



(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) 
1-0020699

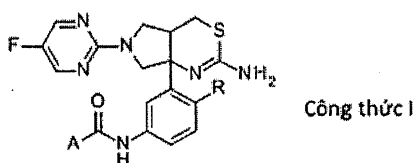
(51)⁷ **C07D 513/04, A61K 31/547, A61P**
25/28

(13) **B**

-
- (21) 1-2015-03293 (22) 04.03.2014
(86) PCT/US2014/020070 04.03.2014 (87) WO2014/143579 18.09.2014
(30) 61/776,819 12.03.2013 US
(45) 25.04.2019 373 (43) 25.12.2015 333
(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America
(72) GREEN, Steven James (US), MERGOTT, Dustin James (US), WATSON, Brian
Morgan (US), WINNEROSKI JR., Leonard Larry (US)
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

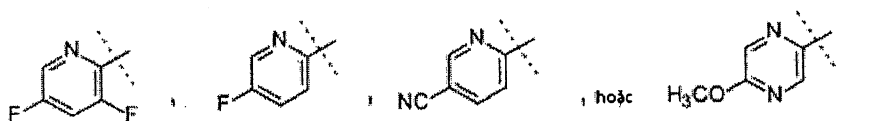
(54) **HỢP CHẤT TETRAHYDROPYROLOTHIAZIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY**

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



trong đó R là H hoặc F; và

A là:



hoặc muối dược dụng của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập hợp chất tetrahydropyrolotiazin, được phẩm chứa hợp chất này, và chất trung gian và quy trình hữu dụng để tổng hợp hợp chất này. Hợp chất này là hữu ích để điều trị các rối loạn sinh lý.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế thuộc lĩnh vực điều trị bệnh Alzheimer và các bệnh và rối loạn khác liên quan đến amyloid β (Abeta) peptit, một đoạn peptit gây độc cho thần kinh và có độ kết tụ cao của protein tiền chất amyloid (APP). Bệnh Alzheimer là rối loạn thoái hóa thần kinh gây hủy hoại mà đã ảnh hưởng đến hàng triệu bệnh nhân trên thế giới. Xét theo các chất hiện được chấp nhận trên thị trường mà chỉ mang lại lợi ích triệu chứng thoáng qua cho bệnh nhân, vẫn có nhu cầu chưa được đáp ứng thỏa đáng trong việc điều trị bệnh Alzheimer.

Bệnh Alzheimer khác biệt bởi sự sản sinh, kết tụ, và phân hủy Abeta trong não. Việc ức chế hoàn toàn hoặc một phần β -secretase (enzym phân cắt protein tiền chất amyloid vị trí β ; BACE) mà đã thể hiện là có tác dụng đáng kể đến các bệnh lý liên quan đến mảng tinh bột và phụ thuộc vào mảng tinh bột ở mô hình chuột nhắt đã gợi ý rằng việc làm giảm một lượng nhỏ hàm lượng A β peptit có thể dẫn đến việc làm giảm đáng kể gánh nặng mảng tinh bột và thiếu hụt synap thần kinh trong thời gian dài, nhờ đó mang lại lợi ích điều trị đáng kể, đặc biệt là trong việc điều trị bệnh Alzheimer.

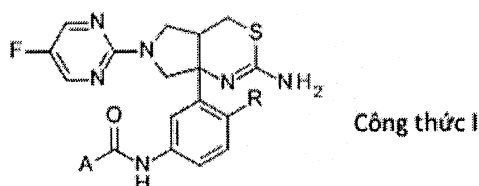
US 2009/0209755 bộc lộ dẫn xuất aminodihydrothiazin ngưng tụ mà có hoạt tính ức chế BACE và cũng được bộc lộ là tác nhân điều trị hữu dụng đối với bệnh thoái hóa thần kinh do A β peptit gây ra, như bệnh suy giảm trí nhớ kiểu Alzheimer. Ngoài ra, J. Neuroscience, 31(46), trang 16507-16516 (2011) đã bộc lộ (S)-4-(2,4-difluoro-5-pyrimidin-5-yl-phenyl)-4-methyl-5,6-dihydro-4H-[1,3]thiazin-2-ylamin, một chất ức chế BACE hoạt động ở CNS sử dụng qua đường miệng.

Chất ức chế BACE mà có hiệu lực đủ để xuyên qua CNS là được mong muốn để điều trị các rối loạn do Abeta peptit gây ra, như bệnh Alzheimer. Sáng chế đề xuất một

số hợp chất mà là chất ức chế BACE tiềm năng. Ngoài ra, sáng chế đề xuất một số hợp chất mà xuyên qua được CNS.

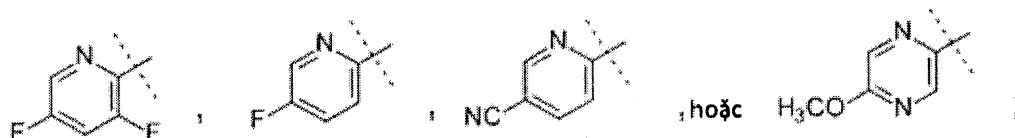
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất có công thức I:



trong đó R là H hoặc F; và

A là:



hoặc muối dược dụng của nó.

Phần mô tả còn bộc lộ phương pháp điều trị bệnh Alzheimer ở bệnh nhân, bao gồm bước cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của nó với lượng hữu hiệu trị liệu.

Phần mô tả còn bộc lộ phương pháp ngăn ngừa sự tiến triển tình trạng tổn thương nhận thức nhẹ thành bệnh Alzheimer ở bệnh nhân, bao gồm bước cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của nó với lượng hữu hiệu trị liệu.

Phần mô tả còn bộc lộ phương pháp ức chế BACE ở bệnh nhân, bao gồm bước cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của chúng với lượng hữu hiệu trị liệu.

Phần mô tả còn bộc lộ phương pháp ức chế sự phân cắt protein tiền chất amyloid do BACE gây ra, bao gồm bước cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của chúng với lượng hữu hiệu trị liệu.

Phần mô tả còn bộc lộ phương pháp ức chế việc sản sinh Abeta peptit, bao gồm bước cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng với lượng hữu hiệu trị liệu.

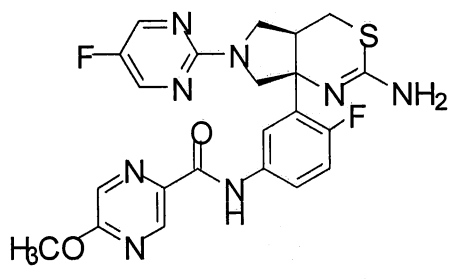
Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I hoặc muối được dụng của chúng để sử dụng trong phác đồ điều trị, cụ thể là để điều trị bệnh Alzheimer hoặc để ngăn ngừa tiến triển của tình trạng tổn thương nhận thức nhẹ thành bệnh Alzheimer. Ngoài ra, phần mô tả còn bộc lộ việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh Alzheimer. Phần mô tả còn bộc lộ việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, để sản xuất thuốc để ngăn ngừa sự tiến triển của tình trạng tổn thương nhận thức nhẹ thành bệnh Alzheimer. Phần mô tả còn bộc lộ việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, để sản xuất thuốc để ức chế BACE. Phần mô tả còn bộc lộ việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, để sản xuất thuốc để ức chế việc sản sinh Abeta peptit.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm, chứa hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, kết hợp với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng. Theo một phương án cụ thể, được phẩm còn chứa một hoặc nhiều tác nhân điều trị khác. Sáng chế còn bao gồm các chất trung gian và quy trình mới để tổng hợp hợp chất có công thức I.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tình trạng tổn thương nhận thức nhẹ đã được xác định là pha triệu chứng báo trước tiềm tàng của bệnh suy giảm trí nhớ kèm theo bệnh Alzheimer dựa trên biểu hiện lâm sàng và tiến triển của bệnh nhân có biểu hiện tình trạng tổn thương nhận thức nhẹ thành bệnh suy giảm trí nhớ Alzheimer theo thời gian. (Morris, *et al.*, *Arch. Neurol.*, **58**, 397-405 (2001); Petersen, *et al.*, *Arch. Neurol.*, **56**, 303-308 (1999)). Thuật ngữ “ngăn ngừa sự tiến triển của tình trạng tổn thương nhận thức nhẹ thành bệnh Alzheimer” bao gồm việc làm chậm, làm ngừng, hoặc thay đổi tiến triển của tình trạng tổn thương nhận thức nhẹ thành bệnh Alzheimer ở bệnh nhân.

Hợp chất được ưu tiên là:



hoặc muối được dụng của chúng, trong đó bazơ tự do được đặc biệt ưu tiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “điều trị” hoặc “để điều trị” bao gồm việc hạn chế, việc làm chậm, ngừng, hoặc đảo ngược tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn vốn có.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh nhân" được dùng để chỉ người.

Thuật ngữ “ức chế việc sản sinh Abeta peptit” được dùng để chỉ việc làm giảm hàm lượng Abeta peptit *in vivo* ở bệnh nhân.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng hữu hiệu trị liệu” được dùng để chỉ lượng hoặc liều hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của chúng mà, khi sử dụng liều đơn hoặc đa cho bệnh nhân, mang lại tác dụng mong muốn cho bệnh nhân đang chẩn đoán hoặc điều trị.

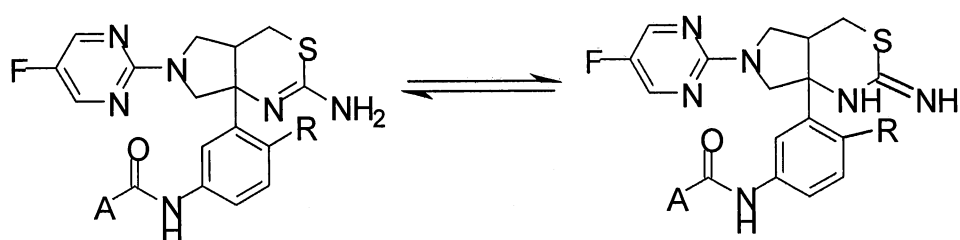
Lượng có hiệu quả có thể được bác sĩ khám bệnh, như là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, xác định dễ dàng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát các kết quả thu được trong các hoàn cảnh tương tự. Để xác định lượng hữu hiệu trị liệu cho bệnh nhân, một số yếu tố sẽ được bác sĩ khám bệnh cân nhắc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: kiểu bệnh nhân; cỡ người, độ tuổi, và tình trạng sức khỏe nói chung; bệnh hoặc rối loạn cụ thể mắc phải; mức độ mắc bệnh hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn; đáp ứng của cá thể bệnh nhân; hợp chất cụ thể được sử dụng; đường dùng; đặc tính sinh khả dụng của chế phẩm được sử dụng; chế độ liều được chọn; việc sử dụng các thuốc kèm theo; và các tình huống liên quan khác.

Hợp chất theo sáng chế thường có hiệu quả trong khoảng liều rộng. Ví dụ, liều dùng mỗi ngày thường nằm trong khoảng từ 0,01 đến khoảng 20mg/kg thể trọng. Trong một số trường hợp, liều dùng thấp hơn giới hạn dưới của khoảng liều nêu trên có thể cao hơn trung bình, còn trong trường hợp khác thì liều cao hơn có thể được sử dụng mà có tác dụng phụ có thể chấp nhận được, và do đó khoảng liều nêu trên không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Tốt hơn nếu hợp chất theo sáng chế được bào chế dưới dạng dược phẩm được sử dụng bằng đường dùng bất kỳ mà làm cho hợp chất sinh khả dụng, bao gồm dùng qua đường miệng và dùng ngoài đường tiêu hóa. Tốt nhất nếu, các dược phẩm này để dùng qua đường miệng. Dược phẩm và quy trình bào chế chúng đã được biết rõ trong lĩnh vực. (Ví dụ, xem, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại ở dạng đồng phân hỗn hợp, như được biểu thị trên Sơ đồ A. Khi viện dẫn đến một trong các chất đồng phân hỗn hợp cụ thể của hợp chất theo sáng chế, cần hiểu rằng nó bao gồm cả hai dạng chất đồng phân hỗn hợp và tất cả các hỗn hợp của chúng.

Sơ đồ A

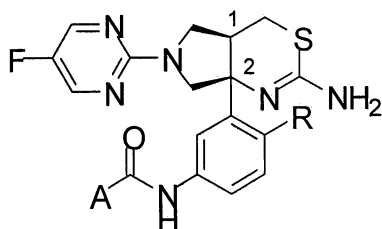


Hợp chất theo sáng chế, hoặc muối của chúng, có thể được điều chế bằng nhiều quy trình đã biết trong lĩnh vực, một số quy trình được minh họa trên Sơ đồ, Ví dụ điều chế, và Ví dụ sau đây. Các bước tổng hợp đặc hiệu đối với mỗi con đường đã nêu có thể được kết hợp theo các cách khác nhau, hoặc kết hợp với các bước từ sơ đồ khác, để điều chế hợp chất có công thức I, hoặc muối của chúng. Sản phẩm của mỗi bước trong sơ đồ dưới đây có thể được thu hồi bằng các phương pháp chuẩn ước, bao gồm chiết, làm bay hơi, kết tủa, sắc ký, lọc, nghiền, và kết tinh.

Một số tâm hóa học lập thể không được cụ thể hóa và một số nhóm thế đã bị loại bỏ trong các sơ đồ sau để cho rõ ràng và không được dự định để giới hạn hướng dẫn của sơ đồ theo cách bất kỳ. Ngoài ra, các chất đồng phân, đồng phân đối ảnh, hoặc các chất đồng phân không đối quang riêng biệt có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tách riêng hoặc phân giải tại thời điểm thuận lợi bất kỳ để tổng hợp hợp chất có công thức I bằng các phương pháp như kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký không đối xứng (Ví dụ, xem, J. Jacques, et al., "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley and Sons, Inc., 1981, and E.L. Eliel and S.H. Wilen, "*Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994). Tên gọi "chất đồng phân 1" và "chất đồng phân 2" được dùng để chỉ hợp chất mà rửa giải lần lượt từ phép sắc ký thứ nhất và thứ hai, và nếu sắc ký không đối xứng được bắt đầu sớm trong khi tổng hợp, cùng tên gọi này sẽ được áp dụng cho phần chất trung gian và ví dụ tiếp theo. Ngoài ra, chất trung gian được nêu trong sơ đồ sau đây chứa một số nhóm bảo vệ nitor. Nhóm bảo vệ khác có thể giống hoặc khác nhau trong mỗi lần xuất hiện phụ thuộc vào điều kiện phản ứng cụ thể và phản ứng cụ thể cần thực hiện. Các điều kiện bảo vệ và loại nhóm bảo vệ đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ và được nêu trong tài liệu chuyên ngành (Ví dụ, xem "*Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*", Fourth Edition, Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng hợp chất theo sáng chế chứa nhân mà chứa ít nhất hai tâm không đối xứng:

Sơ đồ B



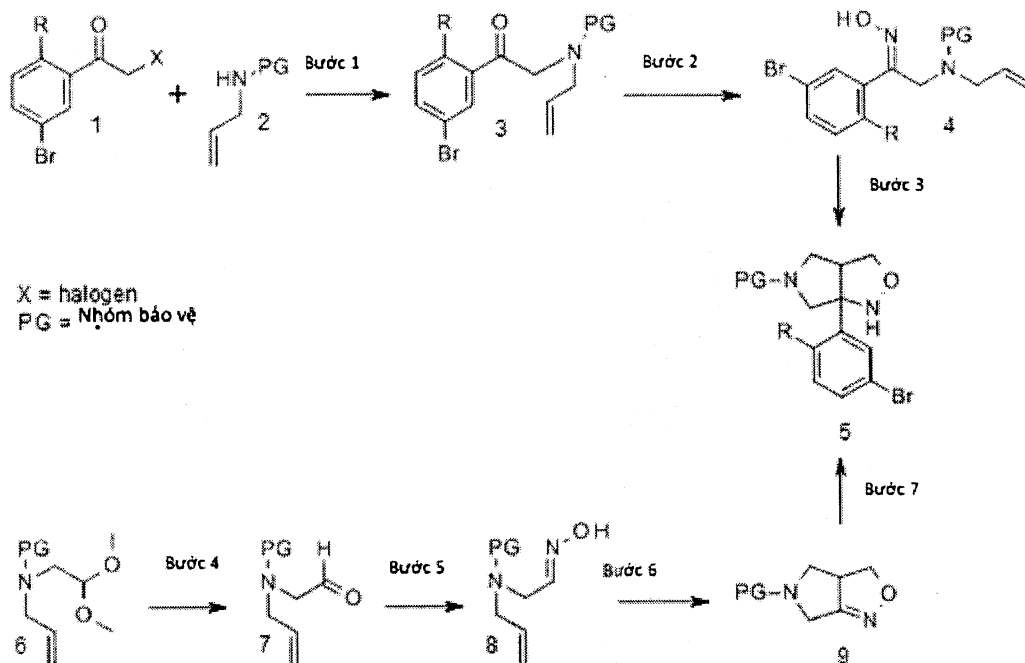
Mặc dù sáng chế bao gồm tất cả các chất đồng phân đối ảnh riêng biệt, cũng như hỗn hợp các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất này, bao gồm raxemat, hợp chất có

cấu hình tuyệt đối tại các nguyên tử cacbon được đánh số 1 và 2 như được minh họa trên Sơ đồ B là hợp chất được ưu tiên theo sáng chế.

Các chữ viết tắt được sử dụng trong bản mô tả được xác định theo *Aldrichimica Acta*, Vol. 17, No. 1, 1984. Các chữ viết tắt khác được xác định như sau: “APP” được dùng để chỉ protein tiền chất amyloid; “BOC” được dùng để chỉ *tert*-butyloxycarbonyl; “CSF” được dùng để chỉ dịch não tủy; “DCC” được dùng để chỉ 1,3-dicyclohexylcarbodiimide; “DIC” được dùng để chỉ diisopropylcarbodiimide; “DMEM” được dùng để chỉ môi trường Eagle được cải biến bởi Dulbecco; “DMSO” được dùng để chỉ dimethyl sulfoxide; “EDCI” được dùng để chỉ 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride; “ee” được dùng để chỉ lượng dư chất đồng phân đối ảnh; “EtOAc” được dùng để chỉ ethyl axetat; “Ex” được dùng để chỉ ví dụ; “F12” được dùng để chỉ môi trường F12 Ham; “FBS” được dùng để chỉ huyết thanh bào thai bò; “FRET” được dùng để chỉ phép chuyển năng lượng cộng hưởng huỳnh quang; “HEK” được dùng để chỉ thận của phôi người; “HOAc” được dùng để chỉ axit axetic; “HOAt” được dùng để chỉ 1-hydroxy-7-azobenzotriazol; “HOBt” được dùng để chỉ 1-hydroxybenzotriazol hydrat; “HPLC” được dùng để chỉ sắc ký lỏng hiệu năng cao; “hr” được dùng để chỉ giờ hoặc nhiều giờ; “IC₅₀” được dùng để chỉ nồng độ mà một chất gây ra 50% đáp ứng ức chế tối đa có thể có đối với chất đó; “min” được dùng để chỉ phút hoặc nhiều phút; “MTBE” được dùng để chỉ methyl *tert*-butyl ete; “PDAPP” được dùng để chỉ protein tiền chất amyloid được lấy từ tiểu cầu; “Prep” được dùng để chỉ được phẩm; “RFU” được dùng để chỉ đơn vị huỳnh quang tương đối; “R_t” được dùng để chỉ thời gian lưu; “RT” được dùng để chỉ nhiệt độ trong phòng; “SCX” được dùng để chỉ phép trao đổi ion mạnh; “SFC” được dùng để chỉ sắc ký lỏng siêu tới hạn; và “THF” được dùng để chỉ tetrahydrofuran.

Trong sơ đồ dưới đây, tất cả các nhóm thế, trừ khi có quy định khác, là như được xác định trên đây. Các thuốc thử và nguyên liệu ban đầu thường là dễ dàng có sẵn đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các chất khác có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật hóa hữu cơ và hóa dị vòng tiêu chuẩn mà tương tự để tổng hợp hợp chất có cấu trúc tương tự đã biết và quy trình được nêu trong Phần Ví dụ điều chế và Ví dụ bao gồm quy trình mới bất kỳ.

Sơ đồ 1

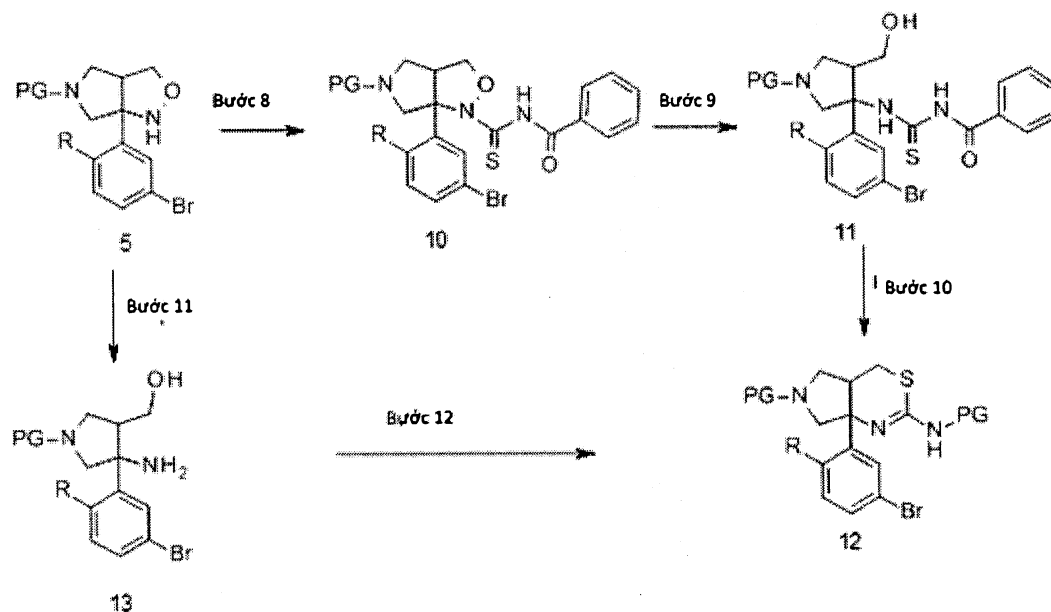


Sơ đồ 1 thể hiện sự hình thành oxim (4) và (8). Mỗi oxim có thể được sử dụng để tạo ra isoxazol hai vòng (5). Nhóm thiom được thể có thể được chèn tại các vị trí khác nhau của quy trình tổng hợp như nêu trong Sơ đồ 1, Bước 1 và Bước 7. “PG” là nhóm bảo vệ được phát triển cho nhóm amin, như carbamat và alyl. Các nhóm này đã được biết rõ và được đánh giá cao trong lĩnh vực.

Trong phản ứng 2 bước, keton có halogen ở vị trí beta (1) có thể được alkyl hóa (3, Bước 1) bằng alyl amin được bảo vệ (2) bằng cách sử dụng bazơ vô cơ như kali cacbonat và sau đó, được xử lý bằng hydroxylamin hydroclorua và bazơ hữu cơ như pyridin trong dung môi cho proton phân cực như etanol để thu được oxim (4, Bước 2). Sau đó, oxim (4) có thể được chuyển hóa thành isoxazol hai vòng (5) trong 3+2 quy trình vòng hóa bằng một số phương pháp như gia nhiệt oxim (4) trong dung môi không phân cực như toluen hoặc xylen để tạo ra isoxazol hai vòng (5, Bước 3). Theo cách khác, oxim có thể được tạo thành bắt đầu từ dimetyl axetal (6) mà đã được xử lý bằng axit như axit formic để tạo ra aldehyt (7, Bước 4). Sau đó, trong bước 5, aldehyt (7) có thể được chuyển hóa thành oxim (8) bằng hydroxylamin hydroclorua và bazơ như natri

axetat trihydrat. Isoxazol hai vòng (9) có thể được tạo thành từ oxim (8) như nêu trong Bước 6 bằng cách sử dụng dung dịch trong nước chứa natri hypoclorua. Sau đó, trong bước 7, isoxazol hai vòng được bảo vệ (9) được cho phản ứng với thuốc thử lithi hữu cơ thơm hoặc thuốc thử Grignard để thu được isoxazol hai vòng được bảo vệ (5).

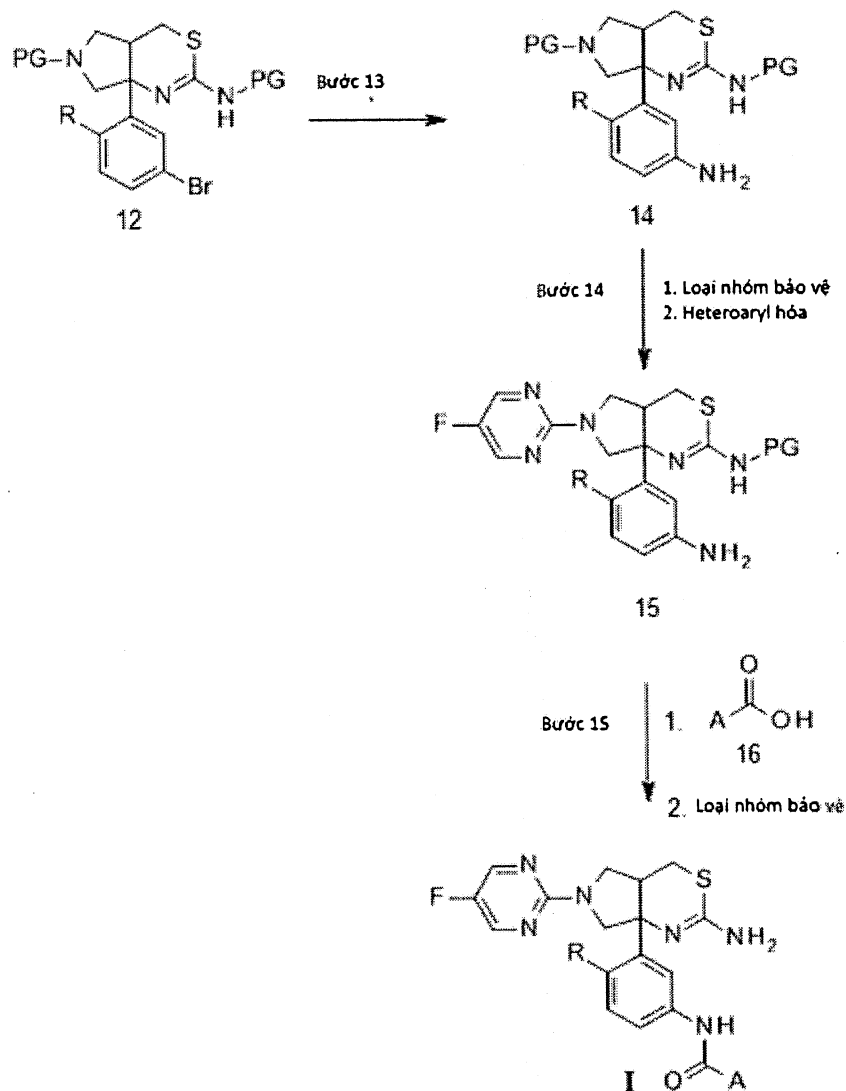
Sơ đồ 2



Sơ đồ 2 minh họa con đường khác để tổng hợp pyrolo thiazin được bảo vệ (12). Isoxazol hai vòng được bảo vệ (5) có thể được xử lý bằng bột Zn trong axit axetic hoặc bằng Raney Nickel trong dung môi phân cực như ethanol trong điều kiện áp suất hydro để thu được aminopyrrolidin metanol (13, Bước 11). Sau đó, aminopyrrolidin metanol (13) được cho phản ứng với benzoyl isothioxyanat trong dung môi phân cực như THF, tiếp theo là bổ sung 1,1-carbonyldiimidazol (CDI) để thu được pyrolidin thiazin được bảo vệ ngưng tụ (12, Bước 12). Theo cách khác, amin của isoxazol hai vòng (5) có thể được cho phản ứng với benzoyl isothioxyanat để thu được thiourea (10, Bước 8), và sau đó, trong bước 9, vòng isoxazol có thể được mở vòng bằng bột kẽm trong axit axetic để thu được hợp chất hydroxyl (11). Sau đó, hợp chất hydroxyl (11) có thể được xử lý bằng CDI trong dung môi nhận proton phân cực như THF hoặc 1-clo-N,N,2-trimetylpropenylamin trong DCM để tạo ra pyrolidin thiazin được bảo vệ ngưng tụ (12, Bước 10). Pyrolidin thiazin ngưng tụ (12) có thể cũng được tạo thành từ phản ứng

Mitsunobu như bằng cách sử dụng triphenylphosphin và diisopropyl azodicarboxylat (DIAD).

Sơ đồ 3



Sơ đồ 3 thể hiện sự chuyển hóa của pyrolo thiazin (12) thành anilin (14, Bước 13) mà sau đó, có thể được axyl hóa, tiếp theo là khử nhóm bảo vệ và heteroaryl hóa của pyrrolidin. Việc khử nhóm bảo vệ của thiazin amin tạo ra hợp chất có công thức I.

Việc khử halogen hóa azido được thực hiện trên pyrolo thiazin thích hợp (12) khi có mặt nguồn azit, như natri azit. Các phản ứng khử halogen hóa azido đã được biết rõ và được đánh giá cao trong lĩnh vực. Việc khử của chất trung gian azit anilin thu được (14, Bước 13) có thể bị ảnh hưởng bởi điều kiện hydro hóa đã được biết rõ và được nêu

trong lĩnh vực hoặc bằng tác nhân khử đã được biết rõ trong lĩnh vực, như LiAlH_4 , NaBH_4 , PPh_3 .

Pyrolidin được bảo vệ BOC có thể được loại nhóm bảo vệ trong điều kiện axit đã được biết rõ trong lĩnh vực (Bước 1 của Bước 14). Sau đó, pyrolidin được loại nhóm bảo vệ có thể được heteroaryl hóa trong phản ứng thế ái nhân thơm ($\text{S}_\text{N}\text{Ar}$) bằng pyrimidin thơm được thế bằng cách sử dụng bazơ hữu cơ như diisopropyletylamin, trietylamin, hoặc N,N,N,N' -tetrametylguanidin để thu được hợp chất 15 (Bước 2 của Bước 14). Anilin (15) có thể được kết hợp với axit carboxylic thơm chứa nguyên tử khác loại (16) trong điều kiện kết hợp (Bước 1 của Bước 15). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng có một số phương pháp và thuốc thử để tạo thành amit thu được từ phản ứng của axit carboxylic và amin. Ví dụ, phản ứng của anilin thích hợp (15) với axit thích hợp của hợp chất 16 khi có mặt thuốc thử kết hợp và bazơ amin như DIPEA hoặc trietylamin, sẽ tạo thành hợp chất có công thức I sau đây khử nhóm bảo vệ của thiazin amin. Thuốc thử kết hợp bao gồm carbodiimite như DCC, DIC, EDCI, và oxim thơm như HOBt và HOAt. Ngoài ra, muối uroni hoặc phosphoni của anion không ái nhân như HBTU, HATU, PyBOP, và PyBrOP có thể được sử dụng thay cho thuốc thử phối hợp truyền thống hơn. Các chất phụ gia như DMAP có thể được sử dụng để tăng cường phản ứng. Theo cách khác, anilin amin được bảo vệ (15) có thể được axyl hóa bằng cách sử dụng được thế benzoyl clorua khi có mặt bazơ như trietylamin hoặc pyridin. Sau đó, thiazin amin được bảo vệ có thể được loại nhóm bảo vệ bằng bazơ hữu cơ như pyridin và methylhydroxylamin hydroclorua trong dung môi nhận proton phân cực như etanol hoặc bazơ vô cơ như lithi hydroxit trong metanol để thu được hợp chất có công thức I.

Trong bước tùy ý, muối được dụng của hợp chất có công thức I có thể được tạo thành bằng phản ứng của bazơ tự do thích hợp có công thức I với axit được dụng thích hợp trong dung môi thích hợp trong điều kiện tiêu chuẩn. Ngoài ra, sự hình thành muối này có thể xảy ra đồng thời khi khử nhóm bảo vệ của nhóm bảo vệ nitơ. Sự hình thành muối này đã được biết rõ và được đánh giá cao trong lĩnh vực. Ví dụ, xem, Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, **33**: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* "Salt Selection and Optimization Procedures for

Pharmaceutical New Chemical Entities,” *Organic Process Research and Development*, **4**: 427-435 (2000); và Berge, S.M., *et al.*, “Pharmaceutical Salts,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **66**: 1-19, (1977). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng hợp chất có công thức I dễ dàng được chuyển hóa thành và có thể phân tách ở dạng muối được dụng, như muối hydroclorua.

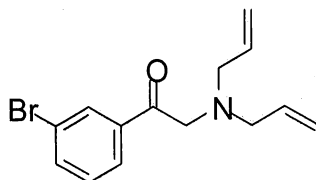
Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ điều chế và Ví dụ

Các ví dụ điều chế và ví dụ sau đây sẽ minh họa sáng chế chi tiết hơn. Trừ khi được chỉ dẫn ngược lại, hợp chất được minh họa ở đây được nêu tên và đánh số bằng cách sử dụng Symyx® Draw phiên bản 3.2 hoặc phiên bản 4.0 (Symyx Solutions, Inc.) hoặc IUPACNAME ACDLABS.

Ví dụ điều chế 1

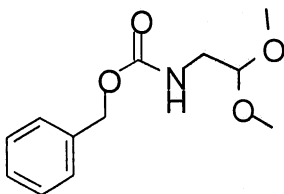
1-(3-Bromphenyl)-2-(diallylamino)etanon



Kali cacbonat (38,8g, 281mmol) được bổ sung vào 3-bromphenaxyl bromua (60 g 216mmol) trong axetonitril (430ml), và hỗn hợp được làm nguội trong nitơ đến 0°C. Diallylamin (34,6ml, 280,63mmol) được bổ sung từng giọt trong 1 giờ và phản ứng được để ấm đến 22°C qua đêm. Hỗn hợp phản ứng thô được cô và cặn được phân chia vào nước (300ml) và MTBE (300ml). Lớp nước được loại bỏ và lớp hữu cơ được rửa bằng nước (100ml, 2 ×) và bằng nước muối (100ml). Lớp hữu cơ được làm khô qua natri sulfat, lọc, và dung môi được làm bay hơi đến khối lượng không đổi để thu được hợp chất nêu ở đề mục (62g, 98%). ES/MS (m/e): 294 (M+1).

Ví dụ điều chế 2

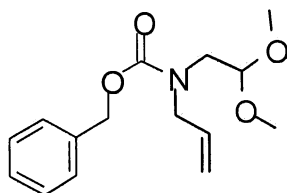
Benzyl N-(2,2-dimetoxyetyl)carbammat



Dung dịch chứa aminoaxetaldehyt dimetyl axetal (25ml, 229mmol) trong toluen (120ml) được xử lý ở 0°C bằng 4,85M dung dịch natri hydroxit (70,8ml, 343,5mmol). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 10 phút và benzyl cloformat (33,8ml, 229mmol) được bổ sung và giữ cho nhiệt độ bên trong thấp hơn 20°C trong khi bổ sung. Hỗn hợp được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Lớp hữu cơ được tách riêng, rửa bằng nước muối, làm khô qua natri sulfat, và được cô đến khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (54g, 98 %). ES/MS (m/e): 240 (M+H).

Ví dụ điều chế 3

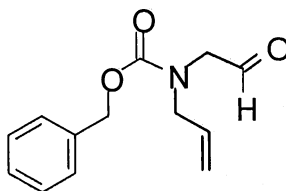
Benzyl N-allyl-N-(2,2-dimethoxyethyl)carbamate



Dung dịch chứa benzyl N-(2,2-dimethoxyethyl)carbamate (50g, 208,9mmol) trong toluen (180ml) được xử lý bằng kali hydroxit rắn (51,6g, 919,69mmol) trong nitơ. Sau khi 10 phút, benzyltriethylammonium clorua (0,8g, 3,1mmol) được bổ sung. Sau 10 phút nữa dung dịch chứa allyl bromua (33g, 272,8mmol) trong toluen (50ml) được bổ sung từng giọt trong 10 phút. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 48 giờ. Hỗn hợp được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được dập tắt bằng nước. Lớp hữu cơ được tách riêng, rửa bằng nước muối, làm khô qua magie sulfat, và được cô đến khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (44g, 75 %). ES/MS (m/e): 280 (M+H).

Ví dụ điều chế 4

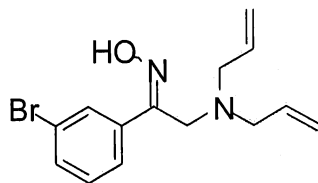
Benzyl N-allyl-N-(2-oxoethyl)carbamate



Dung dịch chứa benzyl N-allyl-N-(2,2-dimethoxyethyl)carbamate (30g, 107mmol) trong axit formic (36,8ml, 860mmol) và nước (4,84ml) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp được cô và pha loãng hexan/ethyl axetat (1:2) và nước. Lớp hữu cơ được tách riêng, được rửa bằng nước muối dung dịch đến độ pH=6, và làm khô qua natri sulfat. Dung môi được làm bay hơi để thu được hợp chất nêu ở đề mục (25g, 99 %). ES/MS (m/e): 234 (M+H).

Ví dụ điều chế 5

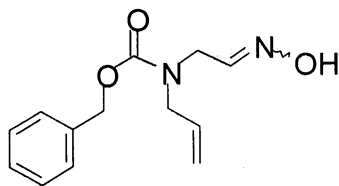
1-(3-Bromphenyl)-2-(diallylamino)etanon oxim



Dung dịch chứa 1-(3-bromophenyl)-2-(diallylamino)etanon (60g, 204,7mmol) trong etanol (720ml) và pyridin (24,8ml, 307mmol) được khuấy 15 phút ở 22°C. Hydroxylamin hydroclorua (17g, 246mmol) được bổ sung từng phần vào dung dịch trong 1 giờ. Phản ứng được làm ấm đến 50°C trong 2 giờ và sau đó, được gia nhiệt đến 70°C trong 16 giờ. Dung môi được làm bay hơi và cặn được phân chia vào nước (300ml) và methyl *tert*-butyl ete (300ml). Lớp hữu cơ được tách riêng và được rửa bằng nước (100ml, 2 ×) và nước muối (100ml). Lớp hữu cơ được làm khô qua natri sulfat, lọc, và làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (75,5g, 79%). ES/MS (m/e): 309 (M+1).

Ví dụ điều chế 6

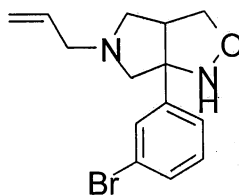
Benzyl N-allyl-N-[2-hydroxyiminoethyl]carbamate



Dung dịch chứa benzyl N-allyl-N-(2-oxoethyl)carbamate (25g, 107mmol) trong axetonitril (150ml) được xử lý bằng hydroxylamin hydroclorua (9,68g, 139mmol) và dung dịch chứa natri axetat trihydrat (16g, 117,9mmol) vào nước (75ml). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Axetonitril được làm bay hơi và dung dịch trong nước được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được tách riêng, làm khô qua magie sulfat, và được cô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục (24g, 90 %). ES/MS (m/e): 249 (M+H).

Ví dụ điều chế 7

5-Allyl-6a-(3-bromophenyl)-3,3a,4,6-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-c]isoxazol

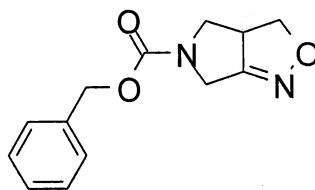


1-(3-bromophenyl)-2-(diallylamino)etanon oxim thô (75,5g, 195,34mmol) được hòa tan trong toluen (600ml) và hồi lưu trong 12 giờ. Dung môi được làm bay hơi *trong chân không* và cặn được hòa tan trong hỗn hợp HCl 1N nước (1 L) và metyl *tert*-butyl ete (300ml). Hỗn hợp được khuấy trong 15 phút và tảo cát (10 g) được bổ sung. Hỗn hợp được khuấy trong 20 phút nữa và lọc qua tảo cát. Bánh lọc được rửa bằng HCl 1N trong nước (200ml) và metyl *tert*-butyl ete (200ml). Lớp hữu cơ được tách riêng và được rửa bằng HCl 1N (2 × 100ml). Lớp nước được kết hợp và độ pH được điều chỉnh đến 9 bằng NaOH 50% trọng lượng. Hỗn hợp nước được chiết bằng metyl *tert*-butyl ete (3 × 250ml). Lớp hữu cơ được kết hợp, làm khô qua natri sulfat và lọc. Dịch lọc được làm bay hơi và làm khô trong chân không để thu được chất rắn màu đỏ (60 g). Chất rắn màu đỏ được pha loãng bằng heptan (600ml) và hỗn hợp được gia nhiệt đến hồi lưu trong 20 phút. Than hoạt tính (2 g) được bổ sung và hỗn hợp được lọc qua tảo cát. Dịch

lọc được cô trong áp suất khí quyển để điều chỉnh thể tích cuối cùng đến 300ml. Dung dịch được làm nguội đến 22°C và được khuấy trong 3 giờ. Chất rắn màu vàng nhạt được thu gom bằng cách lọc và làm khô trong chân không đến khối lượng không đổi để thu được hợp chất nêu ở đề mục (40g, 60%). ES/MS (m/e): 309 (M+1).

Ví dụ điều chế 8

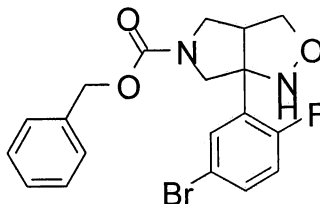
Benzyl 3,3a,4,6-tetrahydropyrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxylat



Dung dịch chứa Benzyl N-allyl-N-[2-hydroxyiminoethyl]carbamate (24g, 96,6mmol) trong diclometan (338ml) được xử lý từng giọt trong 10 phút bằng dung dịch trong nước chứa natri hypoclorua 5% trọng lượng (106,08mmol, 143,06ml). Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Phản ứng được dập tắt bằng dung dịch trong nước 40% chứa natri bisulfite (7 g). Lớp hữu cơ được tách riêng, làm khô qua magie sulfat, và được cô trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel rửa giải bằng 5% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (18g, 75 %). ES/MS (m/e): 247 (M+H).

Ví dụ điều chế 9

Benzyl 6a-(5-brom-2-flu-phenyl)-3,3a,4,6-tetrahydro-1H-pyrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxylat



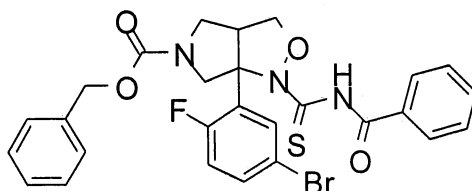
Dung dịch hexan 1,6M chứa n-butyl lithi (25,4ml, 40,6mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch ở -78°C chứa 4-brom-1-flu-2-iodobenzen (12,22g, 40,6mmol) trong

tetrahydrofuran (60ml) để thu được dung dịch màu vàng được khuấy ở nhiệt độ -78°C trong 15 phút.

Boron triflorua eterat (5,14ml, 40,6mmol) được bổ sung vào dung dịch riêng biệt ở -78°C chứa benzyl 3,3a,4,6-tetrahydropyrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxylat (5g, 20,3mmol) trong tetrahydrofuran (60ml) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ -78°C trong 5 phút. Dung dịch này được bổ sung vào hỗn hợp lithi hữu cơ ở -78°C đã được điều chế trước thông qua ống thông. Hỗn hợp phối hợp được khuấy trong 30 phút ở -78°C . Hỗn hợp được được dập tắt bằng amoni clorua trong nước bão hòa và làm ấm đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được chiết bằng etyl axetat (3 ×) và dịch chiết hữu cơ được kết hợp, làm khô qua natri sulfat, lọc và dung môi được tách loại *trong chân không*. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel trong 35 phút bằng gradien etyl axetat từ 5% đến 100% trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,27g, 27%). ES/MS (m/e): ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 421/423 (M+H).

Ví dụ điều chế 10

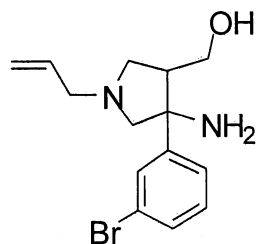
Benzyl 1-(benzoylcarbamothioyl)-6a-(5-brom-2-flo-phenyl)-3,3a,4,6-tetrahydropyrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxylat



Benzoyl isothioxyanat (2,87ml, 21,28mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch chứa benzyl 6a-(5-brom-2-flo-phenyl)-3,3a,4,6-tetrahydro-1H-pyrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxylat (5,977g, 14,2mmol) trong tetrahydrofuran (95ml) và được khuấy qua đêm trong nitơ. Dung môi được tách loại *trong chân không*. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel trong 30 phút bằng gradien EtOAc từ 5% đến 100% trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (6,05g, 73%). ES/MS (m/e): ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 584/586 (M+H).

Ví dụ điều chế 11

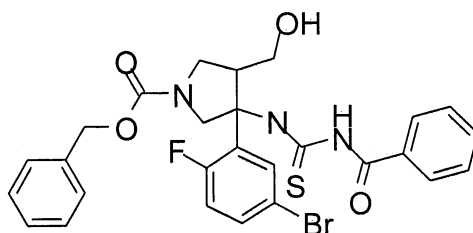
[1-Allyl-4-amino-4-(3-bromphenyl)pyrolidin-3-yl]metanol



Dung dịch ở 22°C chứa 5-allyl-6a-(3-bromophenyl)-3,3a,4,6-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-c]isoxazol (40g, 129,4mmol) trong axit axetic (400ml) được xử lý bằng bột mịn kẽm (42,3g, 646,8mmol) một lần. Phản ứng được khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Etyl axetat (400ml) được bổ sung và hỗn hợp được lọc qua tảo cát. Dịch lọc được làm bay hơi và cặn làm khô trong chân không. Cặn được phân chia vào nước (300ml) và MTBE (300ml). Độ pH được điều chỉnh đến 8 bằng natri hydroxit 50% trọng lượng và lớp hữu cơ được tách riêng, làm khô qua natri sulfat, và lọc. Dịch lọc được làm bay hơi và cặn làm khô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục (41g, 97%). ES/MS (m/e): 311 (M+1).

Ví dụ điều chế 12

Benzyl 3-(benzoylcarbamothioylamino)-3-(5-brom-2-flo-phenyl)-4-(hydroxymetyl)pyrrolidin-1-carboxylat

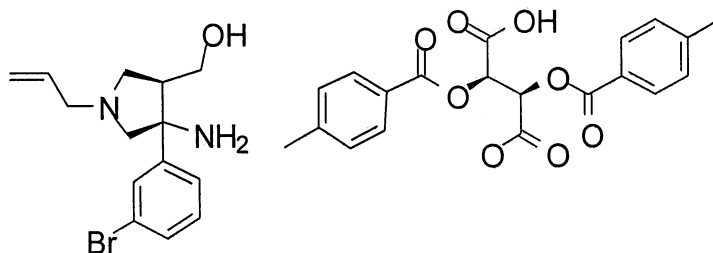


Hỗn hợp gồm benzyl 1-(benzoylcarbamothioyl)-6a-(5-brom-2-flo-phenyl)-3,3a,4,6-tetrahydropyrido[3,4-c]isoxazol-5-carboxylat (6,05 g 10,4mmol) và kẽm (bột mịn, <10 micron) (6,77g, 103,5mmol) được khuấy trong axit axetic (52ml) ở nhiệt độ trong phòng qua đêm trong nitơ. Phản ứng được pha loãng bằng etyl axetat và lọc qua tảo cát. Dung môi được tách loại trong chân không và cặn được pha loãng bằng etyl axetat, nước và natri bicacbonat trong nước bão hòa. Hỗn hợp được chiết bằng etyl axetat (3 ×), các lớp hữu cơ thu gom được kết hợp và làm khô qua natri sulfat, lọc và dung môi được tách loại *trong chân không*. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel

trong 30 phút bằng gradien EtOAc từ 5% đến 100% trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (5,222g, 86%). ES/MS (m/e): ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 586/588 (M+H).

Ví dụ điều chế 13

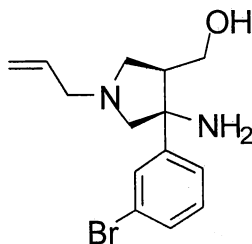
[(3R,4S)-1-Allyl-4-amino-4-(3-bromphenyl)pyrrolidin-3-yl]metanol; axit (2R,3R)-2,3-bis[(4-metylbenzoyl)oxy]butanedioic



Dung dịch chứa [1-allyl-4-amino-4-(3-bromphenyl)pyrrolidin-3-yl]metanol (77g, 235mmol) trong isopropyl alcohol (914ml) được gia nhiệt đến 70°C. Axit Di-*p*-toluoyl-L-tartaric (86,2g, 223mmol) được bổ sung và hỗn hợp được làm nguội đến 22°C trong 2 giờ và được khuấy qua đêm. Huyền phù đặc được lọc để thu gom chất rắn màu vàng nhợt và được rửa bằng rượu isopropylic. Chất rắn được làm khô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục (63g, 36%). ES/MS (m/e): 311 (M+1). Sản phẩm được phân tích bằng sắc ký không đối xứng pha đảo: Phân tích của chất đồng phân rửa giải thứ nhất (Cột: Chiralpak ID-3 4,6 x 50 mm; rửa giải: 70:30, dung dịch nước amoniac 20 mM bicacbonat axetonitril; lưu lượng: 1,5ml/phút ở UV 215 nm) xác nhận chất đồng phân đối ảnh được làm giàu chất đồng phân đối ảnh (96% ee) có $R_t = 1,26$ phút.

Ví dụ điều chế 14

[(3R,4S)-1-Allyl-4-amino-4-(3-bromphenyl)pyrrolidin-3-yl]metanol

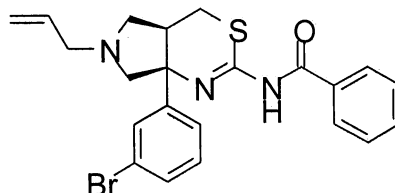


[(3R,4S)-1-Allyl-4-amino-4-(3-bromphenyl)pyrrolidin-3-yl]metanol; Axit (2R,3R)-2,3-bis[(4-metylbenzoyl)oxy]butanedioic (63g, 85,8mmol) được kết hợp với

HCl 1N trong nước (800ml) và etyl axetat (400ml) và hỗn hợp được khuấy trong 15 phút ở 22°C. Các lớp được tách riêng và độ pH của lớp nước được điều chỉnh đến 10 bằng natri hydroxit 50% trọng lượng. Hỗn hợp nước được chiết bằng methyl *tert*-butyl ete (3 × 250ml). Các lớp hữu cơ thu gom được làm khô qua magie sulfat, lọc và làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (27g, 99%) ES/MS (m/e): 311 (M+1).

Ví dụ điều chế 15

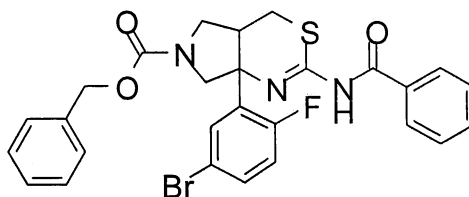
N-[(4aR,7aS)-6-Allyl-7a-(3-bromphenyl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]-thiazin-2-yl]benzamidit



Dung dịch chứa [(3R,4S)-1-allyl-4-amino-4-(3-bromphenyl)pyrrolidin-3-yl]metanol (27 g; 86,7mmol) trong tetrahydrofuran (270ml) được làm nguội đến -5°C trong áp suất nito. Benzoyl isothioxyanat (12,3ml, 91mmol) được bổ sung từng giọt và giữ cho nhiệt độ thấp hơn 0°C. Phản ứng được để ấm đến 22°C trong 1 giờ. 1,1'-Carbonyldiimidazol (28,1g, 173,5mmol) được bổ sung trong một lần và phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ 22°C và sau đó, được gia nhiệt đến hồi lưu trong 16 giờ. Dung môi được tách loại *trong chân không* và cặn làm khô trong chân không. Chất liệu thô được phân chia trong methyl *tert*-butyl ete (500ml) và nước (250ml). Lớp hữu cơ được tách riêng, làm khô qua magie sulfat, lọc và làm bay hơi đến khô. Chất liệu thô được tinh chế qua silica gel với gradien từ 90/10 đến 60/40 metylen clorua etyl axetat để thu được hợp chất nêu ở đề mục (27g, 68%). ES/MS (m/e): 456 (M+1).

Ví dụ điều chế 16

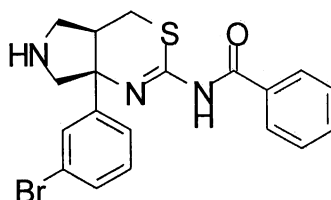
Benzyl 2-benzamido-7a-(5-brom-2-flo-phenyl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d]-[1,3]thiazin-6-carboxylat



1,1'-carbonyldiimidazol (2,87g, 17,7mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa benzyl 3-(benzoylcarbamothioylamino)-3-(5-brom-2-flo-phenyl)-4-(hydroxymetyl)pyrrolidin-1-carboxylat (5,198g, 8,86mmol) trong tetrahydrofuran (52ml). Hỗn hợp được khuấy trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó, phản ứng được gia nhiệt ở hồi lưu qua đêm trong nito. Phản ứng được làm nguội, pha loãng bằng nước, và được chiết bằng etyl axetat (3 ×). Lớp hữu cơ được kết hợp, làm khô qua natri sulfat, lọc, và dung môi được tách loại *trong chân không*. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel 30 phút bằng gradien 5% đến 100% EtOAc trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,93g, 58%). ES/MS (m/e): ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$). 568/570 (M+H)

Ví dụ điều chế 17

N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Bromphenyl)-4a,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid



Hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng chứa N-[(4aR,7aS)-6-allyl-7a-(3-bromphenyl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrulo[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (1g, 2,19 mmol) và axit N,N-dimetylbarbituric (0,868g, 5,48mmol) trong cloform (22ml) được khử khí bằng cách sục nito qua huyền phù đặc thu được ở RT trong 5 phút. Hỗn hợp được xử lý bằng tetrakis(triphenylphosphin)palladi (0,261g, 219 μmol) và được khuấy trong 1,5 giờ trong nito.

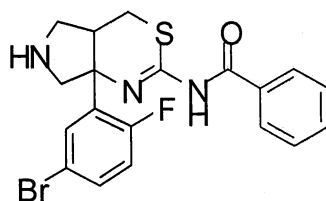
Trong bình riêng biệt, hỗn hợp chứa N-[(4aR,7aS)-6-allyl-7a-(3-bromphenyl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrulo[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (22,2g, 48,6mmol) và axit N,N-dimetylbarbituric (19,28g, 121,6mmol) trong cloform (486ml) được khử khí bằng

cách sục nitơ qua huyền phù đặc thu được ở RT trong 5 phút. Hỗn hợp được xử lý bằng tetrakis(triphenylphosphin)paladi (5,79g, 4,86mmol) và được khuấy trong 2 giờ trong nitơ.

Hai hỗn hợp phản ứng được kết hợp và dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được sản phẩm thô. Chất liệu thô được tinh chế qua silica gel trong 30 phút bằng gradien metanol 0,5% đến 10% trong diclometan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (22,4g, 100%). ES/MS (m/e): ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 416/418 (M+H).

Ví dụ điều chế 18

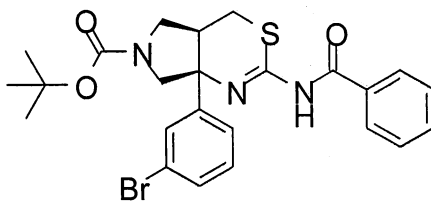
N-[7a-(5-Brom-2-flo-phenyl)-4a,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrol[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamidit



Iodotrimethylsilan (2,21ml, 15,46mmol) được bổ sung từng giọt vào ở nhiệt độ trong phòng dung dịch chứa benzyl 2-benzamido-7a-(5-brom-2-flo-phenyl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylat (2,93g, 5,15mmol) trong axetonitril (44ml). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong hai giờ và dung môi được tách loại *trong chân không*. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cột SCX bằng cách sử dụng 3:1 diclometan: metanol và sau đó, 2:1 diclometan: amoniac 7N trong metanol để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,098g, 94%). ES/MS (m/e): ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 434/436 (M+H).

Ví dụ điều chế 19

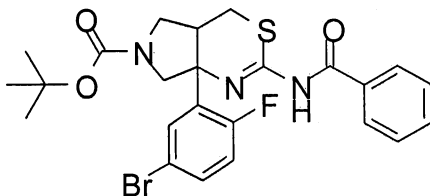
tert-Butyl (4aR,7aS)-2-benzamido-7a-(3-bromphenyl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylat



Dung dịch ở nhiệt độ trong phòng chứa N-[(4aR,7aS)-7a-(3-bromophenyl)-4a,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (22,4g, 36,69 mmol) trong diclometan (367ml) được xử lý bằng di-*t*-butyldicacbonat (8,81g, 40,36mmol) tiếp theo là trietylamin (7,67ml, 55,04mmol) và phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trong nitơ. Dung môi được tách loại *trong chân không* và sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel trong 25 phút bằng gradien từ 5% đến 100% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (20,22g, 100%). ES/MS (m/e): ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 516/518 (M+H).

Ví dụ điều chế 20

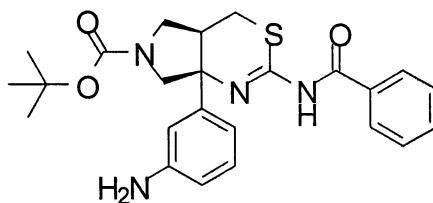
tert-Butyl 2-benzamido-7a-(5-brom-2-flo-phenyl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylat



Di-*t*-butyldicacbonat (1,16g, 5,31mmol) và trietylamin (1,01ml, 7,25mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa N-[7a-(5-brom-2-flo-phenyl)-4a,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrol[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (2,098g, 4,83mmol) trong diclometan (48ml). Phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong nitơ. Dung môi được tách loại *trong chân không* và sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel trong 30 phút bằng gradien 5% đến 100% EtOAc trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,556g, 99%). ES/MS (m/e): ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 534/536 (M+H).

Ví dụ điều chế 21

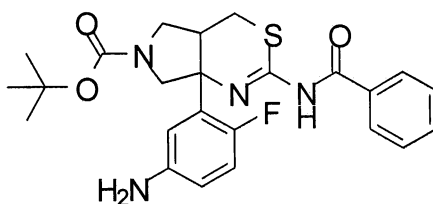
tert-Butyl (4aR,7aS)-7a-(3-aminophenyl)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylat



Dung dịch chứa *tert*-butyl (4aR,7aS)-2-benzamido-7a-(3-bromophenyl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylat (5g, 9,7mmol) và *trans*-N,N'-dimethyl-1,2-xyclohexandiamin (220,3mg, 1,5mmol) trong etanol (100ml) được xử lý bằng natri azit (1,30g, 19,4mmol). Dung dịch trong nước chứa muối natri của axit L-ascorbic (0,66 M, 3,2mL, 2,1mmol) và nước (10ml) được bổ sung và phần bên trên của bình được súc bằng nitơ. Hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch trong nước chứa đồng(II) sulfat pentahydrat (0,33 M, 3,2mL, 1,1mmol) và hỗn hợp được gia nhiệt ngay trên đĩa nóng đã gia nhiệt trước ở 80°C trong 1,5 giờ trong nitơ. Thu được hỗn hợp đồng nhất khi gia nhiệt. Phản ứng được làm nguội và nước đá được bổ sung. Hỗn hợp được chiết bằng etyl axetat (3×). Lớp hữu cơ được kết hợp và làm khô qua natri sulfat, lọc, và dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được sản phẩm thô azit. Sản phẩm azit thô được kết hợp với paladi 10% trên cacbon (2 g) trong etanol nguội (150ml) và hỗn hợp được súc bằng cách sử dụng chân không/nitơ và sau đó, chân không/hydro. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 psi (206,84271 kPa) của hydro trong 2 giờ. Phản ứng được thông khí và hỗn hợp được lọc qua tảo cát bằng cách sử dụng diclometan để tráng bánh lọc. Dung môi được tách loại từ dịch lọc *trong chân không* và sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel bằng etyl axetat 50% trong diclometan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (4g, 91%). ES/MS (m/e): 453 (M+H).

Ví dụ điều chế 22

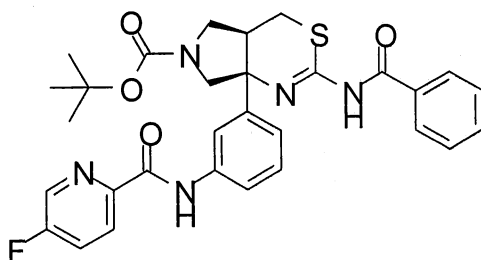
tert-Butyl 7a-(5-amino-2-fluorophenyl)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylat



Dung dịch chứa *tert*-butyl 2-benzamido-7a-(5-brom-2-flo-phenyl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylat (2,556g, 4,8mmol) và *trans*-N,N'-dimetyl-1,2-xyclohexandiamin (150mg, 1,1mmol) trong etanol (50ml) được xử lý bằng natri azit (933mg, 14,3mmol). Dung dịch trong nước chứa muối natri của axit L-ascorbic (0,66 M, 3,2mL, 2,1mmol) và nước (1ml) được bổ sung và phần bên trên của bình được súc bằng nitơ. Hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch trong nước chứa đồng (II) sulfat pentahydrat (0,33 M, 3,2mL, 1,1mmol) và hỗn hợp được gia nhiệt ngay trên đĩa nóng đã gia nhiệt trước ở 80°C trong 1,5 giờ trong nitơ. Hỗn hợp đồng nhất được thu được khi gia nhiệt. Phản ứng được làm nguội, pha loãng bằng nước đá, và hỗn hợp được chiết bằng etyl axetat (3 ×). Lớp hữu cơ được kết hợp và làm khô qua natri sulfat, lọc, và dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được sản phẩm thô azit. Sản phẩm thô azit được kết hợp với paladi 10% trên cacbon (1 g) trong etanol nguội (150ml) và hỗn hợp được súc bằng cách sử dụng chân không/nitơ và sau đó, chân không/hydro. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong áp suất hydro 30 psi (206,84271 kPa) trong 5 giờ. Phản ứng được thông khí, lọc qua tảo cát, và bánh lọc được tráng bằng diclometan. Tách loại dung môi từ dịch lọc *trong chân không* và tinh chế sản phẩm thô qua silica gel bằng etyl axetat 50% trong diclometan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,014g, 89%). ES/MS (m/e): 471 (M+H).

Ví dụ điều chế 23

tert-Butyl (4aR,7aS)-2-benzamido-7a-[3-[(5-flopyridin-2-carbonyl)amino]phenyl]-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylat

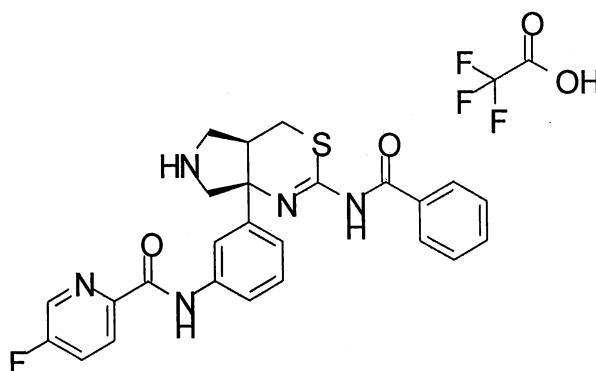


Huyền phù đặc chứa *tert*-butyl (4aR,7aS)-7a-(3-aminophenyl)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylat (93mg, 0,21mmol), axit 5-flopyridin-2-carboxylic (31,9mg, 0,23mmol), 1-hydroxy-benzotriazol hydrat (56,7mg,

0,41mmol) và 1-(2-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (40mg, 0,21mmol) trong diclometan (4ml) chứa dimethylformamide (1 ml) được xử lý bằng diisopropylethylamine (179,2μL, 1,03mmol) và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Phản ứng hỗn hợp được pha loãng diclometan (5ml) và natri bicarbonat trong nước bão hòa (15ml). Lớp hữu cơ được tách riêng và được rửa bằng natri clorua trong nước bão hòa (10ml), làm khô qua natri sulfat, lọc, và dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được thô hợp chất nêu ở đề mục (105mg, 89%). ES/MS (m/e): 576 (M+H).

Ví dụ điều chế 24

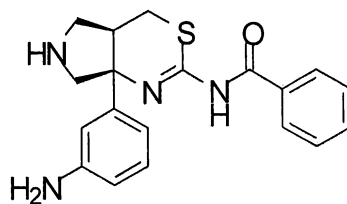
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-4a,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrido[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-fluoropyridin-2-carboxamide; axit 2,2,2-trifluoroacetic



tert-Butyl (4aR,7aS)-2-benzamido-7a-[3-[(5-fluoropyridin-2-carbonyl)amino]-phenyl]-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylate (105mg, 0,18mmol) được hòa tan trong diclometan (2ml) và được xử lý bằng axit trifluoroacetic (500 μL, 6,6mmol). Dung dịch màu vàng thu được được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng và dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được sản phẩm thô nêu ở đề mục (190mg, 100%). ES/MS (m/e): 476 (M+H).

Ví dụ điều chế 25

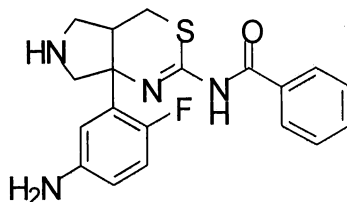
N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminophenyl)-4a,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrido[3,4-d][1,3]-thiazin-2-yl]benzamide



Axit triflo axetic (25ml) được bổ sung vào dung dịch chứa *tert*-butyl (4aR,7aS)-7a-(3-aminophenyl)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d]-[1,3]thiazin-6-carboxylat (4g, 8,84mmol) trong diclometan (100ml) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong nitơ trong 4 giờ. Dung môi được tách loại *trong chân không* và sản phẩm thô được tinh chế bằng cột SCX bằng cách sử dụng 3:1 diclometan: metanol và sau đó, 2:1 diclometan: amoniac 7N trong metanol để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,49g, 80%). ES/MS (m/e): 353 (M+H).

Ví dụ điều chế 26

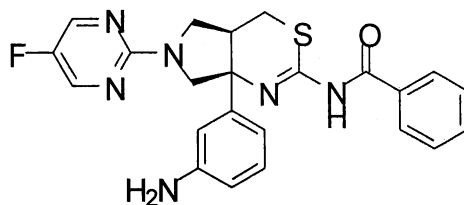
N-[7a-(5-Amino-2-flo-phenyl)-4a,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamidit



Axit triflo axetic (10ml) được bổ sung vào dung dịch chứa *tert*-butyl 7a-(5-amino-2-flo-phenyl)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-6-carboxylat (2,013g, 4,28mmol) trong diclometan (30ml) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong nitơ trong 4 giờ. Dung môi được tách loại *trong chân không* và sản phẩm thô được tinh chế bằng cột SCX bằng cách sử dụng 3:1 diclometan:metanol và sau đó, 2:1 diclometan: amoniac 7N trong metanol để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,555g, 98%). ES/MS (m/e): 371 (M+H).

Ví dụ điều chế 27

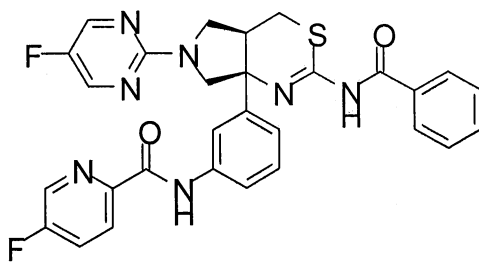
N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminophenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamidit



Dung dịch chứa N-[(4aR,7aS)-7a-(3-aminophenyl)-4a,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (2,49g, 7,06mmol), 5-flo-2-clopyrimidin (3,74g, 28,26mmol), và diisopropyletylamin (6,16ml, 35,32mmol) trong 1,4-dioxan (60ml) được gia nhiệt đến hồi lưu trong 4 giờ trong nitơ. Phản ứng được làm nguội, pha loãng bằng nước và được chiết bằng etyl axetat (3 ×). Dịch chiết hữu cơ thu gom được làm khô qua natri sulfat, lọc và dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel 25 phút trong bằng gradien 5% đến 100% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,51g, 79%). ES/MS (m/e): 449 (M+H).

Ví dụ điều chế 28

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-pyrolo-[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-flo-pyridin-2-carboxamid



Dung dịch chứa N-[3-[(4aR,7aS)-2-benzamido-4a,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-flo-pyridin-2-carboxamid; axit 2,2,2-triflo axetic (150mg, 254 μmol), 5-flo-2-clopyrimidin (68mg, 51 μmol) và diisopropyletylamin (98 μL, 56 μmol) được gia nhiệt trong dimetyl sulfoxit (5ml) qua đêm ở nhiệt độ 40°C. 5-flo-2-clopyrimidin (68mg, 51 μmol) và diisopropyl-etylamin (98 μL, 56 μmol) được bổ sung vào và hỗn hợp được gia nhiệt qua đêm ở 50°C. 5-flo-2-clopyrimidin (68mg, 51 μmol) và diisopropyletylamin (98 μL, 56 μmol) được bổ sung và hỗn hợp được gia nhiệt qua đêm ở 50°C trong đêm thứ ba. Phản ứng được làm

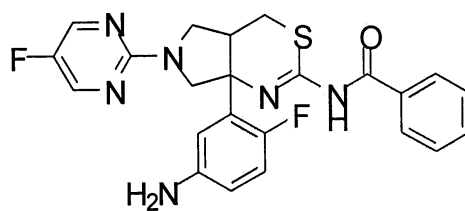
nguội, pha loãng bằng nước natri cacbonat bão hòa (50ml) để thu được huyền phù đặc mà được lọc và làm khô trong lò chân không ở 50°C trong 4 giờ để thu được hợp chất nêu ở đề mục (60mg, 41%). ES/MS (m/e): 449 (M+H).

Ví dụ điều chế thay thế 28

N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminophenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (282mg, 628,73 μ mol) và axit 5-flopyridin-2-carboxylic (106,46mg, 754,47 μ mol) được kết hợp trong diclometan (3ml) và dimetylformamit (0,5ml). 1-Hydroxybenzotriazol (112,70mg, 817,35 μ mol) và sau đó, 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua (159,07mg, 817,35 μ mol) được bổ sung và hỗn hợp thu được được khuấy trong 5 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong nitơ. Phản ứng hỗn hợp được pha loãng bằng nước và độ pH được điều chỉnh bằng NaOH 1N đến ~12. Hỗn hợp được chiết bằng etyl axetat (3 $\times$). Dịch chiết hữu cơ được kết hợp, làm khô qua natri sulfat, lọc và dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel trong 20 phút gradien bằng 5% đến 100% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (327mg, 91%). ES/MS (m/e): 571 (M+H).

Ví dụ điều chế 29

N-[7a-(5-Amino-2-flo-phenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid

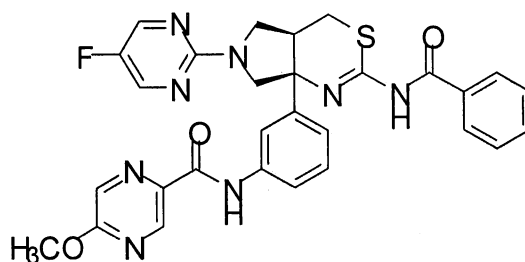


Dung dịch chứa N-[7a-(5-amino-2-flo-phenyl)-4a,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrido[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (705mg, 1,90mmol), 5-flo-2-clopyrimidin (1,01g, 7,61mmol), và diisopropyletylamin (1,66ml, 9,52mmol) được gia nhiệt trong 1,4-dioxan (20ml) đến hồi lưu trong 4 giờ trong nitơ. Phản ứng được làm nguội, pha loãng bằng nước, và được chiết bằng etyl axetat (3 $\times$). Lớp hữu cơ được kết hợp, làm khô qua natri sulfat, lọc và dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được sản

phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel trong 25 phút bằng gradien 5% đến 100% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (590mg, 66%). ES/MS (m/e): 467 (M+H).

Ví dụ điều chế 30

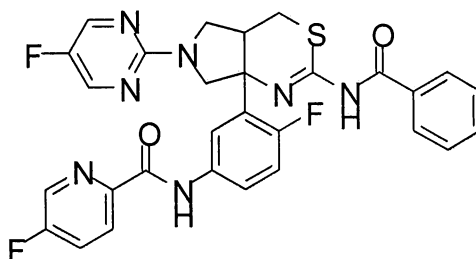
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol-3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-metoxypyrazin-2-carboxamit



N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminophenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamidit (400mg, 891,81 μ mol) và axit 5-metoxypyrazin-2-carboxylic (165mg, 1,07mmol) được kết hợp trong diclometan (4ml) và dimetylformamid (0,5ml). 1-Hydroxybenzotriazol (160mg, 1,16mmol) và sau đó, 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimitt hydroclorua (226mg, 1,16mmol) được bổ sung và hỗn hợp thu được được khuấy trong 5 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong nitơ. Phản ứng hỗn hợp được pha loãng bằng nước và độ pH được điều chỉnh đến ~12 bằng NaOH 1 N. Hỗn hợp được chiết bằng etyl axetat (3 $\times$). Dịch chiết hữu cơ thu gom được làm khô qua natri sulfat, lọc và dung môi được tách loại *trong chân không*. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel trong 20 phút bằng gradien 5% đến 100% etyl axetat trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (482mg, 92%). ES/MS (m/e): 585 (M+H).

Ví dụ điều chế 31

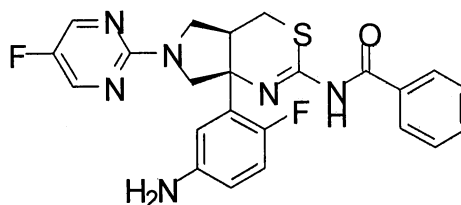
N-[3-[2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]-thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-flo-pyridin-2-carboxamit



N-[7a-(5-Amino-2-fluorophenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (302mg, 647 μ mol) và axit 5-flopyridin-2-carboxylic (110mg, 777 μ mol) được kết hợp trong diclometan (3ml) và dimetylformamit (0,5ml). 1-Hydroxybenzotriazol (116mg, 842 μ mol) và sau đó, 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua (164mg, 842 μ mol) được bổ sung và hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển nitơ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước và độ pH được điều chỉnh bằng NaOH 1N đến ~12 và sau đó, được chiết bằng etyl axetat (3 $\times$). Lớp hữu cơ được kết hợp và lọc để thu gom chất liệu không tan. Chất rắn được rửa bằng nước và etyl axetat và làm khô trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục. Lớp hữu cơ từ dịch lọc được làm khô qua natri sulfat, lọc và dung môi được tách loại *trong chân không*. Cặn được tinh chế qua silica gel bằng 20 phút 5% to 100% etyl axetat trong hexan gradien để thu được hợp chất nêu ở đề mục với hiệu suất phối hợp (275mg, 72%). ES/MS (m/e): 590 (M+H).

Ví dụ điều chế 32

N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluorophenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid, (chất đồng phân 1)

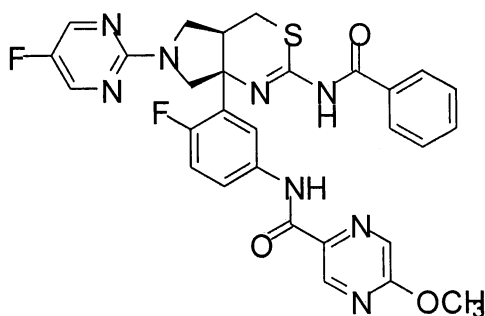


Raxemic N-[7a-(5-amino-2-fluorophenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (1,694g, 3,63mmol) được tinh chế bất đối xứng bằng HPLC (Cột: Chiralcel OJ, 8 x 35 cm; rửa giải: 90% metanol (0,2% dimetyletylamin) và 10% axetonitril; lưu lượng 400ml/phút ở bước sóng UV 280 nm).

Phân tích chất đồng phân thứ nhất rửa giải (Cột: Chiralcel OJ-H 0,46 x 15 cm; rửa giải: 10:90 axetonitril:metanol (với 0,2% dimetyetylamin); lưu lượng: 0,6ml/phút ở bước sóng UV 280 nm) xác nhận chất đồng phân đối ảnh được làm giàu chất đồng phân đối ảnh (99% ee) với $R_t = 6,70$ phút, (723mg, 43%). ES/MS (m/e): 467 (M+H).

Ví dụ điều chế 33

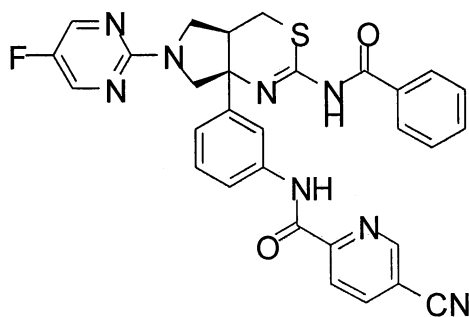
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-metoxypyrazin-2-carboxamit, (chất đồng phân 1)



N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-flo-phenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamidit (0,361g, 0,77mmol, chất đồng phân 1) được hòa tan trong hỗn hợp chứa diclometan (4ml) và DMF (0,5ml). Axit 5-metoxypyrazin-2-carboxylic (240mg, 1,55mmol), 1-hydroxybenzotriazol (210mg, 1,55mmol) và 1-(3-dimetylamino-propyl)-3-etylcarbodiimidit hydroclorua (300mg, 1,55mmol) được bổ sung vào hỗn hợp và hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng dung dịch được bổ sung trực tiếp lên cột nạp 12 g silica gel và được tinh chế bằng cách sử dụng cột 40 g silica gel và rửa giải bằng 0-100% etyl axetat/hexan gradient. Sản phẩm được hòa tan trong etyl axetat (200ml), được rửa nạp NaOH 1H (2 x 50ml), và bằng nước muối (1 x 50ml). Phép tinh chế trên silica gel được lặp lại như nêu trên để thu được hợp chất nêu ở đề mục (350mg, 74%). ES/MS (m/e): 603 (M+H).

Ví dụ điều chế 34

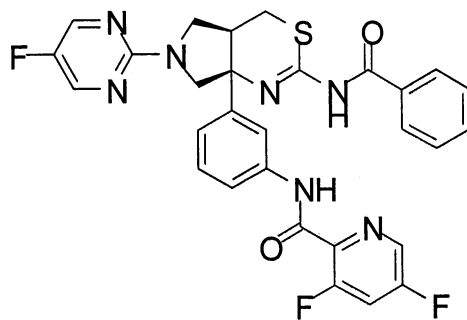
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-xyano-pyridin-2-carboxamidit



N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminophenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (0,30g, 0,67mmol) được hòa tan trong diclometan (10ml) và axit 5-xyanopyridin-2-carboxylic (129mg, 0,87mmol), 1-hydroxybenzotriazol (185mg, 1,34mmol) và 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimit hydroclorua (169mg, 0,87mmol) được bổ sung. Diisopropyletyamin (0,35ml, 2mmol) được bổ sung và phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Chất liệu này được tinh chế trực tiếp bằng sắc ký silica gel rửa giải bằng 0-100% ethyl axetat hexan gradien để thu được hợp chất nêu ở đề mục (360mg, 88%). ES/MS (m/e): 579 (M+H).

Ví dụ điều chế 35

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-pyrido[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-3,5-diflo-pyridin-2-carboxamit

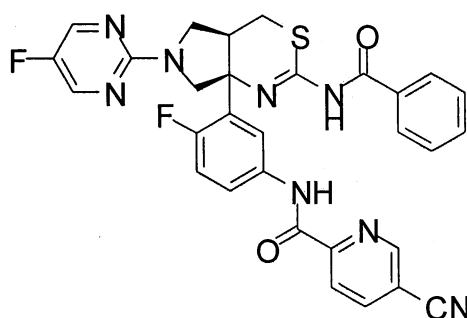


N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminophenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (0,30g, 0,67mmol) được hòa tan trong diclometan (10ml) và axit 3,5-diflopyridin-2-carboxylic (138mg, 0,87mmol), 1-hydroxybenzotriazol (185mg, 1,34mmol) và 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimit hydroclorua (169mg, 0,87mmol) được bổ sung. Diisopropyl-etylamin

(0,35ml, 2mmol) được bổ sung và phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Phản ứng được tinh chế trực tiếp bằng silica gel sắc ký rửa giải bằng 0-100% etyl axetat hexan gradien để thu được hợp chất nêu ở đề mục (330mg, 84%). ES/MS (m/e): 590 (M+H).

Ví dụ điều chế 36

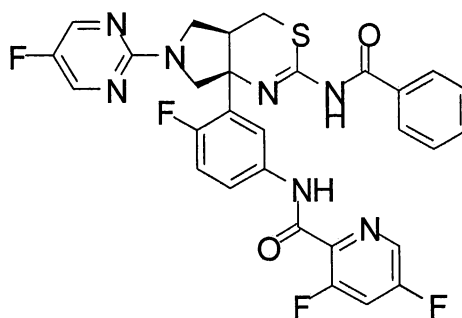
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-xyano-pyridin-2-carboxamit, (chất đồng phân 1)



N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-flo-phenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamidit (0,180g, 0,39mmol, chất đồng phân 1) được hòa tan trong hỗn hợp chứa diclometan (2ml) và DMF (0,25ml). Axit 5-xyanopyridin-2-carboxylic (114mg, 0,77mmol), 1-hydroxybenzotriazol (106mg, 0,77mmol) và 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua (150mg, 0,77mmol) được bổ sung và phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp được pha loãng bằng nước (10ml), etyl axetat (10ml) và được bổ sung vào dung dịch chứa NaOH 1H (100ml). Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc (2 × 100ml) và lớp hữu cơ được kết hợp và rửa bằng nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô qua MgSO₄, lọc và cô. Cặn được tinh chế qua silica gel sắc ký bằng cách sử dụng gradien 0-100% etyl axetat hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (133mg, 57%). ES/MS (m/e): 597 (M+H).

Ví dụ điều chế 37

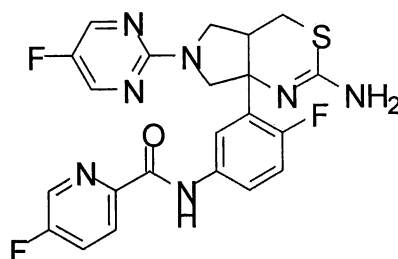
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-3,5-diflo-pyridin-2-carboxamit, (chất đồng phân 1)



N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-flo-phenyl)-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-2-yl]benzamid (0,180g, 0,39mmol, chất đồng phân 1) được hòa tan trong hỗn hợp chứa diclometan (2ml) và DMF (0,25ml). Axit 5-xyanopyridin-2-carboxylic (114mg, 0,77mmol), 1-hydroxybenzotriazol (106mg, 0,77mmol) và 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua (150mg, 0,77mmol) được bổ sung và phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp được pha loãng bằng nước (10ml) và etyl axetat (10ml) và sau đó, poured into dung dịch chứa NaOH 1H (100ml). Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc (2 × 100ml). Dịch chiết hữu cơ được kết hợp và rửa bằng nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô qua MgSO₄, lọc và cô. Cặn được tinh chế qua sắc ký silica gel bằng cách sử dụng gradien 0-100% etyl axetat hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (190mg, 80%). ES/MS (m/e): 608 (M+H).

Ví dụ A

N-[3-[2-Amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d][1,3]-thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-flo-pyridin-2-carboxamit

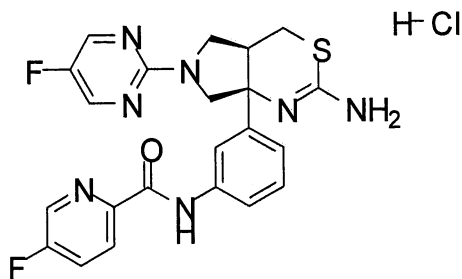


Hỗn hợp chứa N-[3-[2-benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-flo-pyridin-2-carboxamit (293mg, 497 μmol), O-metylhydroxylamin hydroclorua (430mg, 4,97mmol) và pyridin

(402 μ l, 4,97mmol) được gia nhiệt trong ethanol (13ml) đến 70°C trong bình nón đáy kín trong 2,5 giờ. Dimetyl sulfoxit (3ml) được bổ sung và hỗn hợp được gia nhiệt ở 70°C qua đêm. Dimetyl sulfoxit (10ml) được bổ sung và tiếp tục gia nhiệt ở 70°C trong 4 giờ. O-metylhydroxylamin hydroclorua (208mg, 2,48mmol) và pyridin (201 μ l, 2,48mmol) được bổ sung và hỗn hợp được gia nhiệt đến 60°C trong 3 giờ và hỗn hợp được khuấy trong 3 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Trong bình riêng biệt, hỗn hợp chứa N-[3-[2-benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4.a,5,7-tetrahydropyrol[3.-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-flo-pyridin-2-carboxamit (276mg, 468 μ mol), O-metylhydroxylamin hydroclorua (405mg, 4,68mmol) và pyridin (478 μ l, 4,68mmol) được gia nhiệt trong ethanol (15ml) và dimetyl sulfoxit (4ml) ở 70°C trong bình nón đáy kín qua đêm. Dimetyl sulfoxit (10ml) được bổ sung và tiếp tục gia nhiệt ở 70°C trong 4 giờ. O-metylhydroxylamin hydroclorua (195mg, 2,34mmol) và pyridin (189 μ l, 2,34mmol) được bổ sung và gia nhiệt tiếp tục ở 70°C trong 3 giờ, tiếp theo là khuấy hỗn hợp trong 3 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Hai hỗn hợp phản ứng được kết hợp và hầu hết dung môi được tách loại *trong chân không*. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột SCX bằng cách sử dụng 3:1 diclometan:metanol và sau đó, 2:1 diclometan: amoniac 7N trong metanol. Sản phẩm thô được tinh chế tiếp qua silica gel trong 20 phút bằng gradien từ 0,5% đến 10% amoniac metanol 7N trong diclometan gradien để thu được hợp chất nêu ở đề mục (451mg, 96%). ES/MS (m/e): 486 (M+H).

Ví dụ 1

N-{3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4a,5,6,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-7a(4H)-yl]phenyl}-5-flopyridin-2-carboxamit hydroclorua

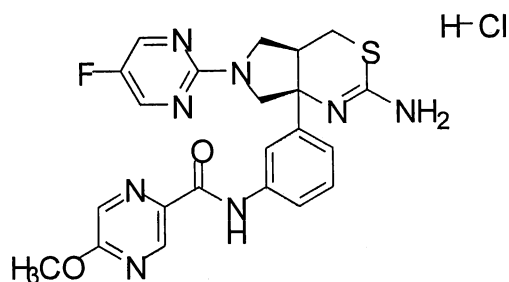


Hỗn hợp chứa N-[3-[(4aR,7aS)-2-benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-flo-pyridin-2-carboxamit (320mg,

560 μmol), O-metylhydroxylamin hydroclorua (485mg, 5,60mmol) và pyridin (453 μl , 5,60mmol) trong etanol (15ml) được gia nhiệt ở 65°C trong lọ đóng kín trong năm giờ. Phản ứng được làm nguội và dung môi được tách loại *trong chân không*. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel trong 30 phút bằng gradien 0,5% đến 10% amoniac 7N trong metanol diclometan gradien để thu được N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4.a,5,7-tetrahydropyrol[3.-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-flopyridin-2-carboxamit (219mg, 84%). Chất liệu được hòa tan trong diclometan (1ml) và metanol (0,5ml) và hydro clorua 1M trong dietyl ete (0,47ml, 470 μmol) được bổ sung. Dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được hợp chất nêu ở đề mục (228mg, 81%). ES/MS (m/e): 468 (M+H).

Ví dụ 2

N-{3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4a,5,6,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-7a(4H)-yl]phenyl}-5-metoxypyrazin-2-carboxamit hydroclorua



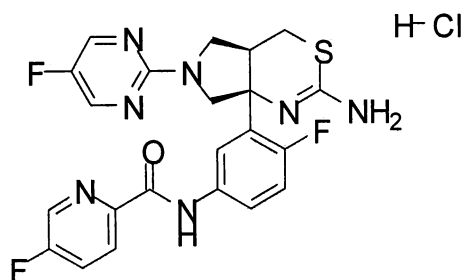
Hỗn hợp chứa N-[3-[(4aR,7aS)-2-benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-metoxypyrazin-2-carboxamit (479mg, 819 μmol), O-metylhydroxylamin hydroclorua (709mg, 8,19mmol) và pyridin (663 μl , 8,19mmol) trong etanol (20ml) được gia nhiệt ở 50°C trong bình nón đáy kín qua đêm. Dimetyl sulfoxit (4ml) được bổ sung và hỗn hợp được gia nhiệt đến 70°C trong 4 giờ để thu được dung dịch. Phản ứng được làm nguội và hầu hết dung môi được tách loại *trong chân không*. Nước được bổ sung và độ pH được điều chỉnh đến ~12 bằng natri hydroxit 1N. Hỗn hợp được chiết bằng etyl axetat (5 $\times$). Dịch chiết hữu cơ thu gom được làm khô qua natri sulfat, lọc và dung môi được tách loại *trong chân không*. Sản phẩm thô được tinh chế qua silica gel 30 phút bằng gradien 0,5% đến 10% amoniac metanol 7N trong diclometan gradient. Hỗn hợp được tinh chế lại trên cột

SCX bằng cách sử dụng 3:1 diclometan:metanol và sau đó, 2:1 diclometan:amoniac 7N trong metanol để loại cặn dimetyl sulfoxit. Hỗn hợp được tinh chế lần cuối qua silica gel 20 phút bằng từ gradien 0,5% đến 10% amoniac metanol 7N trong diclometan để thu được N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-metoxypyrazin-2-carboxamit.

Chất liệu được hòa tan trong diclometan (1ml) và metanol (0,5ml) và hydro clorua 1M trong dietyl ete (0,66ml, 660 μ mol) được bổ sung. Dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được hợp chất nêu ở đề mục (329mg, 78%). ES/MS (m/e): 481 (M+H).

Ví dụ 3

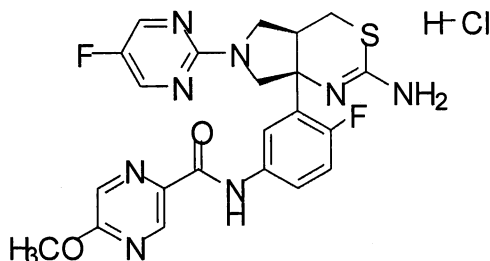
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-flo-pyridin-2-carboxamit hydroclorua



Raxemic N-[3-[2-amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-flo-pyridin-2-carboxamit (451mg, 929 μ mol) được tinh chế bất đối xứng bằng SFC (Cột: Chiralcel OD-H (5 μ m), 2,1 x 25 cm; rửa giải: 40 % metanol (0,2% isopropylamin) trong CO₂; lưu lượng 70ml/phút ở bước sóng UV225 nm). Phân tích không đối xứng chất đồng phân rửa giải thứ nhất: Cột: Chiralcel OD-H (5 μ m), 4,6 x 150 mm; rửa giải: 40% metanol (0,2% isopropylamin) trong CO₂; lưu lượng 5ml/phút ở bước sóng UV225 nm xác nhận chất đồng phân đối ảnh được làm giàu chất đồng phân đối ảnh (>99% ee) có R_t = 1,01 phút (175mg, 360 μ mol). Chất liệu (bazơ tự do, chất đồng phân 1) được hòa tan trong diclometan (1ml) và metanol (0,5ml) và hydro clorua 1M trong dietyl ete (0,36ml, 360 μ mol) được bổ sung. Dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được hợp chất nêu ở đề mục (183mg, 38%). ES/MS (m/e): 486 (M+H).

Ví dụ 4

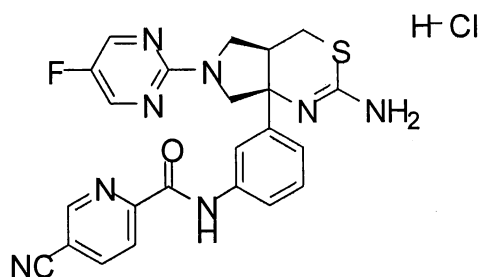
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-metoxypyrazin-2-carboxamit hydroclorua



N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-metoxypyrazin-2-carboxamit (0,350g, 0,58mmol, chất đồng phân 1) được hòa tan trong THF (2ml) và sau đó, metanol (4ml) và etanol (4ml) được bổ sung. O-Metylhydroxylamin hydroclorua (495mg, 5,81mmol) và pyridin (470μl, 5,81mmol) được bổ sung vào hỗn hợp và phản ứng được làm ấm đến 50°C và được khuấy qua đêm. Silica gel (~10 g) được bổ sung vào phản ứng và hỗn hợp được cô. Mẫu, được làm khô trên silica gel, được nạp lên hộp rỗng và được tinh chế rửa giải bằng 0-10% gradien amoniac metanol 7N trong diclometan. Sản phẩm được tinh chế lần thứ hai trên cột SCX bằng cách sử dụng 3:1 diclometan:metanol và sau đó, 2:1 diclometan:amoniac 7N trong metanol. Sản phẩm được tinh chế lần cuối cùng trên silica gel bằng 0% đến 10% gradien amoniac 7N metanol trong diclometan để thu được bazơ tự do của hợp chất nêu ở đề mục. Chất liệu được hòa tan trong diclometan (5ml) và hydro clorua 1M trong dietyl ete (0,20ml, 660 μmol) được bổ sung. Dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được hợp chất nêu ở đề mục (71mg, 23%). ES/MS (m/e): 498 (M+H).

Ví dụ 5

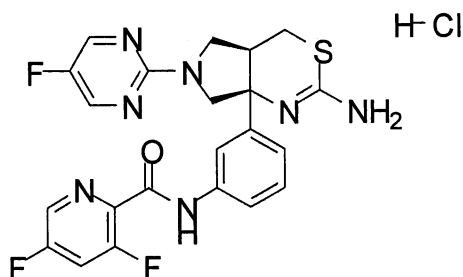
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-xyano-pyridin-2-carboxamit hydroclorua



N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-5-xyano-pyridin-2-carboxamit (360mg, 0,59mmol) được hòa tan trong etanol (10ml) và diclometan (2ml). O-metyl-hydroxylamin hydroclorua (504mg, 5,91mmol) và pyridin (478 μ l, 5,91mmol) được bổ sung và phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cuối tuần (70 giờ). Phản ứng được làm ấm đến 60°C và được khuấy trong 24 giờ. Phản ứng được cô để thu được sản phẩm thô và được tinh chế qua silica gel sắc ký bằng cách sử dụng 0-10% gradien amoniac 7N metanol trong diclometan để thu được bazơ tự do của hợp chất nêu ở đề mục. Chất liệu được hòa tan trong diclometan (5ml) và hydroclorua 1M trong dietyl ete (0,54ml, 540 μ mol) được bổ sung. Dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được hợp chất nêu ở đề mục (240mg, 75%). ES/MS (m/e): 475 (M+H).

Ví dụ 6

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-3,5-diflo-pyridin-2-carboxamit hydroclorua

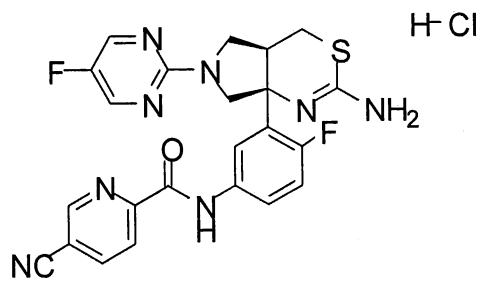


N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-pyrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]phenyl]-3,5-diflo-pyridin-2-carboxamit (330mg, 0,53mmol) được hòa tan trong THF (10ml) và etanol loãng (10ml). O-metyl-hydroxylamin hydroclorua (453mg, 5,32mmol) và pyridin (430 μ l, 5,91mmol) được bổ sung và phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cuối tuần (70 giờ). Phản ứng

được làm ấm đến 60°C và được khuấy trong 24 giờ. Hỗn hợp được cô trên silica gel (~10 g) và được tinh chế qua sắc ký silica gel bằng cách sử dụng 0-10% gradien amoniac 7N metanol trong diclometan để thu được bazơ tự do của hợp chất nêu ở đề mục. Chất liệu được hòa tan trong diclometan (5ml) và hydro clorua 1M trong dietyl ete (0,49ml, 490 μ mol) được bổ sung. Dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được hợp chất nêu ở đề mục (159mg, 54%). ES/MS (m/e): 486(M+H).

Ví dụ 7

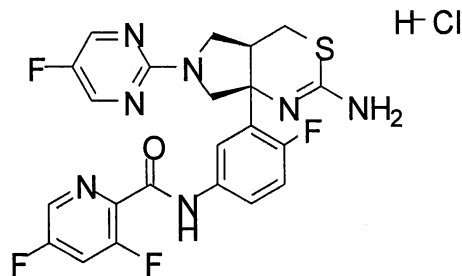
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-xyano-pyridin-2-carboxamit hydroclorua



N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrol[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-5-xyano-pyridin-2-carboxamit (133mg, 0,22mmol, chất đồng phân 1) được hòa tan trong THF (1ml) và pha loãng metanol (3ml) và etanol (3ml). O-metylhydroxylamin hydroclorua (190mg, 2,2mmol) và pyridin (180 μ l, 2,2mmol) được bổ sung. Phản ứng được làm ấm đến 50°C và được khuấy qua đêm. Hỗn hợp được cô trên silica gel (~10 g) và được tinh chế qua silica gel sắc ký rửa giải bằng 0-10% gradien amoniac 7N metanol trong diclometan. Chất liệu được tinh chế lần thứ hai trên cột SCX bằng cách sử dụng 3:1 diclometan:metanol và sau đó, 2:1 diclometan:amoniac 7N trong metanol. Hỗn hợp được tinh chế lần cuối cùng trên silica gel bằng 0% đến 10% gradien amoniac metanol 7N trong diclometan để thu được bazơ tự do của hợp chất nêu ở đề mục. Chất liệu được hòa tan trong diclometan (5ml) và hydroclorua 1M trong dietyl ete (0,27ml, 270 μ mol) được bổ sung. Dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được hợp chất nêu ở đề mục (114mg, 97%). ES/MS (m/e): 493 (M+H).

Ví dụ 8

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-3,5-diflo-pyridin-2-carboxamit hydroclorua



N-[3-[(4aR,7aS)-2-benzamido-6-(5-flopyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrido[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-flo-phenyl]-3,5-diflo-pyridin-2-carboxamit (190mg, 0,31mmol, chất đồng phân 1) được hòa tan trong THF (1ml) và pha loãng metanol (3ml) và etanol (3ml). O-Metylhydroxylamin hydroclorua (267mg, 3,1mmol) và pyridin (253μl, 3,1mmol) được bổ sung và phản ứng được làm ấm đến 50°C và được khuấy qua đêm. Phản ứng được tinh chế trên cột SCX bằng cách sử dụng 3:1 diclometan:metanol và sau đó, 2:1 diclometan:amoniac 7N trong metanol. Chất liệu được tinh chế lần cuối cùng trên silica gel bằng 0% đến 10% gradien amoniac 7N metanol trong diclometan để thu được bazơ tự do của hợp chất nêu ở đề mục. Chất liệu được hòa tan trong diclometan (5ml) và hydroclorua 1M trong dietyl ete (0,20ml, 200 μmol) được bổ sung. Dung môi được tách loại *trong chân không* để thu được hợp chất nêu ở đề mục (101mg, 60%). ES/MS (m/e): 504 (M+H).

Quy trình thử nghiệm *in vitro*:

Đối với các thử nghiệm enzym và tế bào *in vitro*, hợp chất thử nghiệm được điều chế trong DMSO để tạo ra 10 mM dung dịch gốc. Dung dịch gốc được pha loãng hàng loạt trong DMSO để thu được đường cong pha loãng một phần mười với nồng độ hợp chất cuối cùng nằm trong khoảng từ 10 mM đến 0,05 nM trong đĩa đáy tròn 96 lỗ trước khi thực hiện các thử nghiệm enzym và tế bào nguyên vẹn *in vitro*.

Thử nghiệm ức chế proteaza *in vitro*:

Biểu hiện BACE1 của người

BACE1 của người (số hiệu lưu giữ: AF190725) được tách dòng từ ADN bỏ thể của não toàn phần bằng RT-PCR. Trình tự nucleotit tương ứng với trình tự axit amin #1 đến 460 được chèn vào ADN bỏ thể mã hóa polypeptit IgG₁ (Fc) của người (Vassar et al. 1999). Protein dung hợp của BACE1(1-460) và Fc của người, được gọi là *huBACE1:Fc*, được xây dựng thành vật truyền pJB02. BACE1(1-460):Fc (*huBACE1:Fc*) của người được biểu hiện thoáng qua vào tế bào HEK293. 250 µg ADN bỏ thể của mỗi cấu trúc được kết hợp với Fugene 6 và được bổ sung vào 1 lit tế bào HEK293. Bốn ngày sau khi chuyển nhiễm, thu lấy môi trường điều kiện để tinh chế.

Tinh chế *huBACE1:Fc*.

huBACE1:Fc được tinh chế bằng sắc ký Protein A. Enzym được bảo quản ở 80°C ở dạng các phân phân ước nhỏ.

Thử nghiệm BACE1 FRET

Dung dịch pha loãng hàng loạt của hợp chất thử nghiệm được điều chế như nêu trên. Hợp chất được pha loãng tiếp 20× trong dung dịch đệm KH₂PO₄. Mười µL mỗi dung dịch pha loãng được bổ sung vào mỗi lỗ trên hàng A đến H của đĩa màu đen liên kết protein thấp tương ứng chứa hỗn hợp phản ứng (25 µL chứa 50 mM KH₂PO₄, pH 4,6, 1 mM TRITON® X-100, 1mg/mL Albumin huyết thanh bò, và 15 µM cơ chất FRET) (Xem Yang, et al., *J. Neurochemistry*, **91**(6) 1249-59 (2004)). Các chất được trộn đều trên máy lắc đĩa trong 10 phút. 15 µL chứa 200 pM BACE1(1-460):Fc. Xem (Vasser, et al., *Science*, **286**, 735-741 (1999)) trong dung dịch đệm KH₂PO₄ được bổ sung vào đĩa chứa cơ chất và hợp chất thử nghiệm để khơi mào phản ứng. RFU của hỗn hợp tại thời điểm 0 được ghi tại bước sóng kích thích 355 nm và bước sóng phát xạ 460 nm, sau khi trộn nhanh trên máy lắc đĩa. Đĩa phản ứng được bọc bằng lá nhôm và giữ trong lò ảm bóng tối ở nhiệt độ trong phòng trong từ 16 đến 24 giờ. RFU tại cuối thời điểm ủ được ghi lại giống các cài đặt kích thích và phát xạ được sử dụng tại thời điểm 0. Sự khác biệt của RFU tại thời điểm 0 và thời điểm ủ là đại diện của hoạt tính của BACE1 theo hợp chất điều trị. Sự khác biệt RFU được vẽ sơ đồ theo nồng độ chất ức chế và đường cong được điều chỉnh bằng phương trình logistic bốn thông số để thu được các giá trị EC₅₀ và IC₅₀. (Xem Sinha, et al., *Nature*, **402**, 537-540 (2000)).

Hợp chất tiêu biểu sau đây được thử nghiệm cơ bản như nêu trên và thể hiện hoạt tính sau đây đối với BACE1:

Bảng 1

Ví dụ #	BACE1 IC ₅₀ (nM)
1	0,610 (+ 0,0948, n=8/9)
2	0,482 (+ 0,0580, n=6/7)
3	0,554 (+ 0,0674, n=3)
4	0,569 (+ 0,0796, n=2)
5	0,450 (+ 0,0911, n=4)
6	0,739 (+ 0,181, n=7)
7	0,358 (n=1/3)
8	0,730 (+ 0,0951, n=3)

Giá trị trung bình $\pm$ SEM; SEM = sai số chuẩn của giá trị trung bình

Dữ liệu này thể hiện rằng hợp chất trong Bảng 1 ức chế hiệu quả hoạt tính enzym BACE1 tài tổ hợp tinh chế *in vitro*.

Thử nghiệm trên tế bào nguyên vẹn để đo hoạt tính ức chế Beta-Secretaza

Thử nghiệm trên tế bào nguyên vẹn HEK293Swe

Thử nghiệm trên tế bào nguyên vẹn thông thường để đo hoạt tính ức chế beta-secretaza sử dụng dòng tế bào thận của phôi người HEK293p (số hiệu lưu giữ ATCC CRL-1573) biểu hiện ổ định ADN bộ thể của người APP751 chứa đột biến kép tồn tại trong tự nhiên Lys651Met652 thành Asn651Leu652, thường được gọi là đột biến Swedish (lưu ý là HEK293Swe) và đã được thể hiện là sản sinh quá mức Abeta (Citron, *et al.*, *Nature*, **360**, 672-674 (1992)). Thử nghiệm sản sinh Abeta *In vitro* đã được nêu trong tài liệu kỹ thuật chuyên ngành (Xem Dovey, *et al.*, *Journal of Neurochemistry*, **76**, 173-181 (2001); Seubert, *et al.*, *Nature*, **361**, 260 (1993); và Johnson-Wood, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1550-1555 (1997)).

Các tế bào (HEK293Swe ở mức độ $3,5 \times 10^4$ tế bào/lỗ, chứa 200 μ L môi trường nuôi cấy, DMEM chứa 10% FBS) được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 4 đến 24 giờ khi có mặt/không có mặt chất ức chế (pha loãng trong DMSO) ở nồng độ mong muốn. Ở thời điểm cuối của việc ủ, môi trường điều kiện được phân tích để xác nhận hoạt tính beta-secretaza, ví dụ, bằng cách phân tích Abeta peptit. Abeta peptit toàn phần (Abeta 1-x) được đo bằng ELISA bánh kẹp, bằng cách sử dụng 266 đơn dòng làm kháng thể bắt giữ và 3D6 biotinyl hóa làm kháng thể thông báo. Theo cách khác, Abeta 1-40 và Abeta 1-42 peptit được đo bằng ELISA bánh kẹp, bằng cách sử dụng 2G3 đơn dòng làm kháng thể bắt giữ đối với Abeta 1-40, và 21F12 đơn dòng làm kháng thể bắt giữ đối với Abeta 1-42. Cả hai phép ELISA Abeta 1-40 và Abeta 1-42 đều sử dụng 3D6 biotinyl hóa làm kháng thể thông báo. Nồng độ Abeta được giải phóng trong môi trường điều kiện sau khi xử lý bằng hợp chất tương ứng với hoạt tính của BACE1 trong điều kiện này. Đường con ức chế 10 điểm được vẽ sơ đồ và được điều chỉnh bằng phương trình logistic bốn thông số để thu được các giá trị EC_{50} và IC_{50} đối với tác dụng làm giảm Abeta. Các hợp chất tiêu biểu sau đây được thử nghiệm cơ bản như nêu trên và thể hiện hoạt tính sau đây đối với tác dụng làm giảm Abeta:

Bảng 2

Ví dụ	HEK 293 Swe A-beta (1-40) ELISA	HEK 293 Swe A-beta (1-42) ELISA
	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)
1	0,619	0,437
2	0,324	0,289
3	1,26	0,299
5	0,0887	0,0785
6	0,220	0,211

Giá trị trung bình $\pm$ SEM; SEM = sai số chuẩn của giá trị trung bình

Dữ liệu này thể hiện rằng hợp chất theo Bảng 2 ức chế hiệu quả việc sản sinh Abeta nguyên thể ở tế bào nguyên vẹn.

Thử nghiệm tế bào thần kinh PDAPP sơ cấp

Thử nghiệm xác nhận trên tế bào nguyên vẹn cũng được thực hiện trên các môi trường nuôi cấy tế bào thần kinh sơ cấp được sinh ra từ phôi chuột nhất chuyển gen PDAPP. Các tế bào vỏ thần kinh sơ cấp được chuẩn bị từ phôi PDAPP vào ngày 16 của tuổi phôi và được nuôi cấy trong các đĩa 96 lỗ (15×10^4 tế bào/lỗ tròn DMEM/F12 (1:1) thêm 10% FBS). Sau 2 ngày *in vitro*, môi trường nuôi cấy được thay thế bằng DMEM/F12 không chứa huyết thanh (1:1) chứa thành phần bổ sung B27 và 2 μ M (nồng độ cuối) Ara-C (Sigma, C1768). Vào ngày 5 *in vitro*, tế bào thần kinh được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ khi có mặt/không có mặt chất ức chế (pha loãng trong DMSO) ở nồng độ mong muốn. Ở thời điểm cuối của việc ủ, môi trường điều kiện được phân tích để xác nhận hoạt tính beta-secretaza, ví dụ, bằng cách phân tích Abeta peptit. Abeta peptit toàn phần (Abeta 1-x) được đo bằng ELISA bánh kẹp, bằng cách sử dụng 266 đơn dòng làm kháng thể bắt giữ và 3D6 biotinyl hóa làm kháng thể thông báo. Theo cách khác, Abeta 1-40 và Abeta 1-42 peptit được đo bằng ELISA bánh kẹp, bằng cách sử dụng 2G3 đơn dòng làm kháng thể bắt giữ đối với Abeta 1-40, và 21F12 đơn dòng làm kháng thể bắt giữ đối với Abeta 1-42. Cả ELISA Abeta 1-40 và Abeta 1-42 đều sử dụng 3D6 biotinyl làm kháng thể thông báo. Nồng độ Abeta giải phóng trong môi trường điều kiện sau khi xử lý bằng hợp chất tương ứng với hoạt tính BACE1 trong điều kiện này. Đường cong ức chế 10 điểm được vẽ và được điều chỉnh bằng phương trình logistic bốn thông số để thu được các giá trị EC_{50} và IC_{50} đối với tác dụng làm giảm Abeta. Các hợp chất tiêu biểu sau đây được thử nghiệm cơ bản như nêu trên và thể hiện hoạt tính sau đây đối với tác dụng làm giảm Abeta:

Bảng 3

Ví dụ	Tế bào thần kinh PDAPP A-beta (1-40) ELISA IC ₅₀ (nM)	Tế bào thần kinh PDAPP A-beta (1-42) ELISA IC ₅₀ (nM)
1	0,487 ($\pm$ 0,0946, n=2)	0,591 ($\pm$ 0,268, n=2)
2	0,244 (n=1/2)	1,22 ($\pm$ 0,967, n=2)
3	0,309 ($\pm$ 0,0478, n=2)	0,184 ($\pm$ 0,0234, n=2)
4	0,134	0,131
5	0,132 ($\pm$ 0,0717, n=2)	0,0813
6	0,279 ($\pm$ 0,0607, n=2)	0,308 ($\pm$ 0,115, n=2)
7	0,0873	0,0649
8	0,285	0,29

Giá trị trung bình $\pm$ SEM; SEM = sai số chuẩn của giá trị trung bình

Dữ liệu này thể hiện rằng hợp chất trong Bảng 3 ức chế hiệu quả việc sản sinh Abeta ở tế bào nguyên vẹn.

Ức chế Beta-Secretaza *In vivo*

Một số mô hình động vật, bao gồm chuột nhắt, chuột lang, chó, và khỉ, có thể được sử dụng để sàng lọc hoạt tính ức chế beta-secretaza *in vivo* sau khi điều trị bằng hợp chất. Các động vật được sử dụng theo sáng chế có thể là động vật kiểu đại, chuyển gen, hoặc thiếu gen. Ví dụ, mô hình chuột nhắt PDAPP, được chuẩn bị như được nêu trong tài liệu Games et al., *Nature* **373**, 523-527 (1995), và động vật không chuyển gen hoặc thiếu gen khác là hữu dụng để phân tích sự ức chế sản sinh Abeta và sAPPbeta *in vivo* khi có mặt hợp chất ức chế. Nói chung, các con chuột nhắt PDAPP từ 2 đến 12 tháng tuổi, chuột nhắt thiếu gen hoặc động vật không chuyển gen được cho sử dụng hợp chất được bào chế trong chất dẫn, như dầu ngô, xyclodextran, dung dịch đệm phosphat, PHARMASOLVE®, hoặc chất dẫn thích hợp khác. Từ một đến 24 giờ sau khi sử dụng hợp chất, các con vật bị giết, và não cũng như dịch não tủy và huyết thanh được tách

loại để phân tích về các đoạn Abetas, C99, và sAPP. (Xem May, *et al.*, *Journal of Neuroscience*, 31, 16507-16516 (2011)).

Đối với các nghiên cứu được lý in vivo tiêu chuẩn, các con vật được cho sử dụng nhiều nồng độ hợp chất và so sánh với nhóm đối chứng được điều trị bằng chất dẫn được cho sử dụng tại các thời điểm như nhau. Đối với một số nghiên cứu trong một giai đoạn, mô não, huyết thanh, hoặc dịch não tủy thu được từ các con vật được lựa chọn, bắt đầu tại thời điểm 0 để xác lập giá trị ban đầu. Hợp chất hoặc chất dẫn thích hợp được sử dụng cho nhóm khác và bị giết ở các thời điểm khác nhau sau khi sử dụng. Mô não, huyết thanh, hoặc dịch não tủy thu được từ các con vật được lựa chọn và được phân tích xem có mặt sản phẩm phân cắt APP, bao gồm Abeta peptit, sAPPbeta, và các mảnh APP khác, ví dụ, bằng thử nghiệm ELISA bánh kẹp cụ thể. Tại cuối thời gian thử nghiệm, các con vật bị giết và mô não, huyết thanh, hoặc dịch não tủy được phân tích xem có mặt Abeta peptit, C99, và sAPPbeta, nếu thích hợp. Mô não của các con vật chuyển gen APP có thể còn được phân tích về lượng mảng tinh bột beta-amyloid sau khi điều trị bằng hợp chất. "Abeta 1-x peptit" như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ tổng số các loại Abeta bắt đầu bằng gốc 1 và kết thúc bằng đầu tận cùng C lớn hơn gốc 28. Việc này xảy ra trong hầu hết các loại Abeta và thường được gọi là "Abeta toàn phần".

Các động vật (chuột nhắt PDAPP hoặc chuyển gen APP khác hoặc không chuyển gen) được cho sử dụng hợp chất ức chế có thể minh họa hiện tượng giảm Abeta hoặc sAPPbeta trong mô não, huyết thanh hoặc dịch não tủy và hiện tượng giảm mảng tinh bột beta amyloid trong mô não, khi so với đối chứng được điều trị bằng chất dẫn hoặc đối chứng tại thời điểm không. Ví dụ, 3 giờ sau khi sử dụng hợp chất theo Ví dụ 1 với liều 1, 3, hoặc 10mg/kg qua đường miệng cho chuột nhắt PDAPP cái còn nhỏ, hàm lượng Abeta 1-x peptit lần lượt giảm khoảng 34%, 48%, và 53% trong đồi hải mã của não, và khoảng 43%, 59% và 66% trong vỏ não, so với chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn.

Ví dụ, 3 giờ sau khi sử dụng hợp chất theo Ví dụ 3 với liều 1 hoặc 3mg/kg qua đường miệng, hàm lượng Abeta 1-x peptit lần lượt giảm khoảng 38% và 50% trong đồi

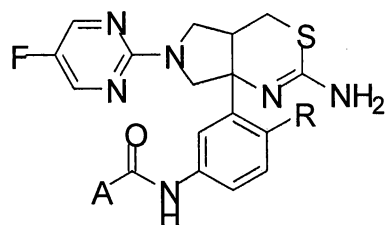
hải mã của não, và khoảng 34% và 53% trong vỏ não, so với chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn.

Xét theo hoạt tính của hợp chất theo Ví dụ 1 và 3 đối với enzym BACE *in vitro*, các tác dụng làm giảm Abeta là thống nhất với tác dụng ức chế BACE *in vivo*, và cũng thể hiện sự xuyên qua CNS của hợp chất theo Ví dụ 1 và 3.

Các nghiên cứu này cho thấy rằng hợp chất theo sáng chế ức chế BACE và, do đó, hữu dụng để làm giảm hàm lượng Abeta.

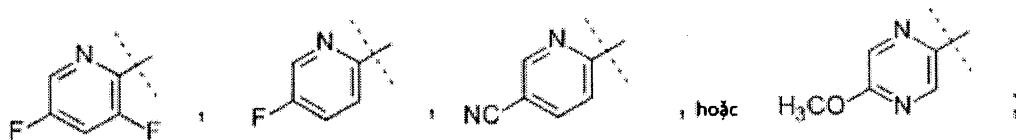
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



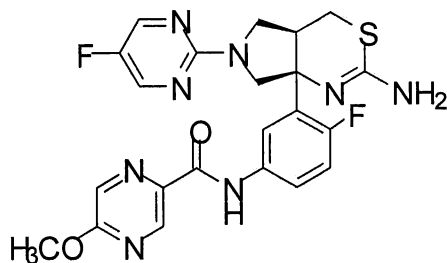
trong đó R là H hoặc F; và

A là:

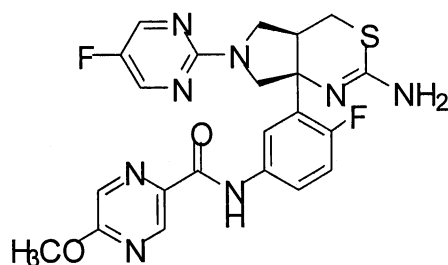


hoặc muối dược dụng của nó.

2. Hợp chất hoặc muối theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



3. Hợp chất theo điểm 2, trong đó hợp chất này có công thức:



4. Dược phẩm, chứa hợp chất hoặc muối dược dụng của nó theo điểm bất kỳ trong các điểm 1-3 với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược dược dụng.