế chế phẩm nêu trên, quy trình này bao gồm bước trộn hoạt chất với tá được, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng. Tùy thuộc vào cách thức sử dụng, dược phẩm, ví dụ, sẽ chứa hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 99% trọng lượng (phần trăm trọng lượng), như từ 0,05 đến 80% trọng lượng, ví dụ từ 0,10 đến 70% trọng lượng, như từ 0,10 đến 50% trọng lượng, tất cả phần trăm theo khối lượng được tính dựa trên tổng khối lượng hỗn hợp.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng theo cách tiêu chuẩn cho tình trạng bệnh mà mong muốn được điều trị, ví dụ bằng cách dùng khu trú (như vào phổi và/hoặc vào đường khí hoặc vào da), hít, qua đường miệng, qua trực tràng hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa. Đối với những mục đích này, hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Dược phẩm thích hợp theo sáng chế là chất thích hợp để sử dụng qua đường miệng ở dạng liều đơn vị, ví dụ viên nén hoặc viên nang chứa hoạt chất với lượng từ 0,1mg đến 1g.

Mỗi bệnh nhân có thể nhận được hoạt chất, ví dụ, với mức liều từ 0,0001mg/kg đến 10mg/kg, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,005mg/kg đến 5mg/kg, được dùng ví dụ, từ 1 đến 4 lần mỗi ngày.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) kết hợp với tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dùng, được phẩm này được bào chế để dùng bằng cách hít (bao gồm hít qua miệng và mũi).

Hợp chất có công thức (I) có thể được dùng bằng cách sử dụng cơ cấu giải phóng thích hợp, ví dụ từ máy hít bột khô, máy hít liều định trước, máy khí dung hoặc cơ cấu giải phóng qua đường mũi. Các cơ cấu này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Máy hít bột khô có thể được sử dụng để dùng hợp chất có công thức (I), riêng lẻ hoặc kết hợp với chất mang được dùng, trong trường hợp kết hợp, dưới dạng bột mịn hoặc hỗn hợp đặt trước của nó. Máy hít bột khô có thể ở dạng liều đơn hoặc đa liều và có thể sử dụng bột khô hoặc viên nang chứa bột.

Theo một phương án, hợp chất có công thức (I), hoặc được phẩm chứa hợp chất có công thức (I), được dùng bằng các phương pháp sử dụng máy hít bột khô (dry powder inhaler: DPI).

DPI có thể được sử dụng “bị động” hoặc “kích hoạt bằng hơi thở”, hoặc “chủ động”, trong đó bột được phân tán bằng một số cơ chế khác không phải bằng cách hít bởi bệnh nhân, ví dụ, bằng cách cấp khí nén bên trong. Tại thời điểm này, có 3 loại máy hít bột khô thụ động: máy hít liều đơn, máy hít đa liều đơn vị hoặc máy hít liều đa (có khoang chứa). Trong cơ cấu liều đơn, mỗi liều được cung cấp, thường ở dạng viên nang gelatin, và được nạp vào máy hít trước khi sử dụng, ví dụ về loại cơ cấu này bao gồm các cơ cấu Spinhaler[®] (Aventis), Rotahaler[®] (GlaxoSmithKline), Aeroliser[™] (Novartis), Inhalator[®] (Boehringer) và Eclipse (Aventis). Máy hít đa liều đơn vị chứa một số liều được bao gói riêng biệt, dưới dạng nhiều viên nang gelatin hoặc ở dạng vi bầm, ví dụ về loại cơ cấu này bao gồm các cơ cấu Diskhaler[®] (GlaxoSmithKline), Diskus[®] (GlaxoSmithKline), Nexthaler[®] (Chiesi) và Aerohaler[®] (Boehringer). Trong các cơ cấu đa liều, dược chất được giữ trong khoang chứa bột lớn, từ đó mỗi liều sẽ được định lượng, ví dụ về loại cơ cấu này bao gồm các cơ cấu Genuair[®]

(AstraZeneca), Turbuhaler® (AstraZeneca), Easyhaler® (Orion), Novolizer® (ASTA Medica), Clickhaler® (Innovata Biomed), Spiromax® (Teva) và Pulvinal® (Chiesi).

Dược phẩm dùng để hít để sử dụng trong DPI có thể được bào chế bằng cách trộn hoạt chất nghiền mịn (có đường kính khí động lực thường bằng hoặc nhỏ hơn 10µm, như bằng hoặc nhỏ hơn 5µm, ví dụ nằm trong khoảng từ 1 đến 5µm) bằng chất mang, ví dụ, mono-, di- hoặc polysaccarit, rượu đường, hoặc polyol khác. Chất mang thích hợp là đường, ví dụ, lactoza, glucoza, raffinosa, melezitoza, lactitol, maltitol, trehaloza, sucroza, manitol; và tinh bột. Thích hợp là, các hạt hoạt chất bám dính vào hạt chất mang để tạo ra hỗn hợp bột định trước (có sự tương tác). Các hạt chất mang có thể có đường kính trung bình nằm trong khoảng từ 20 đến 1000µm, thường là từ 50 đến 500µm.

Theo cách khác, dược phẩm dùng để hít có thể được bào chế bằng cách tạo hình cầu bột nghiền mịn (ví dụ chứa hoạt chất nghiền mịn và các hạt chất mang nghiền mịn), hình cầu này sẽ bị phá vỡ trong quá trình hít.

Tiếp theo, hỗn hợp bột, nếu cần, có thể được phân tán vào viên nang gelatin cứng, mỗi viên chứa mức liều hoạt chất mong muốn. Theo cách khác, hỗn hợp bột có thể nạp vào khoang chứa của máy hít đa liều, ví dụ, Genuair®, hoặc Turbuhaler®.

Theo phương án khác nữa, hợp chất có công thức (I) được dùng bằng các phương pháp dùng cho máy hít định liều, cụ thể là máy hít định liều có áp (pressurised metered dose inhaler: pMDI). pMDI chứa dung dịch hoặc hỗn dịch thích hợp làm hoạt chất trong đồ chứa có áp. Hoạt chất được giải phóng bằng cách khởi động van trên thiết bị pMDI. Việc khởi động có thể bằng tay hoặc được khởi động bằng hơi thở. Ở pMDI được khởi động bằng tay, cơ cấu được khởi động bởi người sử dụng khi họ hít, ví dụ bằng cách ép một cơ chế giải phóng thích hợp lên cơ cấu pMDI. pMDI được khởi động bằng hơi thở sẽ được khởi động khi bệnh nhân hít qua miệng. Điều này có thể là thuận lợi vì việc khởi động cơ cấu được thực hiện nhờ việc hít của bệnh nhân và có thể dẫn đến việc định liều hoạt chất ổn định hơn nữa. Ví dụ về cơ cấu pMDI bao gồm, ví dụ Rapihaler® (AstraZeneca).

Dược phẩm dùng để hít để sử dụng trong pMDI có thể được bào chế bằng cách hòa tan hoặc phân tán hợp chất có công thức (I) trong chất đẩy thích hợp và có hoặc không có tá dược bổ sung như dung môi (ví dụ etanol), chất hoạt động bề mặt, chất làm trơn hoặc tác nhân làm ổn định. Chất đẩy thích hợp bao gồm các chất đẩy hydrocacbon, cloflocacbon và hydrofloalkan (ví dụ heptafloalkan), hoặc hỗn hợp bất kỳ của các chất đẩy này. Chất đẩy được ưu tiên là P134a và P227, mỗi chất này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với các chất đẩy khác và/hoặc chất hoạt động bề mặt và/hoặc tá dược khác.

Theo phương án khác nữa, hợp chất có công thức (I) được dùng bằng các phương pháp dùng cho máy hít định liều kết hợp với cơ cấu đệm. Cơ cấu đệm là đã biết và bao gồm Nebuchamber® (AstraZeneca) hoặc Volumatic® (GlaxoSmithKline).

Theo phương án khác nữa, hợp chất có công thức (I) được dùng bằng các phương pháp dùng cho máy khí dung. Máy khí dung thích hợp là đã biết và bao gồm eFlow® (PARI GmbH).

Dược phẩm dùng để hít để sử dụng trong máy khí dung có thể được bào chế bằng cách phân tán hoặc tốt hơn là hòa tan hợp chất có công thức (I) trong môi trường nước thích hợp. Dược phẩm còn có thể chứa, ví dụ chất điều chỉnh độ pH và/hoặc chất điều chỉnh độ trương thích hợp, chất hoạt động bề mặt và chất bảo quản. Ví dụ chế phẩm thích hợp để hít từ máy khí dung chứa hợp chất có công thức (I) được phân tán trong môi trường nước thích hợp (mg/g trong nước Mill-Q) chứa natri clorua (9mg/g); axit xitric khô (0,0735mg/g); natri xitrat (0,19mg/g); benzalkoni clorua (0,1mg/g), EDTA (etylendiamin axit tetraaxetic, 0,1mg/g) và Polysorbat 80 (0,3mg/g).

Theo phương án khác nữa, hợp chất có công thức (I) được dùng qua đường mũi dưới dạng dạng phun từ cơ cấu giải phóng dùng qua mũi thích hợp, ví dụ bơm khí dung hoặc MDI. Theo cách khác, hợp chất có thể được sử dụng qua đường mũi dưới dạng bột bằng cách sử dụng cơ cấu DPI thích hợp ví dụ Rhinocort®, Turbuhaler® (AstraZeneca).

Dược phẩm dùng để hít để sử dụng trong bơm khí dung hoặc cơ cấu MDI dùng qua đường mũi có thể được bào chế bằng cách phân tán hoặc tốt hơn là hòa tan hợp chất có công thức (I) trong môi trường nước thích hợp. Dược phẩm này còn có thể

chứa chất điều chỉnh độ pH và/hoặc chất điều chỉnh độ trương thích hợp, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất làm trơn, chất làm thay đổi mùi vị hoặc độ nhớt. Nếu cần, chất phụ trợ để làm tăng độ hấp thụ từ khoang mũi có thể cũng được bao gồm, như polyme kết dính sinh học thích hợp. Chế phẩm bột khô thích hợp để giải phóng qua đường mũi như được mô tả trên đây trong phần liên quan đến cơ chế giải phóng DPI. Tuy nhiên, nếu muốn hạn chế sự thâm nhập của hợp chất vào phổi và giữ hợp chất ở trong khoang mũi, có thể cần thiết sử dụng thêm hợp chất ở dạng hạt có kích cỡ to hơn, ví dụ hạt có đường kính trung bình lớn hơn khoảng $10\mu\text{m}$, ví dụ từ $10\mu\text{m}$ đến $50\mu\text{m}$.

Theo đó, sáng chế còn đề xuất cơ cấu hít (ví dụ máy hít bột khô, cụ thể là máy hít bột khô đa liều đơn vị, hoặc máy hít pMDI) chứa được phẩm dùng để hít theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp điều trị, trong đó hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, và hoạt chất thứ hai được dùng đồng thời, liên tục hoặc trong cùng một hỗn hợp, để điều trị một hoặc nhiều tình trạng bệnh được nêu trên đây. Hỗn hợp điều trị này có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất khác.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm (ví dụ, để sử dụng làm thuốc để điều trị một trong số các bệnh hoặc tình trạng được nêu trong sáng chế này, như CF hoặc COPD) chứa hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một hoạt chất bổ sung được chọn từ:

- a) chất chủ vận nhận thụ thể beta-adreno;
- b) chất đối kháng thụ thể muscarinic;
- c) chất đối kháng thụ thể muscarinic và chất chủ vận thụ thể nhận beta-adreno kết hợp;
- d) chất chủ vận thụ thể giống Toll (như chất chủ vận TLR7 hoặc TLR9)
- e) chất đối kháng adenosin;
- f) chất chủ vận thụ thể glucocorticoid (steroidal hoặc không-steroidal);
- g) chất đối kháng p38;
- h) chất đối kháng IKK2;
- i) chất đối kháng PDE4;
- j) chất điều biến chức năng thụ thể chemokine (như chất đối kháng thụ thể CCR1, CCR2B, CCR5, CXCR2 hoặc CXCR3);
- k) chất đối kháng CRTh2; hoặc
- l) chất thẩm thấu, ví dụ chất thẩm thấu ion, như muối tăng trương lực như được xác định dưới đây.

Sáng chế còn đề cập đến việc kết hợp hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất chủ vận nhận thụ thể beta-adreno (bao gồm kiểu phụ thụ thể beta 1-4) như terbutalin (ví dụ như muối sulphat), salmeterol (ví dụ như muối xinafoat), salbutamol (albuterol) (ví dụ như muối sulphat), procaterol (ví dụ như muối hydroclorua), pirbuterol (ví dụ như muối axetat), orciprenaline (metaproterenol) (ví dụ như muối sulphat), milveterol (ví dụ như muối hydroclorua), levosalbutamol (levalbuterol) (ví dụ như muối hydroclorua), abediterol, isoprenaline (isoproterenol) (ví dụ như muối hydroclorua), indacaterol (ví dụ như muối maleat), vilanterol (ví dụ như muối trifenatat (axit triphenylaxetic axit)), formoterol (ví dụ như muối fumarat, ví dụ muối fumarat dihydrat), carmoterol, bitolterol (ví dụ như muối mesylat), olodaterol, bedoradrin (ví dụ như muối sulphat), bambuterol (ví dụ như muối hydroclorua), arformoterol (ví dụ như muối tartrat), PF-610355 (2-[3-[2-[(2R)-2-hydroxy-2-[4-hydroxy-3-(metansulfonamido)phenyl]etyl]amino]-2-metyl-propyl]phenyl]-N-[[3-(4-

hydroxyphenyl)phenyl]metyl]axetamit), N-(2-diethylaminoethyl)-N-[2-[2-(4-hydroxy-2-oxo-3H-1,3-benzothiazol-7-yl)ethylamino]ethyl]-3-[2-(1-naphthyl)etoxy]propanamit, N-xyclohexyl-3-[2-(3-flophenyl)ethylamino]-N-[2-[2-(4-hydroxy-2-oxo-3H-1,3-benzothiazol-7-yl)ethylamino]ethyl]propanamit, hoặc N-xyclohexyl-N-[2-[2-(5-hydroxy-3-oxo-4H-1,4-benzoxazin-8-yl)ethylamino]ethyl]-3-[2-[3-(1-metylpyrazol-4-yl)phenyl]etoxy]propanamit.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất đối kháng thụ thể muscarinic (ví dụ chất đối kháng M1, M2 hoặc M3, như chất đối kháng M3 chọn lọc) như tiotropi (ví dụ như muối bromua), oxitropi (ví dụ như muối bromua), ipratropi (ví dụ như muối bromua), glycopyroni bromua (ví dụ như hỗn hợp raxemic của các chất đồng phân lập thể, hoặc dưới dạng chất đồng phân lập thể R,R-, R,S-, S,R-, hoặc S,S-, hoặc dưới dạng hỗn hợp chứa 2 hoặc nhiều chất đồng phân lập thể R,R-, R,S-, S,R-, hoặc S,S-), acilidini (ví dụ như muối bromua), GSK573719 (3-[2-[3-(5-xyclohexyloxycacbonyl-thiophen-2-yl)-ureido]-3-(4-hydroxy-phenyl)-propionylamino]-1-(3-hydroxy-benzyl)-1-metyl-piperidini), BEA2180BR (8-metyl-8-aza-bixyclo[3,2,1]oct-6-en-3-yl este của axit hydroxy-di-thiophen-2-yl-axetic) (ví dụ như muối hydrobromua), [(3R)-1-[2-oxo-2-(2-pyridylamino)ethyl]quinuclidin-1-ium-3-yl]1-phenylxycloheptancarboxylat (ví dụ như muối bromua), hoặc 2-[(4-clophenyl)metoxy]etyl-[[2-[(R)-xyclohexyl-hydroxy-phenyl-metyl]oxazol-5-yl]metyl]-dimetyl-Amoni (ví dụ như muối napadisylat).

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với tác nhân là chất đối kháng thụ thể muscarinic cho khớp (ví dụ chất đối kháng M1, M2 hoặc M3, như chất đối kháng M3 chọn lọc) và chất chủ vận nhận thụ thể beta-adreno như PF4348235 ([1-[9-[[2-(2R)-2-hydroxy-2-[4-hydroxy-3-(metansulfonamido)phenyl]ethyl]amino]nonyl]-4-piperidyl]-N-[2-(3-clo-4-hydroxy-phenyl)phenyl]carbamate), 3-[2-[2-clo-3-[[8-(2-etylthiazol-4-cacbonyl)-11-oxa-3,8-diazaspiro[5,5]undecan-3-yl]metyl]phenyl]etoxy]-N-xyclopentyl-N-[2-[2-(5-hydroxy-3-oxo-4H-1,4-benzoxazin-8-yl)ethylamino]ethyl]propanamit, N-butyl-N-[2-[2-(5-hydroxy-3-oxo-4H-1,4-benzoxazin-8-yl)ethylamino]ethyl]-3-[2-[3-[2-[8-(2-isopropylthiazol-4-cacbonyl)-11-oxa-3,8-diazaspiro[5,5]undecan-3-yl]ethyl]phenyl]etoxy]propanamit, hoặc 7-[(1R)-2-[2-[2-flo-5-[[8-(2-isopropylthiazol-4-

cacbonyl)-11-oxa-3,8-diazaspiro[5,5]undecan-3-yl]metyl]phenyl]ethylamino]-1-hydroxy-etyl]-4-hydroxy-3H-1,3-benzothiazol-2-on.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất chủ vận thụ thể giống Toll (bao gồm chất chủ vận TLR7 hoặc TLR9) như loxoribin (7-allyl-2-amino-9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-2-yl]-1H-purin-6,8-dion), metyl 2-[3-[[3-(6-amino-2-butoxy-8-oxo-7H-purin-9-yl)propyl-(3-morpholinopropyl)amino]metyl]phenyl]axetat (ví dụ như muối hydrobromua, hydroclorua hoặc dimaleat), 4-(dimethylamino)butyl 2-[4-[[2-amino-4-metyl-6-(pentylamino)pyrimidin-5-yl]metyl]phenyl]axetat (ví dụ như disaccharin, muối của axit difumaric, muối của axit di-1-hydroxy-2-naphtoic hoặc muối của axit mono-benzoic), hoặc 5'-TCG AAC GTT CGA AGA TGA TGA T (được mô tả là SEQ ID 171 trong WO2004/0158179).

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất đối kháng adenosin như regadenoson, ATL-313 (metyl 4-[3-[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(xyclopropylcarbamoyl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl]purin-2-yl]prop-2-ynyl]piperidin-1-carboxylat), hoặc apadenoson (metyl 4-[3-[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(etylcarbamoyl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl]purin-2-yl]prop-2-ynyl]xyclohexancarboxylat).

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất chủ vận thụ thể glucocorticoit (steroidal hoặc không-steroidal) như triamxinolon, triamxinolon axetonua, prednison, mometason furoat, loteprednol etabonat, fluticason propionat, fluticason furoat, fluoxinolon axetonua, dexametason xipecliat, desisobutyryl xiclesonua, clobetasol propionat, xiclesonua, butixocort propionat, budesonua, beclometason dipropionat, alclometason dipropionat, (1R,3aS,3bS,10aR,10bS,11S,12aS)-1-[[[(xyanometyl)thio]cacbonyl]-7-(4-flophenyl)-11-hydroxy-10a,12a-dimetyl-1,2,3,3a,3b,4,5,7,10,10a,10b,11,12,12a-tetradecahydroxyclopenta[5,6]naphto[1,2-f]indazol-1-yl 2-furoat, (1R,2R,3aS,3bS,10aS,10bR,11S,12aS)-10b-Flo-1-[[[(flometyl)sulfanyl]cacbonyl]-7-(6-flopyridin-3-yl)-11-hydroxy-2,10a,12a-trimetyl-1,2,3,3a,3b,4,5,7,10,10a,10b,11,12,12a-tetradecahydroxyclopenta[5,6]naphto[1,2-

f]indazol-1-yl metoxyaxetat, 2,2,2-triflo-N-[(1S,2R)-2-[1-(4-flophenyl)indazol-5-yl]oxy-2-(3-metoxyphenyl)-1-metyl-etyl]axetamit, 3-[5-[(1R,2S)-1-(4H-1,3-benzodioxin-7-yl)-2-(2,2-diflopropanoylamino)propoxy]indazol-1-yl]-N-(3-pyridylmetyl)benzamit, 3-[5-[(1R,2S)-2-(2,2-diflopropanoylamino)-1-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)propoxy]indazol-1-yl]-N-[(3R)-1,1-dioxothiolan-3-yl]benzamit, hoặc 3-[5-[(1R,2S)-2-(2,2-diflopropanoylamino)-1-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)propoxy]indazol-1-yl]-N-[(3R)-tetrahydrofuran-3-yl]benzamit.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất đối kháng p38 như PH797804 (3-[3-bromo-4-(2,4-diflobenzyloxy)-6-metyl-2-oxo-2H-pyridin-1-yl]-4,N-dimetyl-benzamit), losmapimod, PF03715455 (1-[5-tert-butyl-2-(3-clo-4-hydroxy-phenyl)pyrazol-3-yl]-3-[[2-[[3-[2-(2-hydroxyetyl)sulfanyl]phenyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-6-yl]sulfanyl]phenyl]metylure), N-xyclopropyl-4-metyl-3-[6-(4-metyl piperazin-1-yl)-4-oxo-quinazolin-3-yl]benzamit, hoặc N-xyclopropyl-3-flo-4-metyl-5-[3-[[1-[2-[2-(metyl amino)etoxy]phenyl]xyclopropyl]amino]-2-oxo-pyrazin-1-yl]benzamit.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất ức chế phosphodiesteraza (PDE) như metylxantanin bao gồm theophylin và aminophylin hoặc chất ức chế PDE isoenzym chọn lọc (bao gồm chất ức chế PDE4 hoặc chất ức chế của đẳng dạng PDE4D) như tetomilast, roflumilast, oglemilast, ibudilast, GPD-1116 (3-benzyl-5-phenyl-1H-pyrazolo[4,3-c][1,8]naphtyridin-4-on), ronomilast, NVP ABE 171 (axit 4-[8-(2,1,3-benzoxadiazol-5-yl)-1,7-naphtyridin-6-yl]benzoic), RPL554 (2-[(2E)-9,10-dimetoxy-4-oxo-2-(2,4,6-trimetylphenyl)imino-6,7-dihydropyrimido[6,1-a]isoquinolin-3-yl]etylure), CHF5480 ([[(Z)-2-(3,5-diclo-4-pyridyl)-1-(3,4-dimetoxyphenyl)vinyl](2S)-2-(4-isobutylphenyl)propanoat], hoặc GSK256066 (6-[3-(dimetylcarbamoyl)phenyl]sulfonyl-4-(3-metoxyanilino)-8-metyl-quinolin-3-carboxamit).

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất đối kháng IKK2 như axit 5-(2-isopropylisoindolin-5-yl)-3-[1-(2-metoxetyl sulfonyl)-4-piperidyl]-1H-indol-7-carboxylic.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất điều biến chức năng thụ thể chemokin như chất đối kháng của CCR1, CCR2, CCR2A, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 hoặc CCR11 (đối với họ C-C), ví dụ chất đối kháng thụ thể CCR1, CCR2B hoặc CCR5; CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 hoặc CXCR5 (đối với họ C-X-C), ví dụ chất đối kháng thụ CXCR2 hoặc CXCR3; hoặc CX₃CR1 đối với họ C-X₃-C. Ví dụ, sáng chế đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế với PS-031291 (2-[(4-clo-benzyl)-metyl-amit] 1-[(4-triflometyl-phenyl)-amit] của axit pyrrolidin-1,2-dicarboxylic), CCX-354 (1-[4-(4-clo-3-metoxi-phenyl)piperazin-1-yl]-2-[3-(1H-imidazol-2-yl)pyrazolo[3,4-b]pyridin-1-yl]etanon), vicriviroc, maraviroc, xenicriviroc, navarixin (2-hydroxy-N,N-dimetyl-3-[[2-[(1R)-1-(5-metyl-2-furyl)propyl]amino]-3,4-dioxo-xyclobuten-1-yl]amino]benzamid), SB656933 (1-(2-clo-3-flo-phenyl)-3-(4-clo-2-hydroxy-3-piperazin-1-ylsulfonyl-phenyl)ure), N-[1-[(3R)-3-(3,5-diflophenyl)-3-(1-metylsulfonyl-4-piperidyl)propyl]-4-piperidyl]-N-etyl-2-(4-metylsulfonylphenyl)axetamid, N-[2-[(2S)-3-[[1-[(4-clophenyl)metyl]-4-piperidyl]amino]-2-hydroxy-2-metyl-propoxy]-4-hydroxy-phenyl]axetamid, axit 2-[2-clo-5-[(2S)-3-(5-clospiro[3H-benzofuran-2,4'-piperidin]-1'-yl)-2-hydroxy-propoxy]-4-(metylcarbamoil)phenoxy]-2-metyl-propanoic, N-[2-[(2,3-diflophenyl)metylsulfanyl]-6-[(1R,2S)-2,3-dihydroxy-1-metyl-propoxy]pyrimidin-4-yl]azetidin-1-sulfonamid, hoặc N-[2-[(2,3-diflophenyl)metylsulfanyl]-6-[(1R,2R)-2,3-dihydroxy-1-metyl-propyl]amino]pyrimidin-4-yl]azetidin-1-sulfonamid.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất ức chế sinh tổng hợp leukotrien, chất ức chế 5-lipoxaza (5-LO) hoặc chất đối kháng protein hoạt hóa 5-lipoxaza (5-lipoxigenase activating protein: FLAP) như TA270 (4-hydroxy-1-metyl-3-octyloxy-7-sinapinoilamino-2(1H)-quinolinon), PF-4191834 (2H-pyran-4-carboxamid, tetrahydro-4-[3-[[4-(1-metyl-1H-pyrazol-5-yl)phenyl]thio]phenyl]-), setileuton, CMI977 (1-[4-[(2S,5S)-5-[(4-flophenoxy)metyl]tetrahydrofuran-2-yl]but-3-ynyl]-1-hydroxy-ure), axit fiboflapon (3-[3-tert-butylsulfanyl-1-[[4-(6-etoxy-3-pyridyl)phenyl]metyl]-5-[(5-metyl-2-pyridyl)metoxy]indol-2-yl]-2,2-dimetyl-propanoic), GSK2190915 (axit 1H-indol-2-propanoic, 3-[(1,1-dimetyletyl)thio]-1-[[4-(6-metoxi-3-pyridinyl)phenyl]metyl]- α,α -

dimethyl-5-[(2-pyridinyl)methoxy]-), licofelon, quiflapon (axit 3-[3-tert-butylsulfanyl-1-[(4-clophenyl)methyl]-5-(2-quinolylmethoxy)indol-2-yl]-2,2-dimethyl-propanoic), veliflapon (axit (2R)-2-xyclopentyl-2-[4-(2-quinolylmethoxy)phenyl]axetic), ABT080 (axit 4,4-bis[4-(2-quinolylmethoxy)phenyl]pentanoic), zileuton, zafirlukast, hoặc montelukast.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất đối kháng CRTh2 hoặc chất đối kháng DP2 như ACT129968 (axit 2-[2-[(5-axetyl-2-methoxy-phenyl)methylsulfanyl]-5-flo-benzimidazol-1-yl]axetic), AMG853 (axit 2-[4-[4-(tert-butylcarbamoyle)-2-[(2-clo-4-xyclopropyl-phenyl)sulfonylamino]phenoxy]-5-clo-2-flo-phenyl]axetic), AM211 (axit 2-[3-[2-[[benzylcarbamoyle(etyl)amino]methyl]-4-(triflometyl)phenyl]-4-methoxy-phenyl]axetic), axit 2-[4-axetamido-3-(4-clophenyl)sulfanyl-2-methyl-indol-1-yl]axetic, axit (2S)-2-[4-clo-2-(2-clo-4-etylsulfonyl-phenoxy)phenoxy]propanoic, axit 2-[4-clo-2-[2-flo-4-(4-flophenyl)sulfonyl-phenyl]phenoxy]axetic, hoặc axit (2S)-2-[2-[3-clo-4-(2,2-dimethylpyrrolidin-1-cacbonyle)phenyl]-4-flo-phenoxy]propanoic.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất đối kháng MK2 (MAPKAP kinaza 2) như varesplabid, PF-3644022 ((10R)-10-methyl-3-(6-methylpyridin-3-yl)-9,10,11,12-tetrahydro-8H-[1,4]diazepino[5',6':4,5]thieno[3,2-f]quinolin-8-on), hoặc 4-benzoyl-D-phenylalanyl-D-seryl-D-tryptophyl-D-seryl-2,3,4,5,6-pentafluoro-D-phenylalanyl-3-xyclohexyl-D-alanyl-D-arginyl-D-arginyl-D-arginyl-D-glutaminy-D-arginyl-D-arginin.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất đối kháng myeloperoxidaza như resveratrol, piceatannol, 3-[[2-(2R)-tetrahydrofuran-2-yl]methyl]-2-thioxo-7H-purin-6-on, hoặc 1-(2-isopropoxyetyl)-2-thioxo-5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-4-on.

Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất thẩm thấu. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất thẩm thấu” là phân tử nhỏ có hoạt tính thẩm thấu và nhằm để bao hàm cả chất thẩm thấu ion và chất thẩm thấu không ion. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề

xuất hỗn hợp của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất thẩm thấu ion, như muối tăng trương lực.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm (ví dụ, để sử dụng làm thuốc để điều trị một trong số các bệnh hoặc tình trạng được nêu trong sáng chế này, như CF hoặc COPD) chứa hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một hoạt chất bổ sung được chọn từ:

- a) chất chủ vận nhận thụ thể beta-adreno;
- b) chất đối kháng thụ thể muscarinic;
- c) chất đối kháng thụ thể muscarinic và chất chủ vận thụ thể nhận beta-adreno kết hợp; hoặc
- d) chất chủ vận thụ thể glucocorticoid (steroidal hoặc không-steroidal); hoặc
- e) chất thẩm thấu, ví dụ chất thẩm thấu ion, như muối tăng trương lực.

như được nêu trên đây.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, ít nhất một hoạt chất bổ sung là chất chủ vận nhận thụ thể beta-adreno. Theo khía cạnh khác, ít nhất một hoạt chất bổ sung là chất đối kháng thụ thể muscarinic. Theo khía cạnh khác, ít nhất một hoạt chất bổ sung là chất chủ vận thụ thể glucocorticoid (steroidal hoặc không-steroidal). Theo khía cạnh khác nữa, ít nhất một hoạt chất bổ sung là chất đối kháng thụ thể muscarinic và chất chủ vận thụ thể nhận beta-adreno kết hợp. Theo khía cạnh khác nữa, ít nhất một hoạt chất bổ sung là chất thẩm thấu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Hợp chất được mô tả trong bản mô tả này sẽ được minh họa thêm trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế sau đây. Các Ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa cho sáng chế mà không làm giới hạn nó.

Các chữ viết tắt:

aq (Aqueous) Trong nước

(BOC)₂O/Boc Di-tertbutyl dicacbonat

CV	(Column Volume) Thể tích cột
DEA	Dietylamin
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIPA	Diisopropylamin
DIEA/DIPEA	Diisopropyletylamin
ESI	(Electrospray Ionization) Ion hóa phun điện tử
FA	Axit Formic
Fmoc/Fmoc	Florenylmetyloxycarbonyl
HATU	1-[Bis(dimetylamino)metylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridini 3-oxid hexaflophosphat
HBSS Hank	(Hanks' Balanced Salt Solution) Dung dịch muối cân bằng
HBTU hexaflophosphat	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroni
HEPES	Axit 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonic
HPLC tính năng cao	(High Performance Liquid Chromatography) Sắc ký lỏng
IPA	Isopropylamin
LC/MS ký lỏng	(Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy) Phổ khối sắc
MeTHF	Metyl-tetrahydrofuran
MTBE	tert-Butyl metyl ete
NMP	N-metylpyrolidinon
Rt	(Retention time) Thời gian duy trì
sat.	(Saturated) Bảo hòa
SFC	(Supercritical fluid chromatography) Sắc ký lỏng siêu tới

hạn

TBME	tert-Butyl metyl ete
TEA	Trietylamin
THF	Tetrahydrofuran
wt-%	(weight-%)% trọng lượng

Phương pháp chung

Phổ NMR được ghi lại trên phổ kế Bruker Avance, Avance II hoặc Avance III ở tần số proton là 400, 500 hoặc 600MHz. Phổ kế JEOL EX-270 được sử dụng nếu tần số proton là 270MHz được báo cáo. Các đỉnh trung tâm của cloform- δ (H 7,26 ppm), axeton (H 2,04 ppm), diclometan- d_2 (H 5,32 ppm), CH_3OD (H 3,30 ppm) hoặc $DMSO-d_6$ (H 2,49 ppm) được sử dụng làm tham chiếu nội. Sự biến đổi ít của dịch chuyển hóa học có thể xảy ra, như là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, là kết quả của những thay đổi khi điều chế mẫu, như sự biến đổi của mẫu phân tích và chứa hoặc loại bỏ chất phụ trợ (ví dụ các chuẩn của thử nghiệm NMR hoặc axit trifloaxetic).

Các thử nghiệm LC/MS được thực hiện bằng cách sử dụng hệ Waters Acquity UPLC được kết hợp với khối phổ kế Waters Xevo Q-ToF theo kiểu ESI. Phép LC được thực hiện làm 2 quá trình: 1) cột BEH C18 (1,7 μ m 2,1x50mm) kết hợp với gradien (2-95% B trong 5 phút) của dung dịch đệm Amoni cacbonat 46mM trong nước/amoniac ở độ pH = 10 (A) và MeCN (B) ở tốc độ chảy là 1,0ml/phút. 2) cột HSS C18 (1,8 μ m 2,1x50mm) với gradien (2-95% B trong 5 phút) của dung dịch đệm FA 10mM trong nước /amoni format 1mM ở độ pH = 3 (A) và MeCN (B) ở tốc độ chảy là 1,0ml/phút.

Độ tinh khiết quang, được biểu thị dưới dạng lượng dư đồng phân đối ảnh (enantiomeric excess: (% ee)), được xác định bằng phép HPLC bất đối bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký seri Agilent 1100. Phương pháp A: Hệ thống được trang bị Chiralpak IC 250x4,6mm; 5 μ m. Heptan/iPrOH/etanolamin (với tỷ lệ 60:40:0,1) có tốc độ chảy là 1ml/phút được sử dụng làm pha di động. Thể tích truyền là 10 μ l và phát hiện hợp chất được phát hiện bằng tia UV ở bước sóng 268nm. Phương pháp B: Hệ thống được trang bị Chiralpak IC 150x4,6mm, 3 μ m. CO_2 , 120 bar (A) và MeOH

(0,5% DEA) (B) được sử dụng làm pha di động với tỷ lệ của A/B là 80/20 có tốc độ chảy là 4ml/phút. Thể tích truyền là 5 μ l.

Phép HPLC điều được thực hiện bằng hệ Waters FractionLynx với việc phát hiện MS được tích hợp vào và được trang bị cột Prep C18 OBD 5 μ m 19 x 150mm của X-Bridge hoặc Sunfire. Theo cách khác, thiết bị Gilson GX-281 có bộ phát hiện UV được tích hợp vào được sử dụng, được trang bị cột Kromasil C8 10 μ m, đường kính trong 20x250 hoặc đường kính trong 50x250mm. Gradient nước/MeCN/AcOH (với tỷ lệ 95/5/0,1) hoặc nước/0,05% TFA hoặc nước/0,1% NH₄HCO₃ (A) và MeCN (B) được sử dụng làm dung môi rửa giải.

Phép SCF điều chế được thực hiện bằng hệ Waters Prep100 SCF có bộ phát hiện MS được tích hợp vào, được trang bị cột Waters Viridis 2-EP hoặc Phenomenex Luna Hilic, 30 x 250mm, 5 μ m. Gradient CO₂ (100g/min, 120 bar, 40°C) (A) và MeOH/NH₃ (20mM) hoặc MeOH (5% FA) hoặc MeOH (B) được sử dụng làm dung môi rửa giải

Trừ khi được quy định khác, nguyên liệu ban đầu là có bán sẵn trên thị trường hoặc đã được mô tả trước trong tài liệu chuyên ngành. Tất cả các dung môi và chất phản ứng thương mại là thuộc loại dành cho phòng thí nghiệm và được sử dụng nguyên như khi nhận được, trừ khi có quy định khác.

Tên hóa học như được mô tả trong phần Ví dụ dưới đây được hình thành bằng cách sử dụng gói định phần mềm danh ChemDraw (Ultra 11). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ rằng, các gói sản phẩm định danh khác nhau có thể tạo ra tên hóa học khác nhau cho cùng một hợp chất. Chỉ nhằm mục đích minh họa, tên hóa học được tạo ra trong các Ví dụ từ 1 đến 16 dưới đây lần lượt bằng cách sử dụng gói phần mềm định danh ACD/Name 2012:

3,5-diamino-6-clo-N-[(2R)-2-(2-metylbenzyl)-3-({[1-(3-{{(2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl}amino}propanoyl)piperidin-4-yl]metyl}amino)propyl]pyrazin-2-carboxamit;

1-deoxy-1-[(2-{{[4-({[(2R)-3-{{(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)cacbonyl}amino}-2-(2-metylbenzyl)propyl]amino}metyl)benzoyl]amino}etyl)-(hexyl)amino]-D-xylitol;

1-deoxy-1-[[2-([4-([[(2R)-3-[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)cacbonyl]amino}-2-(2-methylbenzyl)propyl]amino)methyl)piperidin-1-yl]cacbonyl]amino)ethyl](hexyl)amino]-D-glucitol;

3,5-diamino-6-clo-N-[(2R)-3-([1-(3-{hexyl[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl]amino}propanoyl)piperidin-4-yl]methyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl]pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-[(2R)-3-([1-(3-{hexyl[(2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]amino}propanoyl)piperidin-4-yl]methyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl]pyrazin-2-carboxamit;

1-deoxy-1-[[4-[4-([[(2R)-3-[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)cacbonyl]amino}-2-(2-methylbenzyl)propyl]amino)methyl)piperidin-1-yl]-4-oxobutyl](hexyl)amino]-D-glucitol;

3,5-diamino-6-clo-N-[(2R)-2-(2-methylbenzyl)-3-([1-(3-[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl]amino}propanoyl)piperidin-4-yl]methyl)amino)propyl]pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-[(2R)-3-([1-(3-{hexyl[(2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl]amino}propanoyl)piperidin-4-yl]methyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl]pyrazin-2-carboxamit;

1-deoxy-1-[[2-([4-([[(2R)-3-[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)cacbonyl]amino}-2-(2-methylbenzyl)propyl]amino)methyl)benzoyl]amino)ethyl](hexyl)amino]-D-mannitol;

1-deoxy-1-[[2-([4-([[(2R)-3-[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)cacbonyl]amino}-2-(2-methylbenzyl)propyl]amino)methyl)benzoyl]amino)ethyl](hexyl)amino]-D-glucitol;

1-deoxy-1-[[2-([4-([[(2R)-3-[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)cacbonyl]amino}-2-(2-methylbenzyl)propyl]amino)methyl)phenoxy]cacbonyl]-amino)ethyl](hexyl)amino]-D-glucitol;

1-deoxy-1-[[2-([4-([[(2R)-3-[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)cacbonyl]amino}-2-(2-methylbenzyl)propyl]amino)ethyl)benzoyl]amino)ethyl]-

(hexyl)amino]-D-gluxitol;

1-deoxy-1-[(2-{[4-(2-{[(2R)-3-{[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)carbonyl]amino}-2-(2-methylbenzyl)propyl]amino}ethyl)benzoyl]amino}ethyl)-(hexyl)amino]-D-xylitol;

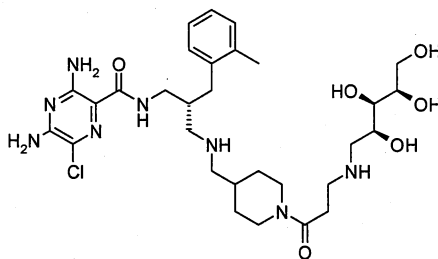
1-deoxy-1-[(2-{[4-({[(2S)-3-{[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)carbonyl]amino}-2-(2-methylbenzyl)propyl]amino}methyl)benzoyl]amino}ethyl)-(hexyl)amino]-D-xylitol;

5-deoxy-5-[(2-{[4-({[(2S)-3-{[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)carbonyl]amino}-2-(2-methylbenzyl)propyl]amino}methyl)benzoyl]amino}ethyl)-(hexyl)amino]-D-xylitol;

1-deoxy-1-[(2-{[3-(2-{[(2R)-3-{[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)carbonyl]amino}-2-(2-methylbenzyl)propyl]amino}ethyl)benzoyl]amino}ethyl)-(hexyl)amino]-D-gluxitol.

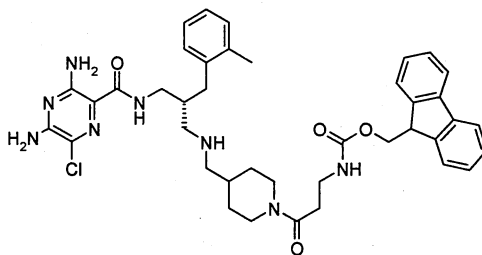
Ví dụ 1

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-2-(2-methylbenzyl)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methyl)amino)propyl)pyrazin-2-carboxamit



Bước 1

(R)-2-(2-(2-methylbenzyl)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methyl)amino)propyl)pyrazin-2-carboxamide

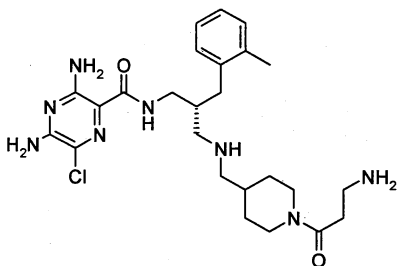


Hỗn hợp của (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (318mg, 0,91mmol) (Chất trung gian A), (9H-floren-9-yl)metyl 3-(4-formylpiperidin-1-yl)-3-oxopropylcarbamate (440mg, 1,08mmol) (Chất trung gian F) và axit axetic (80 μ l, 1,40mmol) trong THF khô (6ml) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Natri triaxetoxymetana (340mg, 1,60mmol) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 40°C trong 1,5 giờ nữa. Nước được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 5 phút và dung môi được làm bay hơi hết. Chất còn lại được phân bố giữa EtOAc và nước. Dung dịch NaHCO₃ 10% (trong nước) được thêm vào pha nước cho đến khi đạt tới độ pH = 8-9. Các pha được tách riêng và pha nước được chiết ngược bằng EtOAc. Pha hữu cơ màu vàng thu gom được được làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được làm bay hơi hết. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phép HPLC điều chế (Kromasil C8; H₂O/MeCN/AcOH với tỷ lệ 95/5/0,2). Các phân đoạn có liên quan được kết hợp lại và được cô trong chân không. Dung dịch NaHCO₃ 10% (trong nước) được thêm vào và pha nước được chiết bằng EtOAc. Pha hữu cơ được làm khô trên MgSO₄, lọc và làm bay hơi. Dầu dính nhớt còn lại được hòa tan trong DCM/Heptan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn, 196mg (29%, độ tinh khiết 87%) sau khi làm bay hơi.

LC/MS: m/z 739 [M+H]⁺.

Bước 2

(R)-3,5-Diamino-N-(3-(((1-(3-aminopropanoyl)piperidin-4-yl)metyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit



(R)-(9H-Floren-9-yl)methyl 3-(4-((3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propylamino)methyl)piperidin-1-yl)-3-oxopropylcarbamate (196mg, 0,27mmol) (từ Bước 1) được hòa tan trong DCM (5ml) và được xử lý bằng piperidin (0,5ml). Dung dịch phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ, tiếp theo làm bay hơi để thu được chất rắn màu vàng.

Chất thô được hòa tan trong THF (5ml) và DIPEA (280 μ l, 1,60mmol) và được xử lý bằng (BOC)₂O (0,141ml, 0,61mmol) trong THF (1ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau 3 giờ, LC/MS chỉ cho thấy một lượng nhỏ chuyển hóa thành sản phẩm được bảo vệ Boc một lần, phần lớn vẫn là amin không được phản ứng. Một lượng dư lớn DIPEA và BOC₂(O) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. MeCN (2-3ml) được thêm vào để làm tăng độ hòa tan và hỗn hợp phản ứng được đun nóng ở 50°C trong 2 giờ, tiếp theo là ở nhiệt độ trong phòng qua cuối tuần.

Các chất dễ bay hơi được làm bay hơi trong chân không và phần cặn được phân bố giữa EtOAc và nước. Pha nước được axit hóa bằng cách thêm dung dịch axit xitric 0,5M. Nước muối được thêm vào để trợ giúp tách các pha. Pha hữu cơ được rửa bằng nước và nước muối.

Dung môi được làm bay hơi hết và phần cặn được hòa tan trong DCM và được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh (EtOAc/heptan, gradien 30 – 100% EtOAc). Dung môi được làm bay hơi để thu được hợp chất nêu ở đề mục này được bảo vệ Boc hai lần (96mg).

Hợp chất được bảo vệ Boc hai lần vừa thu được (96mg) được hòa tan trong DCM (2ml) và được xử lý bằng TFA (0,5ml), dung dịch phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm bay hơi, phần cặn được hòa tan trong nước và được tinh chế bằng phép HPLC điều chế (Kromasil C8;

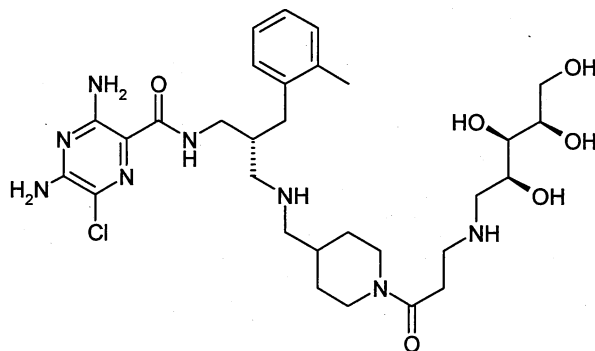
H₂O/MeCN/HCO₂H với tỷ lệ 95/5/0,2 đến 60/40/0,2 trong 16 phút). Làm khô lạnh sẽ thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn (64mg, 45%).

LC/MS: m/z 517 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, MeOD) δ 1,13 - 1,34 (m, 2H), 1,83 - 2,06 (m, 3H), 2,29 - 2,39 (m, 1H), 2,35 (s, 3H), 2,59 - 2,93 (m, 9H), 3,08 - 3,23 (m, 3H), 3,32 - 3,37 (m, 1H), 3,67 - 3,74 (m, 1H), 3,87 - 3,96 (m, 1H), 4,52 - 4,6 (m, 1H), 7,11 - 7,22 (m, 4H), 8,51 (s, 0,4H, phần cặn axit formic).

Bước 3

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-2-(2-metylbenzyl)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)amino)propyl)pyrazin-2-carboxamit

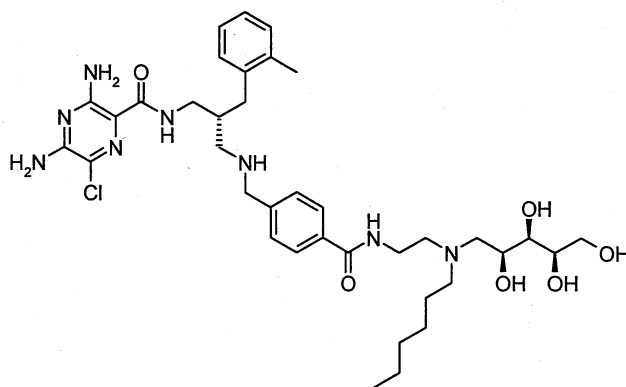


(R)-3,5-Diamino-N-(3-(((1-(3-aminopropanoyl)piperidin-4-yl)metyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (900mg, 1,74mmol) được hòa tan trong metanol (10ml). (2R,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentanal (261mg, 1,74mmol) được thêm vào, sau đó thêm tiếp 5 nước nước. Natri xyanobohydrua (328mg, 5,22mmol) được thêm vào tiếp đó và độ pH được điều chỉnh đến ~7,0 bằng cách thêm dung dịch axit axetic. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Các chất dễ bay hơi được loại bỏ và sản phẩm thô tạo thành được tinh chế bằng phép HPLC điều chế (H₂O/MeCN/AcOH với tỷ lệ 95/5/0,2 đến 60/40/0,2 trong 20 phút). Các phân đoạn có liên quan được thu gom lại và được làm khô lạnh. Hợp chất nêu ở đề mục này được hòa tan trong 2M HCl (4ml) và được làm khô lạnh, quy trình này được lặp lại 3 lần, sẽ thu được muối HCl của hợp chất nêu ở đề mục này (144mg, 11%).

^1H NMR (500MHz, MeOD) δ 1,30 (ddd, 2H), 1,84 - 2,13 (m, 3H), 2,32 - 2,45 (m, 4H), 2,62 - 2,77 (m, 2H), 2,81 - 2,98 (m, 7H), 3,15 (dd, 1H), 3,26 (d, 2H), 3,32 - 3,42 (m, 2H), 3,58 - 3,83 (m, 6H), 3,95 (t, 1H), 4,06 (dd, 1H), 4,55 (s, 1H), 7,05 - 7,33 (m, 4H).

Ví dụ 2

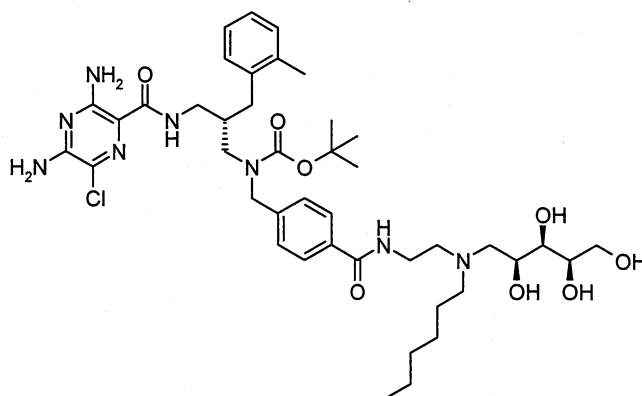
3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)-amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)-pyrazin-2-carboxamit



Phương pháp A

Bước 1

tert-Butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)-propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)-benzyl)carbamate



(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (Chất trung gian E, 1,23g, 1,73mmol), (2R,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentanal (0,521g,

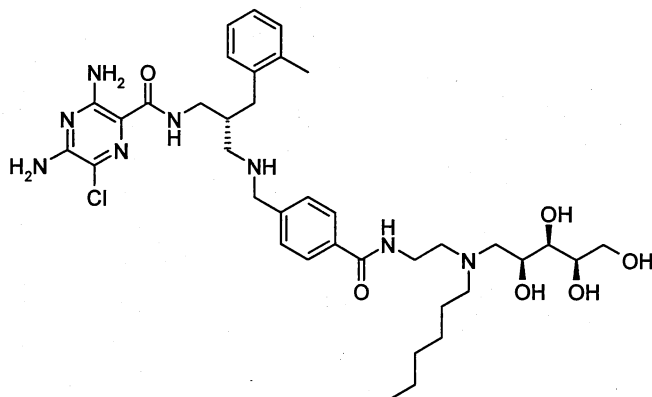
3,47mmol) và DIPEA (0,303ml, 1,73mmol) được hòa tan trong MeOH (10ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Natri xyanobohydrua (0,327g, 5,20mmol) và axit axetic (0,099ml, 1,73mmol) được thêm vào và việc khuấy được tiếp tục ở 50°C trong 3 ngày. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, tôi bằng cách thêm dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước), được khuấy trong 15 phút và tiếp theo được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc (100ml) và dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) (50ml), lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (100ml). Pha hữu cơ thu gom được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không. Hợp chất được tinh chế bằng phép HPLC điều chế trên cột Kromasil C8 (10µm, đường kính trong 250x50mm) bằng cách sử dụng gradien 20 – 60% axetonitril trong dung dịch đệm H₂O/MeCN/AcOH với tỷ lệ 95/5/0,2 trong 20 phút với tốc độ chảy là 100ml/phút. Hợp chất được bảo vệ bằng tia UV ở bước sóng 268nm. Hợp chất này được thu gom và được làm khô lạnh để thu được tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)-carbamate (1,21g, 83%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS: m/z 843,5 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,74 - 0,85 (m, 3H), 1,12 - 1,27 (m, 6H), 1,27 - 1,45 (m, 11H), 2,20 (s, 3H), 2,25 - 2,35 (m, 1H), 2,39 - 2,66 (m, 6H), 2,9 - 3,06 (m, 1H), 3,06 - 3,51 (m, 12H), 3,53 - 3,6 (m, 1H), 3,6 - 3,72 (m, 1H), 4,2 - 4,68 (m, 5H), 6,97 (bs, 2H), 7,03 - 7,19 (m, 6H), 7,72 (d, 2H), 7,78 - 7,99 (m, 1H), 8,21 - 8,36 (m, 1H).

Bước 2

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua



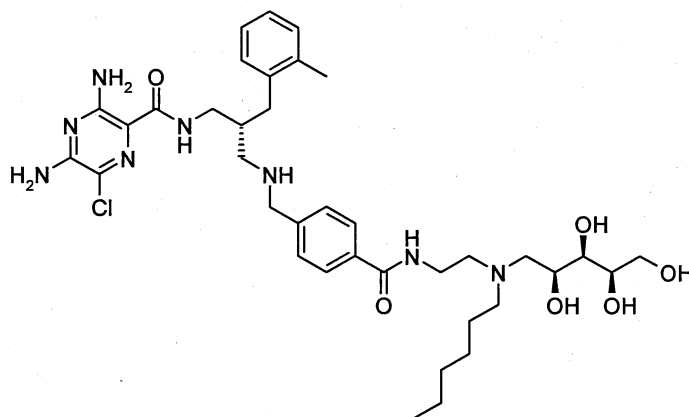
Axetyl clorua (5,69ml, 80,0mmol) được thêm từng giọt vào bình đã được làm lạnh trong thùng nước đá chứa MeOH (20ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 5 phút và tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (1,21g, 1,43mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ và tiếp theo được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong nước và được làm khô lạnh để thu được 3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua (1,17g, 100%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

LC/MS: m/z 743,4 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,8 - 0,9 (m, 3H), 1,2 - 1,33 (m, 6H), 1,62 - 1,74 (m, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,3 - 2,41 (m, 1H), 2,59 - 2,74 (m, 2H), 2,74 - 2,85 (m, 1H), 2,86 - 2,98 (m, 1H), 3,09 - 3,51 (m, 11H), 3,56 - 3,62 (m, 1H), 3,62 - 3,75 (m, 2H), 3,99 - 4,09 (m, 1H), 4,14 - 4,29 (m, 2H), 4,58 (s, 4H), 7 - 7,21 (m, 6H), 7,62 (d, 2H), 7,92 (d, 2H), 8,27 (t, 1H), 8,91 - 9 (m, 1H), 9,16 (d, 2H), 9,52 (d, 1H).

Bước 3

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)-amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



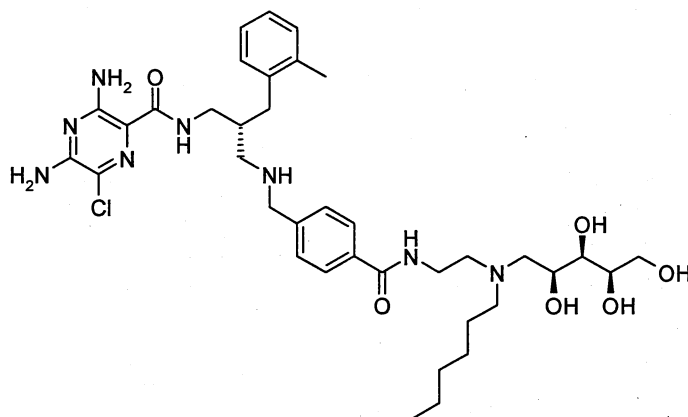
3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamid dihydroclorua (1,17g, 1,43mmol) được hòa tan trong nước (15ml) và được bazơ hóa bằng cách thêm dung dịch Na₂CO₃ 10% (trong nước) đến độ pH ~11. Sản phẩm được chiết bằng EtOAc (5x70ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không để thu được chất bán rắn/dầu. Phần cặn được hòa tan trong axetonitril/nước và được làm khô lạnh để thu được 3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)-pyrazin-2-carboxamid (1,02g, 96%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

LC/MS: m/z 743,5 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,75 - 0,85 (m, 3H), 1,12 - 1,26 (m, 6H), 1,31 - 1,43 (m, 2H), 1,94 - 2,05 (m, 1H), 2,24 (s, 3H), 2,35 - 2,49 (m, 5H), 2,54 - 2,65 (m, 4H), 3,14 - 3,23 (m, 1H), 3,25 - 3,4 (m, 5H), 3,4 - 3,49 (m, 2H), 3,53 - 3,59 (m, 1H), 3,62 - 3,78 (m, 3H), 4,26 (d, 1H), 4,38 (d, 1H), 4,45 (t, 1H), 4,51 (d, 1H), 6,96 (bs, 2H), 7,03 - 7,14 (m, 4H), 7,40 (d, 2H), 7,74 (d, 2H), 8,24 - 8,37 (m, 2H).

Phương pháp B

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)-amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamid



Dung dịch chứa 4-formyl-N-(2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)benzamidit (Chất trung gian I, 133g, 108,5g hoạt chất, 0,26mol) trong EtOH (1500ml), (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamidit (Chất trung gian A, 108,8g, 0,31mol), EtOH (230ml) và DIPEA (64,4ml, 0,37mol) được nạp vào bình có vành ở cổ dung tích 5 lít. Hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến 40°C trong 1 giờ. AcOH (45,4ml, 0,79mol) được nạp vào dung dịch trong suốt này. Dung dịch phản ứng được khuấy ở 40°C trong 20 phút. NaCNBH₃ (23,2g, 0,37mol) được nạp từng phần vào dung dịch phản ứng trong 10 phút, lưu ý rằng có bay hơi khí. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 40°C qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, tôi cẩn thận bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa trong nước (3100ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được chiết bằng 10% MeOH/EtOAc (2 x 5000ml) và 10% MeOH/DCM (5000ml). Pha hữu cơ được kết hợp lại và được cô trong chân không để thu được 271g chất thô. Phép phân tích NMR cho thấy độ tinh khiết khoảng 80%, với các dấu vết NaCNBH₃ có mặt. Phần cặn được hòa tan trong DCM (12 lít) và IPA (770ml). Hỗn hợp phản ứng được rửa bằng hỗn hợp của dung dịch NaHCO₃ bão hòa trong nước (2700ml) và nước (770ml). Pha nước được chiết bằng DCM (1200ml). Các chất hữu cơ được kết hợp lại và được cô trong chân không để thu được 298g (191g hoạt chất, 97%) dưới dạng chất rắn màu vàng. HPLC-MS cho thấy độ tinh khiết 88,0%. ¹H NMR cho thấy độ tinh khiết khoảng 60%, với khoảng 27% trọng lượng IPA và khoảng 8% trọng lượng Chất trung gian A.

Chất thô vừa thu được (290g, 235mmol) được pha loãng trong MeOH ẩm (750ml) và axetonitril (15 lít) được thêm vào trong khi vẫn tiếp tục làm bay hơi hỗn

hợp đẳng phí ra khỏi hỗn hợp phản ứng. Sau khi khoảng 10 lít dung môi được làm bay hơi, hỗn hợp còn lại chứa chất kết tủa giống gồm được khuấy trong 14 ngày nữa ở nhiệt độ trong phòng.

Pha lỏng được gạn ra khỏi phần cặn giống gồm. 2,5 lít axetonitril được thêm vào phần cặn này và sau khi khuấy trong 1 giờ và axetonitril được gạn ra. Chất thô vừa thu được (khoảng 175g) được đưa vào tinh chế lần cuối bằng phép sắc ký HPLC [CelluCoat 250x100mm, 10 μ m; pha di động: MeOH/MeCN/TEA = 95:5:0,1; lượng truyền vào: 1,0g/chu trình; thời gian của chu trình: 3,5 phút]. Hiệu suất của hợp chất nêu ở đề mục này: 148g (77%).

LC/MS: m/z 743,5 [M+H]⁺

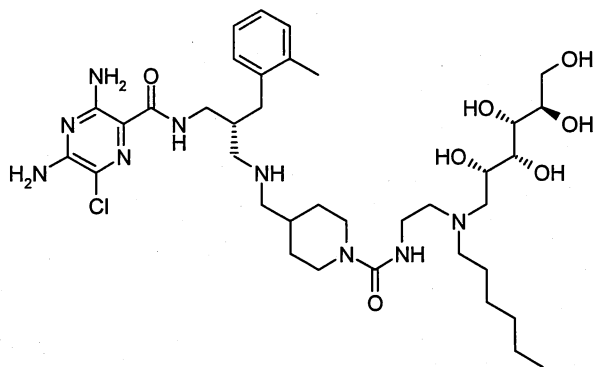
¹H NMR (600MHz, DMSO; trong trường hợp của các đỉnh đồng phân atropi, chỉ có những dịch chuyển của chất đồng phân atropi được báo cáo) δ 0,80 (t, 3H), 1,34 – 1,4 (m, 2H), 1,09 – 1,24 (m, 6H), 1,34 – 1,4 (m, 2H), 2,00 (s, 1H), 2,00 (s, 1H), 2,24 (s, 3H), 2,36 – 2,42 (m, 1H), 2,43 – 2,49 (m, 4H), 2,51 – 2,54 (m, 1H), 2,56 – 2,64 (m, 4H), 3,15 – 3,22 (m, 1H), 3,23 – 3,3 (m, 3H), 3,35 – 3,4 (m, 1H), 3,42 (s, 1H), 3,43 – 3,49 (m, 1H), 3,54 – 3,59 (m, 1H), 3,62 – 3,7 (m, 2H), 3,74 (d, 1H), 4,27 (s, 1H), 4,39 (s, 1H), 4,46 (t, 1H), 4,52 (s, 1H), 6,96 (s, 1H), 7,03 – 7,08 (m, 2H), 7,40 (d, 2H), 7,74 (d, 2H), 8,26 – 8,31 (m, 1H), 8,31 – 8,35 (m, 1H).

¹³C NMR (151MHz, DMSO) δ 13,91, 19,04, 22,08, 26,48, 26,61, 31,27, 34,23, 37,42, 38,60, 41,55, 50,84, 53,06, 53,44, 54,55, 57,43, 62,65, 69,23, 71,12, 72,61, 112,95, 117,12, 125,54, 125,83, 126,89, 127,72, 129,63, 130,03, 132,85, 135,82, 138,74, 144,02, 152,69, 154,14, 165,55, 166,01.

HPLC bất đối (phương pháp A; heptan/IPA/TEA với tỷ lệ 75:25:0,1): 98,9% ee, Rt = 14,75 phút (R), 18,63 phút (S).

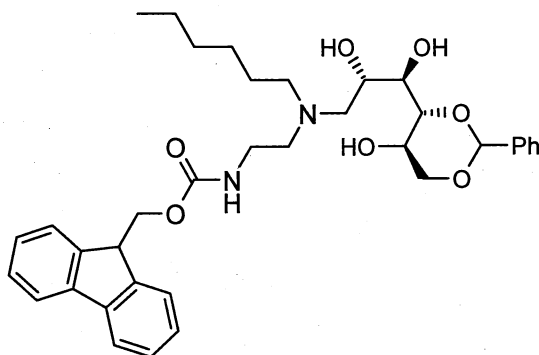
Ví dụ 3

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbonyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



Bước 1:

(9H-Floren-9-yl)metyl 2-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)etylcarbamát



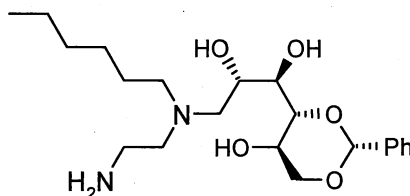
9H-Floren-9-ylmetyl N-(2-aminoetyl)carbamát hydroclorua (1,50g, 4,71mmol, 1,0 đương lượng), (2R,4aR,7R,8R,8aS)-2-phenyl-hexahydro-2H-pyrano[3,2-d][1,3]dioxin-6,7,8-triol (1,51g, 5,63mmol, 1,20 đương lượng), metanol (30ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 100ml. Sau khi khuấy hỗn hợp trên đây trong 30 phút, NaBH_3CN (590mg, 9,39mmol, 2,00 đương lượng), AcOH (570mg, 9,49mmol, 2,0 đương lượng) được thêm vào. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, hexanal (530mg, 5,29mmol, 1,50 đương lượng) được thêm vào, sau đó thêm tiếp NaBH_3CN nữa (450mg, 7,16mmol, 2,00 đương lượng). Dung dịch tạo thành được khuấy trong 5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, dung dịch phản ứng được cô trong chân không. Hỗn hợp tạo thành được rửa bằng nước, chiết bằng etyl axetat và Lớp hữu cơ được thu gom và được làm khô trên Na_2SO_4 . Chất rắn được lọc ra. Quá trình này sẽ thu được 1,6g (73%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu màu vàng sáng.

LC/MS: m/z 619 [M+H]⁺

¹H NMR (300MHz, CD₃OD): 1,80 - 1,92 (m, 3H), 1,15 - 1,40 (m, 6H), 1,41 - 1,72 (m, 2H), 2,88 - 3,15 (m, 5H), 3,33 - 3,43 (m, 2H), 3,55 - 3,61 (m, 1H), 3,67 - 3,83 (m, 1H), 3,85 - 4,12 (m, 3H), 4,22 - 4,40 (m, 4H), 5,57 (s, 1H), 7,33 - 7,65 (9H, m), 7,67 (d, 2H), 7,83 (d, 2H).

Bước 2:

(1R,2S)-3-((2-Aminoethyl)(hexyl)amino)-1-[(2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl]propan-1,2-diol

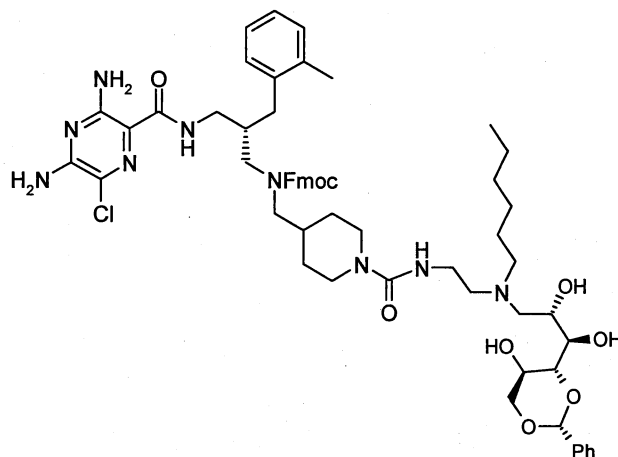


9H-Floren-9-ylmetyl N-(2-[[[(2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-[(2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl]propyl]](hexyl)amino]etyl)carbammat (1,6g, 2,59mmol, 1,0 đương lượng), metanol (10ml), diethylamin (5ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Phần cặn được đưa vào cột silicagel và được rửa giải bằng amoniac/MeOH (với tỷ lệ 1:100). Quá trình này sẽ thu được 600mg (59%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 397 [M+H]⁺

Bước 3:

(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl((1-(2-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)etylcarbamoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbammat

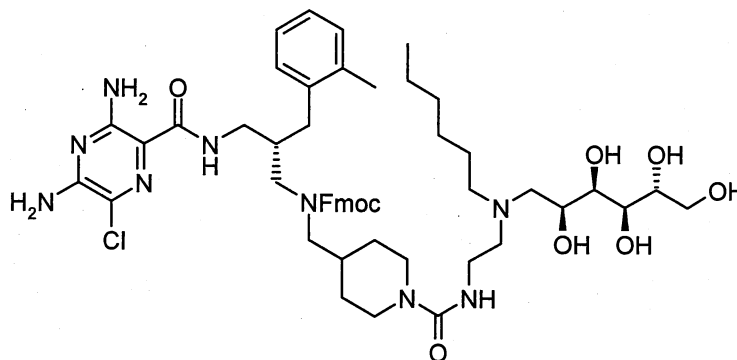


(S)-(9H-Floren-9-yl)methyl 3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl(piperidin-4-ylmethyl)carbamate (Chất trung gian B, 400mg, 0,60mmol, 1,0 đương lượng), triethylamin (177mg, 1,75mmol, 3,0 đương lượng), triphosgen (173mg, 0,58mmol, 1,0 đương lượng) trong DCM (5ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml. Dung dịch tạo thành được khuấy trong 0,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp tạo thành được rửa bằng 3x10ml nước. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không để thu được cloformamit trung gian, chất này được thêm vào từng giọt (được hòa tan trong DCM) vào dung dịch chứa triethylamin (177mg, 1,75mmol, 3,0 đương lượng) và (1R,2S)-3-[(2-aminoethyl)(hexyl)amino]-1-[(2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl]propan-1,2-diol (347mg, 0,88mmol, 1,50 đương lượng) trong DCM (5ml) được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép TLC điều chế bằng DCM/MeOH (với tỷ lệ 10:1). Quá trình này sẽ thu được 145mg (22%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 1090 [M+H]⁺

Bước 4:

(9H-Floren-9-yl)methyl (S)-3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl((1-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbamoyl)piperidin-4-yl)methyl)carbamate

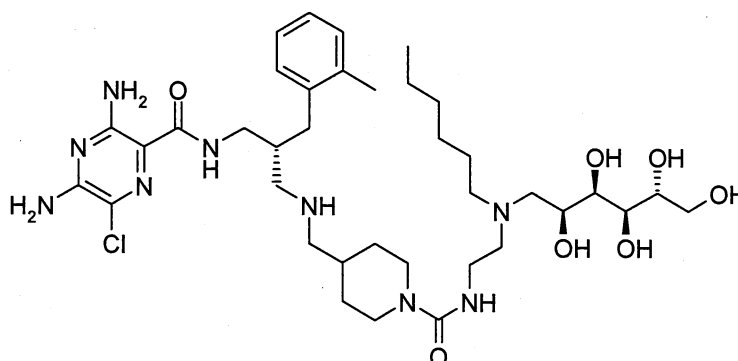


(9H-Floren-9-yl)methyl (S)-3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl((1-(2-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)ethylcarbamoyl)piperidin-4-yl)methyl)carbamate (144mg, 0,13mmol, 1,0 đương lượng), ethanol (0,5ml), dung dịch HCl 4M (3ml) được thêm vào một lọ nhỏ dung tích 8ml. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không. Quá trình này sẽ thu được 120mg (dạng thô) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu màu vàng.

LC/MS: m/z 1002 [M+H]⁺

Bước 5:

3,5-Diamino-6-chloro-N-((R)-3-((1-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbamoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



9H-Floren-9-yl)methyl (S)-3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl((1-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbamoyl)piperidin-4-yl)methyl)carbamate (120mg,

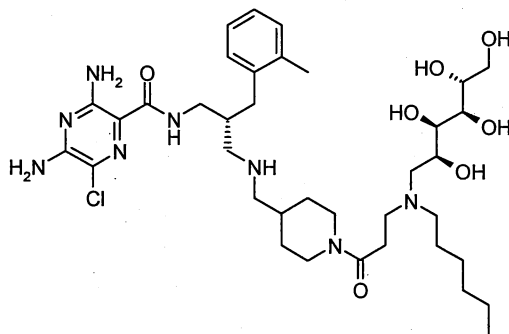
0,12mmol, 1,0 đương lượng), dietylamin (2ml) trong N,N-dimetylformamit (4ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không. Sản phẩm thô (100mg) được tinh chế bằng phép HPLC điều chế với các điều kiện sau đây (2#-AnalyseHPLC-SHIMADZU(HPLC-10)): Cột XBridge Prep C18 OBD, 5 μ m, 19*150mm; pha di động, nước với TFA 0,05% và ACN (ACN 23,0% lên đến 33,0% trong 15 phút); Detector, MS, UV 254nm. Quá trình này sẽ thu được 8mg (7%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 780 [M+H]⁺

¹H NMR (300MHz, CD₃OD): 0,91- 0,95 (m, 3H), 1,27 – 1,38 (m, 8H), 1,81 – 1,97 (m, 5H), 2,36 (s, 4H), 2,62-2,69(m, 1H), 2,86-2,96 (m, 7H), 3,31-3,55 (m, 3H), 3,63-3,68 (m, 6H), 3,70-3,83 (m, 6H), 4,05-4,17 (m, 3H), 7,13-7,20 (m, 4H)

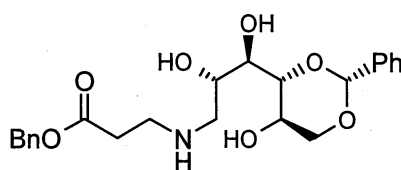
Ví dụ 4

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



Bước 1:

Benzyl 3-((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propylamino)propanoat

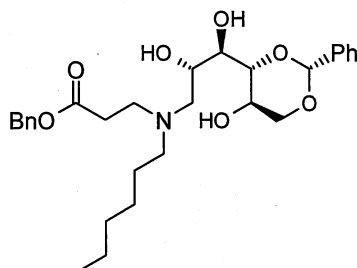


Benzyl 3-aminopropanoat của axit 4-metylbenzen-1-sulfonic (2,00g, 5,69mmol, 1,0 đương lượng), (2R,4aR,7R,8R,8aS)-2-phenyl-hexahydro-2H-pyrano[3,2-d][1,3]dioxin-6,7,8-triol (2,29g, 8,54mmol, 1,5 đương lượng), metanol (30ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 100ml. Sau 30 phút, NaBH_3CN (720mg, 11,46mmol, 2,00 đương lượng), AcOH (680mg, 11,32mmol, 2,0 đương lượng) được thêm vào. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp tạo thành được cô, được pha loãng bằng etyl axetat và được rửa bằng nước. Lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan. Chất rắn được lọc ra. Việc loại bỏ dung môi trong chân không sẽ tạo ra 1,9g (77%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu không màu, chất này được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

LC/MS: m/z 967 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 2:

Benzyl 3-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)propanoat

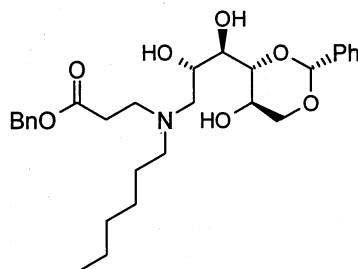


Benzyl 3-[[[(2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-[(2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl]propyl]amino]propanoat (1,90g, dạng thô), hexanal (660mg, 6,59mmol, 1,5 đương lượng), metanol (30ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 100ml. Sau 30 phút, NaBH_3CN (550mg, 8,75mmol, 2,0 đương lượng) và AcOH (530mg, 8,83mmol, 2,0 đương lượng) được thêm vào. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp tạo thành được cô, được pha loãng bằng etyl axetat và được rửa bằng nước, lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan. Chất rắn được lọc ra. Phần cặn được đưa vào cột silicagel và được rửa giải bằng etyl axetat/ete dầu mỏ (với tỷ lệ 1:2). Quá trình này sẽ thu được 1,3g (57%) benzyl 3-[[[(2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-[(2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl]propyl](hexyl)amino]propanoat dưới dạng dầu màu vàng sáng.

LC/MS: m/z 516 $[M+H]^+$.

Bước 3:

Axit 3-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)propanoic

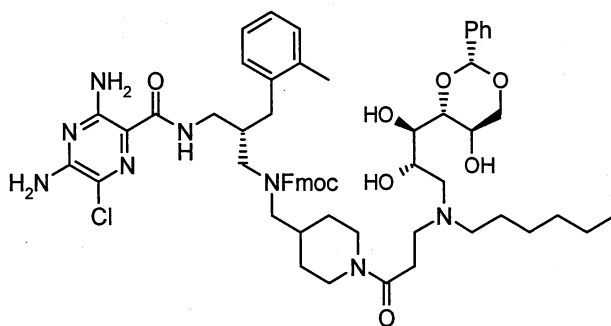


Benzyl 3-[[[(2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-[(2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl]propyl](hexyl)amino]propanoat (1,3g, 2,52mmol, 1,0 đương lượng), Pd/C (5% trọng lượng, 700mg), etanol (20ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 100ml. H_2 (g) được thêm vào hỗn hợp trên. Dung dịch tạo thành được khuấy trong môi trường H_2 qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Chất rắn được lọc ra. Dịch lọc được cô trong chân không. Quá trình này sẽ thu được 0,5g (47%) axit 3-[[[(2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-[(2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl]propyl](hexyl)amino]propanoic dưới dạng dầu không màu.

LC/MS: m/z 426 $[M+H]^+$.

Bước 4:

(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl((1-(3-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbamate



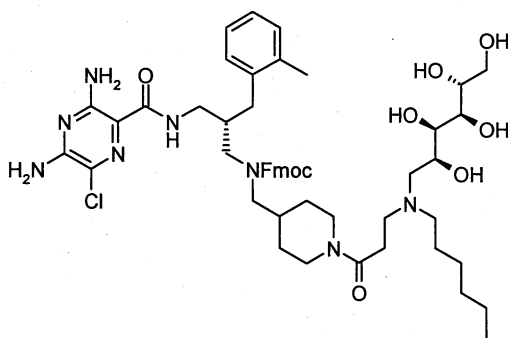
Axit 3-[[[(2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-[(2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-

dioxan-4-yl]propyl](hexyl)amino]propanoic (381,49mg, 0,90mmol, 3,00 đương lượng), (S)-(9H-floren-9-yl)metyl 3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl(piperidin-4-ylmetyl)carbamate (Chất trung gian B, 200,0mg, 0,30mmol, 1,0 đương lượng), HATU (170,5mg, 0,45mmol, 1,5 đương lượng), DIEA (57,9mg, 0,45mmol, 1,5 đương lượng), N,N-dimetylformamit (5ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml. Dung dịch tạo thành được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Nước được thêm vào hỗn hợp phản ứng trên và huyền phù được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được thu gom và được rửa bằng nước muối. Hỗn hợp phản ứng được làm khô trên natri sulfat khan. Chất rắn được lọc ra và dịch lọc được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép TLC điều chế (DCM:MeOH=10:1). Các phân đoạn có liên quan được thu gom lại và sau khi loại bỏ các chất dễ bay hơi sẽ tạo ra 200mg (62%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 1076 [M+H]⁺.

Bước 5:

(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbamate



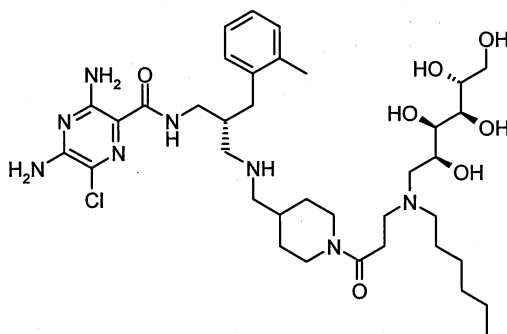
(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl((1-(3-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-(((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbamate (Bước 4, 200mg, 0,19mmol, 1,0 đương lượng) và dung dịch HCl (4M trong etanol, 2ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Làm bay hơi các chất dễ bay hơi sẽ tạo ra 200mg hợp

chất nêu ở đề mục này dạng thô dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 987 $[M+H]^+$.

Bước 6:

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)-propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbamate (Bước 5200mg, 0,20mmol, 1,00 đương lượng), metanol (6ml), diethylamin (3ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 25ml. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không. Sản phẩm thô (100mg) được tinh chế bằng phép HPLC điều chế với các điều kiện sau đây (Prep-HPLC-019): Cột XSelect CSH Prep C18 OBD, 5 μ m, 19*150mm; pha di động, nước chứa TFA 0,05% và MeCN (MeCN 22,0% lên tới 30,0% trong 8 phút, lên tới 100% trong 1 phút, được giữ ở 100% trong 1 phút, giảm xuống 22% trong 2 phút); Detector, UV 254/220nm. Quá trình này sẽ thu được 38mg (21%) 3,5-diamino-6-clo-N-[(2R)-3-([(1-(3-[hexyl[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl]amino]propanoyl)piperidin-4-yl]metyl]amino)-2-[(2-methylphenyl)metyl]propyl]pyrazin-2-carboxamit; axit trifloaxetic dưới dạng chất rắn màu vàng.

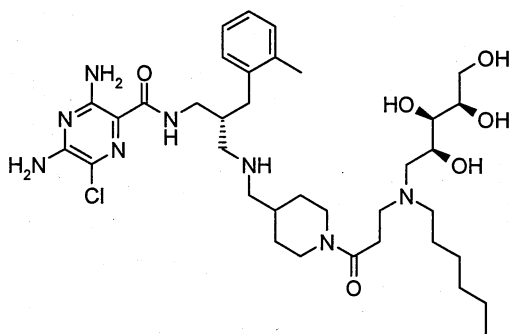
^1H NMR (300MHz, CD_3OD): δ 0,95 - 0,97 (m, 3H), 1,22 - 1,50 (m, 8H), 1,70 - 2,10 (m, 5H), 2,30 - 2,51 (m, 4H), 2,63 - 2,81 (m, 2H), 2,88 - 3,16 (m, 7H), 3,16 - 3,20 (m, 2H), 3,34 - 3,78 (m, 5H), 3,51-3,87 (m, 7H), 3,95 - 4,10 (m, 1H), 4,10 - 4,25

(m, 1H), 4,54 (d, 1H), 7,14 – 7,22 (m, 4H).

LC/MS: m/z 765 [M+H]⁺.

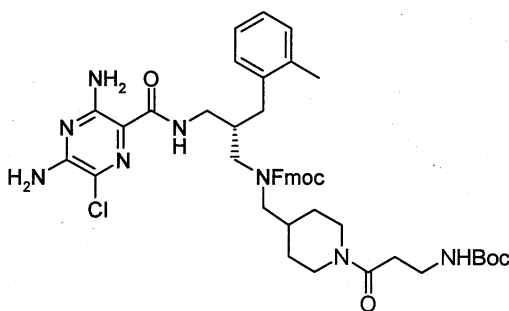
Ví dụ 5

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



Bước 1:

(S)-(9H-Floren-9-yl)metyl (1-(3-tert-butoxycarbonylaminopropanoyl)-piperidin-4-yl)metyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)-carbammat



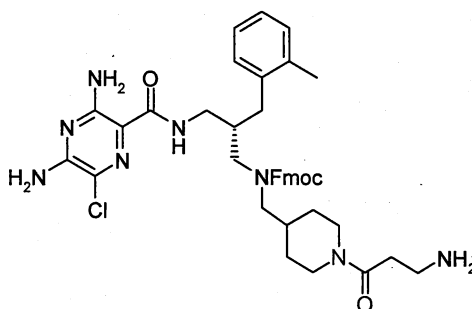
Một bình (25ml) được nạp (S)-(9H-floren-9-yl)metyl 3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl(piperidin-4-ylmetyl)carbammat (Chất trung gian B, 300mg, 0,45mmol), axit 3-(tert-butoxycarbonylaminopropanoic (100mg, 0,53mmol), DIPEA (145mg, 1,13mmol), HATU (342mg, 0,9mmol) và DMF (10ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 6 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng 25ml etyl axetat và được rửa bằng nước (3 x 25ml). Lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄ khan. Chất kết tủa được lọc ra và dịch lọc

được cô trong chân không. Sản phẩm thô thu được được tinh chế bằng cột silicagel bằng diclometan/metanol (với tỷ lệ 20:1, thể tích) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (280mg, 67%) dưới dạng chất rắn màu vàng sáng.

LC/MS: m/z 839 $[M+H]^+$.

Bước 2:

(S)-(9H-Floren-9-yl)metyl (1-(3-aminopropanoyl)piperidin-4-yl)metyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbammat

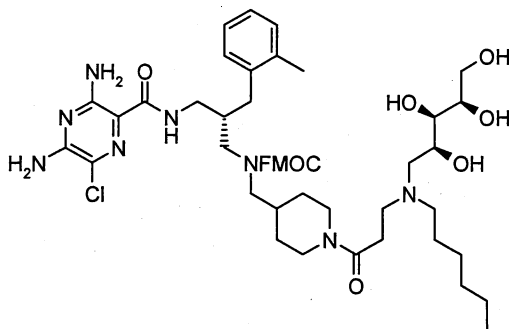


(S)-(9H-Floren-9-yl)metyl (1-(3-tert-butoxycacbonylaminopropanoyl)piperidin-4-yl)metyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbammat (Bước 1, 216mg, 0,26mmol, 1,0 đương lượng) và hydro clorua (4M trong metanol, 5ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml. Dung dịch tạo thành được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Làm bay hơi các chất dễ bay hơi sẽ tạo ra 190mg hợp chất nêu ở đề mục này dạng thô dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 739 $[M+H]^+$.

Bước 3:

(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbammat

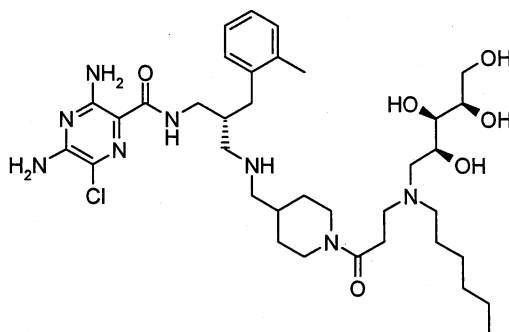


(S)-(9H-Floren-9-yl)methyl (1-(3-aminopropanoyl)piperidin-4-yl)methyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate (Bước 2, 190mg, 0,26mmol, 1,0 đương lượng), (3R,4S,5R)-oxan-2,3,4,5-tetrol (39mg, 0,26mmol, 1,0 đương lượng), metanol (6ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml. Sau 30 phút, NaBH_3CN (66mg, 1,05mmol, 4,0 đương lượng) được thêm vào từ từ ở 0°C . Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, hexanal (39mg, 0,39mmol, 1,0 đương lượng) được thêm vào, sau đó thêm tiếp NaBH_3CN bổ sung (66mg, 1,05mmol, 4,0 đương lượng). Dung dịch tạo thành được khuấy trong 5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ để thu được sản phẩm thô, chất này được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

LC/MS: m/z 957 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 4:

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



(9H-Floren-9-yl)methyl (S)-3-(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-

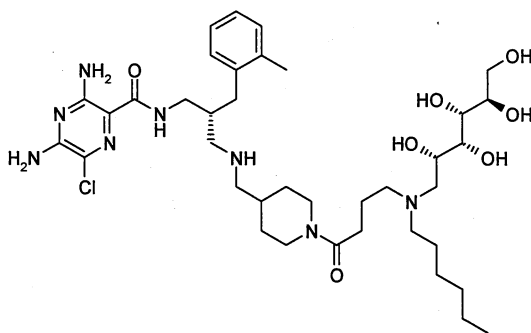
methylbenzyl)propyl((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)-propanoyl)piperidin-4-yl)methyl)carbamate (Bước 3, 230mg, 0,24mmol, 1,00 đương lượng), metanol (5ml), diethylamin (0,5ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml. Dung dịch tạo thành được khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phép HPLC điều chế với các điều kiện sau đây (Prep-HPLC-019): Cột XSelect CSH Prep C18 OBD, 5 μ m, 19*150mm; pha di động, nước chứa TFA 0,05% và MeCN (MeCN 18,0% lên tới 35,0% trong 8 phút, lên tới 100,0% trong 1 phút, giữ ở 100,0% trong 1 phút, giảm xuống 18,0% trong 2 phút); Detector, UV 254/220nm. Quá trình này sẽ thu được 36,9mg (16%) of hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 735 [M+H]⁺.

¹H NMR (300MHz, CD₃OD): δ 0,96 (d, 3H), 1,26-1,40 (m, 8H), 1,81-2,01(m, 5H), 2,37 (s, 4H), 2,62-2,94 (m, 9H), 3,17-3,47 (m, 7H), 3,55-3,78 (m, 6H), 3,98 (d, 1H), 4,15 (s, 1H), 4,56 (d, 1H), 7,14-7,21 (m, 4H).

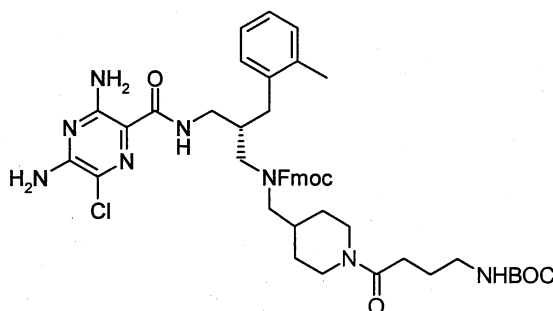
Ví dụ 6

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(4-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamid



Bước 1:

(S)-(9H-Floren-9-yl)methyl ((1-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)methyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate

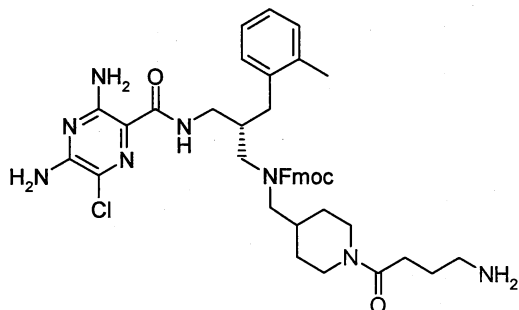


(S)-(9H-Floren-9-yl)methyl (3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(piperidin-4-yl)methyl carbamat (Chất trung gian B, 900mg, 1,35mmol), axit 4-((tert-butoxycarbonyl)amino)butanoic (821mg, 4,04mmol), HATU (2305mg, 6,06mmol), và DIEA (1,06ml, 6,06mmol) trong DMF (10ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml để thu được dung dịch màu vàng. Dung dịch tạo thành được khuấy ở 25°C trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng EtOAc (50ml), và được rửa liên tục bằng Nước (50ml). Lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh trên silicagel, rửa giải bằng gradien từ 20 đến 70% EtOAc trong ete dầu mỏ. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (834mg, 73%) dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 853 [M+H]⁺.

Bước 2:

(S)-(9H-Floren-9-yl)methyl (1-(4-aminobutanoyl)piperidin-4-yl)methyl(3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate



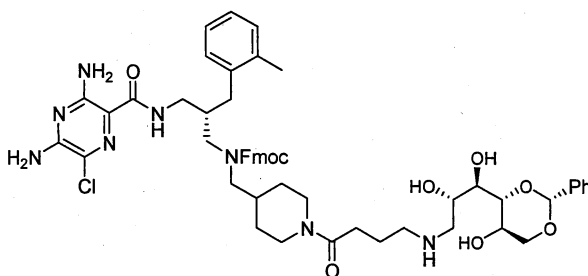
(S)-(9H-Floren-9-yl)methyl ((1-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)methyl)(3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate (Bước 1, 834mg, 0,98mmol) được hòa tan trong dung

dịch HCl trong metanol (4M) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 753 [M+H]⁺.

Bước 3:

(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl((1-(4-((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propylamino)butanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbamát



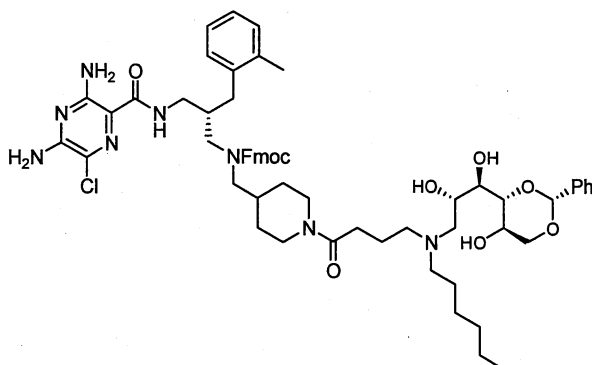
(S)-(9H-Floren-9-yl)metyl (1-(4-aminobutanoyl)piperidin-4-yl)metyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbamát (Bước 2, 250mg, 0,33mmol, 1,0 đương lượng), D-glucosa được bảo vệ axetal (2R,4aR,7R,8R,8aS)-2-phenyl-hexahydro-2H-pyrano[3,2-d][1,3]dioxin-6,7,8-triol (133mg, 0,50mmol, 1,5 đương lượng) và metanol (5ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 25ml. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút. Tiếp theo, NaBH₃CN (41mg, 0,65mmol, 2,0 đương lượng) và AcOH (40mg, 0,67mmol, 2,00 đương lượng) được thêm vào. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để thu được 210mg (dạng thô) (9H-floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl((1-(4-((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propylamino)butanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbamát dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 1005 [M+H]⁺.

Bước 4:

(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-

methylbenzyl)propyl((1-(4-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)methyl)carbamate

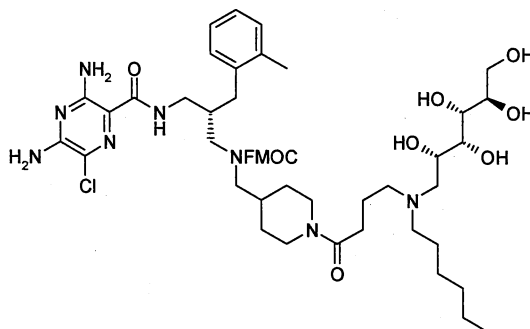


(9H-Floren-9-yl)methyl (S)-3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl((1-(4-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propylamino)butanoyl)piperidin-4-yl)methyl)carbamate (210mg, dạng thô) được hòa tan trong MeOH (5ml), hexanal (42mg, 0,42mmol, 2,00 đương lượng) được thêm vào, sau đó thêm tiếp NaBH_3CN (26mg, 0,41mmol, 2,00 đương lượng) và AcOH (25mg, 0,42mmol, 2,00 đương lượng). Hỗn hợp tạo thành được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng và tiếp theo, được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan với nước và chiết bằng 3x20ml etyl axetat. Các lớp hữu cơ thu gom được và được cô trong chân không và sẽ tạo ra 152mg (67%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu màu vàng thô.

LC/MS: m/z 1089 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 5:

(9H-Floren-9-yl)methyl (S)-3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl((1-(4-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)methyl)carbamate

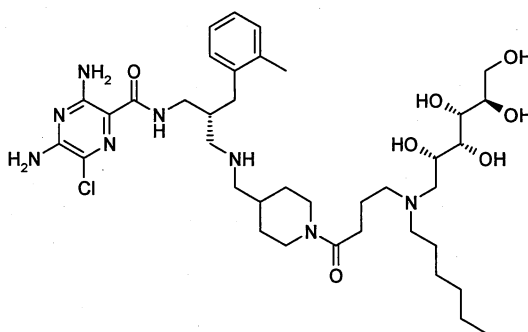


(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl((1-(4-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbammat (Bước 4, 152mg, 0,14mmol, 1,00 đương lượng), HCl (4M trong etanol, 5ml) và etanol (1ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 25ml. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Làm bay hơi các chất dễ bay hơi sẽ tạo ra 138mg hợp chất nêu ở đề mục này dạng thô dưới dạng dầu màu vàng.

LC/MS: m/z 1002 [M+H]⁺.

Bước 6:

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(4-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)metyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



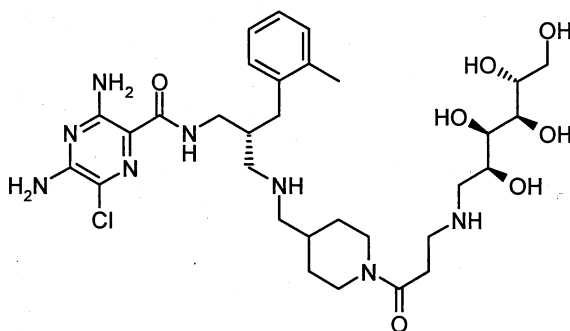
(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl((1-(4-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbammat (Bước 4, 138mg, 0,14mmol, 1,0 đương lượng), dietylamin (2ml), N,N-dimetylformamit (2ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 25ml. Dung dịch tạo thành được khuấy trong qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không. Sản phẩm thô (110mg) được tinh chế bằng phép HPLC điều chế với các điều kiện sau đây: Cột XSelect CSH Prep C18 OBD, 5um, 19*150mm; pha di động, nước chứa TFA 0,05% và MeCN (MeCN 23% lên tới 30% trong 8 phút, lên tới 100% trong 1 phút, được giữ ở 100% trong 1 phút, giảm xuống 23,0% trong 2 phút); Detector, UV 254/220nm. Thu được 15,7mg (13%) hợp chất nêu ở đề mục này dạng trifloaxetat dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 779,5 $[M+H]^+$.

1H NMR (300MHz, CD_3OD): 0,92- 0,96 (m, 3H), 1,21 – 1,39 (m, 8H), 1,78 – 2,03 (m, 7H), 2,36 (s, 4H), 2,61-2,69 (m, 4H), 2,87-2,93 (m, 5H), 3,13-3,31 (m, 5H), 3,32-3,36 (m, 1H), 3,63-3,77 (s, 6H), 3,78-3,96 (m, 1H), 4,15-4,18 (m, 1H), 4,84-4,86 (m, 1H), 7,13-7,20 (m, 4H).

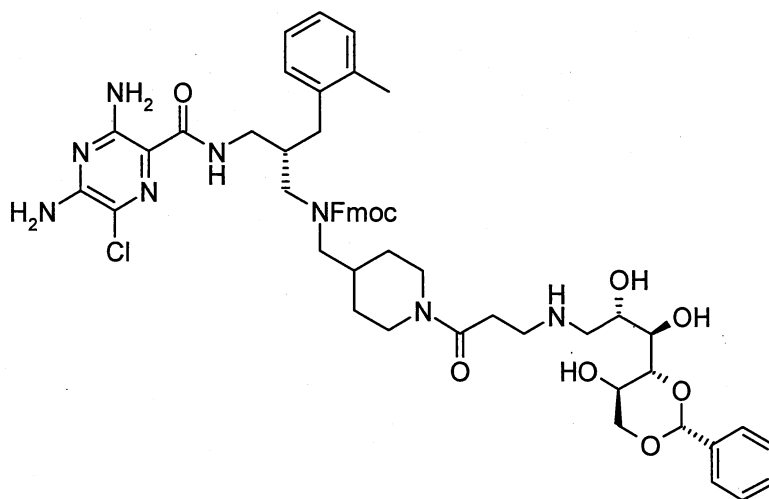
Ví dụ 7

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-2-(2-metylbenzyl)-3-((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexylamino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)propyl)pyrazin-2-carboxamit



Bước 1:

(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl((1-(3-((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propylamino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbamit



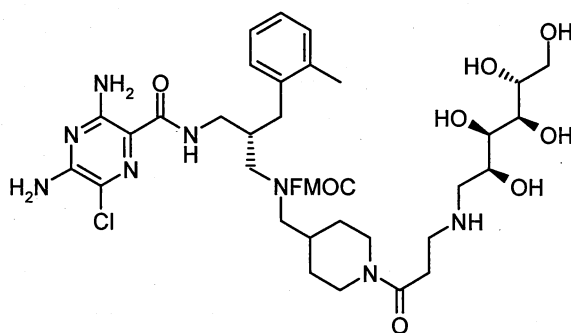
3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-

tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit (Ví dụ 5/Bước 2, 20mg, 0,27mmol, 1,0 đương lượng) và D-glucoza được bảo vệ axetal (2R,4aR,7R,8R,8aS)-2-phenylhexahydropyrano[3,2-d][1,3]dioxin-6,7,8-triol (218mg, 0,81mmol, 3,0 đương lượng) trong metanol (5ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 25ml. Dung dịch tạo thành được khuấy trong 0,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. NaBH₃CN (34mg, 0,54mmol, 2,0 đương lượng), AcOH (30mg, 0,50mmol, 2,0 đương lượng) được thêm vào. Hỗn hợp tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Tồi bằng nước và xử lý bằng cách chiết sau khi loại bỏ dung môi sẽ thu được 220mg hợp chất nêu ở đề mục này dạng thô dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 992 [M+H]⁺.

Bước 2:

(9H-Floren-9-yl)methyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexylamino)propanoyl)piperidin-4-yl)methyl)carbammat

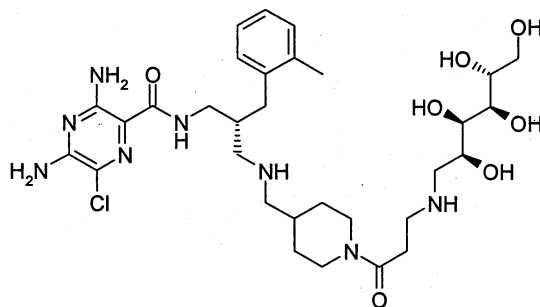


(9H-Floren-9-yl)methyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl((1-(3-((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propylamino)propanoyl)piperidin-4-yl)methyl)carbammat (Bước 1, 200mg, 0,20mmol, 1,0 đương lượng), etanol (1,5ml) và HCl (4M trong etanol, 5ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 25ml. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng và tiếp theo, được cô trong chân không. Thu được 180mg hợp chất nêu ở đề mục này dạng thô dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 904 [M+H]⁺.

Bước 3:

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-2-(2-metylbenzyl)-3-((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexylamino)propanoyl)piperidin-4-yl)metylaminopropyl)pyrazin-2-carboxamit



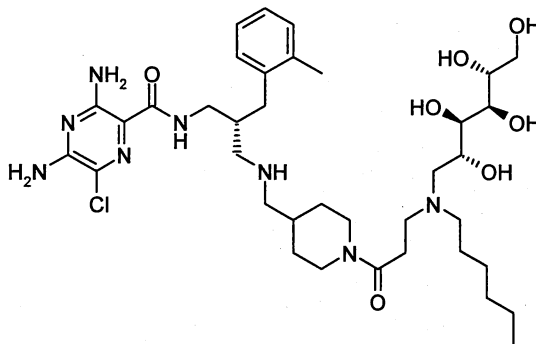
9H-Floren-9-ylmetyl N-[(2S)-3-[(3,5-diamino-6-clo-3,4-dihydropyrazin-2-yl)formamido]-2-[(2-metylphenyl)metyl]propyl]-N-[[1-(3-[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl]amino)propanoyl]piperidin-4-yl]metyl]carbamate (Bước 2, 180mg, 0,20mmol, 1,0 đương lượng), dietylamin (2ml) và N,N-dimetylformamit (4ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 25ml. Dung dịch tạo thành được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được cô trong chân không. Sản phẩm thô (150mg) được tinh chế bằng phép HPLC điều chế bằng cách sử dụng các điều kiện sau đây: Cột XBridge Prep C18 OBD, 5um, 19*150mm; pha di động, nước chứa TFA 0,05% và ACN (ACN 16,0% lên tới 26,0% trong 15 phút); Detector, MS, UV 254/220nm. Quá trình này sẽ thu được 15,5mg (10%) trifloaxetat của hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 681,4 [M+H]⁺

¹H NMR (300MHz, CD₃OD): 1,12- 1,43 (m, 2H), 1,87 – 2,12(m, 3H), 2,14(s, 4H), 2,62-2,75(m, 2H), 2,87-2,93(m, 7H), 3,01-3,19 (m, 3H), 3,31-3,37(m, 1H), 3,77-3,80 (m, 5H), 3,87-3,95(m, 2H), 4,07-4,58(s, 1H), 4,80-4,96(d, 1H), 7,13-7,20(m, 4H).

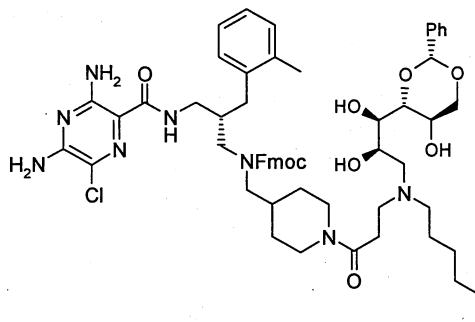
Ví dụ 8

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metylaminopropyl)pyrazin-2-carboxamit



Bước 1:

(9H-Floren-9-yl)methyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)((1-(3-(((2R,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methyl)carbamate



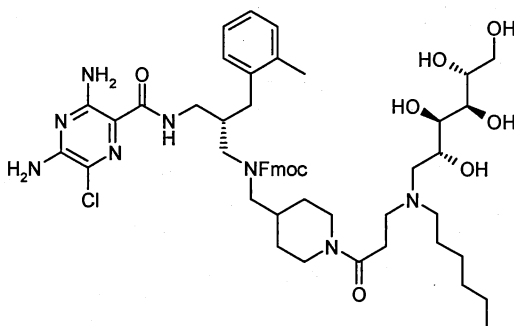
Natri xyanobohydrua (57,0mg, 0,91mmol) được thêm từng phần vào hỗn hợp của hexanal (45,5mg, 0,45mmol) và (9H-floren-9-yl)methyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)((1-(3-(((2R,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)amino)propanoyl)-piperidin-4-yl)methyl)carbamate [được điều chế bằng quy trình tương tự như được mô tả trong Ví dụ 7/Bước 1; bắt đầu từ D-mannitol được bảo vệ axetal (2R,4aR,7S,8R,8aS)-2-phenylhexahydropyrano[3,2-d][1,3]dioxin-6,7,8-triol] (300mg, 0,30mmol) trong MeOH (20ml). Dung dịch tạo thành được khuấy ở 25°C trong 4 giờ. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phép TLC điều chế (DCM: MeOH = 25:1) để thu được (9H-floren-9-yl)methyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)((1-(3-(((2R,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)amino)propanoyl)-piperidin-4-yl)methyl)carbamate (270mg, 83%) dưới dạng gồm màu vàng.

LC/MS: m/z 1076 $[M+H]^+$

1H NMR (300MHz, CD_3OD): δ 0,89 - 1,19 (m, 8H), 1,23 - 1,37 (m, 11H), 1,59 - 1,65 (m, 4H), 2,16 - 2,21 (m, 6H), 2,62 - 3,04 (m, 14H), 3,34 - 3,68 (m, 2H), 3,87 - 3,96 (m, 4H), 4,11 - 4,27 (m, 4H), 4,70 - 4,80 (m, 2H), 5,57 (s, 1H), 7,07 - 7,29 (m, 4H), 7,31 - 7,50 (m, 7H), 7,50 - 7,53 (m, 4H), 7,78 (d, 2H).

Bước 2:

(9H-Floren-9-yl)metyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl((1-(3-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbamát

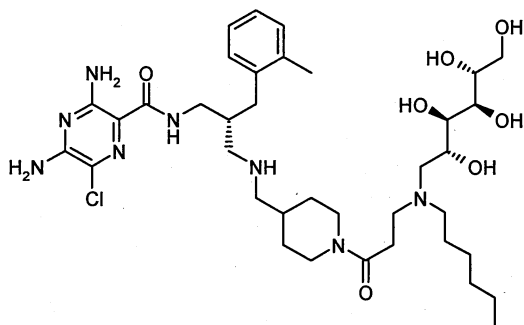


(9H-Floren-9-yl)metyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)((1-(3-(((2R,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbamát (270mg, 0,25mmol) được thêm vào HCl (4M, trong nước, 15ml) trong etanol (5ml). Sau khi khuấy ở 25°C trong 2 giờ hỗn hợp phản ứng được được cô trong điều kiện áp suất giảm và sẽ thu được hợp chất nêu ở đề mục này (200mg, 81%) dưới dạng dầu màu vàng.

LC/MS: m/z 987 $[M+H]^+$.

Bước 3:

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



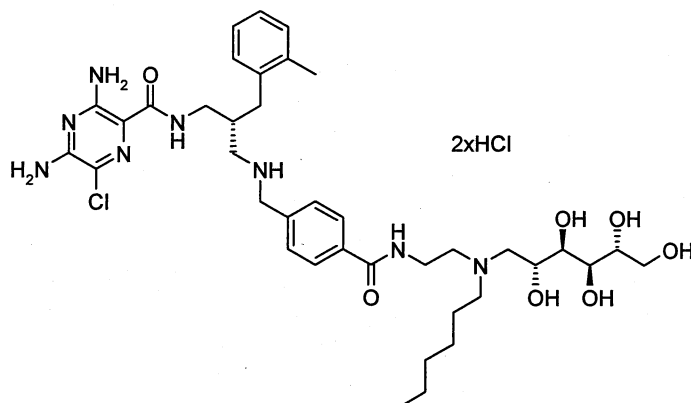
Dietylamin (3ml) được thêm vào (9H-floren-9-yl)metyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)((1-(3-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)carbamát (Bước 2, 200mg, 0,20mmol) trong DMF (6ml). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở 25°C trong 2 giờ. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phép HPLC điều chế, Cột: X Bridge C18, 19*150mm, 5 μ m; Pha di động A: Nước/0,05% TFA, Pha di động B: ACN; Tốc độ chảy: 20ml/phút; Gradient: 30% B đến 70% B trong 10 phút; 254nm, làm dung môi rửa giải. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được 3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-(((1-(3-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit (23,5mg) dưới dạng gồm màu vàng.

LC/MS: m/z 765,4 [M+H]⁺

¹H NMR (300MHz, CD₃OD): δ 0,94 (t, 3H), 1,29 - 1,40 (m, 8H), 1,80 - 2,04 (m, 5H), 2,35 (s, 3H), 2,35 (m, 1H), 2,62 - 2,71 (m, 2H), 2,85 - 2,97 (m, 7H), 3,15 - 3,30 (m, 4H), 3,31 - 3,69 (m, 4H), 3,71 - 3,83 (m, 6H), 4,03 - 4,06 (m, 2H), 4,86 - 4,87(m, 1H), 7,13 - 7,20 (m, 1H).

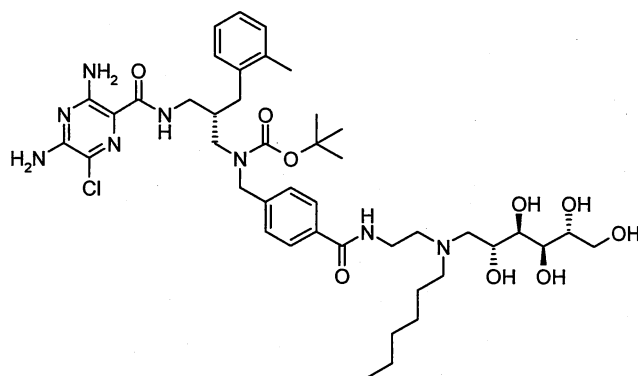
Ví dụ 9

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua



Bước 1

tert-Butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)-propyl)(4-((2-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)carbamát



(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)etyl)carbamoyl)benzyl)carbamát (Chất trung gian E, 500mg, 0,70mmol), (3S,4S,5S,6R)-6-(hydroxymetyl)tetrahydro-2H-pyran-2,3,4,5-tetraol (254mg, 1,41mmol) và DIPEA (0,123ml, 0,70mmol) được hòa tan trong MeOH (10ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Natri xyanobohydrua (133mg, 2,11mmol) và axit axetic (0,040ml, 0,70mmol) được thêm vào và việc khuấy được tiếp tục trong 18 giờ và tiếp theo, ở 50°C trong 30 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, tôi bằng cách thêm dung dịch HCl 3M (trong nước), được khuấy trong 15 phút và tiếp theo được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc (50ml) và NaHCO₃ 8% (trong nước) (50ml), lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (3x50ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân

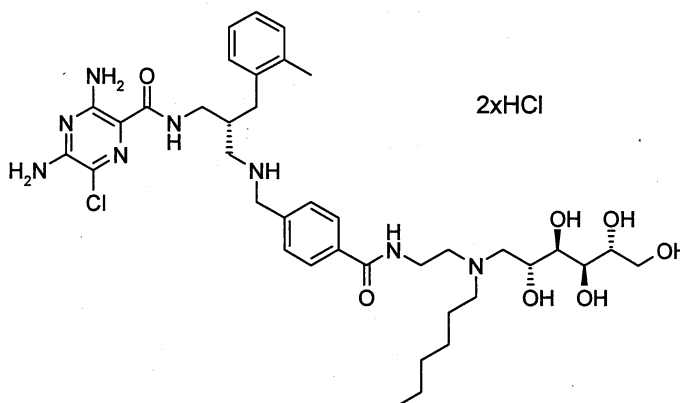
không. Hợp chất được tinh chế bằng phép HPLC điều chế trên cột Kromasil C8 (10 μ m đường kính trong 250x50mm) bằng cách sử dụng gradien dung dịch đậm 20 – 60% axetonitril trong H₂O/MeCN/AcOH với tỷ lệ 95/5/0,2 trong 20 phút với tốc độ chảy là 100ml/phút. Hợp chất được bảo vệ bằng tia UV ở bước sóng 268nm. Hợp chất này được thu gom và được làm khô lạnh để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (195mg, 32%) dưới dạng chất rắn không màu.

LC/MS: m/z 873,6 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,76 - 0,85 (m, 3H), 1,13 - 1,27 (m, 6H), 1,3 - 1,44 (m, 11H), 2,21 (s, 3H), 2,24 - 2,38 (m, 1H), 2,39 - 2,53 (m, 4H), 2,57 - 2,66 (m, 2H), 2,77 (d, 1H), 2,91 - 3,06 (m, 1H), 3,06 - 3,41 (m, 8H), 3,43 - 3,49 (m, 1H), 3,51 (d, 1H), 3,55 - 3,65 (m, 3H), 4,23 - 4,55 (m, 5H), 6,97 (bs, 2H), 7,04 - 7,18 (m, 6H), 7,72 (d, 2H), 7,78 - 7,99 (m, 1H), 8,27 - 8,37 (m, 1H).

Bước 2

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua



Axetyl clorua (1,42ml, 20mmol) được thêm từng giọt vào lọ nhỏ đã được làm lạnh trong thùng nước đá chứa MeOH (5ml, 124mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 5 phút và tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)carbamit (190mg, 0,22mmol) được thêm tiếp vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ và

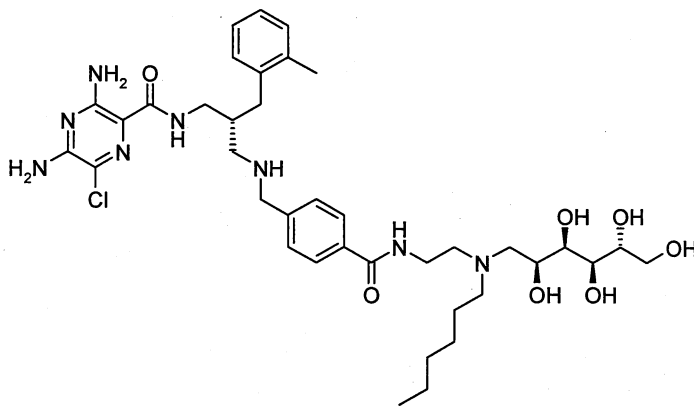
tiếp theo được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong nước và được làm khô lạnh để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (184mg, 100%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

LC/MS: m/z 773,4 $[M+H]^+$

1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 0,81 - 0,89 (m, 3H), 1,2 - 1,33 (m, 6H), 1,62 - 1,77 (m, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,3 - 2,41 (m, 1H), 2,6 - 2,73 (m, 2H), 2,75 - 2,84 (m, 1H), 2,86 - 2,97 (m, 1H), 3,11 - 3,27 (m, 3H), 3,27 - 3,45 (m, 5H), 3,45 - 3,52 (m, 2H), 3,52 - 3,76 (m, 5H), 3,89 - 3,99 (m, 1H), 4,03 - 4,48 (m, 7H), 6,88 - 7,23 (m, 6H), 7,63 (d, 2H), 7,93 (d, 2H), 8,26 (t, 1H), 8,93 - 9,02 (m, 1H), 9,13 - 9,34 (m, 2H), 9,55 (bs, 1H).

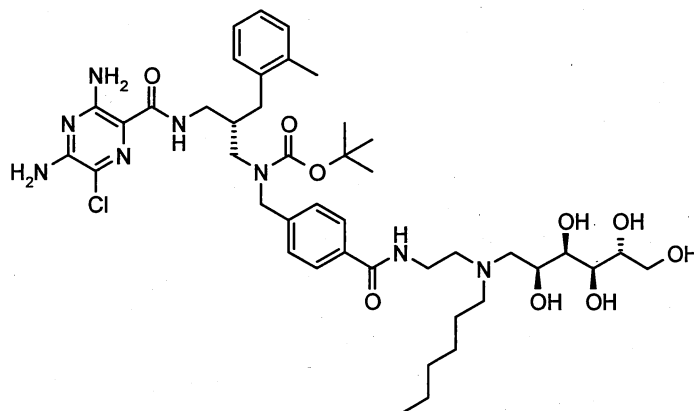
Ví dụ 10

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



Bước 1

tert-Butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)carbamate



(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (Chất trung gian E, 1,25g, 1,76mmol), (3R,4S,5S,6R)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2,3,4,5-tetraol (0,635g, 3,52mmol) và DIPEA (0,308ml, 1,76mmol) được hòa tan trong MeOH (10ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Natri xyanobohydrua (0,332g, 5,29mmol) và axit axetic (0,101ml, 1,76mmol) được thêm vào và việc khuấy được tiếp tục trong 40 giờ ở 50°C. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, tôi bằng cách thêm dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước), được khuấy trong 30 phút và được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc (100ml) và NaHCO₃ 8% (trong nước) (100ml), lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (2x100ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không. Hợp chất được tinh chế bằng phép HPLC điều chế trên cột Kromasil C8 (10μm đường kính trong 250x50mm) bằng cách sử dụng gradien 20 – 60% axetonitril trong dung dịch đệm H₂O/MeCN/AcOH với tỷ lệ 95/5/0,2 trong 20 phút với tốc độ chảy là 100ml/phút. Hợp chất được bảo vệ bảo vệ bằng tia UV ở bước sóng 268nm. Hợp chất này được thu gom và được làm khô lạnh để thu được tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (1,26g, 82%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

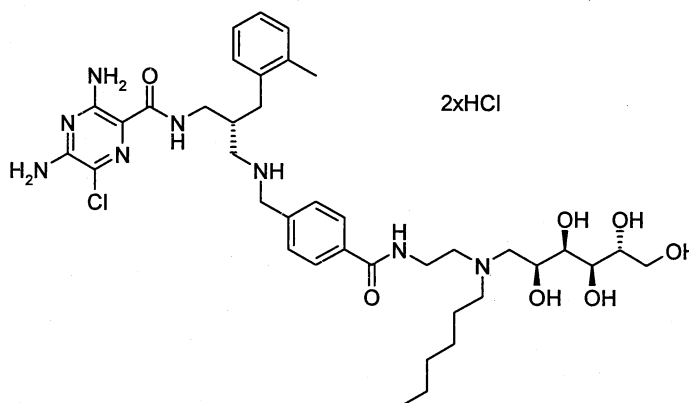
LC/MS: m/z 873,6 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,73 - 0,86 (m, 3H), 1,1 - 1,27 (m, 6H), 1,27 - 1,46 (m, 11H), 2,20 (s, 3H), 2,24 - 2,38 (m, 1H), 2,38 - 2,49 (m, 3H), 2,53 - 2,69

(m, 3H), 2,9 - 3,06 (m, 1H), 3,06 - 3,47 (m, 10H), 3,47 - 3,54 (m, 1H), 3,54 - 3,76 (m, 3H), 4,18 - 4,65 (m, 6H), 6,97 (bs, 2H), 7,03 - 7,19 (m, 6H), 7,72 (d, 2H), 7,78 - 8 (m, 1H), 8,24 - 8,37 (m, 1H).

Bước 2

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua



Axetyl clorua (5,69ml, 80,0mmol) được thêm từng giọt vào bình đã được làm lạnh trong thùng nước đá chứa MeOH (20ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 5 phút và tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)carbamit (1,26g, 1,44mmol) được thêm tiếp vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ và tiếp theo được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong nước và được làm khô lạnh để thu được 3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)-amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua (1,29g, 106%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

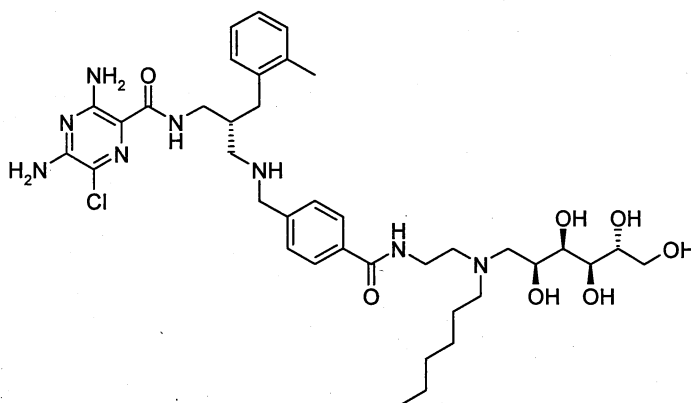
LC/MS: m/z 773,4 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,78 - 0,89 (m, 3H), 1,18 - 1,32 (m, 6H), 1,62 - 1,76 (m, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,33 - 2,44 (m, 1H), 2,67 (d, 2H), 2,73 - 2,84 (m, 1H), 2,84 - 2,96 (m, 1H), 3,1 - 3,44 (m, 9H), 3,44 - 3,54 (m, 2H), 3,55 - 3,62 (m, 1H),

3,62 - 3,75 (m, 3H), 4,02 - 4,12 (m, 1H), 4,12 - 4,3 (m, 2H), 5,58 (bs, 5H), 6,91 - 7,21 (m, 6H), 7,64 (d, 2H), 7,94 (d, 2H), 8,25 (t, 1H), 8,97 - 9,06 (m, 1H), 9,28 (bs, 1H), 9,41 (bs, 1H), 9,70 (d, 1H).

Bước 3

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua (1,23g, 1,45mmol) được hòa tan trong nước (15ml) và được bazơ hóa bằng cách thêm dung dịch Na₂CO₃ 10% (trong nước) đến độ pH ~11. Sản phẩm được chiết bằng EtOAc (6x70ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không để thu được chất bán rắn/dầu. Phần cặn được hòa tan trong axetonitril/nước và được làm khô lạnh để thu được 3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit (1,08g, 96%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

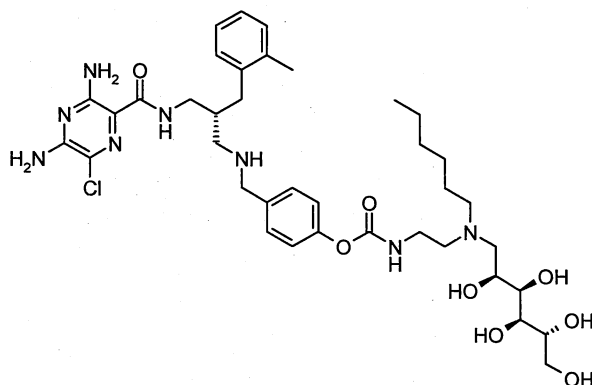
LC/MS: m/z 773,4 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,75 - 0,84 (m, 3H), 1,13 - 1,26 (m, 6H), 1,32 - 1,42 (m, 2H), 1,94 - 2,05 (m, 1H), 2,24 (s, 3H), 2,34 - 2,49 (m, 6H), 2,54 - 2,66 (m, 4H), 3,14 - 3,23 (m, 1H), 3,25 - 3,35 (m, 4H), 3,35 - 3,42 (m, 1H), 3,42 - 3,47 (m, 1H), 3,47 - 3,54 (m, 1H), 3,55 - 3,61 (m, 1H), 3,61 - 3,77 (m, 4H), 4,26 - 4,33 (m, 2H),

4,47 (d, 1H), 4,51 (d, 2H), 6,96 (bs, 2H), 7,04 - 7,14 (m, 4H), 7,40 (d, 2H), 7,74 (d, 2H), 8,26 - 8,37 (m, 2H).

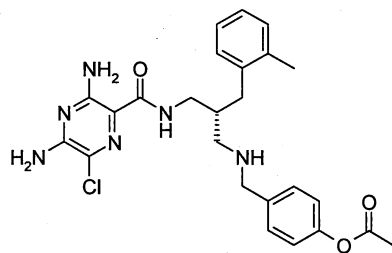
Ví dụ 11

4-(((R)-3-(3,5-Diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propylamino)methyl)phenyl 2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbamate



Bước 1:

(R)-4-((3-(3,5-Diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propylamino)methyl)phenyl axetat



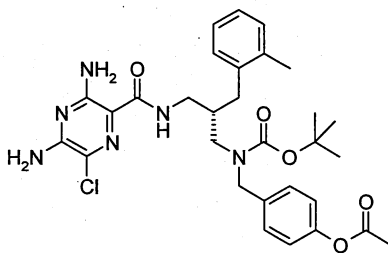
Trong bình hình quả lê dung tích 50ml, (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (Chất trung gian A, 1,6g, 4,59mmol) và 4-formylphenyl axetat (0,753g, 4,59mmol) được thêm vào DCM (30ml) để thu được dung dịch màu vàng. Sau khi khuấy trong 1 giờ, natri triaxetoxihydrat (3,89g, 18,4mmol) được thêm vào và việc khuấy được tiếp tục qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng DCM và được rửa bằng nước và nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và làm bay hơi trong chân không để thu được (R)-4-(((3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)phenyl axetat (1,70g, 75%) thô dưới dạng chất rắn

màu vàng. Sản phẩm được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

LC/MS: m/z 467 $[M+H]^+$.

Bước 2:

(S)-4-((tert-Butoxycarbonyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)phenyl axetat



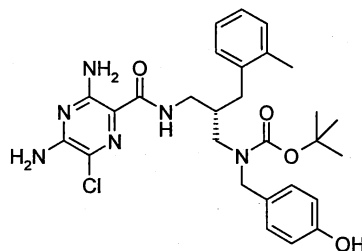
(BOC)₂O (1,07ml, 4,59mmol) được thêm vào hỗn hợp của (R)-4-(((3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)phenyl axetat (1,9g, 3,82mmol) và Na₂CO₃ (0,81g, 7,65mmol) trong dung môi hỗn hợp dioxan (25ml)/nước (8ml) ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng được để đạt tới nhiệt độ trong phòng và được qua đêm. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng EtOAc, và được rửa bằng nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh trên silicagel bằng cách sử dụng gradien từ 10 đến 40% EtOAc trong ete dầu mỏ. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (1,30g, 57%) dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 597 $[M+H]^+$

¹H NMR (300MHz, CD₃OD): δ 1,47 (s, 9H), 2,25 - 2,2,51 (m, 7H), 2,54 - 2,65 (m, 2H), 3,05 - 3,22 (m, 2H), 3,31 - 3,39 (m, 2H), 4,13 - 4,45 (m, 2H), 6,93 - 7,00 (m, 2H), 7,06 - 7,10 (m, 6H).

Bước 3:

(S)-tert-Butyl 3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl(4-hydroxybenzyl)carbamate

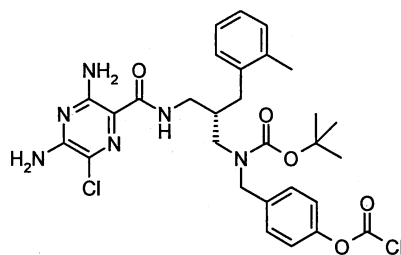


NaOH (0,174g, 4,35mmol) trong nước (8ml) được thêm từng giọt vào dung dịch đã được làm lạnh chứa (S)-4-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)phenyl axetat (1,3g, 2,18mmol) trong MeOH (20ml). Dung dịch phản ứng được khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được axit hóa bằng dung dịch HC 2M trong nước. Hỗn hợp phản ứng này được chiết bằng EtOAc và pha hữu cơ được rửa bằng Nước và nước muối, được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và làm bay hơi để thu được hợp chất nêu ở đề mục này dạng thô (1,20g, 99%) dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 555 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 4:

(S)-4-((tert-Butoxycarbonyl(3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)phenyl cacbonocloridat

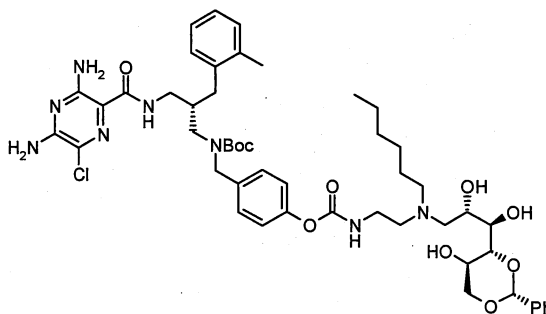


Trong bình đáy tròn dung tích 50ml, (S)-tert-butyl (3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-hydroxybenzyl)carbamate (250mg, 0,45mmol), DIEA (0,354ml, 2,03mmol) được thêm vào THF (10ml) để thu được dung dịch màu vàng. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh bằng thùng nước đá và triphosgen (200mg, 0,68mmol) được thêm vào. Sau khi khuấy trong 1 giờ, hỗn hợp phản ứng này được rót vào nước và chiết bằng EtOAc (3 x 20ml). Lọc hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và làm bay hơi để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (250mg, 90%) dưới dạng dầu màu vàng.

LC/MS: m/z 617 $[M+H]^+$.

Bước 5:

tert-Butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-(((2-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)ethyl)carbamoyl)oxy)benzyl)carbamate

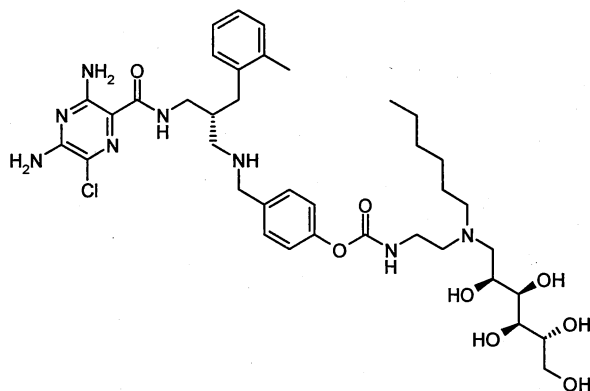


Trong bình đáy tròn dung tích 50ml, (1R,2S)-3-((2-aminoethyl)(hexyl)amino)-1-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propan-1,2-diol (Ví dụ 3/Bước 2, 96mg, 0,24mmol) và DIEA (0,064ml, 0,36mmol) được hòa tan trong THF (10ml) để thu được dung dịch không màu. (S)-4-(((tert-Butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)phenyl cacbonocloridat (Bước 4, 150mg, 0,24mmol) được thêm vào ở 0°C. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được rót vào nước (20ml) và chiết bằng EtOAc (3 x 20ml). Pha hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép TLC điều chế (DCM: MeOH = 10: 1), để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (200mg, 84%) dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 977 $[M+H]^+$.

Bước 6:

4-(((R)-3-(3,5-Diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl-amino)methyl)phenyl 2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)-ethylcarbamate



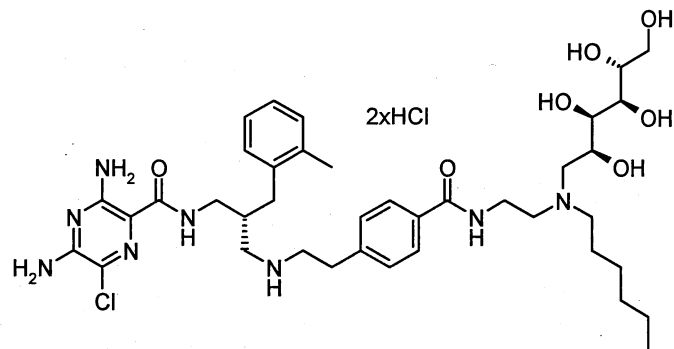
Trong bình đáy tròn dung tích 25ml, tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-(((2-(((2S,3R)-2,3-dihydroxy-3-((2R,4R,5R)-5-hydroxy-2-phenyl-1,3-dioxan-4-yl)propyl)(hexyl)amino)etyl)carbamoyl)oxy)benzyl)carbamate (Bước 5, 200mg, 0,20mmol) được thêm vào EtOH (1ml) để thu được dung dịch màu vàng. Dung dịch HCl trong nước (4M, 3ml) được thêm vào và dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phép HPLC điều chế (Cột Waters XBridge Prep C18 OBD, 5 μ silic oxit, đường kính đường kính trong 50mm, độ dài 150mm), bằng cách sử dụng gradien có độ phân cực của nước giảm dần (TFA 0,05%) và MeCN làm dung môi rửa giải. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (28,0mg, 13%) dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 789,4 [M+H]⁺

¹H NMR (300MHz, CD₃OD): δ 0,79 - 0,99 (m, 3H), 1,25 - 1,55 (m, 6H), 1,69 - 1,91 (m, 2H), 2,25 - 2,45 (m, 4H), 2,51 - 2,84 (m, 1H), 2,81 - 3,01 (m, 3H), 3,28 - 3,31 (m, 4H), 3,34 - 3,82 (m, 12H), 3,86 - 3,92 (m, 1H), 4,09 - 4,37 (m, 3H), 7,03 - 7,35 (m, 6H), 7,453 (d, 2H).

Ví dụ 12

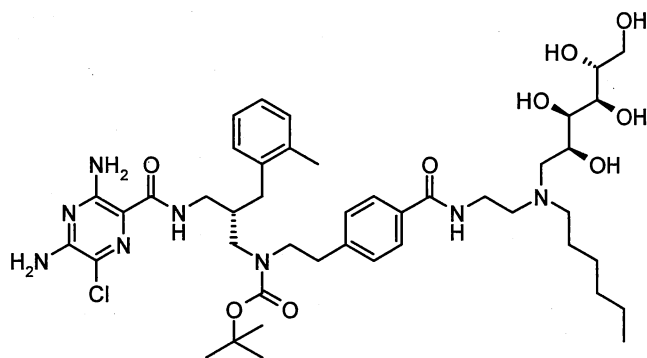
3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua



Bước 1

EN06927-61

tert-Butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)carbamate



(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)carbamate (Chất trung gian D, 500mg, 0,69mmol), (3R,4S,5S,6R)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2,3,4,5-tetraol (249mg, 1,38mmol) và DIPEA (0,121ml, 0,69mmol) được hòa tan trong MeOH (5ml) và được khuấy ở 50°C trong 40 phút trước khi thêm natri xyanobohydrua (130mg, 2,07mmol) và axit axetic (0,044ml, 0,76mmol). Việc khuấy được tiếp tục ở 50°C trong 21 giờ và tiếp đó hỗn hợp phản ứng được để nguội đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách thêm dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước). Hỗn hợp phản ứng được pha loãng trong EtOAc (50ml) và dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) (50ml), lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (4x50ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không. Hợp chất được tinh chế bằng phép HPLC điều chế trên

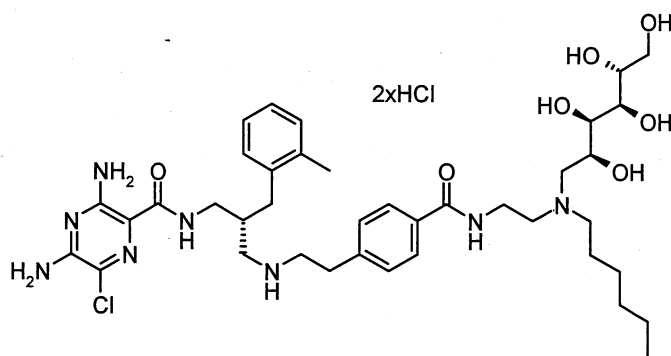
cột Kromasil C8 (10 μ m, đường kính trong 250x50mm) bằng cách sử dụng gradien t20 – 60% axetonitril trong dung dịch đệm H₂O/MeCN/AcOH với tỷ lệ 95/5/0,2 trong 20 phút với tốc độ chảy là 100ml/phút. Hợp chất được bảo vệ bằng tia UV ở 265nm. Hợp chất này được thu gom và được làm khô lạnh để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (385mg, 63%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

LC/MS: m/z 887,6 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,80 (t, 3H), 1,12 - 1,26 (m, 6H), 1,29 - 1,43 (m, 11H), 2,16 - 2,29 (m, 4H), 2,41 - 2,48 (m, 2H), 2,56 - 2,67 (m, 2H), 2,71 (t, 2H), 2,96 (dd, 1H), 3,02 - 3,42 (m, 12H), 3,44 (dd, 1H), 3,47 - 3,54 (m, 1H), 3,55 - 3,74 (m, 3H), 4,18 - 4,79 (m, 4H), 6,96 (bs, 2H), 7,06 - 7,19 (m, 6H), 7,72 (d, 2H), 7,8 - 7,97 (m, 1H), 8,24 - 8,34 (m, 1H).

Bước 2

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua



Axetyl clorua (1,42ml, 20mmol) được thêm từng giọt vào dung dịch đã được làm lạnh trong thùng nước đá chứa MeOH (5ml, 124mmol). Dung dịch phản ứng này được khuấy trong 5 phút và tiếp đó được thêm vào tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl)carbamate (Bước 1, 385mg, 0,43mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2,5 giờ và tiếp theo được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong nước và được làm khô lạnh để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (369mg, 99%) dưới dạng chất

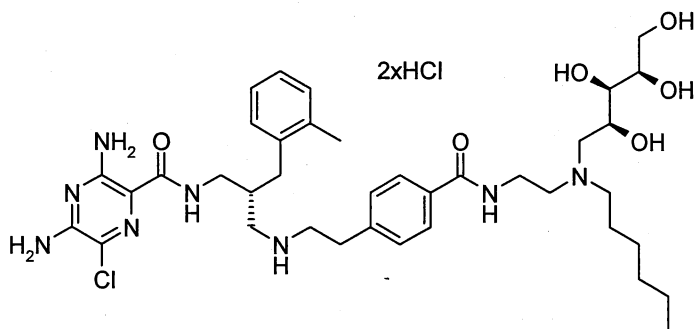
rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 787,4 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,78 - 0,88 (m, 3H), 1,17 - 1,31 (m, 6H), 1,6 - 1,74 (m, 2H), 2,23 - 2,39 (m, 4H), 2,64 - 2,75 (m, 2H), 2,75 - 2,87 (m, 1H), 2,87 - 2,99 (m, 1H), 3,05 (t, 2H), 3,09 - 3,44 (m, 11H), 3,44 - 3,54 (m, 2H), 3,55 - 3,75 (m, 4H), 4 - 4,1 (m, 1H), 4,69 (bs, 7H), 6,88 - 7,2 (m, 5H), 7,23 - 7,3 (m, 1H), 7,36 (d, 2H), 7,88 (d, 2H), 8,24 (t, 1H), 8,85 - 9,16 (m, 3H), 9,63 (d, 1H).

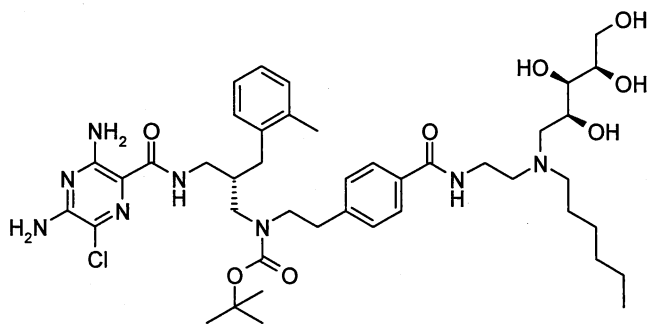
Ví dụ 13

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua



Bước 1:

Tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl)carbamate



(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)etyl)carbamoyl)phenetyl)carbamate (Chất

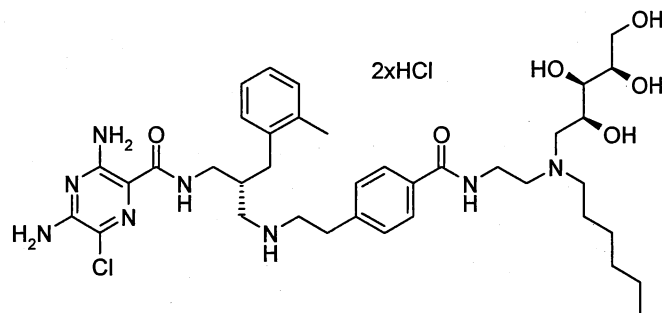
trung gian D, 500mg, 0,69mmol), (2R,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentanal (208mg, 1,38mmol) và DIPEA (0,121ml, 0,69mmol) được hòa tan trong MeOH (5ml) và được khuấy ở 50°C trong 40 phút trước khi thêm natri xyanobohydrua (130mg, 2,07mmol) và axit axetic (0,044ml, 0,76mmol). Việc khuấy được tiếp tục ở 50°C trong 21 giờ và tiếp theo được để nguội đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách thêm dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước). Hỗn hợp phản ứng được pha loãng trong EtOAc (50ml) và dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) (50ml), lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (4x50ml). Pha hữu cơ thu gom được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không. Hợp chất được tinh chế bằng phép HPLC điều chế trên cột Kromasil C8 (10µm đường kính trong 250x50mm) bằng cách sử dụng gradien 20 – 60% axetonitril trong dung dịch đệm H₂O/MeCN/AcOH với tỷ lệ 95/5/0,2 trong 20 phút với tốc độ chảy là 100ml/phút. Hợp chất được bảo vệ bằng tia UV ở 265nm. Hợp chất này được thu gom và được làm khô lạnh để thu được tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)carbamate (374mg, 63%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

LC/MS: m/z 857,6 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,74 - 0,85 (m, 3H), 1,11 - 1,28 (m, 6H), 1,28 - 1,44 (m, 11H), 2,14 - 2,29 (m, 4H), 2,46 (dd, 2H), 2,55 - 2,65 (m, 2H), 2,71 (t, 2H), 2,96 (dd, 1H), 3,02 - 3,51 (m, 14H), 3,52 - 3,6 (m, 1H), 3,6 - 3,71 (m, 1H), 4,17 - 4,77 (m, 3H), 6,96 (bs, 2H), 7,05 - 7,2 (m, 6H), 7,72 (d, 2H), 7,8 - 7,97 (m, 1H), 8,23 - 8,34 (m, 1H).

Bước 2:

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua



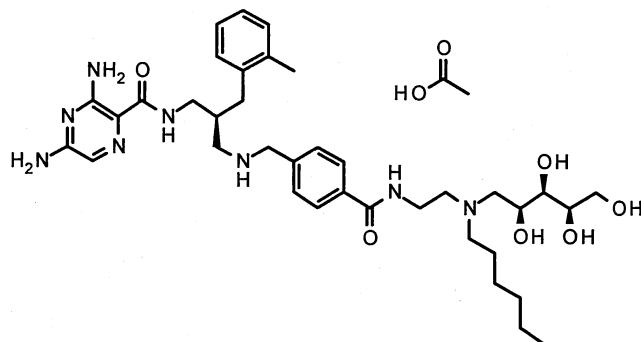
Axetyl clorua (1,42ml, 20,0mmol) được thêm từng giọt vào dung dịch đã được làm lạnh trong thùng nước đá chứa MeOH (5ml, 123,59mmol). Dung dịch phản ứng này được khuấy trong 5 phút và tiếp đó được thêm vào tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl)carbamate (374mg, 0,44mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2,5 giờ và tiếp theo được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong nước và được làm khô lạnh để thu được 3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit dihydroclorua (361mg, 100%) dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z 757,4 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 1 - 1,09 (m, 3H), 1,39 - 1,53 (m, 6H), 1,84 - 1,95 (m, 2H), 2,50 (s, 3H), 2,53 - 2,62 (m, 1H), 2,86 - 2,97 (m, 2H), 2,97 - 3,07 (m, 1H), 3,09 - 3,2 (m, 1H), 3,22 - 3,73 (m, 15H), 3,77 - 3,96 (m, 3H), 4,23 - 4,32 (m, 1H), 4,84 (bs, 6H), 7,15 - 7,42 (m, 5H), 7,45 - 7,52 (m, 1H), 7,58 (d, 2H), 8,11 (d, 2H), 8,46 (t, 1H), 9,13 - 9,2 (m, 1H), 9,30 (d, 2H), 9,92 (d, 1H).

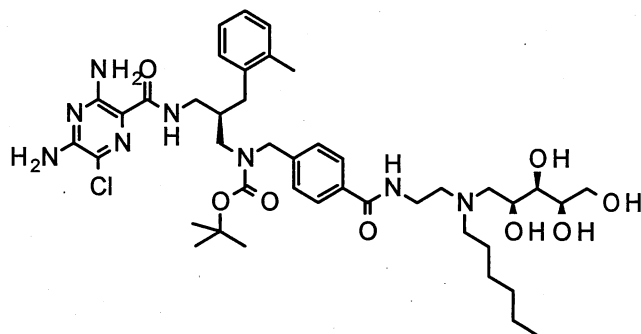
Ví dụ 14

Axit 3,5-diamino-6-clo-N-((S)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit axetic



Bước 1

tert-Butyl ((R)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate



(R)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (Chất trung gian H) (163mg, 0,23mmol), (2R,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentanal (69,0mg, 0,46mmol) và DIPEA (0,040ml, 0,23mmol) được hòa tan trong MeOH (4ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Natri xyanobohydrua (14,44mg, 0,23mmol) và axit axetic (0,039ml, 0,69mmol) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến 50°C trong 20 giờ và tiếp theo được để nguội đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách thêm dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) và được khuấy trong 30 phút. Dung môi được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc (25ml) và dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) (25ml), lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (2x25ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không. Hợp chất được tinh chế bằng phép HPLC điều chế trên cột Kromasil C8 (10µm, đường kính

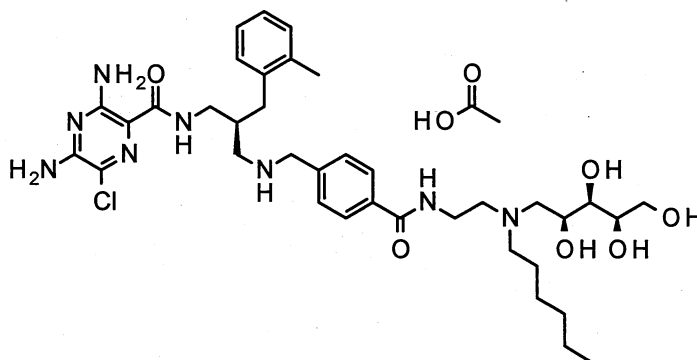
trong 250x20mm) bằng cách sử dụng gradien 30 - 70% axetonitril trong dung dịch đệm H₂O/ACN/AcOH với tỷ lệ 95/5/0,2, trong 20 phút với tốc độ chảy là 19ml/phút. Hợp chất được bảo vệ bằng tia UV ở 265nm. Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom lại và được làm khô lạnh để thu được tert-butyl ((R)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (127mg, 65,5%) dưới dạng chất rắn.

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,75 – 0,84 (m, 3H), 1,13 – 1,26 (m, 6H), 1,29 – 1,42 (m, 11H), 2,20 (s, 3H), 2,25 – 2,35 (m, 1H), 2,41 – 2,47 (m, 2H), 2,56 – 2,62 (m, 2H), 2,89 – 3,05 (m, 1H), 3,07 – 3,15 (m, 1H), 3,2 – 3,49 (m, 13H), 3,52 – 3,59 (m, 1H), 3,61 – 3,69 (m, 1H), 4,21 – 4,35 (m, 2H), 4,35 – 4,55 (m, 3H), 6,96 (bs, 1H), 7,04 – 7,19 (m, 6H), 7,71 (d, 2H), 7,77 – 7,98 (m, 1H), 8,24 – 8,32 (m, 1H).

MS ES⁺: m/z 843,4 [M+H]⁺.

Bước 2

Axit 3,5-diamino-6-clo-N-((S)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit axetic



Axetyl clorua (0,711ml, 10mmol) được thêm từng giọt vào lọ nhỏ đã được làm lạnh trong thùng nước đá chứa MeOH (2,5ml, 61,79mmol) và được khuấy trong 5 phút trước khi thêm tert-butyl ((R)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (127mg, 0,15mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ và tiếp theo được cô

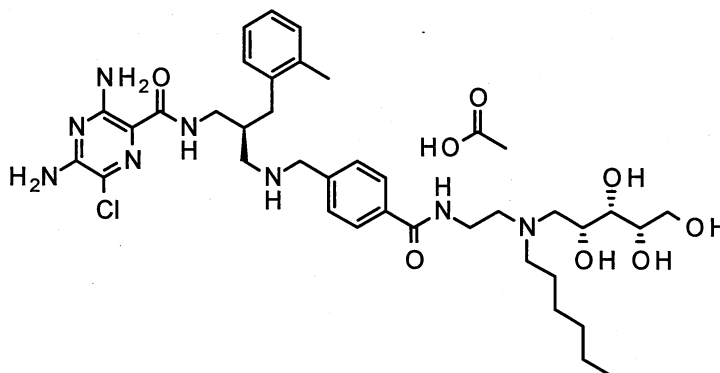
trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc (25ml) và dung dịch Na₂CO₃ 5% (trong nước) (25ml), lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (5x25ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không. Hợp chất được tinh chế bằng phép HPLC điều chế trên cột Kromasil C8 (10µm, đường kính trong 250x20mm) bằng cách sử dụng gradien 5 – 45% axetonitril trong Dung dịch đệm H₂O/ACN/AcOH với tỷ lệ 95/5/0,2, trong 20 phút với tốc độ chảy là 19ml/phút. Hợp chất được bảo vệ bằng tia UV ở bước sóng 268nm. Sản phẩm được làm khô lạnh để thu được 3,5-diamino-6-clo-N-((S)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit (100mg, 82%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,77 – 0,83 (m, 3H), 1,13 – 1,25 (m, 6H), 1,32 – 1,41 (m, 2H), 1,90 (s, 4H), 1,96 – 2,05 (m, 1H), 2,24 (s, 3H), 2,35 – 2,55 (m, 6H), 2,55 – 2,63 (m, 4H), 3,14 – 3,23 (m, 2H), 3,24 – 3,4 (m, 9H), 3,4 – 3,49 (m, 4H), 3,56 (q, 1H), 3,62 – 3,71 (m, 2H), 3,74 (d, 1H), 6,96 (bs, 2H), 7,04 – 7,14 (m, 4H), 7,40 (d, 2H), 7,74 (d, 2H), 8,28 (t, 1H), 8,33 (t, 1H).

MS ES⁺: m/z 743,5 [M+H]⁺.

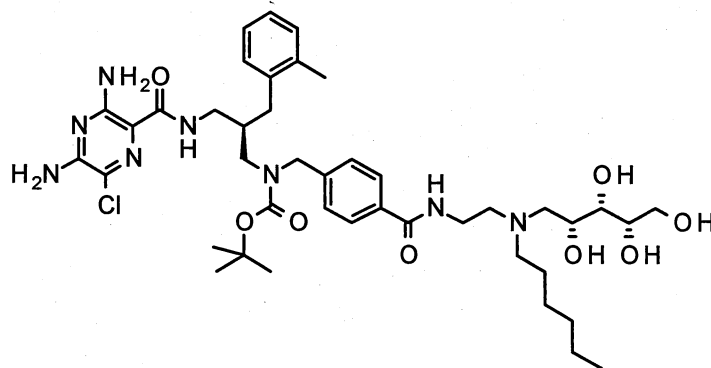
Ví dụ 15

Axit 3,5-diamino-6-clo-N-((S)-3-((4-((2-(hexyl((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit axetic



Bước 1

tert-Butyl ((R)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)carbamate



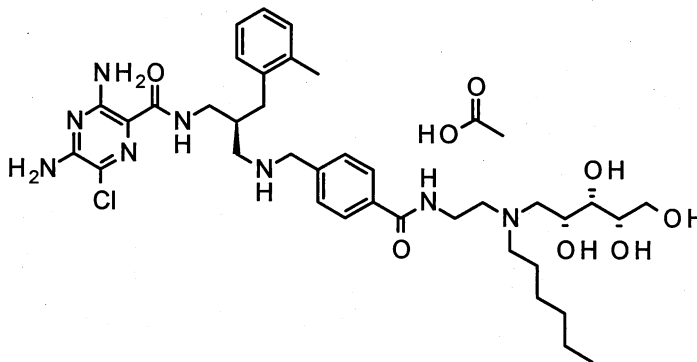
(R)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)etyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (Chất trung gian G) (163mg, 0,23mmol), (2S,3R,4S)-2,3,4,5-tetrahydroxypentanal (69,0mg, 0,46mmol) và DIPEA (40,1μl, 0,23mmol) được hòa tan trong MeOH và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Natri xyanobohydrua (14,44mg, 0,23mmol) và axit axetic (39,5μl, 0,69mmol) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến 50°C trong 20 giờ và tiếp theo được để nguội đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách thêm dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) và được khuấy trong 30 phút. Dung môi được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc (25ml) và dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) (25ml), lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (5x25ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không. Hợp chất được tinh chế bằng phép HPLC điều chế trên cột Kromasil C8 (10μm, đường kính trong 250x20mm) bằng cách sử dụng gradien 30 – 70% axetonitril trong dung dịch đệm H₂O/ACN/AcOH với tỷ lệ 95/5/0,2, trong 20 phút với tốc độ chảy là 19ml/phút. Hợp chất được bảo vệ bảo vệ bằng tia UV ở 265nm. Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom lại và được làm khô lạnh để thu được tert-butyl ((R)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (135mg, 69,7%) dưới dạng chất rắn.

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 0,79 (d, 3H), 1,16 (d, 6H), 1,36 (s, 11H), 2,20 (s, 3H), 2,31 (s, 1H), 2,50 (dt, 5H), 2,58 (s, 3H), 2,92 – 3,05 (m, 1H), 3,06 – 3,15 (m, 1H), 3,31 (s, 6H), 3,39 – 3,5 (m, 2H), 3,53 – 3,59 (m, 1H), 3,61 – 3,69 (m, 1H), 4,22 – 4,34 (m, 2H), 4,34 – 4,55 (m, 3H), 6,97 (bs, 2H), 7,04 – 7,18 (m, 6H), 7,71 (d, 2H), 7,78 – 7,97 (m, 1H), 8,25 – 8,32 (m, 1H).

MS ES^+ : m/z 843,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 2

Axit 3,5-diamino-6-clo-N-((S)-3-((4-((2-(hexyl((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit axetic



Axetyl clorua (0,711ml, 10mmol) được thêm từng giọt vào lọ nhỏ đã được làm lạnh trong thùng nước đá chứa MeOH (2,5ml, 61,79mmol) và được khuấy trong 5 phút trước khi thêm tert-butyl ((R)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexyl((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)-carbamoyl)benzyl)carbamate (135mg, 0,16mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và tiếp theo được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc (25ml) và dung dịch Na_2CO_3 5% (trong nước) (25ml), lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (5x25ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc và làm bay hơi trong chân không. Hợp chất được tinh chế bằng phép HPLC điều chế trên cột Kromasil C8 (10 μm , đường kính trong 250x20mm) bằng cách sử dụng gradien 5 – 45% axetonitril trong dung dịch đệm $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{AcOH}$ với tỷ lệ 95/5/0,2 trong 20 phút với tốc độ chảy là 19ml/phút. Hợp chất được bảo vệ bảo vệ bằng tia UV ở bước sóng 268nm. Sản

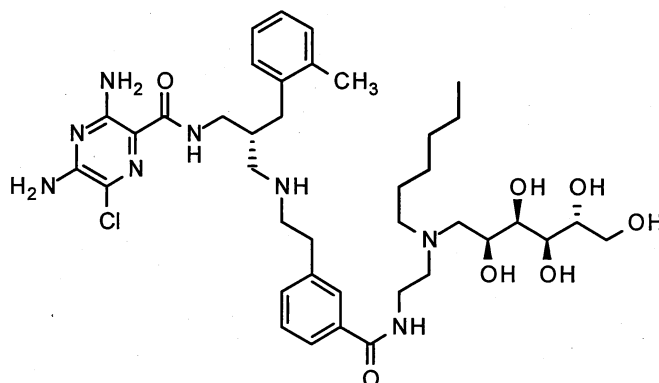
phẩm được làm khô lạnh để thu được 3,5-diamino-6-clo-N-((S)-3-((4-((2-(hexyl((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit (93mg, 70,2%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 0,76 – 0,83 (m, 3H), 1,14 – 1,25 (m, 6H), 1,31 – 1,42 (m, 2H), 1,91 (s, 3H), 1,95 – 2,06 (m, 1H), 2,24 (s, 3H), 2,35 – 2,54 (m, 6H), 2,60 (dd, 4H), 3,14 – 3,5 (m, 11H), 3,56 (q, 1H), 3,66 (dd, 2H), 3,74 (d, 1H), 6,96 (s, 2H), 7,04 – 7,14 (m, 4H), 7,40 (d, 2H), 7,74 (d, 2H), 8,28 (t, 1H), 8,33 (t, 1H).

MS ES^+ : m/z 743,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

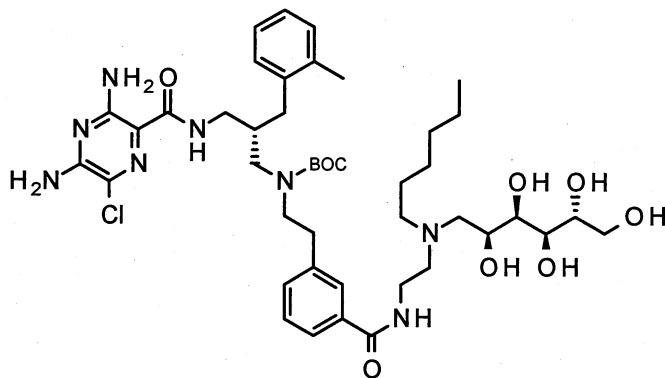
Ví dụ 16

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-(3-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



Bước 1

tert-Butyl (S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl(3-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)carbamate

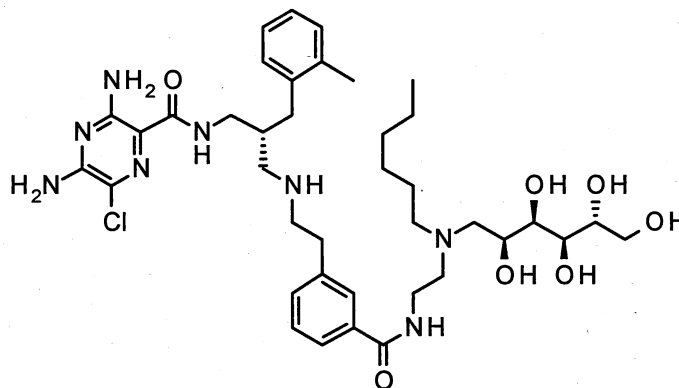


Trong bình đáy tròn dung tích 50ml, (S)-tert-butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(3-((2-(hexylamino)etyl)-carbamoyl)phenetyl)carbamát (Chất trung gian D, 370mg, 0,51mmol) và (3R,4S,5S,6R)-6-(hydroxymetyl)tetrahydro-2H-pyran-2,3,4,5-tetraol (138mg, 0,77mmol) trong MeOH (15ml) được cho vào bình này để thu được dung dịch màu vàng. Sau khi khuấy hỗn hợp trên đây trong 30 phút, NaCNBH₃ (32,1mg, 0,51mmol) được thêm vào. Dung dịch tạo thành được khuấy ở 50°C trong 16 giờ. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để thu được sản phẩm thô tert-butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(3-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl)carbamát (500mg, 110%) dưới dạng chất rắn màu vàng. Sản phẩm được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

LC/MS: m/z 887 [M+H]⁺.

Bước 2

3,5-Diamino-6-clo-N-((R)-3-(3-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit



tert-Butyl ((S)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(3-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)carbamate (500mg, 0,56mmol) trong HCl/MeOH (20ml, 0,56mmol) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml, để thu được dung dịch màu vàng. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phép HPLC điều chế (cột Waters XBridge Prep C18 OBD, 5 μ silic oxit, đường kính trong 50mm, chiều dài 150mm), bằng cách sử dụng hỗn hợp có độ phân cực giảm dần của nước (chứa NH₄HCO₃ 0,1%) và MeCN làm dung môi rửa giải. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được 3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((3-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit (87mg, 20%) dưới dạng chất rắn màu vàng.

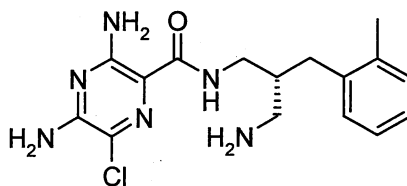
LC/MS: m/z 788 [M+H]⁺

¹H NMR (300MHz, CD₃OD, 25 °C): δ 0,85 - 0,91 (m, 3H), 1,15 - 1,35 (m, 6H), 1,39 - 1,59 (m, 2H), 2,12 - 2,25 (m, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,57 - 2,89 (m, 13H), 3,29 - 3,33 (m, 2H), 3,38 - 3,64 (m, 3H), 3,66 - 3,84 (m, 6H), 7,09 - 7,16 (m, 4H), 7,38 (d, 2H), 7,70 - 7,73 (m, 2H).

Tổng hợp các chất trung gian

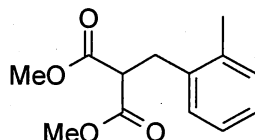
Chất trung gian A

(R)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit



Bước 1:

Dimethyl 2-(2-methylbenzyl)malonat



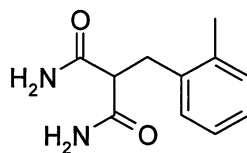
Bình phản ứng được nạp dimethyl malonat (6,00kg, 45,4mol) và metanol (21,3 lít). 25% NaOMe/MeOH (10,37 lít, 45,2mol) được thêm vào trong 10 phút và tiếp theo, 2-metyl benzylclorua (4,26kg, 30,3mol) được thêm vào trong 1,5 giờ, duy trì nhiệt độ phản ứng thấp hơn 30°C. Dung dịch NH₄Cl bão hòa (53,1 lít) được thêm vào hỗn hợp phản ứng, dẫn đến độ pH=8,5. Sản phẩm được chiết bằng isopropyl axetat (3 x 25 lít) và các lớp hữu cơ thu gom được rửa bằng 10% nước muối (10 lít) và được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu (8,63kg, 68% trọng lượng, 83%). Hợp chất nêu ở đề mục vừa thu được này chứa malonat đã được alkyl hóa 2 lần. Độ tinh khiết theo HPLC: 86%.

LC/MS: m/z 237 [M+H]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 270MHz) δ 7,17-7,05 (4H, m), 3,60 (6h, s), 3,82 (1H, t), 3,12 (2H, s), 2,21 (3H, s); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 270MHz) δ 169,5, 136,6, 136,3, 130,8, 129,5, 127,3, 126,4, 52,8, 52,0, 31,8, 19,4.

Bước 2

2-(2-Metylbenzyl)malonamit



Bình phản ứng được nạp dimethyl-2-(2-metylbenzyl)malonat (Bước 1, 5,9kg, 68% trọng lượng, 17,0mol) và metanol (14,8 lít). Amoni hydroxit 34% (24 lít, 36

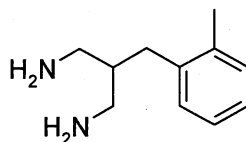
đương lượng) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C cho đến khi được coi là hoàn toàn theo phép phân tích HPLC. Chất rắn được lọc ra và tiếp theo, MTBE (15,3 lít) được thêm vào. Sau 30 phút, chất rắn được lọc ra, được rửa bằng MTBE (2 x 15,3 lít) và được làm khô trong điều kiện áp suất giảm ở 60°C để thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (3,2kg, 91%).

LC/MS: m/z 206,9 [M+H]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 270MHz) δ 7,32-7,21 (2H, br s), 7,15-7,00 (6H, m), 3,33 (1H, t), 2,96 (2H, d), 2,28 (3H, s); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 270MHz) δ 171,0, 137,5, 136,0, 129,9, 128,9, 126,1, 125,6, 53,2, 32,5, 19,1.

Bước 3

2-(2-Metylbenzyl)propan-1,3-diamin



Bình phản ứng được nạp 2-(2-metylbenzyl)malonamit (1,32kg, 6,40mol) và THF (5,4 lít). Hỗn hợp phản ứng dính nhớt được làm lạnh đến 0°C và boran 1M -THF (25,6 lít, 25,6mol) được thêm vào trong 2 giờ, duy trì nhiệt độ phản ứng thấp hơn 2°C. Hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến 15°C và tiếp theo, được khuấy ở 50°C qua đêm. Khi phép phân tích HPLC cho thấy nhỏ hơn 8% chất ban đầu còn lại, hỗn hợp phản ứng này được tôi trong KOH 4M (8 lít), duy trì nhiệt độ thấp hơn 30°C. Lớp hữu cơ được cô trong điều kiện áp suất giảm và lớp nước được chiết hai lần bằng MTBE (2 x 10 lít). Dịch chiết MTBE thu gom được được thêm vào lớp hữu cơ đã cô và các lớp hữu cơ thu gom được tiếp đó được nạp vào dung dịch chứa HCl 6M (10 lít), duy trì nhiệt độ thấp hơn 30°C. Pha nước được rửa bằng MTBE (10 lít) và tiếp theo, được bazơ hóa bằng dung dịch KOH 6M (12 lít). Pha nước được chiết hai lần bằng THF (10 lít và tiếp đó là 5 lít) và pha hữu cơ thu gom được được cô trong điều kiện áp suất giảm. Toluene (5 lít) được thêm vào và tiếp theo được cất đẳng phí để loại bỏ nước còn lại bất kỳ. Hỗn hợp phản ứng được nghiền bằng toluene (5 lít) và chất rắn được lọc ra và được rửa bằng toluene (3 lít). Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm sẽ thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng amin tự do (1,13kg, hiệu suất 70%). Độ

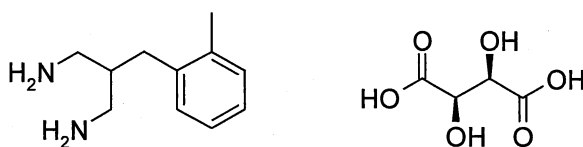
tinh khiết theo HPLC: 91%.

LC/MS: m/z 179,0 $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 270MHz) δ 7,12-7,00 (4H, m), 2,72-2,59 (4H, m), 2,52 (2H, d), 2,27 (3H, s), 1,64 (1H, m), 1,48-1,25 (4H, br s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 270MHz) δ 139,0, 136,3, 130,5, 129,9, 126,2, 125,9, 44,7, 43,8, 34,3, 19,6.

Bước 4

2-(2-Metylbenzyl)propan-1,3-diamin L-tartrat



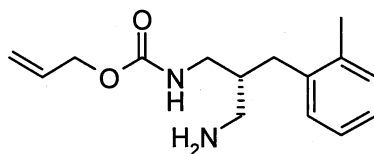
Etanol (4 lít) được thêm vào diamin thô (từ Bước 3) (1,62kg, 9,1mol). Dung dịch chứa axit L-tartaric (1,62kg, 10,8mol) được hòa tan trong etanol (11 lít) được thêm vào, giữ nhiệt độ thấp hơn 40°C . Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 3 ngày và tiếp theo, chất rắn được lọc ra, được rửa bằng etanol (2 x 2 lít) và được làm khô trong điều kiện áp suất giảm ở 50°C để thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng muối mono-L-tartrat của nó (3,21kg, hiệu suất định lượng). Độ tinh khiết theo HPLC: 92,2%.

LC/MS: m/z 179,0 $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 270MHz) δ 7,30-7,15 (4H, m), 4,27 (2H, s), 3,20-3,07 (2H, dd), 3,04-2,94 (2H, dd), 2,79 (2H, d), 2,41 (1H, m), 2,27 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 270MHz) δ 178,4, 137,2, 135,7, 131,0, 130,0, 127,6, 126,7, 73,9, 40,5, 35,9, 32,8, 18,7.

Bước 5

(R)-Alyl (3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbammat (1-(R))



Bình phản ứng được nạp muối 2-(2-metylbenzyl)propan-1,3-diamin L-tartrat

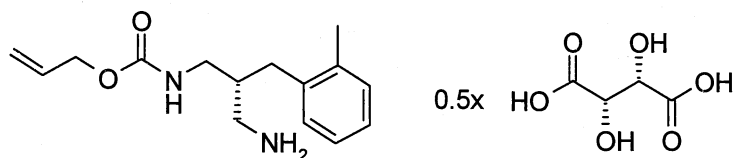
(3,57kg, 10,9mol) và nước (17 lít). Dung dịch NaOH 10M (17 lít, 170mol) được thêm vào, duy trì nhiệt độ phản ứng thấp hơn 25°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút ở 25°C trong 3 ngày và tiếp theo, 2-MeTHF (14 lít) được thêm vào. Các lớp được tách riêng và pha nước được chiết bằng 2-MeTHF (14 lít). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô (natri sulfat), lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm sẽ thu được diamin tự do. Bình phản ứng được nạp diamin tự do, 2-MeTHF (37,4 lít) và dialyl cacbonat (1,80kg, 12,6mol). Lipaza Amano PS IM không di động (5,61kg, 3 phần đương lượng khối lượng) được thêm vào từng phần trong 30 phút và nhiệt độ phản ứng được thiết lập ở 30°C. Sau 4 ngày, ¹H NMR cho thấy nhỏ hơn 5% chất ban đầu còn lại và hỗn hợp phản ứng này được lọc trong qua Celite và được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (2,68kg, 82% ee, hiệu suất 100%). Độ tinh khiết theo HPLC: 84,7%.

LC/MS: m/z 263,1 [M+H]⁺

¹H-NMR (CDCl₃, 270MHz) δ 7,15-7,05 (4H, m), 5,99-5,81 (1H, m), 5,80-5,60 (1H, br s), 5,35-5,15 (2H, m), 4,54 (2H, d), 3,40-3,14 (2H, m), 2,85-2,52 (4H, m), 2,29 (3H, s), 1,90-1,77 (1H, m), 1,50-1,10 (2H, br s); ¹³C-NMR (CDCl₃, 270MHz) δ 156,6, 138,1, 136,1, 133,0, 130,5, 129,7, 126,3, 125,9, 117,5, 65,4, 44,0, 43,4, 41,6, 34,2, 19,5.

Bước 6

Muối (R)-allyl (3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbamate (1-(R)) D-tartrate



(R)-Alyl (3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbamate thô (2,68kg, 10,2mol) được thêm vào EtOH (7,1 lít). Dung dịch chứa axit D-tartaric (1,53kg, 10,2mol) trong EtOH (8 lít) được thêm vào giữ nhiệt độ thấp hơn 25°C. Sau khoảng 1 giờ, chất kết tủa bắt đầu tạo thành và hỗn hợp phản ứng được để khuấy qua đêm. MeCN (5 lít) được thêm vào ở 25°C và chất rắn được lọc ra, được rửa bằng MeCN (2 x 5 lít) và được làm khô trong điều kiện áp suất giảm ở 40°C để thu được 2,94kg hợp chất nêu ở đề mục

này (muối (R) D-tartrat, hiệu suất 100%) với tỷ lệ tỷ lượng bazo/di-axit = 2:1. Độ tinh khiết theo HPLC: 91,6%.

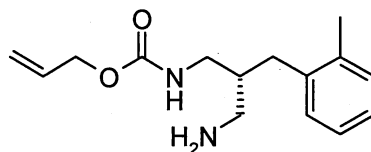
LC/MS: m/z 263,1 [M+H]⁺

¹H-NMR (DMSO-d₆, 270MHz) δ 7,50 (1H, t), 7,22-7,05 (4H, m), 5,98-5,85 (1H, m), 5,35-5,12 (2H, m), 4,48 (2H, d), 3,95 (2H, s), 3,13-2,99 (2H, m), 2,90-2,79 (1H, m), 2,75-2,58 (2H, m), 2,26 (3H, s), 2,08 (1H, m); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 270MHz) δ 174,6, 156,6, 137,4, 136,1, 133,7, 130,3, 129,7, 126,3, 125,8, 117,0, 71,8, 64,4, 65,5, 37,6, 32,7, 19,1, 18,9.

HPLC bất đối (phương pháp A): 88,3% ee; nhiệt độ trong phòng = 11,14 phút (S), 14,57 phút (R).

Bước 7

(R)-Alyl (3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbammat



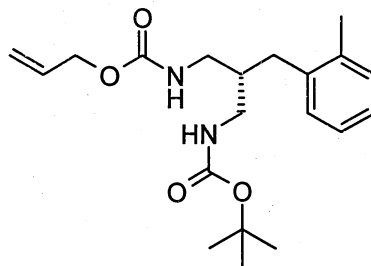
Nước (14,7 lít) và MTBE (14,7 lít) được thêm vào bình dung tích 50 lít trong điều kiện nitơ, sau đó thêm tiếp muối (R)-Alyl (3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbammat (1-(R)) D-tartrat (Bước 6, 2940g). Dung dịch NaOH 10M (14,7 lít) được thêm vào hỗn hợp phản ứng và nhiệt độ phản ứng được duy trì dưới 30°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút, các chất hữu cơ được tách riêng và pha nước được chiết lại bằng MTBE (14,7 lít). Một phần các chất hữu cơ được cô trong chân không (1 lít) để thu được hiệu suất theo phép ngoại suy là 1779g, 95%.

LC/MS: m/z 263,1 [M+H]⁺

¹H NMR (CDCl₃, 270MHz) δ 7,05-7,15 (4H, m), 5,80-5,99 (1H, m), 5,32-5,14 (m, 2H), 4,52 (d, 2H), 3,15-3,38 (m, 2H), 2,55-2,81 (m, 2H), 2,54 (d, 2H), 2,29 (s, 3H), 1,76-1,87 (m, 1H).

Bước 8

(S)-Alyl tert-butyl (2-(2-methylbenzyl)propan-1,3-diyl)dicarbamat

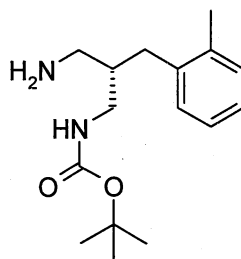


(R)-Alyl (3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate (1740g) được hòa tan trong MTBE (29,4 lít) được thêm vào bình dung tích 50 lít trong điều kiện nitơ. Sau đó thêm tiếp triethylamin (922ml). Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến 0°C và được xử lý bằng BOC-anhydrit (1600ml, 1518g) được hòa tan trong MTBE (3,48 lít). Hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến 20°C và được khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cho là hoàn toàn theo ^1H NMR. Hỗn hợp phản ứng được thêm nước (8,7 lít) và được khuấy trong 15 phút. Các chất hữu cơ được tách riêng và được rửa bằng dung dịch axit xitric 5% (8,7 lít) và nước muối (8,7 lít) trước khi làm khô trên magie sulphat, lọc và cô đặc trong chân không sẽ thu được hợp chất nêu ở đề mục này (2320g, 94%). ^1H NMR cho thấy độ tinh khiết là >90%.

^1H NMR (CDCl_3 , 270MHz) δ 7,02-7,10 (m, 4H), 5,82-5,99 (m, 1H), 5,55 (t, 1H), 5,32-5,15 (m, 2H), 5,02 (t, 1H), 4,52 (d, 2H), 3,17-3,30 (m, 2H), 2,95-3,15 (m, 2H), 2,51 (d, 2H), 2,28 (s, 3H), 1,87-1,95 (m, 1H), 1,43 (s, 9H).

Bước 9

(S)-tert-Butyl (3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate



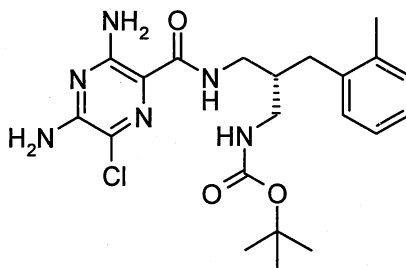
(S)-Alyl tert-butyl (2-(2-methylbenzyl)propan-1,3-diyl)dicarbamat (2330g) hòa tan trong DCM (12,9 lít) và MeOH (10,3 lít) được thêm vào bình dung tích 50 lít trong

điều kiện nitơ, sau đó thêm tiếp $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (148,4g). Hỗn hợp phản ứng này được làm lạnh đến 5°C và được thêm NaBH_4 (729g) từng phần trong thời gian 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến 20°C và được khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được tôi cẩn thận trong nước (46,6 lít) và tiếp theo, được khuấy trong 20 phút. Các chất hữu cơ được tách riêng và pha nước được chiết lại bằng DCM (23,6 lít). Các chất hữu cơ thu gom được được làm khô trên magie sulfat, lọc và được cô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (1679g, hiệu suất 100% (độ tinh khiết ~80% theo ^1H NMR).

^1H NMR (CDCl_3 , 270MHz) δ 7,02-7,15 (m, 4H), 5,22 (br s, 1H), 3,10-3,28 (m, 2H), 2,62-2,80 (m, 2H), 2,52 (d, 2H), 2,29 (s, 3H), 1,75-1,82 (m, 1H), 1,92 (s, 9H), 1,30 (br s, 2H).

Bước 10

(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl) carbamat



Axit 3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxylic (100g), HBTU (202,8g), THF (1200ml) và DIPEA (111ml) được thêm vào bình có dung tích 5 lít trong điều kiện nitơ. Hỗn hợp phản ứng được để khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng. (S)-tert-Butyl (3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbamate (Bước 9, 148,6g) hòa tan trong THF (1,49 lít) được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Cần lưu ý rằng, phản ứng tỏa nhiệt ở 10°C trong khi thêm. Hỗn hợp phản ứng được để khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng, LCMS cho thấy 5% sản phẩm cộng còn lại. Hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến 35°C trong 4 giờ. LC/MS cho thấy 2% sản phẩm cộng còn lại. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ nữa trước khi được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong etyl axetat (1,5 lít) và MTBE (1,5 lít) và được rửa bằng dung dịch NaHCO_3 bão hòa (1 lít), dung dịch axit xitric 5%

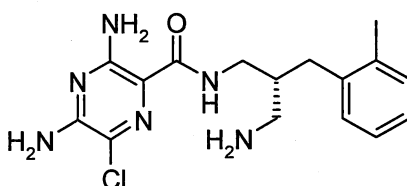
(700ml) và nước muối (700ml). Các chất hữu cơ được làm khô trên magie sulfat, lọc và được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong MTBE (1 lít) và được cô lại trước khi hòa tan trong MTBE (500ml) và diethyl ete (500ml) và lọc để loại bỏ muối DIPEA. Dịch lọc được cô và phép phân tích cho thấy một số muối DIPEA còn lại. Phần cặn được nghiền lại bằng MTBE (750ml) và diethyl ete (750ml) và được lọc lại. Dịch lọc được cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (225g, 94% (được tính toán cho dung môi và TMU)).

LC/MS: m/z 349,2 [M+H]⁺

¹H NMR (CDCl₃, 270MHz) δ 7,46 (t, 1H), 7,13 (m, 4H), 5,52 (t, 1H), 5,22 (br s, 2H), 3,62-3,75 (m, 1H), 3,00-3,40 (m, 5H), 2,80 (s, 3H), 2,49-2,75 (m, 2H), 1,95-2,02 (m, 1H), 1,42 (s, 9H).

Bước 11

3,5-Diamino-N-[(2R)-3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl]-6-clopyrazin-2-carboxamit



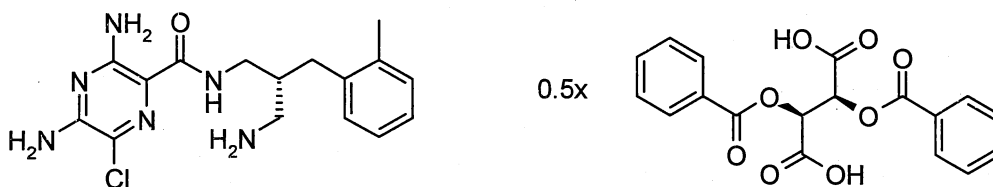
(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl) carbamat (Bước 10, 2215g) trong dioxan (6 lít) được thêm vào bình có mép dung tích 20 lít trong điều kiện nitơ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 20 phút cho đến khi hòa tan hoàn toàn. Tiếp đó, dung dịch HCl 4M trong dioxan (10 lít) được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Phản ứng tỏa ra một lượng khí đáng kể và nhiệt độ phản ứng tăng lên đến 35°C trước khi được làm nguội. Chất kết tủa dạng dầu nhớt được quan sát thấy trong phản ứng. Thực hiện phép LC/MS cho hỗn hợp phản ứng này sau 1 giờ cho thấy phản ứng hoàn toàn. Chất lỏng nổi lên trên được gạn ra và được cô trong chân không. Chất rắn nhớt giống dầu được hòa tan trong nước (6 lít) và được kết hợp với chất nổi trên bề mặt đã được cô hòa tan trong nước (2 lít). Pha nước được rửa bằng MTBE (5 lít). Tiếp theo, pha nước được bazơ hóa bằng dung dịch NaOH 10M (2 lít) và chiết bằng 2-Me-THF (4 x 10 lít). Các chất hữu cơ được làm khô, lọc và được cô trong chân không. Tiếp theo, phần cặn được cô từ MTBE (2 x 4 lít) để loại bỏ 2-

MeTHF còn lại. Chất rắn được nghiền bằng MTBE:heptan (với tỷ lệ 9 lít:1,8 lít) và để khuấy qua cuối tuần. Chất rắn được lọc và được làm khô trong lò ở 40°C sẽ thu được hợp chất nêu ở đề mục này (1657g, 96%).

^1H NMR (CDCl_3 , 270MHz) δ 7,60 (t, 1H), 7,08-7,15 (m, 4H), 5,75 (br s, 2H), 5,12 (b s, 2H), 3,38-3,45 (m, 2H), 2,52-2,82 (m, 4H), 2,30 (s, 3H), 1,80-1,98 (m, 2H), 1,20-1,28 (m, 2H).

Bước 12

(R)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit
(2R,3S)-2-benzoyl-3-(benzoyloxy)sucxinat



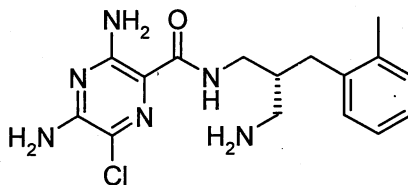
3,5-Diamino-N-[(2R)-3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl]-6-clopyrazin-2-carboxamit (127,4g) và metanol (892ml) được thêm vào bình có dung tích 5 lít trong điều kiện nitơ. Hỗn hợp phản ứng được đun nóng nhẹ đến 30°C cho đến khi tất cả chất rắn được hòa tan. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và axit (+)-dibenzoyl-D-tartaric (65,5g) trong metanol (458ml) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được để khuấy, sau khoảng 2 giờ, chất rắn bắt đầu kết tủa. Hỗn hợp phản ứng được để khuấy qua cuối tuần. Isopropyl axetat (1,5 lít) được thêm vào hỗn hợp phản ứng và việc khuấy được tiếp tục trong 4 giờ. Tiếp theo, chất kết tủa được lọc ra và được rửa bằng isopropyl axetat (2 x 1 lít). Tiếp theo, chất rắn được làm khô trong lò trong 3 ngày ở 40°C. Thu được tổng cộng 147,5g (74%) ở dạng tỷ lệ tỷ lệ của bazơ/di-axit = 2:1.

^1H NMR (CDCl_3 , 270MHz): δ 7,60 (t, 1H), 7,08-7,15 (m, 4H), 5,75 (br s, 2H), 5,12 (b s, 2H), 3,38-3,45 (m, 2H), 2,52-2,82 (m, 4H), 2,30 (s, 3H), 1,80-1,98 (m, 2H), 1,20-1,28 (m, 2H).

HPLC bất đối (phương pháp A): 98,7% ee, R_t = 11,93 phút (R), 14,24 phút (S).

Bước 13

(R)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit



(R)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (2R, 3S)-2-benzoyl-3-(benzoyloxy)succinat (20g, 38,46mmol) được tạo huyền phù trong 2-metyl-THF (200ml) và nước (200ml) và được làm lạnh bằng thùng nước đá. Natri hydroxit, 1M (42,3ml, 42,31mmol) được thêm vào từ từ và tiếp theo hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 40°C cho đến khi tất cả các chất được hòa tan hoàn toàn. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng 2-metyl-THF (2x200ml). Pha hữu cơ thu gom được rửa bằng nước muối (200ml), được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không để thu được (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (13,3g, 99%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

LC/MS: m/z: 349,3 $[M+H]^+$.

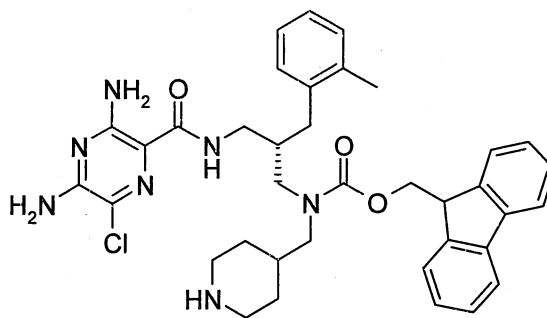
1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 1,50 (bs, 2H), 1,76 - 1,87 (m, 1H), 2,26 (s, 3H), 2,4 - 2,49 (m, 2H), 2,52 - 2,62 (m, 2H), 3,18 - 3,28 (m, 2H), 6,95 (bs, 2H), 7,04 - 7,17 (m, 4H), 8,14 (t, 1H).

HPLC bất đối (phương pháp B): 99,3% ee, R_t = 11,55 phút (S), 13,28 phút (R).

$[\alpha]_D^{20}$: +11,8 (c 1,0, MeCN).

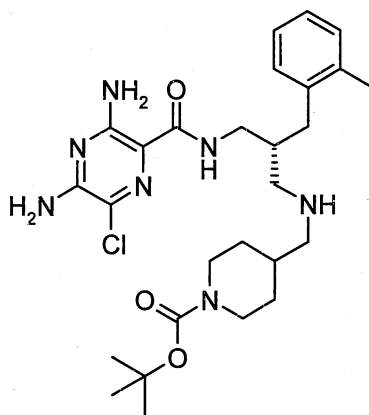
Chất trung gian B

(S)-(9H-Floren-9-yl)metyl 3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl(piperidin-4-ylmetyl)carbamit



Bước 1:

(R)-tert-Butyl 4-(((3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)piperidin-1-carboxylat

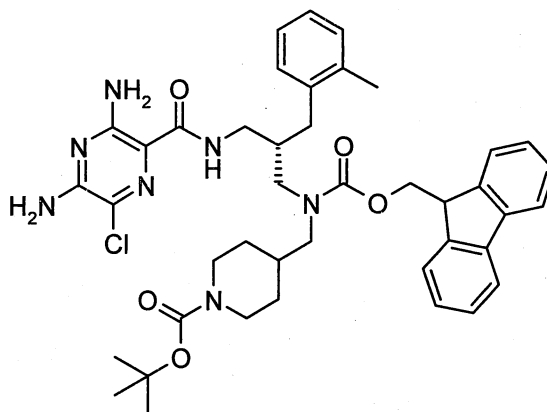


Hỗn hợp của tert-butyl 4-formylpiperidin-1-carboxylat (122mg, 0,57mmol, 1,00 đương lượng) và 3,5-diamino-N-[(2R)-3-amino-2-[(2-methylphenyl)methyl]-propyl]-6-clopyrazin-2-carboxamit (Chất trung gian A, 200mg, 0,57mmol, 1,0 đương lượng) trong diclometan (5ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 50ml, hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ. Tiếp theo, natri triaxetoxybohdyrua (486mg, 2,29mmol, 4,00 đương lượng) được thêm vào. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp tạo thành được rửa bằng 3x10ml nước, được làm khô trên natri sulfat khan và được cô trong chân không. Quá trình này sẽ thu được 250mg (80%) of hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z: 546 [M+H]⁺.

Bước 2:

(S)-tert-Butyl 4-((((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)piperidin-1-carboxylat

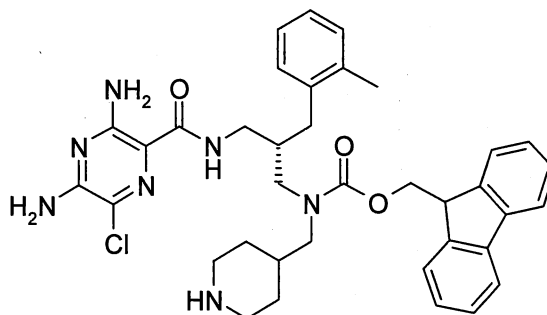


FMOC-clorua (19mg, 0,07mmol, 1,00 đương lượng) trong dioxan (2,0ml) được thêm từng giọt vào hỗn hợp của (R)-tert-butyl 4-(((3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propylamino)methyl)piperidin-1-carboxylat (Bước 1, 40mg, 0,07mmol, 1,0 đương lượng) và Na_2CO_3 (12mg, 0,11mmol, 1,5 đương lượng) trong nước/dioxan (với tỷ lệ 1:2, 3ml). Dung dịch tạo thành được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, chiết bằng 3x5ml etyl axetat. Pha hữu cơ thu gom được được làm khô trên natri sulfat khan. Sau khi loại bỏ dung môi trong chân không, thu được 42mg (75%) hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z: 768 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 3:

(S)-(9H-Floren-9-yl)methyl 3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl(piperidin-4-ylmethyl)carbamate



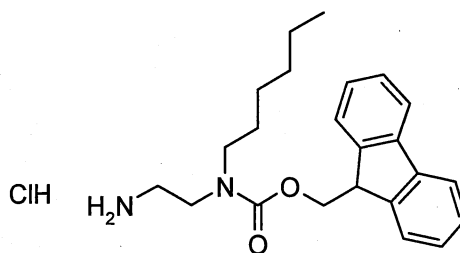
Dung dịch chứa (S)-tert-butyl 4-((((9H-floren-9-yl)metoxy)carbonyl)(3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)piperidin-1-carboxylat (Bước 2, 20mg, 0,03mmol, 1,0 đương lượng) trong HCl/MeOH (4M, 3ml) được thêm vào bình đáy tròn dung tích 25ml. Dung dịch tạo thành được

khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không. Quá trình này sẽ thu được 15mg (86%) 9H-floren-9-ylmetyl N-[(2S)-3-[(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-yl)formamido]-2-[(2-metylphenyl)metyl]propyl]-N-(piperidin-4-ylmetyl)carbamát dưới dạng chất rắn màu vàng.

LC/MS: m/z: 668 [M+H]⁺

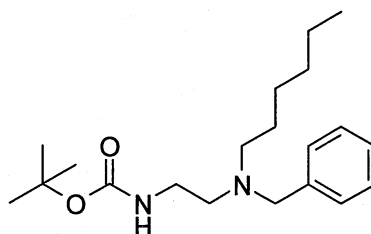
Chất trung gian C

(9H-Floren-9-yl)metyl (2-aminoetyl)(hexyl)carbamát hydroclorua



Bước 1

tert-Butyl (2-(benzyl(hexyl)amino)etyl)carbamát



N-Benzylhexan-1-amin (2,69g, 14,1mmol), tert-butyl (2-oxoetyl)carbamát (4,48g, 28,1mmol) và DIPEA (2,46ml, 14,1mmol) được hòa tan trong MeOH (20ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 45 phút. Natri xyanobohydrua (1,77g, 28,1mmol) và axit axetic (0,806ml, 14,1mmol) được thêm vào và việc khuấy được tiếp tục trong 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách thêm dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung môi được cô trong chân không. Phần cặn được pha loãng bằng nước và chiết bằng EtOAc (2x100ml). Pha hữu cơ thu gom được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên 2 cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 5 – 50% EtOAc trong heptan trong 12 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom và làm bay hơi trong chân không để

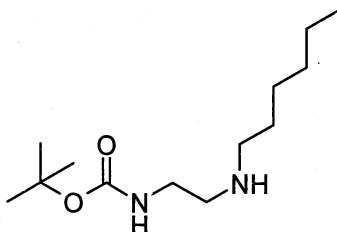
thu được tert-butyl (2-(benzyl(hexyl)amino)ethyl)carbamate (3,19g, 68%) dưới dạng dầu không màu.

LC/MS: m/z: 335,6 $[M+H]^+$

1H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 0,84 - 0,92 (m, 3H), 1,19 - 1,35 (m, 6H), 1,38 - 1,66 (m, 11H), 2,43 (t, 2H), 2,52 (t, 2H), 3,09 - 3,21 (m, 2H), 3,56 (s, 2H), 4,83 - 4,93 (m, 1H), 7,22 - 7,37 (m, 5H).

Bước 2

tert-Butyl (2-(hexylamino)ethyl)carbamate

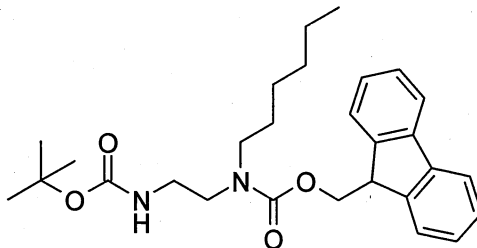


tert-Butyl (2-(benzyl(hexyl)amino)ethyl)carbamate (3,19g, 9,54mmol) được hòa tan trong MeOH (25ml) và $Pd(OH)_2/C$ 20% (0,201g, 0,29mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được hydro hóa trong thiết bị hydro hóa Buchi ở 4 bar và nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Phản ứng được chấm dứt. $Pd(OH)_2/C$ 20% bổ sung (200mg, 0,28mmol) được thêm vào và việc hydro hóa được tiếp tục trong 6 giờ, rồi bước hydro được chấm dứt. Chất xúc tác được lọc ra, được rửa bằng MeOH và dịch lọc được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong MeOH (15ml), $Pd(OH)_2/C$ 20% (250mg, 0,36mmol) được thêm vào và việc hydro hóa được tiếp tục ở 4 bar và nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Chất xúc tác được lọc ra, được rửa bằng MeOH và dịch lọc làm bay hơi trong chân không. Hỗn hợp phản ứng được hòa tan một lần nữa trong MeOH, $Pd(OH)_2/C$ 20% (250mg, 0,36) được thêm vào và việc hydro hóa được tiếp tục trong 3 ngày. Chất xúc tác được lọc ra, được rửa bằng MeOH và dịch lọc làm bay hơi trong chân không để thu được tert-butyl (2-(hexylamino)ethyl)carbamate (2,38g, 102%) dưới dạng dầu không màu.

1H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 0,89 (t, 3H), 1,22 - 1,36 (m, 6H), 1,41 - 1,53 (m, 11H), 2,61 (t, 2H), 2,75 (t, 2H), 3,19 - 3,28 (m, 2H), 4,97 (bs, 1H).

Bước 3

(9H-Floren-9-yl)metyl (2-((tert-butoxycarbonyl)amino)etyl)(hexyl)carbammat



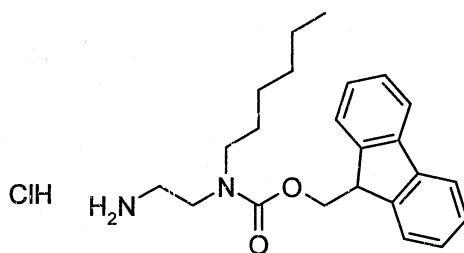
DIPEA (1,79ml, 10,2mmol) và (9H-floren-9-yl)metyl cacbonocloridat (2,65g, 10,2mmol) được thêm vào dung dịch đã được làm lạnh trong thùng nước đá chứa tert-butyl (2-(hexylamino)etyl)carbammat (2,38g, 9,74mmol) trong DCM (40ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy kết hợp làm lạnh trong 10 phút và tiếp theo ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Nước (20ml) được thêm vào, lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng DCM (2x20ml). Pha hữu cơ thu gom được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 5 – 30% EtOAc trong heptan trong 9 CV, rồi đến 30% EtOAc trong heptan trong 3 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom bằng cách sử dụng bước sóng 264nm. Các phân đoạn thu gom được làm bay hơi trong chân không để thu được (9H-floren-9-yl)metyl (2-((tert-butoxycarbonyl)amino)etyl)(hexyl)carbammat (3,70g, 81%) dưới dạng dầu không màu.

LC/MS: m/z: 467,4 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 0,89 (t, 3H), 1,06 - 1,36 (m, 8H), 1,43 (s, 9H), 2,78 - 2,87 (m, 1H), 2,95 - 3,08 (m, 2H), 3,11 - 3,36 (m, 3H), 4,18 - 4,26 (m, 1H), 4,49 - 4,63 (m, 2H), 4,89 (bs, 1H), 7,3 - 7,36 (m, 2H), 7,41 (t, 2H), 7,59 (d, 2H), 7,77 (d, 2H).

Bước 4

(9H-Floren-9-yl)metyl (2-aminoetyl)(hexyl)carbammat hydroclorua



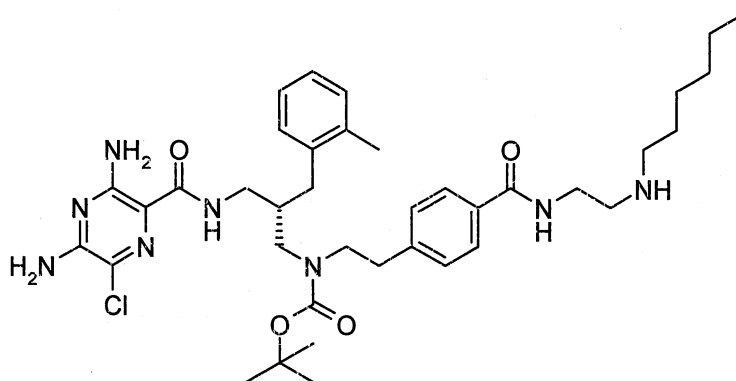
Axetyl clorua (2,84ml, 40,0mmol) được thêm từng giọt vào lọ nhỏ đã được làm lạnh trong thùng nước đá chứa MeOH (10ml, 247mmol) và được khuấy trong 5 phút. Tiếp đó, dung dịch phản ứng này được thêm vào (9H-floren-9-yl)metyl (2-((tert-butoxycacbonyl)amino)etyl)(hexyl)carbamate (3,7g, 7,93mmol) và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2,5 giờ. Dung môi được cô trong chân không để thu được (9H-floren-9-yl)metyl (2-aminoetyl)(hexyl)carbamate hydroclorua (2,92g, 91%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS: m/z: 367,3 $[M+H]^+$

1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 0,82 - 0,97 (m, 4H), 0,99 - 1,51 (m, 7H), 2,68 - 2,88 (m, 3H), 3,23 - 3,39 (m, 3H), 4,23 - 4,4 (m, 2H), 4,52 (d, 1H), 7,29 - 7,37 (m, 2H), 7,37 - 7,46 (m, 2H), 7,64 (d, 2H), 7,83 - 8,09 (m, 5H).

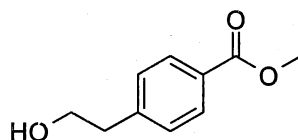
Chất trung gian D

(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)etyl)carbamoyl)phenetyl)carbamate



Bước 1

Metyl 4-(2-hydroxyetyl)benzoat



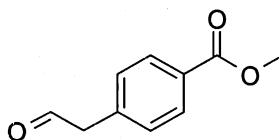
Axit 4-(2-hydroxyetyl)benzoic (2,41g, 14,5mmol) được hòa tan trong MeOH (5ml) và H₂SO₄ (0,06ml, 1,13mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được đun nóng trong lò vi sóng ở 120°C trong 1 giờ và tiếp theo được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc (150ml), được rửa bằng dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) (150ml), nước muối (50ml), được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không để thu được methyl 4-(2-hydroxyetyl)benzoat (2,41g, 92%) dưới dạng dầu màu nhạt.

LC/MS: m/z: 181,0 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 2,94 (t, 2H), 3,88 - 3,94 (m, 5H), 7,32 (d, 2H), 7,97 - 8,02 (m, 2H).

Bước 2

Methyl 4-(2-oxoetyl)benzoat

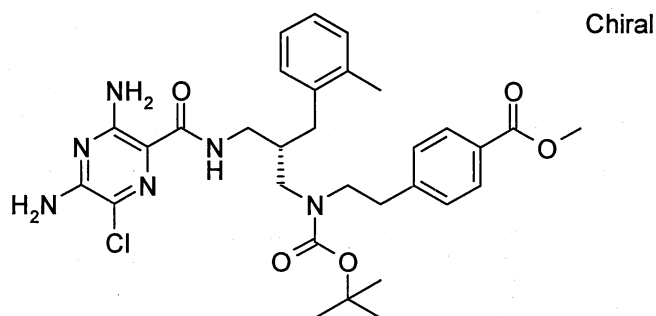


Methyl 4-(2-hydroxyetyl)benzoat (2,41g, 13,37mmol) được hòa tan trong DCM (50ml) và Dess-Martin Periodinan (6,24g, 14,7mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ và tiếp theo được tối bằng cách thêm dung dịch 15% Na₂S₂O₃/NaHCO₃ với tỷ lệ 3:2 (trong nước) (50ml) và được khuấy mạnh trong 30 phút. Các pha được tách riêng và pha nước chiết bằng DCM (2x50ml). Pha hữu cơ thu gom được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 5 – 40% EtOAc trong heptan trong 9 CV rồi đến 50% EtOAc trong heptan trong 3 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom bằng cách sử dụng bước sóng 245nm. Sản phẩm được thu gom và làm bay hơi trong chân không để thu được methyl 4-(2-oxoetyl)benzoat (0,880g, 36,9%) dưới dạng chất rắn màu vàng.

$^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 3,78 (d, 2H), 3,93 (s, 3H), 7,29 - 7,34 (m, 2H), 8,03 - 8,09 (m, 2H), 9,79 (t, 1H).

Bước 3

(S)-Metyl 4-(2-((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)ethyl)benzoat



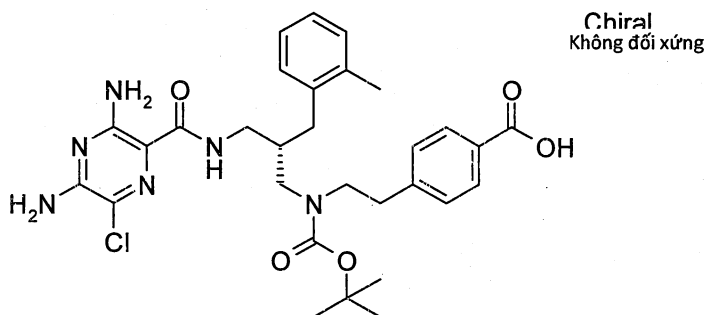
(R)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (Chất trung gian A, 2,00g, 5,56mmol), metyl 4-(2-oxoethyl)benzoat (1,09g, 6,12mmol) và DIPEA (0,971ml, 5,56mmol) được hòa tan trong MeOH (4ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Tiếp theo, natri xyanobohydrua (1,05g, 16,7mmol) và axit axetic (0,318ml, 5,56mmol) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách thêm dung dịch NaHCO_3 8% (trong nước). Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng EtOAc (100ml), được khuấy trong 30 phút và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (100ml). Pha hữu cơ thu gom được rửa bằng nước muối (50ml), được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong DCM (20ml) và BOC_2O (1,290ml, 5,56mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5,5 giờ và tiếp theo được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 10 – 80% of EtOAc trong heptan trong 10 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom bằng cách sử dụng bước sóng 270nm. Sản phẩm được thu gom lại và làm bay hơi trong chân không để thu được (S)-metyl 4-(2-((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)ethyl)benzoat (1,84g, 54%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

LC/MS: m/z : 611,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 1,36 (d, 9H), 2,15 - 2,26 (m, 4H), 2,45 - 2,49 (m, 2H), 2,75 (t, 2H), 2,93 (dd, 1H), 3,01 - 3,4 (m, 5H), 3,84 (s, 3H), 6,97 (bs, 2H), 7,05 - 7,17 (m, 4H), 7,21 (d, 2H), 7,82 (d, 2H), 7,85 - 7,94 (m, 1H).

Bước 4

Axit (S)-4-(2-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)ethyl)benzoic



(S)-Metyl 4-(2-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)ethyl)benzoat (1,84g, 2,56mmol) được hòa tan trong MeOH (20ml) và natri hydroxit (3,37ml, 12,8mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Tiếp theo, dung môi (MeOH) được cô trong chân không. Nước (50ml) và MeTHF (50ml) được thêm vào và độ pH được điều chỉnh đến ~2 bằng dung dịch HCl 3M (trong nước). Các pha được tách riêng và pha nước chiết bằng L-MeTHF (50ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc và làm bay hơi trong chân không để thu được (S)-4-(2-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)ethyl)benzoic axit (1,53g, 100%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

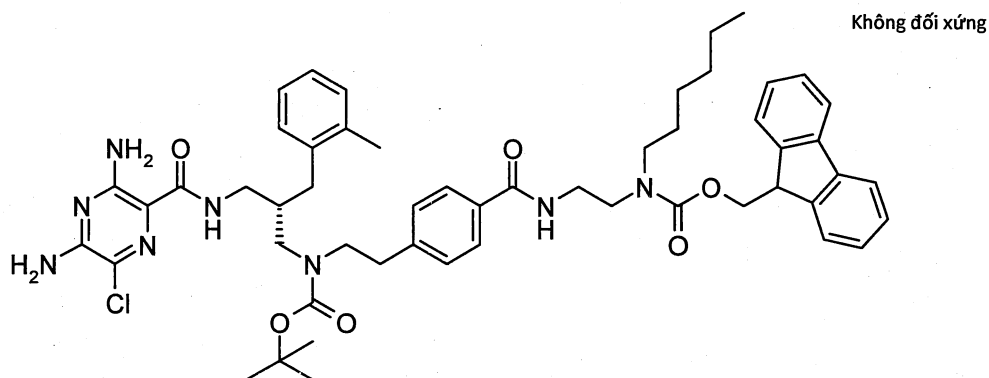
LC/MS: m/z: 597,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 1,33 (s, 9H), 2,21 (d, 4H), 2,38 - 2,49 (m, 2H), 2,73 (t, 2H), 2,83 - 3,43 (m, 6H), 6,84 - 7,26 (m, 8H), 7,78 - 7,98 (m, 3H), 12,80 (bs, 1H).

Bước 5

(S)-tert-Butyl 4-((2-(((9H-floren-9-

yl)metoxy)cacbonyl)(hexyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbammat



Axit (S)-4-(2-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)amino)etyl)benzoic (1,24g, 1,77mmol), 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylisouroni tetraflororat (0,623g, 1,94mmol) và DIPEA (1,54ml, 8,83mmol) được hòa tan trong DCM (30ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút trước khi thêm (9H-floren-9-yl)metyl (2-aminoetyl)(hexyl)carbammat hydroclorua (Chất trung gian C, 0,95g, 2,12mmol). Hồn hợp phản ứng được khuấy trong 2,5 giờ. Hồn hợp phản ứng được rửa bằng dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) (150ml). Pha nước được chiết bằng DCM (150ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradien từ 20 – 80% EtOAc trong heptan trong 9 CV rồi đến 80% EtOAc trong heptan trong 3 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom và làm bay hơi trong chân không để thu được (S)-tert-butyl 4-((2-(((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonyl)(hexyl)amino)etyl)carbamoyl)phenetyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)carbammat (1,56g, 93%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

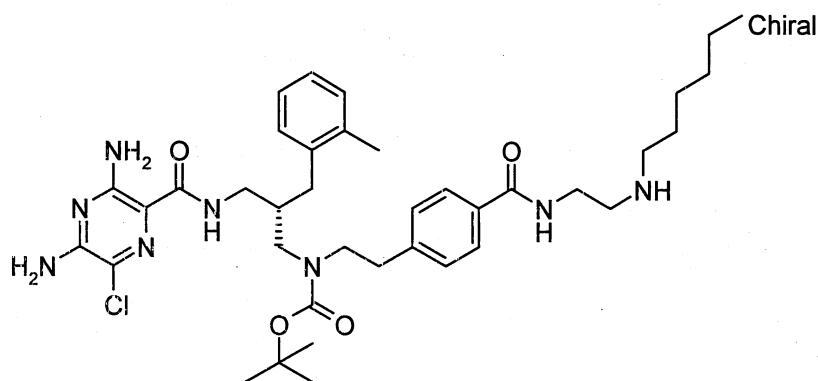
LC/MS: m/z: 945,6 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,82 (t, 3H), 0,87 - 0,97 (m, 2H), 1 - 1,27 (m, 5H), 1,33 (s, 9H), 1,38 - 1,47 (m, 1H), 2,15 - 2,27 (m, 4H), 2,45 (dd, 1H), 2,69 (s, 2H), 2,81 - 2,89 (m, 1H), 2,9 - 3 (m, 1H), 3,01 - 3,41 (m, 11H), 4,15 - 4,27 (m, 2H), 4,48 (d, 1H), 6,96 (bs, 2H), 7,05 - 7,18 (m, 6H), 7,30 (t, 2H), 7,39 (t, 2H), 7,55 - 7,65

(m, 2H), 7,71 (dd, 2H), 7,8 - 7,97 (m, 3H), 8,37 - 8,51 (m, 1H).

Bước 6

(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)phenetyl)carbamate



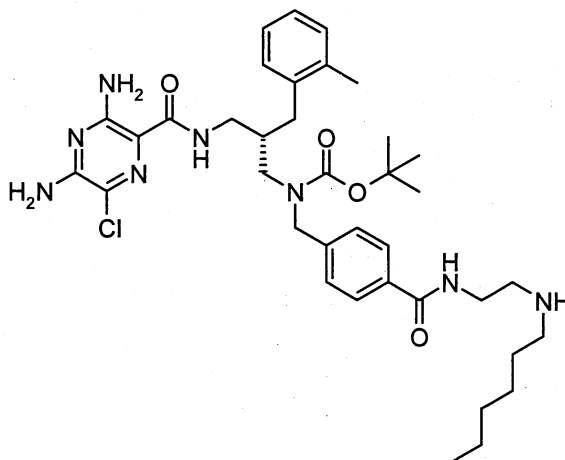
(S)-tert-Butyl 4-((2-(((9H-floren-9-yl)metoxy)carbonyl)(hexylamino)ethyl)carbamoyl)phenetyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate (1,59g, 1,68mmol) được hòa tan trong THF (15ml) và piperidin (1,67ml, 16,8mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ và tiếp theo được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 4 – 8% (2 M amoniac trong MeOH) trong DCM trong 5 CV rồi đến 8% (amoniac 2M trong MeOH) trong DCM trong 10 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom và làm bay hơi trong chân không để thu được (S)-tert-butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)phenetyl)carbamate (1,03g, 85%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

LC/MS: m/z: 723,6 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,84 (t, 3H), 1,19 - 1,44 (m, 17H), 2,15 - 2,29 (m, 4H), 2,45 (dd, 1H), 2,54 (t, 2H), 2,65 - 2,75 (m, 4H), 2,94 (dd, 1H), 3,02 - 3,18 (m, 2H), 3,18 - 3,3 (m, 3H), 3,3 - 3,4 (m, 4H), 6,97 (bs, 2H), 7,05 - 7,2 (m, 7H), 7,73 (d, 2H), 7,79 - 7,97 (m, 1H), 8,32 (t, 1H).

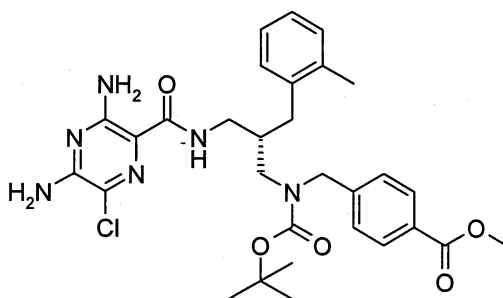
Chất trung gian E

(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate



Bước 1

(S)-Metyl 4-(((tert-butoxycacbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)metyl)benzoat



(R)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (Chất trung gian A, 2,17g, 6,22mmol), metyl 4-formylbenzoat (1,12g, 6,84mmol) và DIPEA (1,09ml, 6,22mmol) được hòa tan trong MeOH (15ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, natri xyanobohydrua (0,782g, 12,4mmol) và axit axetic (0,392ml, 6,84mmol) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Khi theo dõi bằng phép phân tích LCMS, cho thấy chuyển hóa không hoàn toàn, metyl 4-formylbenzoat (200mg, 1,22mmol) được thêm vào và việc khuấy được tiếp tục trong 3 giờ. Tiếp theo, metyl 4-formylbenzoat (200mg, 1,22mmol) và natri xyanobohydrua (200mg, 3,18mmol) lại được thêm vào và việc khuấy được tiếp tục trong 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách thêm dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước). Dung môi được cô trong chân

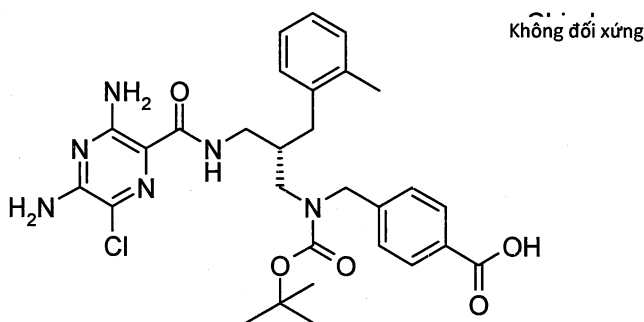
không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc (250ml) và dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) 250ml), lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (250ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong DCM (50ml), BOC₂O (1,63g, 7,46mmol) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được được cô trong chân không và tiếp theo được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 20 – 80% EtOAc trong heptan trong 12 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom bằng cách sử dụng bước sóng 265nm. Sản phẩm được làm bay hơi trong chân không để thu được (S)-metyl 4-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)benzoat (2,85g, 77%) dưới dạng chất rắn.

LC/MS: m/z: 597,5 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 1,36 (d, 9H), 2,21 (s, 3H), 2,24 - 2,38 (m, 1H), 2,45 - 2,57 (m, 2H), 2,95 - 3,3 (m, 4H), 3,83 (s, 3H), 4,33 - 4,51 (m, 2H), 6,97 (bs, 2H), 7,04 - 7,17 (m, 4H), 7,22 (d, 2H), 7,76 - 7,96 (m, 3H).

Bước 2

Axit (S)-4-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)benzoic



(S)-Metyl 4-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)benzoat (2,85g, 4,77mmol) được hòa tan MeOH (40ml) và natri hydroxit, 3,8 M (6,28ml, 23,9mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ và dung môi (MeOH) tiếp theo được cô trong chân không. Nước (75ml) và MeTHF (75ml) được

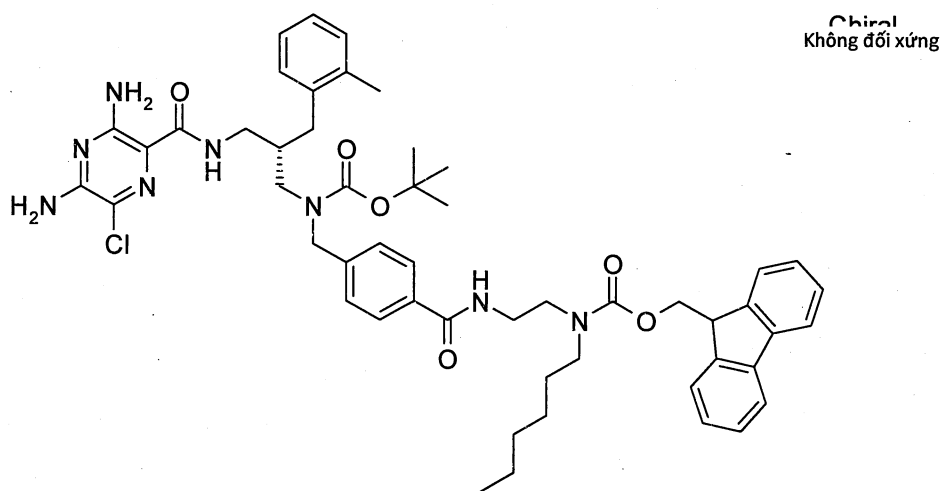
thêm vào và độ pH được điều chỉnh đến ~2 bằng dung dịch HCl 3M (trong nước). Các pha được tách riêng và pha nước chiết bằng MeTHF (75ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không để thu được (S)-4-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)benzoic axit (2,75g, 99%) dưới dạng chất rắn.

LC/MS: m/z: 583,4 $[M+H]^+$

1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 1,32 - 1,42 (m, 9H), 2,20 (s, 3H), 2,24 - 2,38 (m, 1H), 2,5 - 2,55 (m, 2H), 2,92 - 3,36 (m, 4H), 4,27 - 4,54 (m, 2H), 6,97 (bs, 2H), 7,03 - 7,17 (m, 4H), 7,19 (d, 2H), 7,78 - 8 (m, 3H), 12,85 (bs, 1H).

Bước 3

(S)-tert-Butyl 4-((2-(((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonyl)(hexyl)amino)ethyl)-carbamoyl)benzyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate



Axit (S)-4-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)benzoic (1,61g, 2,76mmol), 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylisouroni tetraflororat (0,975g, 3,04mmol) và DIPEA (2,41ml, 13,8mmol) được hòa tan trong DCM (150ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút trước khi thêm (9H-floren-9-yl)methyl (2-aminoethyl)(hexyl)carbamate hydroclorua (Chất trung gian C, 1,48g, 3,31mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ 8% (trong nước) (100ml). Pha nước được chiết bằng DCM (100ml). Pha hữu

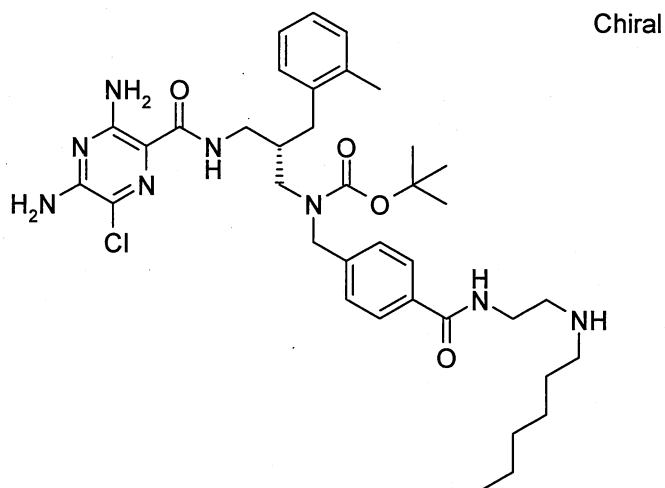
cơ thu gom được được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 20 – 80% EtOAc trong heptan trong 12 CV rồi đến 80% EtOAc trong heptan trong 3 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom và làm bay hơi trong chân không để thu được (S)-tert-butyl 4-((2-(((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonyl)(hexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate (2,38g, 93%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

LC/MS: m/z: 931,5 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 0,82 (t, 3H), 0,86 - 0,96 (m, 1H), 0,99 - 1,27 (m, 6H), 1,27 - 1,48 (m, 10H), 2,19 (s, 3H), 2,23 - 2,35 (m, 1H), 2,45 - 2,54 (m, 2H), 2,8 - 2,9 (m, 1H), 2,9 - 3,05 (m, 1H), 3,05 - 3,38 (m, 8H), 4,16 - 4,32 (m, 3H), 4,39 - 4,56 (m, 2H), 6,97 (bs, 2H), 7,02 - 7,18 (m, 6H), 7,30 (t, 2H), 7,39 (t, 2H), 7,60 (t, 2H), 7,64 - 7,76 (m, 2H), 7,78 - 7,99 (m, 3H), 8,37 - 8,52 (m, 1H).

Bước 4

(S)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate



(S)-tert-Butyl 4-((2-(((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonyl)(hexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate (2,38g, 2,55mmol) được hòa tan trong THF (25ml) và piperidin (2,53ml, 25,6mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt

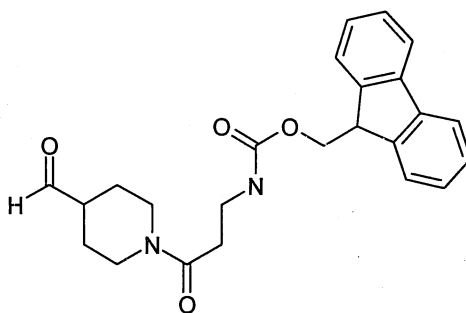
độ trong phòng trong 20 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 2,5 – 8% (amoniac 2M trong MeOH) trong DCM trong 9 CV rồi đến 8% (amoniac 2M trong MeOH) trong DCM trong 3 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom và làm bay hơi trong chân không để thu được (S)-tert-butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (1,60g, 88%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

LC/MS: m/z: 709,5 $[M+H]^+$

1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 0,84 (t, 3H), 1,17 - 1,31 (m, 6H), 1,31 - 1,45 (m, 11H), 2,20 (s, 3H), 2,24 - 2,37 (m, 1H), 2,51 - 2,57 (m, 3H), 2,68 (t, 2H), 2,91 - 3,06 (m, 1H), 3,06 - 3,4 (m, 6H), 4,23 - 4,36 (m, 1H), 4,4 - 4,53 (m, 1H), 6,97 (bs, 2H), 7,04 - 7,19 (m, 6H), 7,72 (d, 2H), 7,79 - 7,98 (m, 1H), 8,28 - 8,35 (m, 1H).

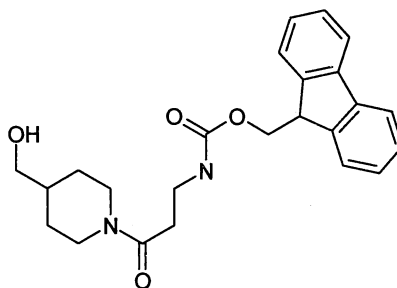
Chất trung gian F

9H-Floren-9-yl)methyl (3-(4-formylpiperidin-1-yl)-3-oxopropyl)carbamate



Bước 1:

(9H-Floren-9-yl)methyl 3-(4-(hydroxymethyl)piperidin-1-yl)-3-oxopropylcarbamate



DIPEA (0,910ml, 5,21mmol) được thêm vào dung dịch đã khuấy chứa

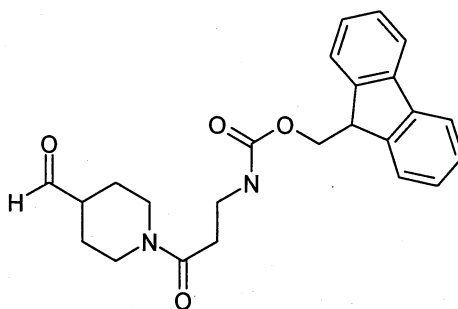
piperidin-4-ylmetanol (200mg, 1,74mmol), axit 3-(((9H-floren-9-yl)methoxy)carbonylamino)propanoic (541mg, 1,74mmol) và HATU (660mg, 1,74mmol) trong DMF khô (5ml). Hỗn hợp phản ứng màu vàng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng EtOAc (50ml) và được rửa bằng dung dịch NaCl 15% trong nước (50ml) và dung dịch NaCl 30% trong nước (50ml). Dung môi được làm bay hơi và phần cặn được tinh chế bằng phép HPLC điều chế. Sau khi làm khô lạnh phần cặn được hòa tan lại trong DCM và heptan được thêm vào. Làm bay hơi sẽ thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn không màu (378mg, 53%).

LC/MS: m/z: 409 [M+H]⁺

¹H NMR (500MHz, DMSO) δ 0,88 - 1,09 (m, 2H), 1,51 - 1,73 (m, 3H), 2,44 (t, 2H), 2,47 - 2,52 (m, 1H + DMSO peak), 2,93 (t, 1H), 3,18 (dd, 2H), 3,23 (d, 2H), 3,80 (d, 1H), 4,20 (t, 1H), 4,29 (d, 2H), 4,37 (d, 1H), 7,21 (t, 1H), 7,33 (dt, 2H), 7,41 (t, 2H), 7,68 (d, 2H), 7,89 (d, 2H).

Bước 2

(9H-Floren-9-yl)methyl 3-(4-formylpiperidin-1-yl)-3-oxopropylcarbamate



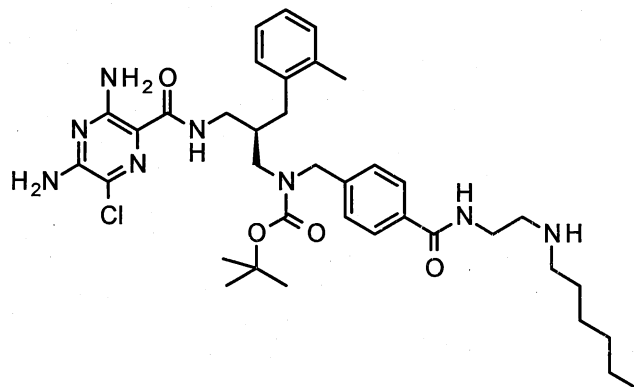
Dess-Martin Periodinan rắn (413mg, 0,97mmol) được thêm vào dung dịch chứa (9H-floren-9-yl)methyl 3-(4-(hydroxymethyl)piperidin-1-yl)-3-oxopropylcarbamate (362mg, 0,89mmol) trong DCM (5ml). Huyền phù tạo thành được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2,5 giờ. Na₂S₂O₃ 10% (3ml), NaHCO₃ 10% (3ml) và DCM (2ml) được thêm vào hỗn hợp phản ứng này, hỗn hợp phản ứng được khuấy mạnh trong 10 phút và được để yên. Các lớp được tách riêng và pha nước chứa muối không hòa tan được chiết lại bằng DCM. Pha hữu cơ thu gom được làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được làm bay hơi để thu được sản phẩm thô (440mg) chất này được sử dụng

mà không cần tinh chế thêm.

LC/MS: m/z : 407 $[M+H]^+$.

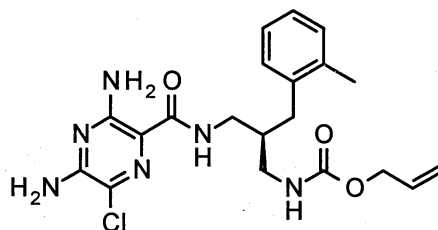
Chất trung gian G

(R)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate



Bước 1

(R)-Allyl (3-(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate



(3,5-Diamino-6-chloropyrazin-2-yl)(1H-imidazol-1-yl)metanon, (858mg, 3,59mmol) và (R)-allyl (3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate (Chất trung gian A, Bước 5) (990mg, 3,77mmol) được tạo huyền phù trong NMP (15ml) và đun nóng đến 100°C trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được để nguội đến nhiệt độ trong phòng. EtOAc (50ml) và nước (50ml) được thêm vào, lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng EtOAc (2x50ml). Pha hữu cơ thu gom được rửa bằng dung dịch HCl 0,1M (trong nước) (50ml), nước (2x50ml), nước muối (50ml), được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 20 –

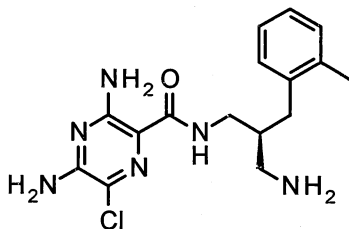
80% EtOAc trong heptan trong 9 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom bằng cách sử dụng bước sóng 270nm. Các phân đoạn thu gom được được kết hợp lại và làm bay hơi trong chân không để thu được (R)-alyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate (714mg, 45,9%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 1,9 - 2,02 (m, 1H), 2,23 (s, 3H), 2,41 - 2,55 (m, 2H), 2,91 - 3,09 (m, 2H), 3,12 - 3,23 (m, 2H), 4,48 (d, 2H), 5,17 (d, 1H), 5,24 - 5,32 (m, 1H), 5,85 - 5,96 (m, 1H), 6,97 (bs, 2H), 7,04 - 7,15 (m, 3H), 7,21 - 7,25 (m, 1H), 7,28 (t, 1H), 8,00 (t, 1H).

LC/MS: m/z 433,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 2

(S)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit



(R)-Allyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate (694mg, 1,60mmol), 1,3-dimethylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trion (688mg, 4,41mmol), palladi (II) axetat (14,4mg, 0,06mmol) và triphenylphosphin (50,5mg, 0,19mmol) được hòa tan trong DCM (7ml) và đun nóng đến 35°C trong 1,5 giờ. Huyền phù được tạo thành. DCM (50ml) và dung dịch Na_2CO_3 5% (trong nước) (50ml) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 15 phút. Các pha được tách riêng và pha nước chiết bằng DCM (50ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không. Hợp chất được tinh chế bằng phép HPLC điều chế trên cột Kromasil C8 (10 μm đường kính trong 250x50mm) bằng cách sử dụng gradien 5 – 45% axetonitril trong dung dịch đệm $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{AcOH}$ với tỷ lệ 95/5/0,2 trong 20 phút với tốc độ chảy là 100ml/phút. Hợp chất được bảo vệ bảo vệ bằng tia UV ở 270nm. Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom lại và được làm khô lạnh để thu được 586mg muối của axit

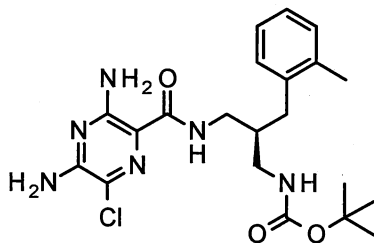
axetic. Muối được khuấy trong EtOAc (50ml) và dung dịch Na_2CO_3 5% (trong nước) trong 15 phút và tiếp theo các pha được tách ra. Pha nước được chiết bằng EtOAc (3x50ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc và làm bay hơi trong chân không để thu được (S)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (411mg, 73,5%) dưới dạng chất rắn màu vàng sáng. Độ tinh khiết bất đối: 60% ee, được xác định bằng cột SFC bất đối: ChiralPak IC (150x4,6mm), cỡ hạt 3 μm , pha di động: 20% MeOH/DEA 100:0,5 trong CO_2 , 120 bar, tốc độ chảy 4ml/phút.

^1H NMR (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1,73 (bs, 2H), 2,01 - 2,12 (m, 1H), 2,50 (s, 3H), 2,64 - 2,73 (m, 2H), 2,76 - 2,86 (m, 2H), 3,4 - 3,53 (m, 2H), 7,19 (bs, 2H), 7,28 - 7,41 (m, 4H), 8,39 (t, 1H).

LC/MS: m/z 349,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 3

(R)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate



(S)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (1,19g, 3,41mmol), BOC_2O (0,871ml, 3,75mmol) và DIPEA (0,596ml, 3,41mmol) được hòa tan trong DCM (100ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được rửa bằng dung dịch HCl 0,1M (trong nước), được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 30 – 70% EtOAc trong heptan trong 9 CV rồi đến 70% EtOAc trong heptan trong 3 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom bằng cách sử dụng bước sóng 268nm. Sản phẩm được làm bay hơi trong chân không để thu được (1,150g, 75%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

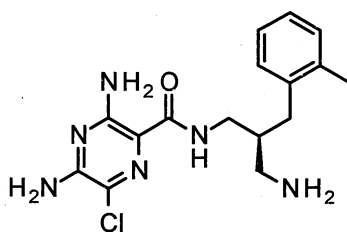
Chất đồng phân đối ảnh được tinh chế bằng cách sử dụng phép HPLC điều chế bất đối (Cột: ChiralPak AY (250x20mm), cỡ hạt 20 μ m, pha di động: heptan/EtOH/TEA với tỷ lệ 20/80:0,1, tốc độ chảy 120m/phút). Hợp chất rửa giải lần đầu được thu gom để thu được 866mg, độ tinh khiết bất đối: 98,6% ee. Độ quay quang $[\alpha]_D^{20} = -6$ (axetonitril, c=1).

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 1,38 (d, 9H), 1,88 - 2 (m, 1H), 2,23 (s, 3H), 2,39 - 2,49 (m, 2H), 2,83 - 2,93 (m, 1H), 2,93 - 3,03 (m, 1H), 3,09 - 3,23 (m, 2H), 6,89 (t, 1H), 6,97 (bs, 2H), 7,04 - 7,15 (m, 3H), 7,22 (d, 1H), 8,01 (t, 1H).

LC/MS: m/z 449,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Bước 4

(S)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit



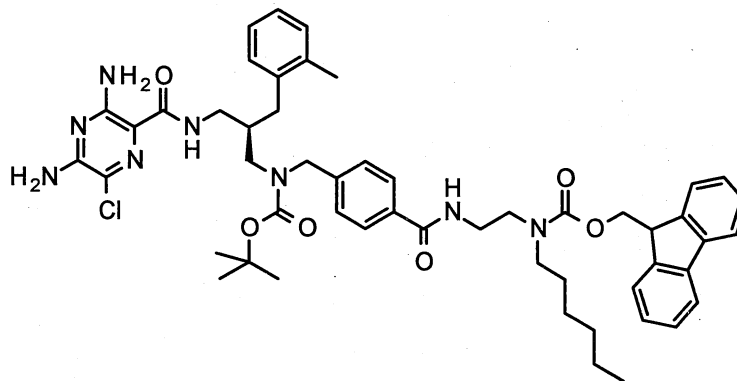
Axetyl clorua (1,422ml, 20mmol) được thêm từng giọt vào bình đã được làm lạnh trong thùng nước đá chứa MeOH (5ml, 123,59mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 5 phút và tiếp đó được thêm vào một bình chứa (R)-tert-butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate (866mg, 1,93mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 45 phút và tiếp theo được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được khuấy trong EtOAc (125ml) và dung dịch NaHCO_3 8% (trong nước) (125ml) trong 15 phút. Các pha được tách riêng và pha nước chiết bằng EtOAc (3x125ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc và làm bay hơi trong chân không để thu được (S)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (459mg, 68,2%) dưới dạng chất rắn màu nhạt. Độ tinh khiết bất đối: 99% ee, được xác định bằng cột SFC bất đối: Lux C4 (150x4,6mm), cỡ hạt 3 μ m, pha di động: 35% EtOH/ NH_3 100:0,5 trong CO_2 , 120 bar, tốc độ chảy 4ml/phút. Độ quay quang $[\alpha]_D^{20} = -45.9$ (CHCl_3 , c=1).

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 1,57 (bs, 2H), 1,78 - 1,88 (m, 1H), 2,26 (s, 3H), 2,39 - 2,48 (m, 2H), 2,52 - 2,62 (m, 2H), 3,18 - 3,28 (m, 2H), 6,95 (bs, 2H), 7,04 - 7,17 (m, 4H), 8,14 (t, 1H).

LC/MS: m/z 349,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 5

(R)-(9H-Floren-9-yl)metyl(2-(4-(((tert-butoxycacbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-metylbenzyl)propyl)amino)metyl)benzamido)etyl)(hexyl)-carbammat



(S)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-metylbenzyl)propyl)-6-clopyrazin-2-carboxamit (215mg, 0,62mmol), (9H-floren-9-yl)metyl (2-(4-formylbenzamido)etyl)(hexyl)carbammat (Chất trung gian H) (293mg, 0,59mmol) và DIPEA (0,103ml, 0,59mmol) được hòa tan trong MeOH (5ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Tiếp theo, natri xyanobohydrua (38,8mg, 0,62mmol) và axit axetic (0,101ml, 1,76mmol) được thêm vào và việc khuấy được tiếp tục trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách thêm dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước). DCM (25ml) và dung dịch NaHCO₃ 8% (trong nước) (25ml) được thêm vào, lắc và các pha được tách riêng. Pha nước được chiết bằng DCM (25ml). Pha hữu cơ thu gom được được làm khô bằng thiết bị tách pha và làm bay hơi trong chân không.

Phần cặn và BOC₂O (0,150ml, 0,65mmol) được hòa tan trong DCM (5ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không. Sản phẩm được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 50g. Gradien từ 50 – 100% of EtOAc trong heptan trong 9 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom bằng cách sử dụng bước sóng 265nm. Các phân đoạn chứa sản phẩm được làm bay hơi trong chân không để thu được (R)-(9H-floren-9-yl)metyl (2-(4-(((tert-butoxycacbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-

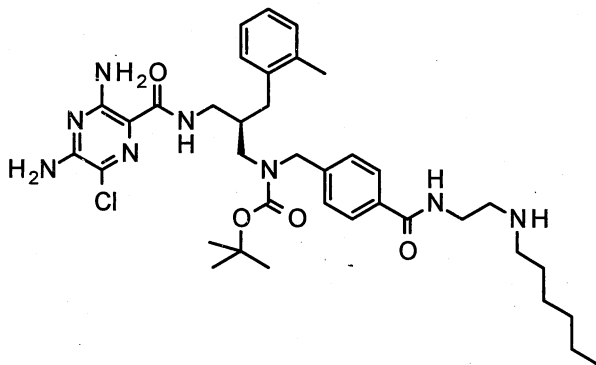
methylbenzyl)propyl)amino)methyl)benzamido)ethyl)(hexyl)carbamate (511mg, 93%) dưới dạng màng không màu.

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 0,82 (t, 3H), 0,87 - 0,96 (m, 1H), 0,99 - 1,26 (m, 6H), 1,27 - 1,5 (m, 10H), 2,19 (s, 3H), 2,23 - 2,35 (m, 1H), 2,8 - 2,9 (m, 1H), 2,9 - 3,04 (m, 1H), 3,05 - 3,39 (m, 10H), 4,16 - 4,32 (m, 3H), 4,39 - 4,57 (m, 2H), 6,88 - 7,18 (m, 8H), 7,30 (t, 2H), 7,39 (t, 2H), 7,55 - 7,76 (m, 4H), 7,77 - 7,99 (m, 3H), 8,37 - 8,52 (m, 1H).

LC/MS: m/z 931,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 6

(R)-tert-Butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate



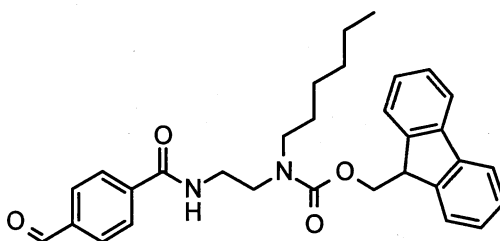
(R)-(9H-Floren-9-yl)methyl (2-(4-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)amino)methyl)benzamido)ethyl)(hexyl)carbamate (511mg, 0,55mmol) được hòa tan trong THF (5ml) và piperidin (0,543ml, 5,49mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 50g. Gradient từ 2,5 - 8% (amoniac 2M trong MeOH) trong DCM trong 9 CV, sau đó thêm tiếp 8% (amoniac 2M trong MeOH) trong DCM trong 3 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom và làm bay hơi trong chân không để thu được (R)-tert-butyl (3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propyl)(4-((2-(hexylamino)ethyl)carbamoyl)benzyl)carbamate (326mg, 84%) dưới dạng chất rắn màu nhạt.

^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 0,84 (t, 3H), 1,12 – 1,45 (m, 17H), 2,20 (s, 3H), 2,24 – 2,36 (m, 1H), 2,51 – 2,58 (m, 2H), 2,69 (t, 2H), 2,92 – 3,05 (m, 1H), 3,05 – 3,4 (m, 7H), 4,22 – 4,37 (m, 1H), 4,38 – 4,54 (m, 1H), 6,97 (bs, 2H), 7,03 – 7,18 (m, 6H), 7,72 (d, 2H), 7,79 – 7,98 (m, 1H), 8,28 – 8,35 (m, 1H).

LC/MS: m/z 709,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Chất trung gian H

(9H-Floren-9-yl)metyl (2-(4-formylbenzamido)etyl)(hexyl)carbamát



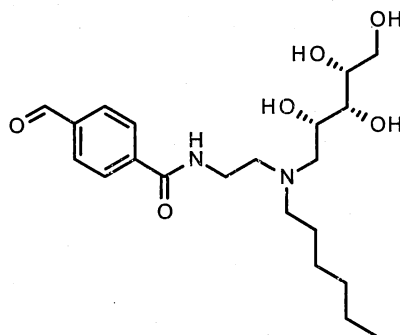
Axit 4-formylbenzoic (0,81g, 5,40mmol) và 4-metylmorpholin (1,424ml, 12,95mmol) được hòa tan trong THF (10ml) và được làm lạnh bằng thùng nước đá. Isobutyl cacbonocloridat (0,700ml, 5,40mmol) được thêm vào từng giọt, hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút và (9H-floren-9-yl)metyl (2-aminoetyl)(hexyl)carbamát hydroclorua (Chất trung gian C) (1,739g, 4,32mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2,5 giờ. Huyền phù tạo thành được chiết giữa EtOAc (50ml) và nước (50ml). Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch axit xitric 5% (2x50ml), Na_2CO_3 10% (trong nước) (50ml), nước muối (50ml), được làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh tự động trên cột Biotage® KP-SIL 100g. Gradient từ 20 – 80% EtOAc trong heptan trong 9 CV sau đó thêm tiếp 80% EtOAc trong heptan trong 3 CV được sử dụng làm pha di động. Sản phẩm được thu gom bằng cách sử dụng bước sóng 260nm. Sản phẩm được làm bay hơi trong chân không để thu được (9H-floren-9-yl)metyl (2-(4-formylbenzamido)etyl)(hexyl)carbamát (1,690g, 79%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 0,82 - 0,95 (m, 3H), 1,08 - 1,46 (m, 8H), 3,02 - 3,21 (m, 3H), 3,48 - 3,64 (m, 3H), 4,16 - 4,25 (m, 1H), 4,51 - 4,74 (m, 2H), 7,2 - 7,42 (m, 5H), 7,5 - 7,67 (m, 3H), 7,75 (d, 2H), 7,93 (q, 3H), 10,06 (s, 1H).

LC/MS: m/z 499,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

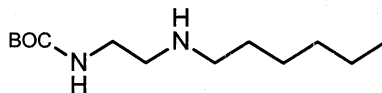
Chất trung gian I

4-Formyl-N-(2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)benzamidit



Bước 1

tert-Butyl 2-(hexylamino)ethylcarbamate



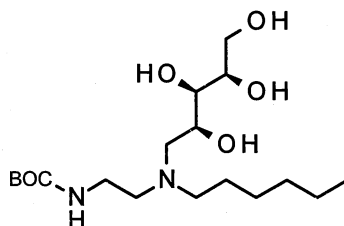
Hexylamin (1020ml, 7,76mol), Na_2CO_3 (206g, 1,94mol) và MeCN (2560ml) được nạp vào bình có vành dung tích 10 lít. Hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến 70°C trong 1 giờ. Dung dịch chứa tert-butyl 2-bromoethylcarbamate (371,3g, 289,6g hoạt chất, 1,29mol) trong MeCN (740ml) được nạp từ từ vào hỗn hợp phản ứng trên trong 1 ½ giờ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 70°C qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến 50°C và được cô trong chân không. Nước (2100ml) và EtOAc (4200ml) được nạp vào phần cạn đã được khuấy. Các lớp được tách riêng và pha hữu cơ được rửa bằng nước (3 x 2100ml). Pha hữu cơ được cô trong chân không và được chưng cất đẳng phí liên tục với nước (3 x 870ml) và EtOH (3 x 870ml) để thu được 368,6g (315,8g hoạt chất, hiệu suất định lượng) của giai đoạn 1 dưới dạng dầu trong suốt.

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ 4,95 (1H, br s), 3,29 – 3,19 (m, 2H), 2,71 (t, 2H), 2,58 (t, 2H), 1,50 – 1,40 (br. m, 11H), 1,35 – 1,23 (m, 6H), 0,89 (t, 3H).

LC/MS: m/z 245 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 2

tert-Butyl 2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethylcarbamate



D-xyloza (124,3g, 0,83mol), tert-butyl 2-(hexylamino)ethylcarbamate (Bước 1, 181,8g, 155,8g hoạt chất, 0,49mol), EtOH (5000ml) và DIPEA (110,8ml, 0,64mol) được nạp vào bình có vành dung tích 10 lít. Hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến 35°C trong 1 giờ, cho đến khi được hòa tan. AcOH (36,5ml, 0,64mol) được nạp vào dung dịch phản ứng này và hỗn hợp tạo thành được khuấy ở 35°C trong 15 phút. NaCNBH_3 (56,1g, 0,89mol) được nạp từng phần vào hỗn hợp phản ứng này trong 5 phút ở 35°C . Không thấy có sự tỏa nhiệt hoặc bay hơi khí. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 35°C qua đêm. NaCNBH_3 (8,0g, 0,13mol) được nạp vào hỗn hợp phản ứng và được khuấy ở 35°C trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được để nguội đến nhiệt độ trong phòng qua đêm. Dung dịch bão hòa trong nước NaHCO_3 (1600ml) được thêm vào hỗn hợp phản ứng trong 10 phút, quan sát thấy phản ứng tỏa nhiệt nhẹ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua cuối tuần. EtOH được loại bỏ trong chân không và được kết hợp với mẻ thứ hai có cùng quy mô (181,8g như giai đoạn 1) để được xử lý tiếp. NaCl (311g) được nạp vào hỗn hợp phản ứng. Pha hữu cơ được chiết bằng dung dịch MeOH 10% /DCM (3 x 3000ml) và pha hữu cơ thu gom được được cô trong chân không. Phần cặn tạo thành được tinh chế bằng cách sắc ký (SiO_2 , 7kg), tải nạp và được rửa giải bằng dung dịch 5% MeOH/DCM + dung dịch 0,2% NH_3 7N trong MeOH (35 lít), 50% MeOH/DCM + 0,2% 7 N NH_3 trong MeOH (75 lít), tiếp theo, rửa dội bằng 65% MeOH/DCM + 0,2% 7 N NH_3 trong MeOH (20 lít). Sản phẩm chứa các phân đoạn được kết hợp lại, làm bay hơi trong chân không và được chưng cất

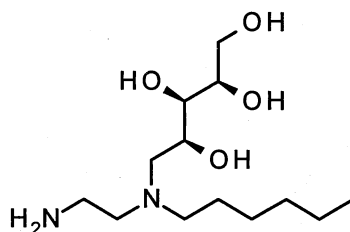
đồng sôi với MeOH (2 x 500ml) để thu được 387g (366g hoạt chất, 76%) hợp chất nêu ở đề mục phụ dưới dạng gồm màu vàng.

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6) δ 6,80 (br.s, 1H), 4,80 – 4,30 (br. m, 3H), 4,22 – 4,05 (br. m, 1H), 3,74 – 3,60 (br. m, 1H), 3,59 – 3,48 (m, 1H), 3,47 – 3,20 (m, 6H), 3,08 – 2,87 (br. m, 2H), 2,70 – 2,45 (br. m, 3H), 1,51 – 1,35 (m, 10H), 1,32 – 1,16 (m, 7H), 0,85 (t, 3H).

LC/MS: m/z 401 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 3

(2R,3R,4S)-5-((2-Aminoethyl)(hexyl)amino)pentan-1,2,3,4-tetraol



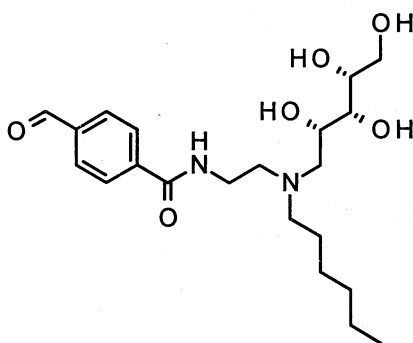
Dung dịch HCl 4M trong dioxan (1710ml, 6,84mol) được nạp vào dung dịch chứa tert-butyl 2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethylcarbamate (Bước 2, 365g, 345g hoạt chất, 0,91mol) trong MeOH (520ml) ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, duy trì nhiệt độ $< 31^\circ\text{C}$. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không để thu được 485,1g (306g hoạt chất, 95%) hợp chất nêu ở đề mục phụ dưới dạng hắc ín màu đen tím.

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6) δ 8,41 (br. s, 3H), 4,20 – 3,00 (br. m, 16H), 1,77 – 1,62 (br. m, 2H), 1,37 – 1,17 (br. m, 6H), 0,87 (br. t, 3H).

MS ES: m/z 279 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 4

4-Formyl-N-(2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)benzamidit



Axit 4-formylbenzoic (107,6g, 0,72mol) và DMF (1400ml) được nạp vào bình có vành ở cổ dung tích 5 lít ở nhiệt độ trong phòng. 4-Metylmorpholin (255,5ml, 2,3mol) được nạp vào hỗn hợp phản ứng thu được. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến -15°C trong 5 phút. Isobutyl cloformat (93,4ml, 0,71mol) được nạp vào hỗn hợp này trong 15 phút, duy trì nhiệt độ phản ứng $< -10^{\circ}\text{C}$. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến -15°C trong 1 giờ. Trong một bình riêng biệt khác, (2R,3R,4S)-5-((2-aminoethyl)(hexyl)amino)pentan-1,2,3,4-tetraol (Bước 3, 383,9g, 245,7g hoạt chất, 0,71mol) được hòa tan trong DMF (1400ml) và 4-metylmorpholin (123ml, 1,1mol) ở 45°C trong 1 giờ. Hỗn hợp chứa sản phẩm từ Bước 3 được nạp vào hỗn hợp anhydrit đã được trộn trong 15 phút, duy trì nhiệt độ phản ứng $< -5^{\circ}\text{C}$. Hỗn hợp tạo thành được để ấm đến nhiệt độ trong phòng qua đêm. Dung dịch NaHCO_3 bão hòa trong nước (2500ml) được nạp từ từ vào hỗn hợp phản ứng này trong 30 phút. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không. Dung dịch NaHCO_3 bão hòa trong nước (1200ml) được nạp vào phần cặn và được khuấy bằng DCM (4900ml) trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các lớp được tách riêng và lớp nước được chiết bằng 13% MeOH/DCM (2870ml). Pha hữu cơ thu gom được rửa bằng dung dịch NaHCO_3 bão hòa trong nước (1200ml) và được cô trong chân không để thu được 395,3g. Phần cặn được kết hợp với 10g chất thô thu được từ phản ứng ở quy mô chất trung gian và được tinh chế bằng cách sắc ký [SiO_2 , 3kg; được tải nạp với 5% MeOH/DCM; được rửa giải bằng 5% MeOH/DCM (30 lít), 10% MeOH/DCM (20 lít), 20% MeOH/DCM (10 lít), 30% MeOH/DCM (30 lít), 40% MeOH/DCM (20 lít) và 100% MeOH (80 lít)]. Các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp lại (100 lít) và được cô trong chân không để thu được 138,4g (112g hoạt chất, 39% hiệu suất) hợp chất nêu ở đề mục phụ này. ^1H NMR cho thấy hoạt tính với 81,4% trọng lượng với độ tạp chất formylbenzamidit còn lại khoảng 5,5%. Phép phân tích

HPLC-MS cho thấy độ tinh khiết 97,4%. Các phân đoạn hỗn hợp (20 lít) được kết hợp lại và được cô trong chân không để thu được 46g chất có độ tinh khiết là 74,5% theo HPLC. Chất này được tinh chế lại bằng cách sắc ký (SiO_2 , 600g), rửa giải bằng 10%-30% MeOH/DCM (18 lít). Các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp lại và được cô trong chân không để thu được 21,0g nữa (20,3g hoạt chất, 44%) hợp chất nêu ở đề mục phụ này.

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6): δ 10,08 (s, 1H), 8,60 (t, 1H), 8,02 (d, 2H), 7,97 (d, 2H), 4,70 – 4,20 (br. m, 4H), 3,66 – 3,52 (m, 2H), 3,46 – 3,34 (m, 8H), 2,65 – 2,58 (m, 2H), 2,51 – 2,44 (m, 2H), 1,40 – 1,28 (br. m, 2H), 1,19 – 1,08 (m, 6H), 0,79 (t, 3H).

LC/MS: m/z 411 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

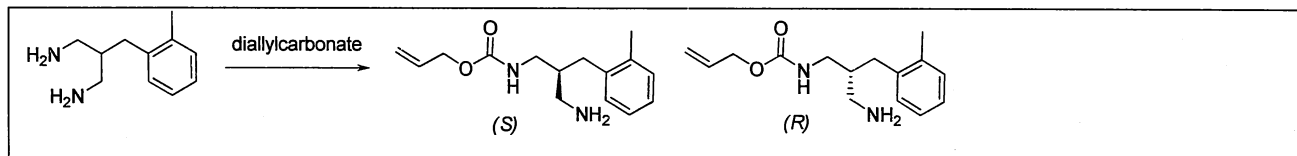
Khử đối xứng 2-(2-metylbenzyl)propan-1,3-diamin bằng enzym

Quá trình khử đối xứng 2-(2-metylbenzyl)propan-1,3-diamin bằng enzym được thực hiện bằng cách sử dụng dialylcacbonat và một khoảng các lipaza không di động.

Thử nghiệm lipaza không di động: dialylcacbonat (0,507ml, 3,53mmol) được thêm vào dung dịch chứa 2-(2-metylbenzyl)propan-1,3-diamin (0,60g, 3,37mmol) trong 1,4-dioxan (30ml). các phần phân ước 1,0ml dung dịch này được thêm vào ống thử nghiệm dung tích 10ml có nắp đậy bằng ren chứa enzym (0,02g) được mô tả trong Bảng 1. Các ống được lắc ở tốc độ 500 vòng/phút/30°C trong 3 ngày. Mỗi ống được lấy mẫu và được phân tích bằng phép HPLC pha ngược (4,6 x 50mm Thermoquest Hypercarb, phát hiện UV ở 260nm) và HPLC bất đối (4,6 x 250mm Chiralpak IC3, phát hiện UV ở 260nm).

6 lipza đã được thử nghiệm cho thấy rằng, nhiều hơn 20% chuyển hóa sau 3 ngày (Bảng 1).

Bảng 1



Enzym	Mức độ chuyển hóa ¹	Tỷ lệ R/S ²
IMM CALB (Candida Antartica Lipaza B)	33,2	0,87
IMM CALBY (Candida Antartica Lipaza B)	52,8	0,81
Novozym 435 (Candida Antarctica Lipaza B)	75,8	1,76
Amano Lipaza PS-C1 (Pseudomonas Cepacia Lipaza)	31,4	9,8
Amano Lipaza PS-IM (Pseudomonas Cepacia Lipaza)	21,2	5,0
Amano Lipaza PS-D (Pseudomonas Cepacia Lipaza)	33,4	12,3
Không có enzym (Đối chứng)	-	-

¹Mức độ chuyển hóa thành mono-allyl carbamat được thể hiện bằng % diện tích từ HPLC.

²Tỷ lệ R/S được thể hiện bằng % diện tích chất đồng phân đối ảnh R chia cho % diện tích chất đồng phân đối ảnh S từ HPLC bất đối.

Thử nghiệm dung môi bằng Amano Lipaza PS-IM: thử nghiệm dung môi bằng Amano Lipaza PS-IM được thực hiện trong 20 thể tích tương đối của dung môi bằng 1,1 đương lượng dialylcacbonat, 1 đương lượng khối lượng Amano PS-IM và 0,1g 2-(2-metylbenzyl)propan-1,3-diamin. Sau 6 ngày ở 30°C, thử nghiệm được lấy mẫu bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như được mô tả đối với thử nghiệm lipaza (Bảng 2). 2-(2-Metylbenzyl)propan-1,3-diamin không được hòa tan hoàn toàn trong dung môi không phân cực, như methyl t-butyl ete, heptan và xyclohexan. Tuy nhiên, việc thêm THF vào mỗi dung môi sẽ cho phép diamin được hòa tan và hỗn hợp dung môi với tỷ lệ 1:1 trên đây sẽ được thử nghiệm. Kết quả gợi ý rằng, 2-MeTHF sẽ cho độ chọn lọc đồng phân đối ảnh tốt nhất, bất kể phản ứng cơ bản như thế nào. Để làm giảm đến mức thấp nhất phản ứng carboxyl hóa cơ bản ở 2-MeTHF, quy mô thử nghiệm 1g chất được thực hiện ở 30°C với lượng dư Amano lipaza PS-IM (3 đương lượng khối lượng pha không di động, 1,2 đương lượng dialylcacbonat, 20 thể tích 2-MeTHF). Phản ứng được tiến hành đến hoàn thành trong 3 ngày và sau khi xử lý, (R)-monoallylcarbammat 1-(R) thô được tách ra có 85% ee. Chuyển hóa sản phẩm thô thành muối D-tartarat tương ứng trong etanol sẽ làm gia tăng lượng dư đồng phân đối ảnh đến 91,0% (tổng hiệu suất 58% từ diamin).

Bảng 2

Dung môi	Mức độ chuyển hóa ¹	Tỷ lệ R/S ²
TBME:THF (1:1)	72,8	6,25
Heptan: THF (1:1)	88,4	5,45
Xyclohexan:THF (1:1)	89,8	6,81
Toluen	52,5	6,63
THF	36,8	4,91
MeTHF	86,2	7,06
MeTHF (Không có enzym)	24,8	-

¹Mức độ chuyển hóa thành mono-allyl carbamat được thể hiện bằng % diện tích từ HPLC.

²Tỷ lệ R/S được thể hiện bằng % diện tích chất đồng phân đối ảnh R chia cho % diện tích chất đồng phân đối ảnh S từ HPLC bất đối.

Thử nghiệm khoang Ussing ENaC kênh Natri

Tế bào biểu mô phế quản sơ cấp của người được biệt hóa ở bề mặt giao diện khí-lỏng (air-liquid interface: ALI) trên tấm hỗ trợ thấm dạng lỗ xoắn tròn ốc (Snapwell) (MatTek Corporation, MA, USA, cat no AIR-100-SNP) được duy trì trong môi trường nuôi cấy ALI trong thiết bị ủ được giữ ẩm ở 37°C và 5% CO₂. Môi trường đáy bên (MatTek Corporation, MA, USA cat no AIR-100-MM-ASY) được thay đổi vào ngày thứ hai. Dịch nhầy hoặc dịch lỏng được hình thành trên mặt đỉnh được khuấy trộn nhẹ sau mỗi ngày thứ hai để duy trì khả năng tồn tại và đặc tính của các tế bào.

Điện áp chuyển biểu mô giữa màng đỉnh và màng đáy bên được xác định bằng cách sử dụng khoang Ussing là khoang Ussing được sản xuất nội bộ, theo trục thẳng đứng, kẹp DVC-1000 V/C có bộ tiền khuếch đại (World Precision Instruments), bộ điện cực (EK1, World Precision Instruments), phần mềm Power Lab Chart5, thùng nước được tuần hoàn bên ngoài và phân phối khí carbogen và hệ điều chỉnh. Điện cực được sử dụng khi thiết lập hệ thống được thả bằng tay bằng cách sử dụng 4% agarosa trong NaCl 0,9% vô trùng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Khoang Ussing được lắp ráp với màng lỗ xoắn tròn ốc rỗng (Costar 3407) và các điện cực được chứa trong dung dịch đệm Krebs (SIGMA-ALDRICH cat no K3753)

trong 1 giờ ở 37°C với sự có mặt của 95% oxy và 5% cacbon dioxit. Sau bước cân bằng này, hệ thống được bù cho điện trở của dịch lỏng và điện áp lệch không đầu vào.

Trước khi thử nghiệm, môi trường nuôi cấy ALI được đánh giá về điện trở chuyển biểu mô (Trans Epithelial Electric Resistance: TEER) bằng thiết bị EndOhm (World Precision Instruments), các tế bào có điện trở nằm trong khoảng từ 400 đến 600 Ôm được sử dụng.

Khoang đã được làm cân bằng được kết nối lại với lỗ xoắn tròn ốc chứa các tế bào ALI và sau 20 phút ổn định, các liều tích lũy của hợp chất được thêm vào phía đỉnh (apex) của màng. Sau đó, mức liều cuối cùng Benzamil 10 μ M được thêm vào để đạt tới mức tối đa.

Tất cả các hợp chất thử nghiệm, bao gồm cả hợp chất đối chứng, được pha loãng từ dung dịch gốc 10mM trong DMSO 100% và được thêm vào đĩa 96 lỗ mờ đục (Greiner, Cat No. 651201). Pha loãng liên tục 12 mức liều được chuẩn bị trong DMSO, bắt đầu bằng 3 μ M sau đó tiếp tục bước pha loãng 10 lần nữa.

Phần mềm Chart5 for Windows được sử dụng để xác định giá trị của dòng đoản mạch sau mỗi khi thêm hợp chất. Dữ liệu được chuyển sang Excel và được phân tích bằng cách sử dụng chương trình IDBS XLfit® 5,2 (ID Business Solutions Ltd). Nồng độ mol của hợp chất thử nghiệm hoặc hợp chất đối chứng tạo ra mức ức chế 50% (đường cong IC50) thu được bằng cách làm khít dữ liệu với hàm số logic 4 thông số có dạng:

$$y = (A + ((B - A) / (1 + (((10^C) / x)^D))))$$

A: Đoạn bằng dưới đáy của đường cong, tức là giá trị y tối thiểu cuối cùng

B: Đoạn bằng trên đỉnh của đường cong, tức là giá trị y tối thiểu cuối cùng

C: Giá trị $\log_{10}x$ ở giá trị nồng độ y là 50%

D: Hệ số nghiêng Hill

x: Giá trị x đã biết

Bảng 1 thể hiện các giá trị pIC₅₀ của các Ví dụ từ 1 đến 14.

Bảng 1

Ví dụ số	pIC ₅₀	Ví dụ số	pIC ₅₀
1	9,5	8	9,5
2	8,6	9	8,6
3	10,1	10	8,6
4	9,2	11	8,8
5	9,0	12	9,6
6	9,5	13	10,1
7	8,9	14	7,5

Ước tính mức độ thấm qua màng nhầy ruột bằng cách sử dụng tế bào đơn lớp Caco-2

Các tế bào Caco-2 được nuôi trồng trong môi trường Đại bàng biến tính Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's medi: DMEM) trên đĩa chuyển 96 lỗ Transwell, màng polycarbonat được đưa vào trong 15 ngày cho đến khi đạt được sự nhập dòng và biệt hóa. Sau khi đánh giá tính nguyên vẹn bằng cách đo điện trở chạy qua, các tế bào đơn lớp được rửa 2 lần bằng HBSS (HEPES 25mM, độ pH=7,4) và được ủ ở 37°C trong 30 phút.

Dung dịch gốc chứa hợp chất thử nghiệm trong DMSO được pha loãng bằng dung dịch HBSS (chứa vàng Lucifer 100μM) để đạt được nồng độ cuối cùng là 10μM; tất cả bước ủ được thực hiện lặp hai. Để xác định tỷ lệ vận chuyển được chất theo hướng từ khoang đỉnh sang khoang đối bên (A sang B), 100μl dung dịch chứa hợp chất thử nghiệm được thêm vào khoảng đỉnh của đĩa chuyển Transwell. Khoang đối bên được nạp đầy bằng 300μl HBSS.

Để xác định sự vận chuyển từ khoang đối bên sang khoang đỉnh (B sang A), khoang đối bên được nạp đầy 300μl dung dịch chứa hợp chất thử nghiệm và 100μl HBSS được thêm vào khoang đỉnh.

Sau khi ủ đĩa ở 37°C trong 2 giờ, 50μl dung dịch từ mỗi khoang được loại bỏ và chuyển sang đĩa 96 lỗ để xác định mức phát huỳnh quang trong thiết bị đọc đĩa thích hợp ở bước sóng kích thích 485nm và bước sóng phát xạ 530nm để theo dõi tính nguyên vẹn của lớp đơn. Để phân tích độ thấm của hợp chất thử nghiệm, 3 thể tích metanol lạnh được thêm vào mỗi mẫu dung dịch đệm và các mẫu được ly tâm ở 4°C

trong 15 phút. Một phần phân ước 5µl chất nổi lên trên được sử dụng cho phép phân tích LC/MS/MS.

Độ thấm biểu kiến (Papp, tính theo cm/s) có thể được tính bằng cách sử dụng phương trình sau đây:

$$P_{app} = \frac{V_A}{DT \times TG} \times \frac{[Duocchat]_{cho}}{[Duocchat]_{bandau, nhan}}$$

trong đó:

V_A là thể tích (ml) trong lỗ nhận (0,3ml từ đỉnh sang đối bên),

DT là diện tích bề mặt của màng (0,143cm² đối với màng hỗ trợ thấm 96 lỗ HTS Transwell), và

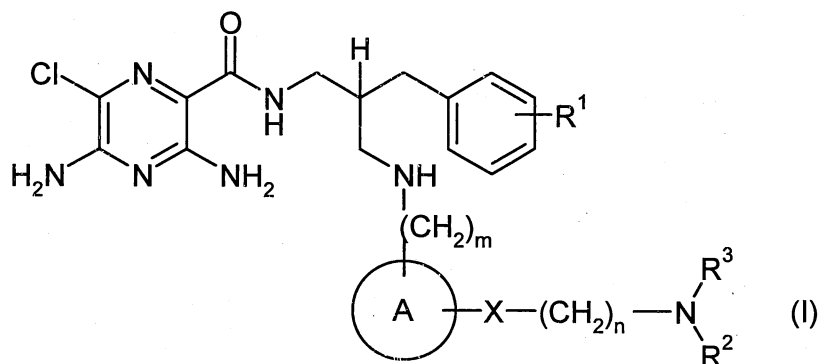
TG là tổng thời gian vận chuyển tính theo s.

Độ thấm biểu kiến theo hướng từ khoang đỉnh sang khoang đối bên (Môi trường A sang B, Papp, 1E-6,cm/s) được xác định cho mỗi hợp chất theo các Ví dụ từ 1 đến 16. Độ thấm không biểu kiến có thể được phát hiện cho hợp chất bất kỳ của các Ví dụ theo hướng từ khoang đỉnh sang khoang đối bên. Hợp chất mà có độ thấm thấp có thể được mong muốn để giải phóng chất ức chế ENaC bằng cách sử dụng qua đường hít.

Phần mô tả các phương án minh họa trên đây chỉ nhằm giải thích cho người có hiểu biết trung bình trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này về sáng chế, mục đích của nó và thực tiễn áp dụng sao cho người có hiểu biết trung bình trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng điều chỉnh và áp dụng sáng chế ở nhiều dạng khác nhau, chúng cũng có thể là thích hợp nhất cho những yêu cầu sử dụng cụ thể. Phần mô tả và các ví dụ cụ thể này, trong khi thể hiện các phương án của sáng chế, chỉ nhằm mục đích minh họa. Do đó, sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án có tính minh họa được mô tả trong bản mô tả này, và có thể được biến đổi khác nhau. Ngoài ra, rõ ràng rằng, các dấu hiệu khác nhau của sáng chế được mô tả trong các phương án riêng biệt, để làm cho rõ ràng, còn có thể được kết hợp lại để tạo ra phương án duy nhất. Ngược lại, nhiều dấu hiệu khác nhau của sáng chế được mô tả trong các phương án riêng biệt, để làm cho ngắn gọn, còn có thể được kết hợp lại để tạo ra phương án phụ của nó.

Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất có công thức (I):



trong đó:

R^1 được chọn từ hydro hoặc C_{1-4} alkyl;

m là 1 hoặc 2;

A được chọn từ phenyl hoặc heterocyclyl;

X được chọn từ $-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^4-$ hoặc $-O-C(=O)-NR^5-$;

n là 2 hoặc 3;

R^2 được chọn từ hydro hoặc C_{1-8} alkyl;

R^3 là C_{5-6} alkyl-OH, trong đó nhóm C_{5-6} alkyl nêu trên còn được thể thêm bằng 3 hoặc 4 nhóm -OH nữa; và

R^4 và R^5 độc lập được chọn từ hydro hoặc C_{1-4} alkyl;

hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^1 là C_{1-4} alkyl và R^4 và R^5 đều là hydro.

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc điểm 2, hoặc muối được dụng của nó, trong đó A là phenyl.

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, hoặc muối được dụng của nó, trong đó X là $-C(=O)-NR^4-$.

5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó:

R^1 là C_{1-4} alkyl;

m là 1;

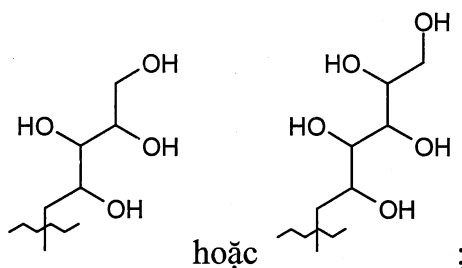
A là phenyl;

X là $-C(=O)-NH-$;

n là 2;

R^2 là C_{1-8} alkyl;

và R^3 được chọn từ chất sau đây:



hoặc muối được dụng của nó.

6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^2 là n-hexyl.

7. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được chọn từ:

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-2-(2-metylbenzyl)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)amino)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)etyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)etylcarbamoyl)piperidin-4-yl)metyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)metyl)amino)-2-(2-metylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(4-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)butanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-2-(2-methylbenzyl)-3-((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexylamino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((1-(3-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)propanoyl)piperidin-4-yl)methylamino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

4-(((R)-3-(3,5-diamino-6-clopyrazin-2-carboxamido)-2-(2-methylbenzyl)propylamino)methyl)phenyl 2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethylcarbamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

3,5-diamino-6-clo-N-((R)-3-((4-((2-(hexyl((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)amino)ethyl)carbamoyl)phenethyl)amino)-2-(2-methylbenzyl)propyl)pyrazin-2-carboxamit;

hoặc muối được dụng của nó.

8. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

9. Hỗn hợp chứa hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, và một hoặc nhiều tác nhân được chọn từ nhóm các chất sau đây:

- chất chủ vận nhận thụ thể beta-adreno;
- chất đối kháng thụ thể muscarinic;
- chất đối kháng thụ thể muscarinic và chất chủ vận thụ thể nhận beta-adreno kết hợp;
- chất chủ vận thụ thể giống Toll (như chất chủ vận TLR7 hoặc TLR9);
- chất đối kháng adenosin;
- chất chủ vận thụ thể glucocorticoid (steroidal hoặc không-steroidal);
- chất đối kháng p38;
- chất đối kháng IKK2;
- chất đối kháng PDE4;
- chất điều biến chức năng thụ thể chemokin (như chất đối kháng thụ thể CCR1, CCR2B, CCR5, CXCR2 hoặc CXCR3);
- chất đối kháng CRTh2; hoặc
- chất thẩm thấu, như muối tăng trương lực.