

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 618**

51 Int. Cl.:

C07D 401/06 (2006.01)

C07D 241/28 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2015 PCT/GB2015/050765**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2015 E 15713339 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 3119752**

54 Título: **Compuestos de 3,4-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamida para el tratamiento de enfermedades mediadas por ENAC**

30 Prioridad:

18.03.2014 US 201461954674 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.08.2018

73 Titular/es:

**ASTRAZENECA AB (100.0%)
SE-151 85 Södertälje, SE**

72 Inventor/es:

**BERGLUND, SUSANNE, ELISABETH;
CONNOLLY, STEPHEN;
HEMMERLING, MARTIN;
HOSSAIN, NAFIZAL;
KRISTOFFERSSON, ANNA;
LUNDKVIST, JOHAN, RUNE, MICHAEL;
NIKITIDIS, GRIGORIOS;
RIPA, LENA, ELISABETH y
SHAMOVSKY, IGOR**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 679 618 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de 3,4-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamida para el tratamiento de enfermedades mediadas por ENAC

5 La presente invención se refiere a derivados de pirazina que tienen actividad farmacéutica, a procesos para preparar dichos derivados, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos derivados y al uso de dichos derivados como agentes terapéuticos activos.

10 La hidratación del epitelio de la vía respiratoria pulmonar asegura una función ciliar eficiente, y la depuración mucociliar (MCC) es un mecanismo de defensa innato de la primera vía respiratoria. La falta de una eliminación adecuada de moco produce estasis de moco y riesgo de obstrucción de las vías respiratorias y predispone a una infección bacteriana crónica. La hipersecreción de moco, el engrosamiento del moco y las tasas reducidas de depuración mucociliar son características bien establecidas de la fisiopatología de la Fibrosis Quística (CF) y de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD), y contribuyen significativamente a la morbilidad y mortalidad de las enfermedades. Un MCC deficiente conduce a la obstrucción de las vías respiratorias por el moco estático, que afecta la función pulmonar y sirve como nido para la infección, que facilita la colonización bacteriana y lleva a un aumento de las tasas y la gravedad de las exacerbaciones de la enfermedad.

15 La fisiopatología de la CF está bien caracterizada y es provocada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) que conduce a la deshidratación de las vías respiratorias, y sigue siendo uno de los trastornos hereditarios fatales más comunes en todo el mundo. Aunque la CF es una enfermedad multiorgánica compleja, la morbilidad y la mortalidad están determinadas principalmente por la enfermedad pulmonar obstructiva crónica que evoluciona desde el inicio de la obstrucción del moco en las vías respiratorias pequeñas, inflamación neutrofílica crónica de las vías respiratorias e infección bacteriana.

20 La fisiopatología de la COPD es compleja y poco conocida. Las guías clínicas actuales describen la COPD como un estado de enfermedad caracterizado por la limitación del flujo de aire que no es completamente reversible. La limitación del flujo de aire suele ser tanto progresiva como asociada a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas y gases nocivos. La fuente contributiva más importante de dichas partículas y gases es el humo del tabaco. Los pacientes con COPD tienen una variedad de síntomas, que incluyen tos, dificultad para respirar y producción excesiva de esputo; dichos síntomas surgen de disfunciones de una serie de compartimentos celulares, que incluyen neutrófilos, macrófagos y células epiteliales.

25 La hidratación adecuada de las vías respiratorias es de importancia clave para mantener la MCC y el contenido de agua apropiado de moco. La regulación de la hidratación de las vías respiratorias está fuertemente relacionada con el movimiento de electrolitos y agua sobre la capa de células epiteliales. El líquido periciliar (PCL) sobre la superficie epitelial de las vías respiratorias que rodea los cilios separa la capa de moco viscoso de la superficie epitelial y facilita el batimiento ciliar. El volumen/profundidad del PCL ha demostrado ser un fuerte determinante de la tasa de MCC.

30 El ENaC (el Canal de Sodio Epitelial) es un canal de iones bloqueado sensible a la amilorida, sin tensión, ampliamente expresado en los epitelios de los sistemas respiratorio, urinario, digestivo, genital y la piel. Sistémicamente, el ENaC desempeña una función clave en la homeostasis electrolítica y en el balance de volumen de líquidos al regular el transporte de Na⁺ sobre el epitelio renal. Mediante el control del transporte de sodio, el ENaC controla el gradiente osmótico sobre el epitelio de la vía respiratoria y, por lo tanto, regula el volumen de PCL. El bloqueo del transporte de sodio mediado por ENaC reduce el gradiente osmótico sobre el epitelio, conduce a la retención de agua en la superficie de las vías respiratorias (aumento del volumen de PCL) y mejora la hidratación del moco y la tasa de MCC.

35 En la literatura se establece una función para el ENaC como un regulador clave del volumen líquido en la superficie de las vías respiratorias (ASL) y la depuración mucociliar (MCC) en vivo. Los estudios en ratones-ENaC (-/-) α-β- y γ, respectivamente, muestran un papel crítico de la función de ENaC en la depuración del líquido pulmonar perinatal (Barker et al., J. Clin. Invest., 1998. 102(8):1634; Bonny y Hummler, Kidney Int., 2000. 57(4):1313; Pradervand et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1999. 96(4):1732). Los ratones transgénicos que sobreexpresan la subunidad β de ENaC muestran una mayor absorción de Na⁺ en las vías respiratorias, agotamiento del volumen de ASL, deshidratación de moco y MCC retardado. Los ratones desarrollan enfermedad pulmonar severa con características clínicas similares a CF y COPD, que incluyen obstrucción de moco, metaplasia de células caliciformes, inflamación neutrofílica, eliminación bacteriana defectuosa y enfisema (Mall et al., Nature Med., 2004. 10:487; Mall et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2007. 177:730). La tasa de mortalidad entre los transgénicos durante los primeros 20 días de vida es de alrededor del 50% debido a la obstrucción mucosa extensa de las vías respiratorias que resulta de asfisia, pero la mortalidad se reduce significativamente mediante la administración de amilorida a los pulmones de los ratones durante 14 días después del nacimiento (Mall et al., ATS Poster abstract #G55, 2008).

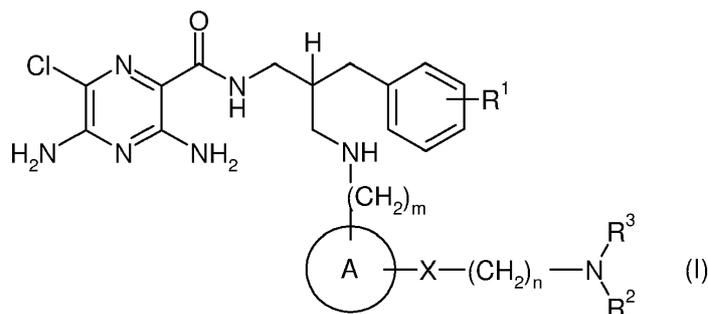
45 Adicionalmente, los humanos con pseudohipoaldosteronismo 1 (PHA1), una enfermedad provocada por mutaciones de pérdida de función en los genes que codifican α-β- y γ-ENaC, muestran un aumento del volumen de ASL y una regulación positiva de MCC (Kerem et al., N. Engl. Med., 1999. 341: 156). El tratamiento de sujetos normales con el

canal ENaC que bloquea el compuesto amilorida, aumenta las tasas de volumen de ASL y MCC (Sood et al., Am. J. Crit. Care Med., 2003. 167: 158).

El amiloride y benzamilol son derivados de pirazina farmacéuticamente activos conocidos por bloquear el canal de sodio epitelial.

- 5 Se conocen compuestos de amina cuaternaria y compuestos de amina cuaternaria α -ramificados que tienen una potente actividad de bloqueo de ENaC humana (Hunt et al. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(2) & 22(8)).

Brevemente, esta especificación describe, en parte, un compuesto de la fórmula (I):



en la que:

- 10 R^1 se selecciona de hidrógeno o alquilo C_{1-4} ;
 m es 1 o 2;
 A se selecciona de fenilo o heterociclilo;
 X se selecciona de $-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^4-$ o $-O-C(=O)-NR^5-$;
 n es 2 o 3;
- 15 R^2 se selecciona de hidrógeno o alquilo C_{1-8} ;
 R^3 es alquilo $C_{5-6}-OH$, en el que dicho grupo alquilo C_{5-6} se sustituye adicionalmente por grupos 3- o 4-OH adicionales; y
 R^4 y R^5 se seleccionan de hidrógeno o alquilo C_{1-4} ;
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 20 Esta especificación también describe, en parte, composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
 Esta especificación también describe, en parte, un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia.
- 25 Esta especificación también describe, en parte, un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento o prevención de un estado de enfermedad mediado por ENaC.
 Esta especificación también describe, en parte, un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un estado de enfermedad mediado por ENaC.
- 30 Esta especificación también describe, en parte, un método para tratar o prevenir un estado de enfermedad mediado por ENaC en un mamífero que sufre de, o está en riesgo de, dicha enfermedad, que comprende administrar a un mamífero en necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 35 Aspectos adicionales de la invención serán evidentes para un experto en la técnica a partir de la lectura de esta especificación.
 Los compuestos de la invención pueden existir en forma de sal o en forma no de sal (es decir, como una base libre), y la presente invención abarca tanto formas de sal como formas de no sal.

- Los compuestos descritos en esta especificación pueden formar sales de adición de ácido. En general, se puede preparar una sal de adición de ácido utilizando diversos ácidos inorgánicos u orgánicos. Dichas sales se pueden formar normalmente, por ejemplo, mezclando el compuesto con un ácido (por ejemplo, una cantidad estequiométrica de un ácido) utilizando diversos métodos conocidos en la técnica. Esta mezcla se puede producir en agua, un solvente orgánico (por ejemplo, éter, acetato de etilo, etanol, metanol, isopropanol o acetonitrilo), o una mezcla acuosa/orgánica.
- En otro aspecto de la invención, las sales de adición de ácido son, por ejemplo, trifluoroacetato, formiato, acetato o ácido clorhídrico.
- El experto conocerá los principios generales y las técnicas de preparación de sales farmacéuticas, tales como aquellas descritas en, por ejemplo, Berge et al., *J. Pharm. Sci.*, 66, 1 - 19 (1977).
- Los compuestos y sales descritos en esta especificación pueden incluir uno o más centros quirales (es decir, asimétricos). En la medida en que una estructura o nombre químico en esta especificación no indique la quiralidad, la estructura o nombre pretende abarcar cualquier estereoisómero individual (es decir, cualquier isómero quiral único) que corresponde a esa estructura o nombre, así como cualquier mezcla de estereoisómeros (por ejemplo, un racemato). En algunas realizaciones, se obtiene un estereoisómero individual al aislar una mezcla de isómeros (por ejemplo, un racemato) utilizando, por ejemplo, separación cromatográfica quiral. En otras realizaciones, se obtiene un estereoisómero individual mediante síntesis directa a partir de, por ejemplo, un material de partida quiral.
- Cuando está en forma cristalina sólida, un compuesto de fórmula (I) puede estar en forma de un cocrystal con otra entidad química y la invención abarca todos dichos cocrystal.
- Los compuestos de la invención pueden existir como un solvato (tal como un hidrato) así como formas no solvatadas, y la presente invención cubre todos estos solvatos.
- Los compuestos y sales descritos en esta especificación pueden existir en diversas formas tautoméricas y la invención abarca todas las formas tautoméricas de este tipo. Los "tautómeros" son isómeros estructurales que existen en equilibrio como resultado de la migración de un átomo de hidrógeno.
- Los compuestos y sales descritos en esta especificación pueden estar marcados isotópicamente (o "radiomarcados"). En ese caso, uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o número de masa que se encuentra normalmente en la naturaleza. Los ejemplos de radionucleidos que se pueden incorporar incluyen ^2H (también escrito como "D" para deuterio), ^3H (también escrito como "T" para tritio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O y ^{36}Cl . El radionucleido que se utilice dependerá de la aplicación específica de ese derivado radiomarcado. Por ejemplo, para el etiquetado de receptores in vitro y los ensayos de competición, ^3H o ^{14}C son a menudo útiles. Para aplicaciones de imágenes de radio, ^{11}C es a menudo útil. En algunas realizaciones, el radionucleido es ^3H . En algunas realizaciones, el radionucleido es ^{14}C . En algunas realizaciones, el radionucleido es ^{11}C .
- Los grupos alquilo y las fracciones son de cadena lineal o ramificada, por ejemplo alquilo C_{1-8} , alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-4} o alquilo C_{5-6} . Ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y n-octilo, tal como metilo o n-hexilo.
- El heterociclilo es un anillo no aromático de 5 o 6 miembros que comprende uno o dos heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre; o un N-óxido del mismo, o un S-óxido o S-dióxido del mismo. Un ejemplo de un heterociclilo es un anillo no aromático de 5 o 6 miembros que comprende uno o dos átomos de nitrógeno; o un N-óxido del mismo, o un S-óxido o S-dióxido del mismo, por ejemplo, pirrolidinilo o piperidinilo, tal como piperidin-4-ilo. Para evitar dudas, los sustituyentes en el anillo de heterociclilo pueden estar unidos a través de un átomo de carbono o un heteroátomo.
- El término "farmacéuticamente aceptable" se utiliza para caracterizar una fracción (por ejemplo, una sal, forma de dosificación o excipiente) que sea adecuado para uso en el paciente previsto.
- En un aspecto particular R^1 se sustituye al grupo fenilo en la posición 2 en relación con el punto de adhesión al resto de la fórmula (I).
- En un aspecto adicional R^1 es alquilo C_{1-4} .
- En un aspecto adicional R^1 es metilo.
- En un aspecto adicional m es 1.
- En un aspecto todavía adicional A se selecciona de fenilo o piperidinilo.
- En un aspecto adicional A es fenilo.
- En un aspecto adicional A es piperidinilo.

En otro aspecto X es $-C(=O)-NR^4-$.

En un aspecto adicional X es $-C(=O)-NH-$.

5 En un aspecto, en el que el grupo X es $-C(=O)-NR^4-$, luego el carbonilo de X se une a A y el grupo amino de X a $(CH_2)_n$. En otro aspecto, en el que el grupo X es $-C(=O)-NR^4-$, luego el grupo amino de X se une a A y el grupo carbonilo de X a $(CH_2)_n$.

En un aspecto, en el que el grupo X es $-O-C(=O)-NR^5-$, luego el oxígeno de éter de X se une a A y el grupo amino de X a $(CH_2)_n$. En otro aspecto, en el que el grupo X es $-O-C(=O)-NR^5-$, luego el grupo amino de X se une a A y el oxígeno de éter de X a $(CH_2)_n$.

10 En otro aspecto el grupo X se sustituye con el grupo A en la posición 4 en relación con el punto de adhesión al resto del compuesto de la fórmula (I).

En otro aspecto n es 2.

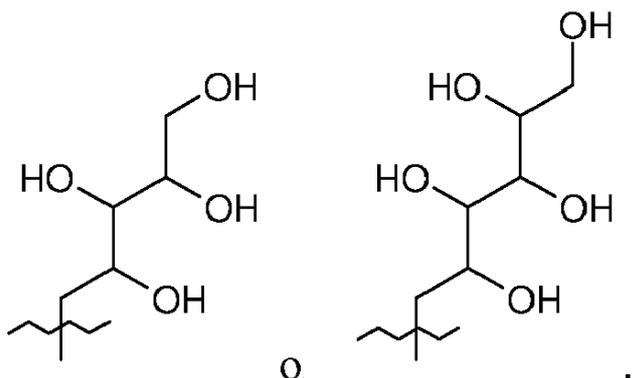
En un aspecto adicional R^2 es alquilo C_{1-8} .

En un aspecto todavía adicional R^2 es n-hexilo.

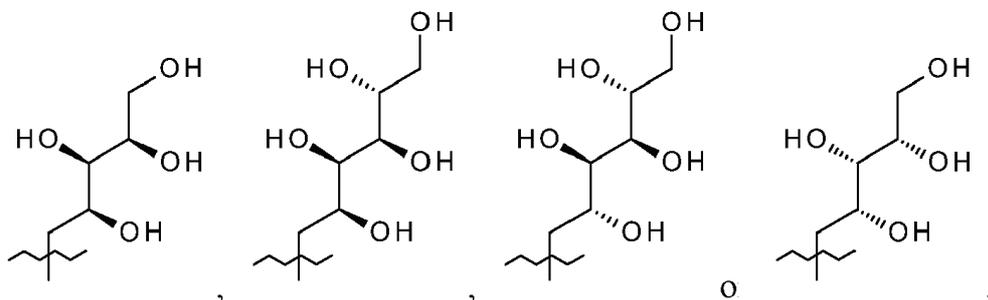
15 En otro aspecto, R^3 es alquilo C_5-OH , en el que el dicho grupo alquilo C_5 se sustituye adicionalmente por unos grupos 3-OH adicionales.

En otro aspecto, R^3 es alquilo C_6-OH , en el que el dicho grupo alquilo C_6 se sustituye adicionalmente por unos grupos 4-OH adicionales.

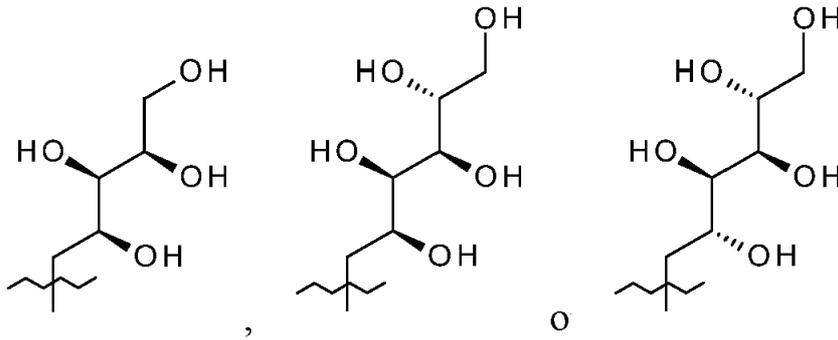
En un aspecto adicional R^3 se selecciona de los siguientes:



20 En otro aspecto, R^3 se selecciona de los siguientes:



En un aspecto adicional R^3 se selecciona de los siguientes:



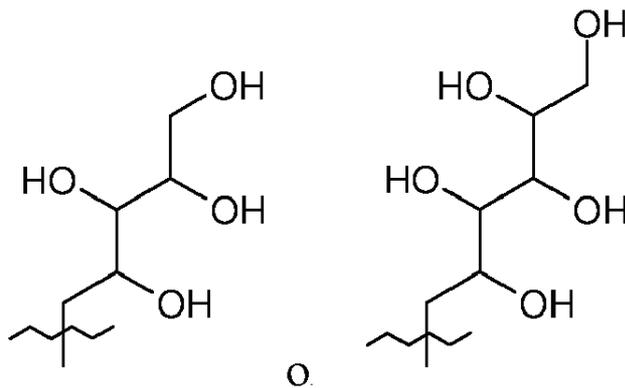
En otro aspecto, R³ se selecciona de (2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentilo, (2S,3R,4R 5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexilo, (2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexilo o (2R,3 S,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipentilo.

5 En un aspecto adicional, R³ se selecciona de (2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentilo, (2S,3R,4R 5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexilo o (2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexilo.

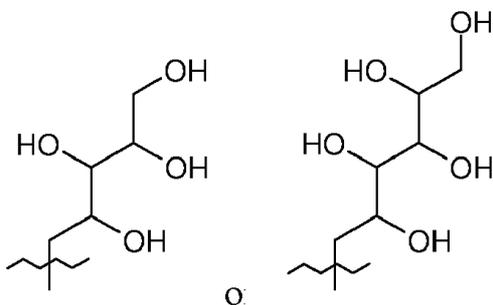
En otro aspecto R⁵ es hidrógeno.

En un aspecto adicional, R¹ es alquilo C₁₋₄; m es 1 o 2; A es fenilo o piperidinilo; X se selecciona de -C(=O)-, -C(=O)-NR⁴- o -O-C(=O)-NR⁵-; n es 2 o 3; R² es hidrógeno o alquilo C₁₋₈; R³ es alquilo C₅₋₆-OH, en el que dicho grupo alquilo C₅₋₆ se sustituye adicionalmente por grupos 3- o 4-OH adicionales; y R⁴ y R⁵ ambos son hidrógeno.

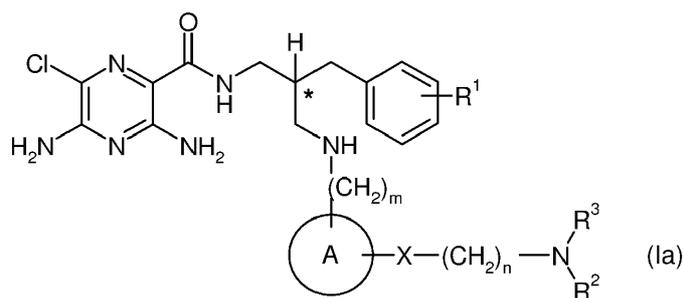
10 En un aspecto adicional, R¹ es alquilo C₁₋₄; m es 1; A es fenilo o piperidinilo; X es -C(=O)-NH-; n es 2; R² es alquilo C₁₋₈; R³ se selecciona de los siguientes:



En un aspecto adicional, R¹ es alquilo C₁₋₄; m es 1; A es fenilo; X es -C(=O)-NH-; n es 2; R² es alquilo C₁₋₈; y R³ se selecciona de los siguientes:



15 En un aspecto adicional de la invención los compuestos de la invención exhiben estereoquímica R en el centro de carbono marcado con un asterisco (*) en la fórmula (Ia) adelante:



Un ejemplo de un compuesto de la invención es:

3,5-diamino-6-cloro-N-(2-(2-metilbencil)-3-(((1-(3-((2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)amino)propil)pirazina-2-carboxamida;

5 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil(2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((1-(2-(hexil(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

10 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((1-(3-(hexil(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((1-(3-(hexil(2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((1-(4-(hexil(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

15 3,5-diamino-6-cloro-N-(2-(2-metilbencil)-3-((1-(3-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((1-(3-(hexil(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

20 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

Carbamato de 4-((3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)fenil 2- 2-

25 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil(2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

30 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil(2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-(3-(3-(2-(hexil(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Un ejemplo adicional de un compuesto de la invención es:

35 3,5-diamino-6-cloro-N-(2-(2-metilbencil)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)amino)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

- 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((1-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etilcarbamoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 5 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((1-(4-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 10 3,5-diamino-6-cloro-N-(2-(2-metilbencil)-3-((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexilamino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((1-(3-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 15 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- carbamato de 4-((3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propilamino)metil)fenil 2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etilo;
- 20 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-((4-((2-(hexil((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 25 3,5-diamino-6-cloro-N-(3-(3-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etilcarbamoil)fenetilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- Un ejemplo adicional de un compuesto de la invención es:
- 30 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-2-(2-metilbencil)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)amino)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etilcarbamoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 35 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 40 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(4-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-2-(2-metilbencil)-3-((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexilamino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;
- 45 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

carbamato de 4-(((R)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propilamino)metil)fenil2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etilo;

5 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

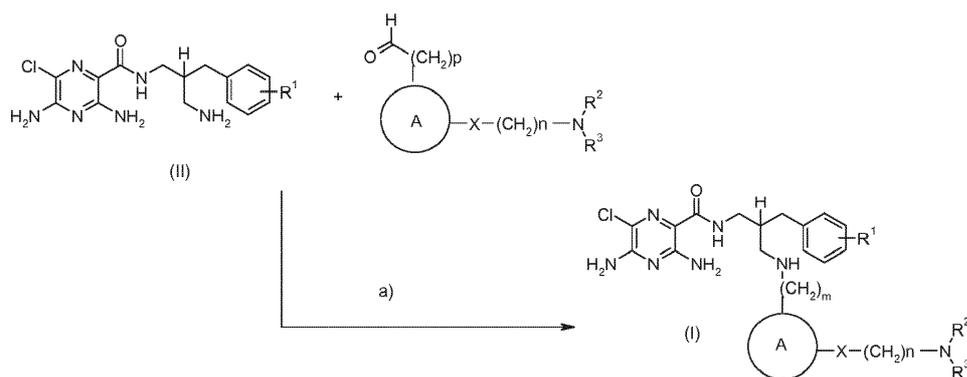
10 3,5-diamino-6-cloro-N-((S)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-((S)-3-((4-((2-(hexil((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-(3-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

15 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

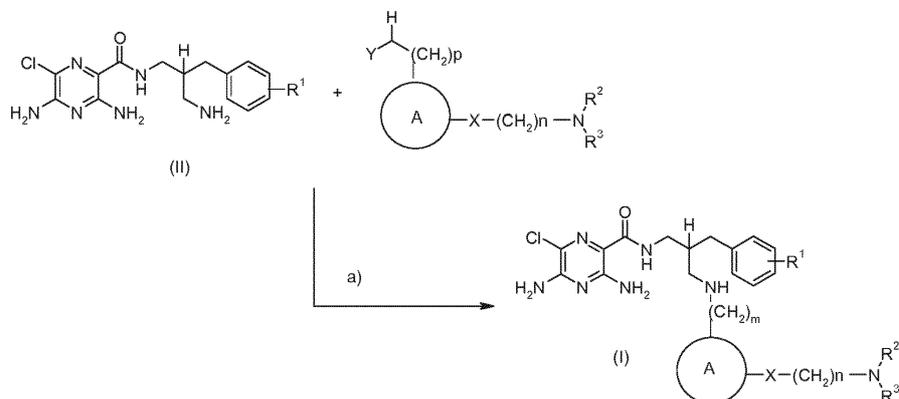
Los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar a partir de los compuestos de la fórmula (II) de acuerdo con el esquema 1, en el que R¹, R², R³, A, X, m y n son como se define en la fórmula (I), y en la que p = m-1.



Esquema 1:

20 1. a) NaH(OAc)₃, AcOH, THF o NaBH₄, MeOH

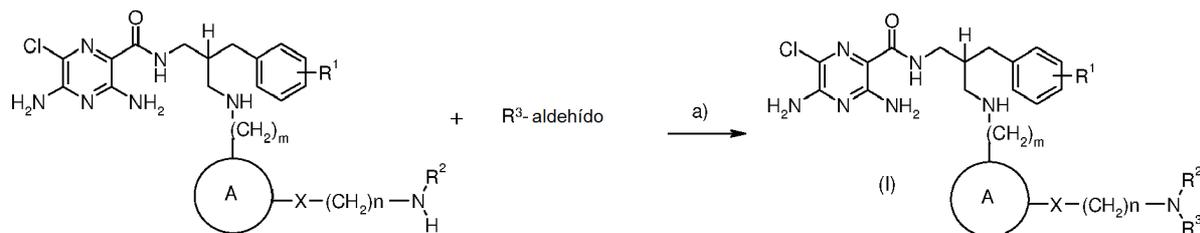
Alternativamente, los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar en una forma descrita en el esquema 2 en el que R¹, R², R³, A, X, m y n son como se define en la fórmula (I), y en el que Y es halógeno, por ejemplo, cloro, bromo o yodo y p = m-1.



25 Esquema 2:

1. a) NaH o K₂CO₃ o Cs₂CO₃ o DIEA, DMF.

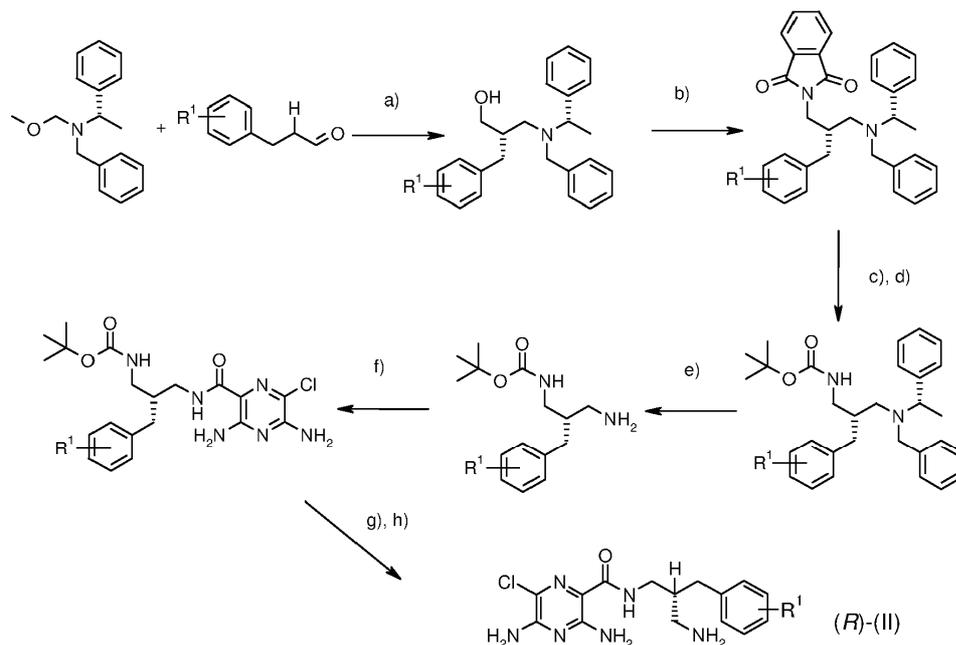
Alternativamente, los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar mediante la introducción de R³ en una etapa final mediante alquilación reductiva de alquilaldehídos polihidroxilados adecuados tales como hexosas o pentosas (el aldehído R³), como se describe en el esquema 3, y en el que R¹, R², R³, A, X, m y n son como se define en la fórmula (I). Las cadenas de polihidroalquilo presentes en R³ pueden estar protegidas por cualquier grupo de protección de alcohol adecuado, por ejemplo como se describe por P.G. M. Wuts, Th. W. Greene, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley-Interscience, New York, 2006. Adicionalmente, como el experto sabrá, y como se describe en los Ejemplos de este documento, los grupos amino adicionales presentes en los compuestos de fórmula (II) pueden estar protegidos por grupos de protección amino adecuados, por ejemplo como se describe en Wuts and Greene (arriba), tal como por grupos dicarbonato de diterbutilo (Boc) o grupos de protección de fluorenilmetiloxycarbonilo (FMoc).



Esquema 3:

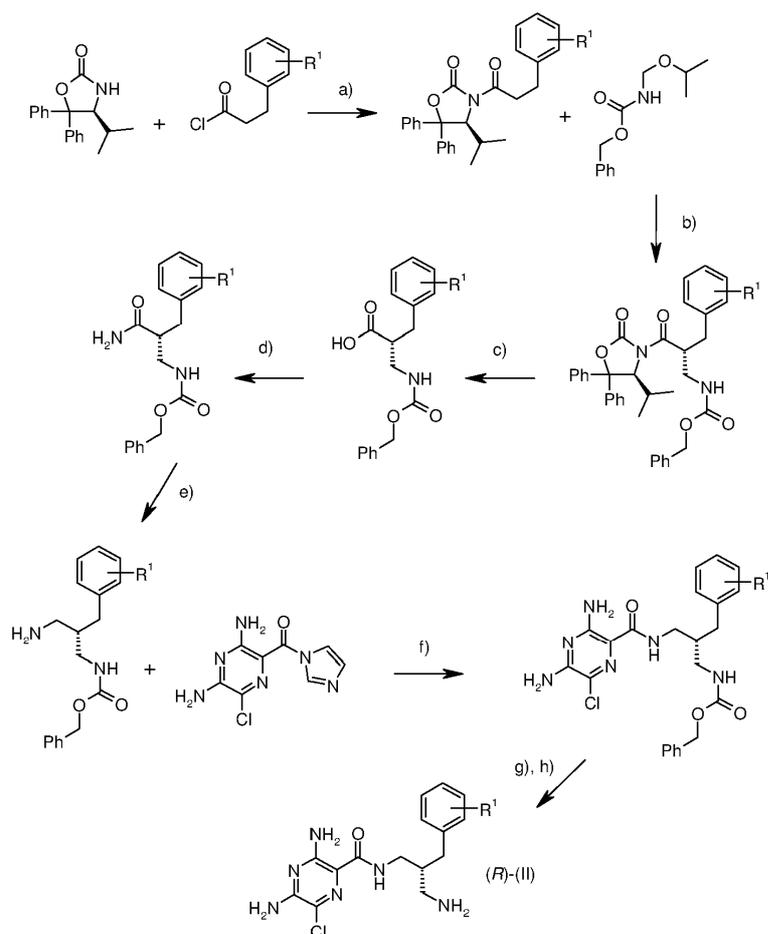
1. a) NaBH(OAc)₃ o NaBH₃CN, AcOH, THF o NaBH₄, MeOH

Compuestos de la fórmula (II) se pueden preparar enantioselectivamente mediante métodos como se describe en el esquema 5 (J. C. D. Müller-Hartwig, L. La Vecchia, H. Meyer, A. K. Beck, D. Seebach, Org. Synth. 85 (2008), 295.) o mediante el método mostrado en los esquemas 4, y 6, en los que R¹ es como se define en la fórmula (I).



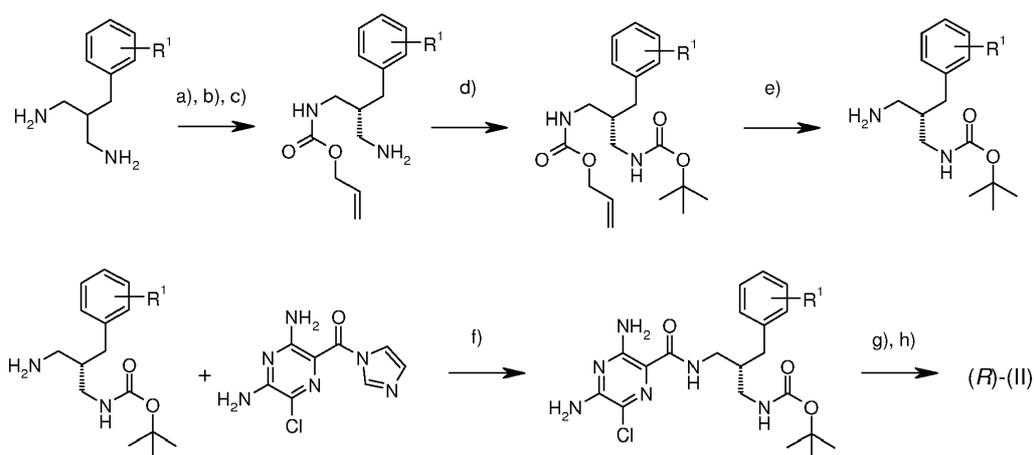
Esquema 4

1. a) i) L-prolina, DMF, ii) NaBH₄, MeOH; b) Ftalamida, PPh₃, DEAD, THF; c) CH₃NH₂, EtOH, d) Boc₂O, DCM, TEA; e) Pd(OH)₂, H₂, MeOH, 70 psi; f) (3-cloro-5-(1H-imidazol-1-ilcarbonil)pirazina-2,6-diamina, DIPEA, NMP; g) TFA, DCM; h) NaOH, THF.



Esquema 5:

1. 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.



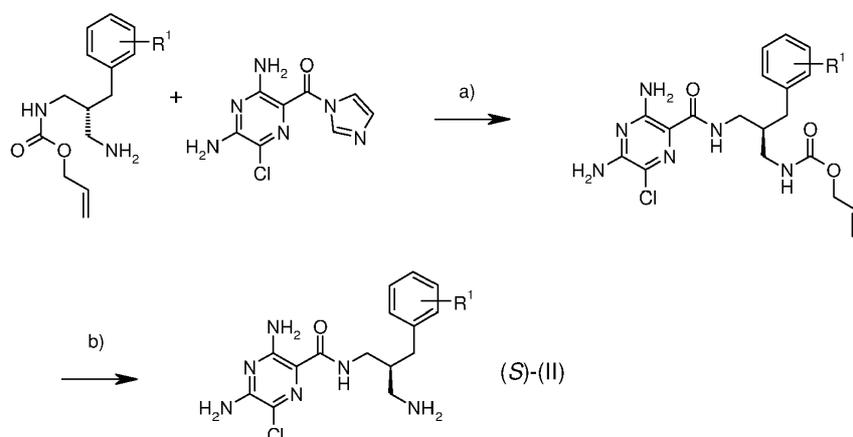
5

Esquema 6:

1. a) Dialilcarbonato, Lipasa PS-C Amano II, MTBE; b) Ácido (por ejemplo D-tartrato), recristalización; c) NaOH 10M, MTBE; d) (BOC)₂O, MTBE; e) LiBH₄, Pd(PPh₃)₄, THF; f) CDI; iPrOAc; g) TFA, DCM; h) NaOH, THF.

10 Los esquemas 4, 5 y 6 describen el acceso al (R)-enantiómero de los compuestos de la fórmula (II). Las reacciones descritas en estos esquemas se pueden aplicar igualmente para acceder al (S)-enantiómero relacionado utilizando materiales de partida de configuración absoluta inversa o enzimas de diferente estereoespecificidad.

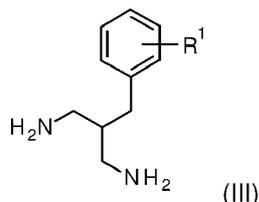
Alternativamente, los compuestos de la fórmula (II) con (S)-configuración se pueden preparar como se muestra en el esquema 7.



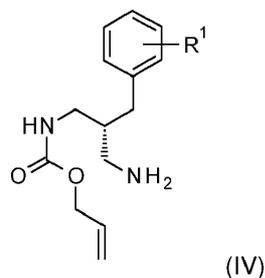
Esquema 7

- 5 1. a) CDI; *i*PrOAc; b) LiBH₄, Pd(PPh₃)₄, THF.

El método descrito en la etapa (a) del Esquema 6 comprende la desimetrización mediada por enzimas de diamina (III) utilizando dialilcarbonato.



- Las enzimas adecuadas para esta reacción incluyen lipasas, en particular lipasas que se originan de *Candida* Antartica o *Pseudomonas* Cepacia. Las enzimas adecuadas incluyen IMM CALB (*Candida* Antartica Lipase B), IMM CALBY (*Candida* Antartica Lipase B), Novozym 435 (*Candida* Antartica Lipase B), Amano Lipase PS-C1 (*Pseudomonas* Cepacia Lipase), Amano Lipase PS-IM (*Pseudomonas* Cepacia Lipase) y Amano Lipase PS-D (*Pseudomonas* Cepacia Lipase), como Amano Lipase PS-C1, Amano Lipase PS-D y Amano Lipase PS-IM. La reacción se puede llevar a cabo en un rango de solventes polares y no polares, y mezclas de los mismos, que incluyen éter de *tert*-butil dimetilo (TBME), tetrahidrofurano (THF), metil-THF (MeTHF, por ejemplo 2-metil-THF), heptanos, ciclohexano y tolueno, como MeTHF. La reacción se puede llevar a cabo a un rango de temperaturas, por ejemplo de 0 °C a 50 °C, por ejemplo de 15 °C a 35 °C, por ejemplo aproximadamente 30 °C. El exceso enantiomérico del producto bruto resultante se puede aumentar opcionalmente mediante procedimientos de resolución conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo mediante cristalización a partir de una sal de tartrato. También se describe en este documento un proceso para preparar un compuesto de fórmula (IV), en la que R¹ es como se definió anteriormente (tal como el compuesto carbamato de (R)-alil-(3-amino-2-(2-metilbencil)propilo)):



- que comprende la desimetrización mediada por enzima de diamina (III) en presencia de carbonato de dialilo, y opcionalmente después de llevar a cabo una resolución enantiomérica. En un aspecto adicional, la enzima se selecciona de una que se origina a partir de *Candida* Antartica o *Pseudomonas* Cepacia, tal como IMM CALB (*Candida* Antartica Lipase B), IMM CALBY (*Candida* Antartica Lipase B), Novozym 435 (*Candida* Antartica Lipase B), Amano Lipase PS-C1 (*Pseudomonas* Cepacia Lipase), Amano Lipase PS-IM (*Pseudomonas* Cepacia Lipase) y Amano Lipase PS-D (*Pseudomonas* Cepacia Lipase). En otro aspecto, la enzima se selecciona de Amano Lipase

PS-C1, Amano Lipase PS-D y Amano Lipase PS-IM, tal como Amino Lipase PS-IM. También se describe el compuesto carbamato de (R)-alil-(3-amino-2-(2-metilbencil)propilo).

5 En un aspecto adicional se divulga el uso del compuesto carbamato de (R)-alil-(3-amino-2-(2-metilbencil)propilo) como un intermedio farmacéutico. En un aspecto adicional, se divulga el uso del compuesto carbamato de (R)-alil-(3-amino-2-(2-metilbencil)propilo) como un intermedio en la fabricación de un compuesto de la fórmula (I).

Los procesos detallados para los compuestos de la invención se describen adicionalmente en los Ejemplos a continuación.

Los compuestos y sales descritos en esta especificación generalmente se pueden utilizar en métodos para tratar diversos trastornos en animales, particularmente mamíferos. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, humanos.

10 Los compuestos de la invención, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, tienen actividad como productos farmacéuticos, en particular como moduladores del ENaC, y se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio, enfermedades del hueso y las articulaciones y otros trastornos autoinmunitarios y alérgicos.

15 Los estados de enfermedad que se pueden tratar con un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyen, pero no se limitan a, enfermedades del tracto respiratorio, tales como: enfermedades obstructivas de las vías respiratorias que incluyen: asma, incluyendo asma bronquial, alérgica, intrínseca, extrínseca, inducida por ejercicio, inducida por fármacos (que incluyen por aspirina e inducida por NSAID) e inducida por polvo, tanto intermitente como persistente y de todas las severidades, y otras causas de hiperreactividad de las vías respiratorias; enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD); bronquitis, que incluye bronquitis infecciosa y eosinofílica; enfisema; bronquiectasia; fibrosis quística; sarcoidosis; pulmón del granjero y enfermedades relacionadas; neumonitis por hipersensibilidad; fibrosis pulmonar, que incluye alveolitis fibrosante criptogénica, neumonías intersticiales idiopáticas, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis que complica la terapia antineoplásica e infección crónica, que incluyen tuberculosis y aspergilosis y otras infecciones fúngicas; complicaciones del trasplante de pulmón; trastornos vasculíticos y trombóticos de la vasculatura pulmonar e hipertensión pulmonar; actividad antitusígena que incluye el tratamiento de la tos crónica asociada con afecciones inflamatorias y secretoras de las vías respiratorias y tos iatrógena; rinitis aguda y crónica que incluye rinitis medicamentosa y rinitis vasomotora; rinitis alérgica perenne y estacional que incluye rinitis nerviosa (fiebre del heno); poliposis nasal; infección vírica aguda que incluye el resfriado común e infección debida a virus sincicial respiratorio, gripe, coronavirus (que incluye SARS) y adenovirus; lesión pulmonar aguda; o síndrome de dificultad respiratoria en adultos (ARDS).

20 En un aspecto adicional de la invención, las enfermedades del tracto respiratorio que se pueden tratar con un compuesto de la invención, o una sal farmacéutica del mismo, incluyen: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); bronquitis, que incluyen bronquitis infecciosa y eosinofílica; bronquiectasia; fibrosis quística; actividad antitusígena que incluye el tratamiento de la tos crónica asociada con afecciones inflamatorias y secretoras de las vías respiratorias y tos iatrógena; asma que incluye bronquial, alérgica, intrínseca, extrínseca, inducida por ejercicio, inducida por fármacos (que incluyen aspirina e inducida por NSAID) y asma inducida por polvo, tanto intermitente como persistente y de todas las severidades, y otras causas de hiperreactividad de las vías respiratorias.

25 En un aspecto todavía adicional de la invención, los estados de enfermedad que se pueden tratar con un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente del mismo, incluye enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis quística, asma, bronquitis crónica y bronquiectasia.

30 En un aspecto todavía adicional de la invención, el estado de enfermedad que se puede tratar con un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente del mismo, es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

En un aspecto de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de COPD.

35 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de COPD.

En un aspecto todavía adicional de la invención, el estado de enfermedad que se puede tratar con un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente del mismo, es fibrosis quística (CF).

En un aspecto de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de CF.

40 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de CF.

Cuando se administra un compuesto o sal descrito en esta especificación para tratar un trastorno, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad suficiente para reducir o aliviar completamente los síntomas u otros

efectos perjudiciales del trastorno; cura del trastorno; revertir, detener por completo, o ralentizar el progreso del trastorno; o reducir el riesgo de que el trastorno empeore.

En algunas realizaciones en las que se utiliza una terapia de combinación, la cantidad del compuesto o sal descrito en esta especificación y la cantidad de los otros agentes farmacéuticamente activos son, cuando se combinan, terapéuticamente eficaces para tratar un trastorno objetivo en el paciente animal. En este contexto, las cantidades combinadas son "cantidad terapéuticamente efectiva" si, cuando se combinan, son suficientes para reducir o aliviar por completo los síntomas u otros efectos perjudiciales del trastorno; cura el trastorno; revertir, detener por completo, o ralentizar el progreso del trastorno; o reducir el riesgo de que el trastorno empeore. Normalmente, dichas cantidades se pueden determinar por un experto en la técnica, por ejemplo, comenzando con el rango de dosificación descrito en esta especificación para el compuesto o sal y un rango(s) de dosificación aprobado o publicado del otro compuesto farmacéuticamente activo.

Con el fin de utilizar un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento terapéutico de un mamífero, tal como humano, dicho ingrediente normalmente se formula de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar como una composición farmacéutica. Por lo tanto en otro aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (ingrediente activo), y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional la presente especificación divulga un proceso para la preparación de dicha composición que comprende mezclar el ingrediente activo con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del modo de administración, la composición farmacéutica, por ejemplo, comprenderá desde 0.05 hasta 99% en peso (por ciento en peso), tal como desde 0.05 hasta 80% en peso, por ejemplo desde 0.10 hasta 70% en peso, tal como desde 0.10 hasta 50% en peso, de ingrediente activo, todos los porcentajes en peso se basan en la composición total.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar de manera estándar para la condición de enfermedad que se desea tratar, por ejemplo, mediante administración tópica (tal como en el pulmón y/o vías respiratorias o la piel), inhalación, oral, rectal o parenteral. Para estos propósitos, los compuestos de esta invención se pueden formular por medios conocidos en la técnica. Una composición farmacéutica adecuada de esta invención es una adecuada para la administración oral en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, un comprimido o cápsula que contiene entre 0.1 mg y 1 g de ingrediente activo.

Cada paciente puede recibir, por ejemplo, una dosis de 0.0001 mgkg⁻¹ a 10 mgkg⁻¹, por ejemplo en el rango de 0.005 mgkg⁻¹ a 5 mgkg⁻¹, del ingrediente activo administrado, por ejemplo, 1 a 4 veces por día.

En una realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula (I) en asociación con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, que se formula para administración inhalada (que incluye inhalación oral y nasal).

El compuesto de fórmula (I) se puede administrar utilizando un dispositivo de suministro adecuado, por ejemplo, de un inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida, un nebulizador o un dispositivo de administración nasal. Dichos dispositivos son bien conocidos.

Se pueden utilizar inhaladores de polvo seco para administrar el compuesto de fórmula (I), solo o en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el caso posterior como un polvo finamente dividido o como una mezcla ordenada. El inhalador de polvo seco puede ser de dosis única o de múltiples dosis y puede utilizar un polvo seco o una cápsula que contiene polvo.

De acuerdo con lo anterior en una realización, el compuesto de la fórmula (I), o una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la fórmula (I), se administra por medio de un inhalador de polvo seco (DPI).

El DPI puede ser "pasivo" o accionado por la respiración, o "activo" cuando el polvo se dispersa por algún mecanismo que no sea la inhalación del paciente, por ejemplo, un suministro interno de aire comprimido. En la actualidad, existen tres tipos de inhaladores de polvo seco pasivo disponibles: inhaladores de dosis única, dosis unitarias múltiples o múltiples dosis (reservorio). En los dispositivos de dosis única, se proporcionan dosis individuales, generalmente en cápsulas de gelatina, y se deben cargar en el inhalador antes de su uso, cuyos ejemplos incluyen dispositivos Spinhaler® (Aventis), Rotahaler® (GlaxoSmithKline), Aeroliser™ (Novartis), Inhalator® (Boehringer) y Eclipse (Aventis). Los inhaladores de dosis unitaria múltiples contienen una cantidad de dosis empacadas de forma individual, ya sea como múltiples cápsulas de gelatina o en ampollas, cuyos ejemplos incluyen dispositivos Diskhaler® (GlaxoSmithKline), Diskus® (GlaxoSmithKline), Nexthaler® (Chiesi) y Aerohaler® (Boehringer). En dispositivos de múltiples dosis, el fármaco se almacena en un depósito de polvo a granel a partir del cual se dosifican las dosis individuales, cuyos ejemplos incluyen dispositivos Genuair® (AstraZeneca), Turbuhaler® (AstraZeneca), Easyhaler® (Orion), Novolizer® (ASTA Medica), Clickhaler® (Innovata Biomed), Spiromax® (Teva) y Pulvinal® (Chiesi).

- Una composición farmacéutica inhalable para uso en un DPI se puede preparar al mezclar el ingrediente activo finamente dividido (que tiene un diámetro aerodinámico generalmente igual o inferior a 10 μm , tal como igual o inferior a 5 μm , por ejemplo, desde 1 hasta 5). μm) con una sustancia vehículo, por ejemplo, un mono, di o polisacárido, un alcohol de azúcar u otro poliol. Los vehículos adecuados son azúcares, por ejemplo, lactosa, glucosa, rafinosa, melecitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol; y almidón. Adecuadamente, las partículas del ingrediente activo se adhieren a las partículas del vehículo para formar una mezcla de polvo ordenada (interactiva). Las partículas de soporte pueden tener un diámetro medio másico de 20 a 1000 μm , más usualmente de 50 a 500 μm .
- Alternativamente, se puede preparar una composición farmacéutica inhalable al procesar un polvo finamente dividido (por ejemplo, que consiste en un ingrediente activo finamente dividido y partículas de soporte finamente divididas) en esferas que se rompen durante el procedimiento de inhalación.
- La mezcla en polvo se puede administrar, según se requiera, en cápsulas de gelatina dura, que contiene cada una la dosis deseada del ingrediente activo. Alternativamente, la mezcla de polvo se puede cargar en el depósito de un inhalador de múltiples dosis, por ejemplo, el Genuair® o el Turbuhaler®.
- En una realización adicional, el compuesto de fórmula (I) se administra por medio de un inhalador de dosis medida, particularmente un inhalador de dosis medida presurizado (pMDI). El pMDI contiene el activo como una solución o suspensión adecuada en un recipiente presurizado. El activo se suministra al accionar una válvula en el dispositivo pMDI. El accionamiento puede ser manual o activado por la respiración. En los pMDI accionados manualmente, el dispositivo es accionado por el usuario mientras inhala, por ejemplo al presionar un mecanismo de liberación adecuado en el dispositivo pMDI. Los pMDI accionados por la respiración se activan cuando el paciente inhala a través de la boquilla del pMDI. Esto puede ser ventajoso ya que el accionamiento del dispositivo se sincroniza con la inhalación del paciente y puede dar como resultado una dosificación más constante del activo. Ejemplos de dispositivos pMDI incluyen, por ejemplo, Rapihaler® (AstraZeneca).
- Se puede preparar una composición farmacéutica inhalable para uso en un pMDI al disolver o dispersar el compuesto de fórmula (I) en un propulsor adecuado y con o sin excipientes adicionales tales como solventes (por ejemplo, etanol), surfactantes, lubricantes o agentes de estabilización. Los propulsores adecuados incluyen propulsores de hidrocarburo, clorofluorocarbono e hidrofluoroalcano (por ejemplo, heptafluoroalcano), o mezclas de cualquiera de dichos propulsores. Los propulsores preferidos son P134a y P227, cada uno de los cuales se puede utilizar solo o en combinación con otros propulsores y/o surfactantes y/u otros excipientes.
- En una realización adicional, el compuesto de fórmula (I) se administra por medio de un inhalador de dosis medida en combinación con un separador. Los separadores adecuados son bien conocidos e incluyen Nebuchamber® (AstraZeneca) o Volumatic® (GlaxoSmithKline).
- En una realización adicional, el compuesto de fórmula (I) se administra por medio de un nebulizador. Los nebulizadores adecuados son bien conocidos e incluyen eFlow® (PARI GmbH).
- Se puede preparar una composición farmacéutica inhalable para uso en un nebulizador al dispersar o preferiblemente disolver el compuesto de fórmula (I) en un medio acuoso adecuado. La composición también puede incluir, por ejemplo, un ajuste de pH y/o tonicidad adecuado, surfactantes y conservantes. Por ejemplo, una composición adecuada para la inhalación de un nebulizador comprende un compuesto de fórmula (I) disperso en un medio acuoso (mg/g en agua Mill-Q) que comprende cloruro de sodio (9 mg/g); ácido cítrico seco (0.0735 mg/g); citrato de sodio (0.19 mg/g); cloruro de benzalconio (0.1 mg/g), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, 0.1 mg/g) y Polisorbato 80 (0.3 mg/g).
- En una realización adicional, el compuesto de fórmula (I) se administra nasalmente como una pulverización desde un dispositivo de administración nasal adecuado, por ejemplo, una bomba de pulverización o un MDI. Alternativamente, el compuesto se podría administrar por vía nasal como un polvo utilizando un dispositivo DPI adecuado, por ejemplo Rhinocort®, Turbuhaler® (AstraZeneca).
- Se puede preparar una composición farmacéutica inhalable para uso en una bomba de pulverización o dispositivo de suministro nasal de MDI al dispersar o preferiblemente disolver el compuesto de fórmula (I) en un medio acuoso adecuado. La composición también puede incluir, por ejemplo, ajuste de pH y/o tonicidad adecuado, surfactantes, conservantes, aromatizantes lubricantes o modificadores de viscosidad. Si se requieren, se pueden incluir aditivos para potenciar la absorción desde la cavidad nasal, tal como un polímero bioadhesivo adecuado. Las composiciones de polvo seco adecuadas para administración nasal son como se describió anteriormente en relación con el suministro de DPI. Sin embargo, cuando es deseable limitar la penetración del compuesto en el pulmón y mantener el compuesto en la cavidad nasal, puede ser necesario utilizar el compuesto como tamaños de partícula mayores, por ejemplo con un diámetro de partícula promedio mayor de aproximadamente 10 μm , por ejemplo de 10 μm a 50 μm .
- De acuerdo con lo anterior, la presente especificación también describe un dispositivo inhalador (por ejemplo, un inhalador de polvo seco, en particular un inhalador de polvo seco de dosis unitaria múltiple, o un inhalador de pMDI) que contiene una composición farmacéutica inhalable de la invención.

La invención se relaciona adicionalmente con una terapia de combinación en la que un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un segundo ingrediente activo se administran concurrentemente, secuencialmente o en mezcla, para el tratamiento de una o más de las afecciones enumeradas anteriormente. Dicha combinación se puede utilizar en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales.

5 En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica (por ejemplo, para uso como un medicamento para el tratamiento de una de las enfermedades o afecciones enumeradas en este documento, tal como CF o COPD) que comprenden un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos un ingrediente activo adicional seleccionado de:

1. a) un agonista del beta-adrenoceptor;
- 10 2. b) un antagonista del receptor muscarínico;
3. c) un antagonista del receptor muscarínico de articulación y agonista del beta-adrenoceptor;
4. d) un agonista del receptor de tipo toll (tal como un agonista TLR7 o TLR9)
5. e) un antagonista de adenosina;
6. f) un agonista del receptor de glucocorticoides (esteroide o no esteroide);
- 15 7. g) un antagonista de p38;
8. h) un antagonista de IKK2;
9. i) un antagonista de PDE4;
10. j) un modulador de función del receptor de quimioquina (tal como un antagonista del receptor de CCR1, CCR2B, CCR5, CXCR2 o CXCR3);
- 20 11. k) un antagonista de CRTh2; o
12. l) un osmolito, por ejemplo un osmolito iónico, tal como solución salina hipertónica como se define adelante.

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un agonista del beta-adrenoceptor (que incluye subtipos 1-4 del receptor) tal como terbutalina (por ejemplo como la sal de sulfato), salmeterol (por ejemplo como la sal de xinafoato), salbutamol (albuterol) (por ejemplo como la sal de sulfato), procaterol (por ejemplo como la sal de clorhidrato), pirbuterol (por ejemplo como la sal de acetato), orciprenalina (metaproterenol) (por ejemplo como la sal de sulfato), milveterol (por ejemplo como la sal de clorhidrato), levosalbutamol (levalbuterol) (por ejemplo como la sal de clorhidrato), abediterol, isoprenalina (isoproterenol) (por ejemplo como la sal de clorhidrato), indacaterol (por ejemplo como la sal de maleato), vilanterol (por ejemplo como la sal de trifenatato (ácido trifenilacético)), formoterol (por ejemplo como la sal de fumarato, por ejemplo la sal de dihidrato de fumarato), carmoterol, bitolterol (por ejemplo como la sal de mesilato), olodaterol, bedoradrina (por ejemplo como la sal de sulfato), bambuterol (por ejemplo como la sal de clorhidrato), arformoterol (por ejemplo como la sal de tartrato), PF-610355 (2-[3-[2-[[2(R)-2-hidroxi-2-[4-hidroxi-3-(metanosulfonamido)fenil]etil]amino]-2-metil-propil]fenil]-N-[[3-(4-hidroxi)fenil]fenil]metil]acetamida), N-(2-dietilaminoetil)-N-[2-[2-(4-hidroxi-2-oxo-3H-1,3-benzotiazol-7-il)etilamino]etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida, N-ciclohexil-3-[2-(3-fluorofenil)etilamino]-N-[2-[2-(4-hidroxi-2-oxo-3H-1,3-benzotiazol-7-il)etilamino]etil]propanamida, o N-ciclohexil-N-[2-[2-(5-hidroxi-3-oxo-4H-1,4-benzoxazin-8-il)etilamino]etil]-3-[2-[3-(1-metilpirazol-4-il)fenil]etoxi]propanamida.

La presente invención todavía se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un antagonista del receptor muscarínico (por ejemplo un antagonista M1, M2 o M3, tal como una antagonista M3 selectivo) tal como tiotropio (por ejemplo como la sal de bromuro), oxitropio (por ejemplo como la sal de bromuro), ipratropio (por ejemplo como la sal de bromuro), bromuro de glucopirronio (por ejemplo como una mezcla racémica de estereoisómeros, o como el R,R-, R,S-, S,R-, o S,S- estereoisómero, o como una mezcla que comprende dos o más de los R,R-, R,S-, S,R-, o S,S- estereoisómeros), aclidinio (por ejemplo como la sal de bromuro), GSK573719 (3-[2-[3-(5-ciclohexiloxicarbonil-tiofen-2-il)-ureido]-3-(4-hidroxi)fenil]-propionilamino]-1-(3-hidroxi-bencil)-1-metil-piperidinio), BEA2180BR (éster 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-ilo de ácido hidroxi-di-tiofen-2-il-acético) (por ejemplo como la sal de bromhidrato), 1-fenilcicloheptanocarboxilato de [(3R)-1-[2-oxo-2-(2-piridilamino)etil]quinuclidin-1-ilo-3-ilo] (por ejemplo como la sal de bromuro), o 2-[(4-clorofenil)metoxi]etil-[[2-[(R)-ciclohexil-hidroxi-fenil-metil]oxazol-5-il]metil]-dimetil-ammonio (por ejemplo como la sal de napadisilato).

50 La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un agente que es un antagonista del receptor muscarínico de articulación (por ejemplo un antagonista de M1, M2 o M3, tal como un antagonista M3 selectivo) y un agonista del beta-adrenoceptor tal como PF4348235 ([1-[9-[[2(R)-2-hidroxi-2-[4-hidroxi-3-

(metanosulfonamido)fenil]etil]amino]nonil]-4-piperidil] N-[2-(3-cloro-4-hidroxi-fenil)fenil]carbamato), 3-[2-[2-cloro-3-[[8-(2-etiltiazol-4-carbonil)-11-oxa-3,8-diazaspiro[5.5]undecan-3-il]metil]fenil]etoxi]-N-ciclopentil-N-[2-[2-(5-hidroxi-3-oxo-4H-1,4-benzoxazin-8-il)etilamino]etil]propanamida, N-butil-N-[2-[2-(5-hidroxi-3-oxo-4H-1,4-benzoxazin-8-il)etilamino]etil]-3-[2-[3-[2-[8-(2-isopropiltiazol-4-carbonil)-11-oxa-3,8-diazaspiro[5.5]undecan-3-il]etil]fenil]etoxi]propanamida, o 7-[(1R)-2-[2-[2-fluoro-5-[[8-(2-isopropiltiazol-4-carbonil)-11-oxa-3,8-diazaspiro[5.5]undecan-3-il]metil]fenil]etilamino]-1-hidroxi]etil]-4-hidroxi-3H-1,3-benzotiazol-2-ona.

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un agonista del receptor de tipo toll (que incluye un agonista de TLR7 o TLR9) tal como loxorribina (7-alil-2-amino-9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-il]-1H-purina-6,8-diona), 2-[3-[[3-(6-amino-2-butoxi-8-oxo-7H-purin-9-il)propil-(3-morpholinopropil)amino]metil]fenil]acetato de metilo (por ejemplo como la sal de bromhidrato, clorhidrato o dimaleato), 2-[4-[[2-amino-4-metil-6-(pentilamino)pirimidin-5-il]metil]fenil]acetato de 4-(dimetilamino)butilo (por ejemplo como la disacarina, ácido difumárico, ácido di-1-hidroxi-2-naftoico o sal de ácido mono-benzoico), o 5'-TCG AAC GTT CGA AGA TGA TGA T (divulgada como la SEQ ID 171 en el documento WO2004/0158179).

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un antagonista de adenosina tal como regadenoson, ATL-313 (4-[3-[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(ciclopropilcarbamoil)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]purin-2-il]prop-2-inil]piperidina-1-carboxilato de metilo), o apadenoson (4-[3-[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(etilcarbamoil)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]purin-2-il]prop-2-inil]ciclohexanocarboxilato de metilo).

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un agonista del receptor de glucocorticoides (esteroide o no esteroide) tal como triamcinolona, acetónido de triamcinolona, prednisona, furoato de mometasona, etabonato de loteprednol, propionato de fluticasona, furoato de fluticasona, acetónido de fluocinolona, cipeclato de dexametasona, desisobutiril ciclesonida, propionato de clobetasol, ciclesonida, propionato de butixocort, budesonida, dipropionato de beclometasona, dipropionato alclometasona, 2-furoato de (1R,3aS,3bS,10aR,10bS,11S,12aS)-1-[[[[(cianometil)tio]carbonil]-7-(4-fluorofenil)-11-hidroxi-10a,12a-dimetil-1,2,3,3a,3b,4,5,7,10,10a,10b,11,12,12a-tetradecahidrociclopenta[5,6]nafto[1,2-f]indazol-1-ilo, metoxiacetato de (1R,2R,3aS,3bS,10aS,10bR,11S,12aS)-10b-Fluoro-1-[[[(fluorometil)sulfanil]carbonil]-7-(6-fluoropiridin-3-il)-11-hidroxi-2,10a,12a-trimetil-1,2,3,3a,3b,4,5,7,10,10a,10b,11,12,12a-tetradecahidrociclopenta[5,6]nafto[1,2-f]indazol-1-ilo, 2,2,2-trifluoro-N-[(1S,2R)-2-[1-(4-fluorofenil)indazol-5-il]oxi-2-(3-metoxifenil)-1-metil-etil]acetamida, 3-[5-[(1R,2S)-1-(4H-1,3-benzodioxin-7-il)-2-(2,2-difluoropropanoilamino)propoxi]indazol-1-il]-N-(3-piridilmetil)benzamida, 3-[5-[(1R,2S)-2-(2,2-difluoropropanoilamino)-1-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)propoxi]indazol-1-il]-N-[(3R)-1,1-dioxotiolan-3-il]benzamida, o 3-[5-[(1R,2S)-2-(2,2-difluoropropanoilamino)-1-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)propoxi]indazol-1-il]-N-[(3R)-tetrahidrofuran-3-il]benzamida.

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un antagonista de p38 tal como PH797804 (3-[3-Bromo-4-(2,4-difluoro-benciloxi)-6-metil-2-oxo-2H-piridin-1-il]-4,N-dimetil-benzamida), losmapimod, PF03715455 (1-[5-tert-butil-2-(3-cloro-4-hidroxifenil)pirazol-3-il]-3-[[2-[[3-[2-(2-hidroxi-etilsulfanil)fenil]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-6-il]sulfanil]fenil]metil]urea), N-ciclopropil-4-metil-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-4-oxo-quinazolin-3-il]benzamida, o N-ciclopropil-3-fluoro-4-metil-5-[3-[[1-[2-[2-(metilamino)etoxi]fenil]ciclopropil]amino]-2-oxo-pirazin-1-il]benzamida.

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE) tal como una metilxantanina que incluye teofilina y aminofilina o un inhibidor de isoenzima PDE selectiva (que incluye un inhibidor de PDE4 o un inhibidor de la isoforma PDE4D) tal como tetomilast, roflumilast, oglemilast, ibudilast, GPD-1116 (3-bencil-5-fenil-1H-pirazolo[4,3-c][1,8]naftiridin-4-ona), romomilast, NVP ABE 171 (ácido 4-[8-(2,1,3-benzoxadiazol-5-il)-1,7-naftiridin-6-il]benzoico), RPL554 (2-[(2E)-9,10-dimetoxi-4-oxo-2-(2,4,6-trimetilfenil)imino-6,7-dihidropirimido[6,1-a]isoquinolin-3-il]etilurea), CHF5480([(Z)-2-(3,5-dicloro-4-piridil)-1-(3,4-dimetoxifenil)vinil](2S)-2-(4-isobutilfenil)propanoato), o GSK256066 (6-[3-(dimetilcarbamoil)fenil]sulfonil-4-(3-metoxianilino)-8-metil-quinolina-3-carboxamida).

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un antagonista de IKK2 tal como ácido 5-(2-isopropilisoidolin-5-il)-3-[1-(2-metoxietilsulfonil)-4-piperidil]-1H-indol-7-carboxílico.

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un modulador de función del receptor de quimioquina tal como un antagonista de CCR1, CCR2, CCR2A, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 o CCR11 (para la familia C-C), por ejemplo un antagonista del receptor CCR1, CCR2B o CCR5; CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 o CXCR5 (para la familia C-X-C), por ejemplo un antagonista del receptor CXCR2 o CXCR3; o CX₃CR1 para la familia C-X₃-C. Por ejemplo, la presente invención se refiere a la combinación de un compuesto de la invención con PS-031291 2-[(4-cloro-bencil)-metil-amida] 1-[(4-trifluorometil-fenil)-amida] de ácido (pirrolidina-1,2-dicarboxílico), CCX-354 (1-[4-(4-cloro-3-metoxi-fenil)piperazin-1-il]-2-[3-(1H-imidazol-2-il)pirazolo[3,4-b]piridin-1-

il]etanona), vicriviroc, maraviroc, cenicriviroc, navarixin (2-hidroxi-N,N-dimetil-3-[[2-[[[(1R)-1-(5-metil-2-furil)propil]amino]-3,4-dioxo-ciclobuten-1-il]amino]benzamida), SB656933 (1-(2-cloro-3-fluoro-fenil)-3-(4-cloro-2-hidroxi-3-piperazin-1-ilsulfonil-fenil)urea), N-[1-[(3R)-3-(3,5-difluorofenil)-3-(1-metilsulfonil-4-piperidil)propil]-4-piperidil]-N-etil-2-(4-metilsulfonilfenil)acetamida, N-2-[(2S)-3-[[1-[(4-clorofenil)metil]-4-piperidil]amino]-2-hidroxi-2-metil-propoxi]-4-hidroxi-fenil]acetamida, ácido 2-[2-cloro-5-[(2S)-3-(5-clorospiro[3H-benzofuran-2,4'-piperidina]-1'-il)-2-hidroxi-propoxi]-4-(metilcarbamoil)fenoxi]-2-metil-propanoico, N-[2-[(2,3-difluorofenil)metilsulfanil]-6-[(1R,2S)-2,3-dihidroxi-1-metil-propoxi]pirimidin-4-il]azetidina-1-sulfonamida, o N-[2-[(2,3-difluorofenil)metilsulfanil]-6-[(1R,2R)-2,3-dihidroxi-1-metil-propil]amino]pirimidin-4-il]azetidina-1-sulfonamida.

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un inhibidor de la biosíntesis de leucotrienos, inhibidor de 5-lipoxigenasa (5-LO) o antagonista de proteína de activación de 5-lipoxigenasa (FLAP) tal como TA270 (4-hidroxi-1-metil-3-octiloxi-7-sinapinoilamino-2(1H)-quinolinona), PF-4191834 (2H-piran-4-carboxamida, tetrahidro-4-[3-[[4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)fenil]tio]fenil]-), setileutón, CMI977 (1-[4-[(2S,5S)-5-[[4-fluorofenoxi]metil]tetrahidrofuran-2-il]but-3-inil]-1-hidroxi-urea), fiboflapon (ácido 3-[3-tert-butilsulfanil-1-[[4-(6-etoxi-3-piridil)fenil]metil]-5-[(5-metil-2-piridil)metoxi]indol-2-il]-2,2-dimetil-propanoico), GSK2190915 (ácido 1H-indol-2-propanoico, 3-[(1,1-dimeteil)tio]-1-[[4-(6-metoxi-3-piridinil)fenil]metil]- α,α -dimetil-5-[(2-piridinil)metoxi]-), licofelona, quilflapon (ácido 3-[3-tert-butilsulfanil-1-[(4-clorofenil)metil]-5-(2-quinolilmetoxi)indol-2-il]-2,2-dimetil-propanoico), veliflapon (ácido (2R)-2-ciclopentil-2-[4-(2-quinolilmetoxi)fenil]acético), ABT080 (ácido 4,4-bis[4-(2-quinolilmetoxi)fenil]pentanoico), zileutón, zafirlukast, o montelukast.

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un antagonista de CRTh2 o un antagonista de DP2 tal como ACT129968 (ácido 2-[2-[(5-acetil-2-metoxi-fenil)metilsulfanil]-5-fluoro-bencimidazol-1-il]acético), AMG853 (ácido 2-[4-[4-(tert-butilcarbamoil)-2-[(2-cloro-4-ciclopropil-fenil)sulfonilamino]fenoxi]-5-cloro-2-fluoro-fenil]acético), AM211 (ácido 2-[3-[2-[[bencilcarbamoil(etil)amino]metil]-4-(trifluorometil)fenil]-4-metoxi-fenil]acético), ácido 2-[4-acetamido-3-(4-clorofenil)sulfanil-2-metil-indol-1-il]acético, ácido (2S)-2-[4-cloro-2-(2-cloro-4-etilsulfonil-fenoxi)fenoxi]propanoico, ácido 2-[4-cloro-2-[2-fluoro-4-(4-fluorofenil)sulfonil-fenil]fenoxi]acético, o ácido (2S)-2-[2-[3-cloro-4-(2,2-dimetilpirrolidina-1-carbonil)fenil]-4-fluoro-fenoxi]propanoico.

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un antagonista de MK2 (MAPKAP quinasa 2) tal como varesplabid, PF-3644022 ((10R)-10-metil-3-(6-metilpiridin-3-il)-9,10,11,12-tetrahydro-8H-[1,4]diazepino[5',6':4,5]tieno[3,2-f]quinolin-8-ona), o 4-benzoil-D-fenilalanil-D-seril-D-triptofil-D-seril-2,3,4,5,6-pentafluoro-D-fenilalanil-3-ciclohexil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-arginil-D-glutaminil-D-arginil-D-arginina.

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un antagonista de mieloperoxidasa tal como resveratrol, piceatannol, 3-[[[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]metil]-2-tioxo-7H-purin-6-ona, o 1-(2-isopropoxietil)-2-tioxo-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-4-ona.

La presente invención aún se relaciona adicionalmente con la combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un osmolito. Como se utiliza este documento, un "osmolito" es una pequeña molécula osmóticamente activa y está destinada para cubrir tanto osmolitos iónicos como no iónicos. En un aspecto adicional de la invención se proporciona una combinación de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un osmolito iónico, tal como solución salina hipertónica.

En un aspecto todavía adicional de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica (por ejemplo, para uso como un medicamento para el tratamiento de una de las enfermedades o afecciones enumeradas en este documento, tal como CF o COPD) que comprende un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos un ingrediente activo adicional seleccionado de:

1. a) un agonista del beta-adrenoceptor;
2. b) un antagonista del receptor muscarínico;
3. c) un antagonista del receptor muscarínico de articulación y agonista del beta-adrenoceptor; o
4. d) un agonista del receptor de glucocorticoides (esteroide o no esteroide); o
5. e) un osmolito, por ejemplo un osmolito iónico, tal como solución salina hipertónica. Como se definió anteriormente.

En un aspecto todavía adicional de la invención, por lo menos un ingrediente activo adicional es un agonista del beta-adrenoceptor. En otro aspecto, por lo menos un ingrediente activo adicional es un antagonista del receptor muscarínico. En un aspecto adicional, por lo menos un ingrediente activo adicional es un agonista del receptor de glucocorticoides (esteroide o no esteroide). En un aspecto todavía adicional, por lo menos un ingrediente activo

adicional es un antagonista del receptor muscarínico de articulación y agonista del beta-adrenoceptor. En un aspecto todavía adicional, por lo menos un ingrediente activo adicional es un osmolito.

Los compuestos descritos en especificación adicionalmente se ilustran en los siguientes Ejemplos. Estos Ejemplos se dan solo a modo de ilustración y no son limitantes.

5 Abreviaturas:

Ac acuoso

(BOC)₂O/Boc bicarbonato de Di-tertbutilo

CV Volumen de Columna

DEA Dietilamina

10 DEAD Dietilazadicarboxilato

DIPA Diisopropilamina

DIEA/DIPEA Diisopropiletilamina

ESI Ionización por electronebulización

FA ácido fórmico

15 FMOC/Fmoc Fluorenilmetiloxycarbonilo

HATU hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido

HBSS Solución salina equilibrada de Hank

HBTU hexafluorofosfato de 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

HEPES ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il]etanosulfónico

20 HPLC Cromatografía líquida de alto desempeño

IPA Isopropilamina

LC/MS Cromatografía líquida – Espectrometría de masa

MeTHF Metil-tetrahidrofurano

MTBE éter de tert-Butil metilo

25 NMP N-metilpirrolidinona

Rt tiempo de retención

sat. Saturado

SFC Cromatografía de fluidos supercríticos

TBME éter de tert-Butil metilo

30 TEA Trietilamina

THF Tetrahidrofurano

wt-% % en peso

Métodos generales

35 Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance, Avance II o Avance III a una frecuencia de protones de 400, 500 o 600 MHz. Se utilizó un espectrómetro JEOL EX-270 si se reporta una frecuencia de protones de 270 MHz. Los picos centrales de cloroformo- δ (H 7.26 ppm), acetona (H 2.04 ppm), diclorometano-d₆ (H 5.32 ppm), CH₃OD (H 3.30 ppm) o DMSO-d₆ (H 2.49 ppm) se utilizaron como referencias internas. Pueden ocurrir ligeras variaciones de desplazamientos químicos, como es bien sabido en la técnica, como resultado de variaciones en la preparación de la muestra, tales como variaciones de la concentración del analito y que incluyen o que omiten aditivos (por ejemplo, estándares de ensayo de RMN o ácido trifluoroacético).

40

Se realizaron experimentos de LC/MS utilizando un sistema Waters Acquity UPLC combinado con un espectrómetro de masas Waters Xevo Q-ToF en modo ESI. LC se ejecutó en dos configuraciones: 1) columna BEH C18 (1.7 µm 2.1x50 mm) en combinación con un gradiente (2-95% B en 5 min) de tampón de carbonato de amonio/amoniaco 46 mM a pH 10 (A) y MeCN (B) a un índice de flujo de 1.0 ml/min. 2) Columna HSS C18 (1.8 µm 2.1x50 mm) con un gradiente (2-95% B en 5 min) de tampón acuoso FA 10 mM/formiato de amonio 1 mM a pH 3 (A) y MeCN (B) a un índice de flujo de 1.0 ml/min.

La pureza óptica, indicada como exceso enantiomérico (% de ee), se determinó mediante HPLC quiral utilizando un cromatógrafo de la serie Agilent 1100. Método A: Sistema equipado con Chiralpak IC 250x4.6 mm; 5µm. Como fase móvil se utilizó heptano/iPrOH/etanolamina (60: 40: 0.1) con un índice de flujo de 1 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µL y la detección del compuesto se realizó mediante UV a 268 nm. Método B: Sistema equipado con Chiralpak IC 150x4.6 mm, 3µm. Como fase móvil se utilizaron CO₂, 120 bar (A) y MeOH (0.5% de DEA) (B) en una relación A/B de 80/20 con un índice de flujo de 4 mL/min. El volumen de inyección fue de 5 µL.

La HPLC preparativa se realizó con un sistema Waters FractionLynx con detección de MS integrada y equipada con columnas Prep C18 OBD de 5 µm 19 x 150 mm de X-Bridge o Sunfire. Alternativamente, se utilizó Gilson GX-281 con detección UV incorporada, equipada con Kromasil C8 10 µm, 20x250 ID o 50x250 ID mm. Se aplicaron como gradientes de eluyente de agua/MeCN/AcOH (95/5/0.1) o agua/0.05% de TFA o agua/0.1% de NH₄HCO₃ (A) y MeCN (B).

Se realizó un SCF preparativo con un sistema Waters Prep100 SCF con detección de MS integrada, equipado con Waters Viridis 2-EP o Phenomenex Luna Hilic, 30 x 250 mm, 5 µm. Se aplicaron como gradientes de eluyente de CO₂ (100 g/min, 120 bar, 40 °C) (A) y MeOH/NH₃ (20 mM) o MeOH (5% de FA) o MeOH (B).

A menos que se indique lo contrario, los materiales de partida estaban disponibles comercialmente o se describieron previamente en la bibliografía. Todos los solventes y reactivos comerciales eran de calidad de laboratorio y se utilizaron como se recibieron a menos que se indique lo contrario.

Los nombres químicos que se describen en los Ejemplos a continuación se generaron utilizando el paquete de denominación ChemDraw (Ultra 11). El experto sabrá que los diferentes paquetes de nombres pueden producir diferentes nombres químicos para el mismo compuesto. Solo a modo de ilustración, los nombres químicos generados para los ejemplos 1 a 16 a continuación utilizando el paquete de denominación ACD/Name 2012 son, respectivamente:

3,5-diamino-6-cloro-N-[(2R)-2-(2-metilbencil)-3-({1-(3-((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il]metil]amino)propil]pirazina-2-carboxamida;

1-desoxi-1-[(2-[[4-((2R)-3-((3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il)carbonil]amino)-2-(2-metilbencil)propil]amino)metil]benzoil]amino)etil](hexil)amino]-D-xilitol;

1-desoxi-1-[(2-[[4-((2R)-3-((3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il)carbonil]amino)-2-(2-metilbencil)propil]amino)metil]piperidin-1-il]carbonil]amino)etil](hexil)amino]-D-glucitol;

3,5-diamino-6-cloro-N-[(2R)-3-({1-(3-{hexil[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil]amino)propanoil)piperidin-4-il]metil]amino)-2-(2-metilbencil)propil]pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-[(2R)-3-({1-(3-{hexil[(2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil]amino)propanoil)piperidin-4-il]metil]amino)-2-(2-metilbencil)propil]pirazina-2-carboxamida;

1-desoxi-1-[[4-[4-((2R)-3-((3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il)carbonil]amino)-2-(2-metilbencil)propil]amino)metil]piperidin-1-il]-4-oxobutil](hexil)amino]-D-glucitol;

3,5-diamino-6-cloro-N-[(2R)-2-(2-metilbencil)-3-({1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil]amino)propanoil)piperidin-4-il]metil]amino)propil]pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-[(2R)-3-({1-(3-{hexil[(2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil]amino)propanoil)piperidin-4-il]metil]amino)-2-(2-metilbencil)propil]pirazina-2-carboxamida;

1-desoxi-1-[(2-[[4-((2R)-3-((3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il)carbonil]amino)-2-(2-metilbencil)propil]amino)metil]benzoil]amino)etil](hexil)amino]-D-manitol;

1-desoxi-1-[(2-[[4-((2R)-3-((3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il)carbonil]amino)-2-(2-metilbencil)propil]amino)metil]benzoil]amino)etil](hexil)amino]-D-glucitol;

1-desoxi-1-[(2-[[4-((2R)-3-((3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il)carbonil]amino)-2-(2-metilbencil)propil]amino)metil]fenoxil]carbonil]amino)etil](hexil)amino]-D-glucitol;

1-desoxi-1-[(2-[[4-(2-((2R)-3-((3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il)carbonil]amino)-2-(2-metilbencil)propil]amino)etil]benzoil]amino)etil](hexil)amino]-D-glucitol;

1-desoxi-1-[(2-[[4-(2-[[[(2R)-3-[[3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il]carbonil]amino}-2-(2-metilbencil)propil]amino]etil]benzoil]amino]etil)(hexil)amino]-D-xilitol;

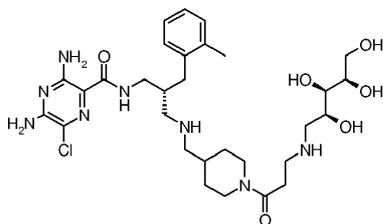
1-desoxi-1-[(2-[[4-[[[(2S)-3-[[3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il]carbonil]amino}-2-(2-metilbencil)propil]amino]metil]benzoil]amino]etil)(hexil)amino]-D-xilitol;

5 5-desoxi-5-[(2-[[4-[[[(2S)-3-[[3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il]carbonil]amino}-2-(2-metilbencil)propil]amino]metil]benzoil]amino]etil)(hexil)amino]-D-xilitol;

1-desoxi-1-[(2-[[3-(2-[[[(2R)-3-[[3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il]carbonil]amino}-2-(2-metilbencil)propil]amino]etil]benzoil]amino]etil)(hexil)amino]-D-glucitol.

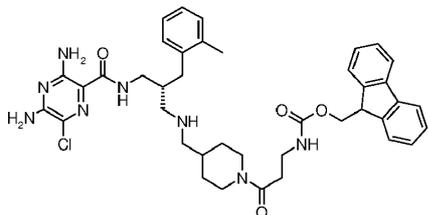
Ejemplo 1

10 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-2-(2-metilbencil)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)propanoil)piperidin-4-il)metil)amino)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa 1

15 (R)-(9H-fluoren-9-il)metil(3-(4-(((3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)piperidin-1-il)-3-oxopropil)carbamato

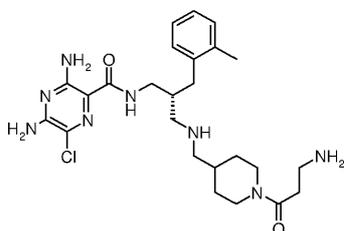


Una mezcla de (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (318 mg, 0.91 mmol) (Intermedio A), 3-(4-formilpiperidin-1-il)-3-oxopropilcarbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (440 mg, 1.08 mmol) (Intermedio F) y ácido acético (80 µL, 1.40 mmol) en THF seco (6 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (340 mg, 1.60 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 40°C durante 1.5 h adicionales. Se agregó agua y la mezcla se agitó durante 5 min y los solventes se evaporaron. El material residual se sometió a participación entre EtOAc y agua. A la fase acuosa se agregó 10% de NaHCO₃ (ac.) hasta que alcanza pH 8-9. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc. Las fases orgánicas amarillas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y los solventes se evaporaron. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (Kromasil C8; H₂O/MeCN/AcOH 95/5/0.2). Se combinaron las fracciones relevantes y se concentraron en vacío. Se agregó 10% de NaHCO₃ (ac.) y la fase acuosa se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El aceite pegajoso residual se disolvió en DCM/Heptano para dar después de evaporación el compuesto del título como un sólido, 196 mg (29%, pureza 87%).

LC/MS: m/z 739 [M+H]⁺

30 Etapa 2

(R)-3,5-diamino-N-(3-(((1-(3-aminopropanoil)piperidin-4-il)metil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida



3-(4-((3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propilamino)metil)piperidin-1-il)-3-oxopropilcarbamato de (R)-(9H-fluoren-9-il)metilo (196 mg, 0.27 mmol) (de la etapa 1) se disolvió en DCM (5 mL) y se trató con piperidina (0.5 mL). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 h luego se evaporó para dejar un sólido amarillo.

5 El material crudo se disolvió en THF (5 mL) y DIPEA (280 μ L, 1.60 mmol) y se trató con (BOC)₂O (0.141 mL, 0.61 mmol) en THF (1 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 h la LC/MS mostró solo una pequeña conversión a producto protegido mono-Boc, la mayoría aún fue amina sin reaccionar. Se agregaron un gran exceso de DIPEA y BOC₂(O) y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se agregó MeCN (2-3 ml) para aumentar la solubilidad y la mezcla se calentó a 50 °C durante 2 h luego a temperatura ambiente durante el fin de semana.

Los volátiles se evaporaron en vacío y el residuo se sometió a partición entre EtOAc y agua. La fase acuosa se hizo ácido por la adición de ácido cítrico 0.5 M. Se agregó solución salina para ayudar a la separación de las fases. La fase orgánica se lavó con agua y solución salina.

15 Se evaporó el solvente y el residuo se disolvió en DCM y se purificó mediante cromatografía flash (EtOAc/heptano, gradiente 30 - 100% de EtOAc). Los solventes se evaporaron para proporcionar el compuesto del título protegido con di-Boc (96 mg).

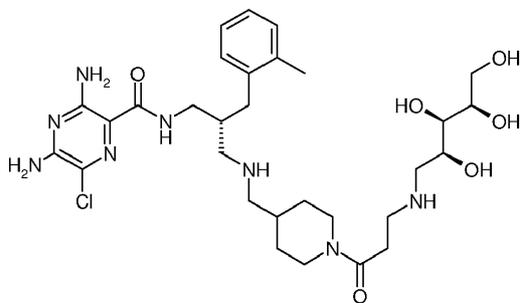
20 El material di-BOC protegido obtenido (96 mg) se disolvió en DCM (2 mL) y se trató con TFA (0.5 mL), la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 horas. La mezcla se evaporó, el residuo disuelto en agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Kromasil C8; H₂O/MeCN/HCO₂H 95/5/0.2 a 60/40/0.2 durante 16 min). El secado por congelación proporcionó el compuesto del título como un sólido (64 mg, 45%)

LC/MS: m/z 517 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, 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, residuo de ácido fórmico).

25 Etapa 3

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-2-(2-metilbencil)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)amino)propil)pirazina-2-carboxamida

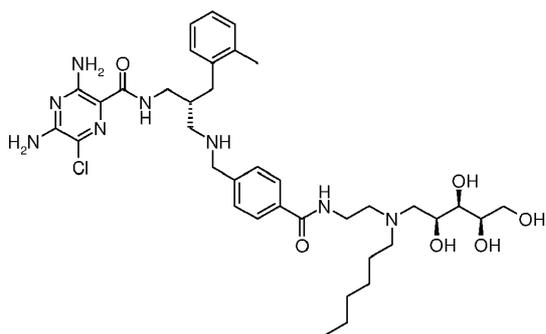


30 (R)-3,5-diamino-N-(3-(((1-(3-aminopropanoil)piperidin-4-il)metil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (900 mg, 1.74 mmol) se disolvió en metanol (10 mL). Se agregó (2R,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentanal (261 mg, 1.74 mmol), seguido por cinco gotas de agua. Luego se agregó cianoborohidruro de sodio (328 mg, 5.22 mmol) y el pH se ajustó a ~7.0 mediante la adición de ácido acético. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18h. Los volátiles se eliminaron y el producto crudo resultante se purificó mediante HPLC preparativa (H₂O/MeCN/AcOH 95/5/0.2 a 60/40/0.2 durante 20 min). Las fracciones relevantes se recolectaron y se secaron por congelamiento. El compuesto del título se disolvió en HCl 2M (4ml) y se secó por congelamiento, un procedimiento se repitió tres veces, produciendo la sal de HCl del compuesto del título (144 mg, 11%).

40 ¹H RMN (500 MHz, 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).

Ejemplo 2

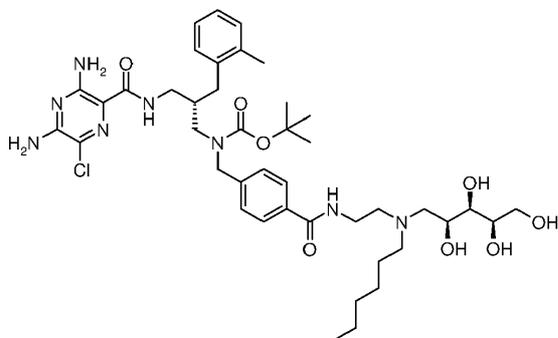
3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Método A

Etapa 1

5 ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de tert-butilo



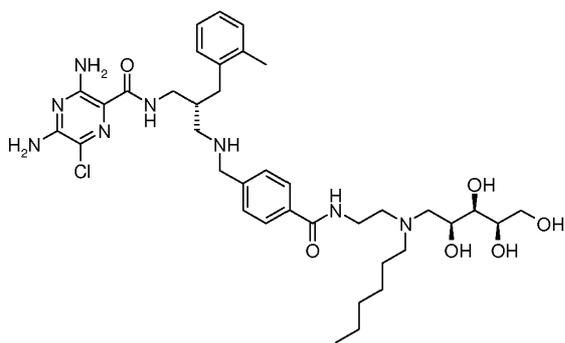
10 (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de (S)-tert-butilo (Intermedio E, 1.23 g, 1.73 mmol), (2R,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentanal (0.521 g, 3.47 mmol) y DIPEA (0.303 mL, 1.73 mmol) se disolvieron en MeOH (10 mL) y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregaron cianoborohidruro de sodio (0.327 g, 5.20 mmol) y ácido acético (0.099 mL, 1.73 mmol) y se continuó la agitación a 50 °C durante 3 días. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se desactivo mediante adición de 8% de NaHCO₃ (ac), se agitó durante 15 min y luego se concentró en vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (100 mL) y 8% de NaHCO₃ (ac) (50 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (100 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El compuesto se purificó mediante HPLC preparativa sobre una Kromasil C8 (10 μm 250x50 ID mm) utilizando un gradiente de 20 - 60% de acetonitrilo en tampón de H₂O/MeCN/AcOH 95/5/0.2 durante 20 minutos con un flujo de 100 mL/min. Los compuestos se detectaron mediante UV a 268 nm. El compuesto se recolectó y se secó por congelamiento para producir ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de tert-butilo (1.21 g, 83%) como un sólido blanco.

LC/MS: m/z 843.5 [M+H]⁺

1H RMN (500 MHz, 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 (s a, 2H), 7.03 - 7.19 (m, 6H), 7.72 (d, 2H), 7.78 - 7.99 (m, 1H), 8.21 - 8.36 (m, 1H).

25 Etapa 2

Diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



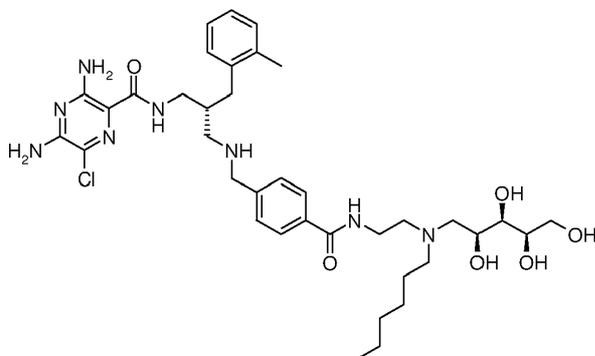
Se agregó en forma de gotas a cloruro de acetilo (5.69 mL, 80.0 mmol) un matraz enfriado en baño de hielo de MeOH (20 mL). La mezcla se agitó durante 5 min y se agregó ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de tert-butilo (1.21 g, 1.43 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h y luego se evaporó en vacío. El residuo se disolvió en agua y se secó por congelamiento para producir diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida (1.17 g, 100%) como un sólido pálido.

LC/MS: m/z 743.4 [M+H]⁺

1H RMN (500 MHz, 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).

Etapa 3

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



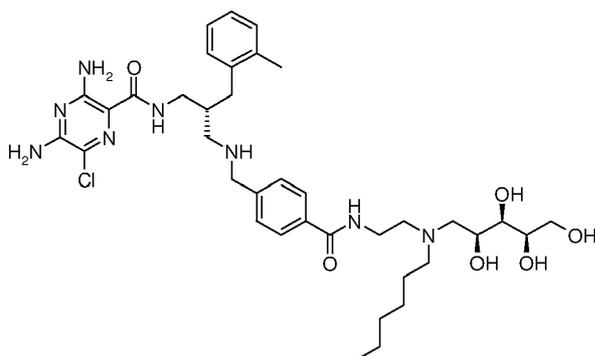
Se disolvió diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida (1.17 g, 1.43 mmol) en agua (15 ml) y se basificó mediante adición de 10% de Na₂CO₃ (ac) a pH ~11. El producto se extrajo con EtOAc (5x70 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío para producir un semisólido/aceite. El residuo se disolvió en acetonitrilo/agua y se secó por congelamiento para producir 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida (1.02 g, 96%) como un sólido pálido.

LC/MS: m/z 743.5 [M+H]⁺

1H RMN (500 MHz, 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 (s a, 2H), 7.03 - 7.14 (m, 4H), 7.40 (d, 2H), 7.74 (d, 2H), 8.24 - 8.37 (m, 2H).

Método B

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



A un matraz de pestaña de 5 L se cargó una solución de 4-formil-N-(2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)benzamida (Intermedio I, 133 g, 108.5 g de activo, 0.26 mol) en EtOH (1500 mL), (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (Intermedio A, 108.8 g, 0.31 mol), EtOH (230 mL) y DIPEA (64.4 mL, 0.37 mol). La mezcla se calentó a 40 °C durante 1 h. A la solución clara se cargó AcOH (45.4 ml, 0.79 mol). La solución se agitó a 40 °C durante 20 min. A esta se cargó NaCNBH₃ (23.2 g, 0.37 mol) en forma de porciones durante 10 min, observando la evolución del gas. La mezcla se agitó a 40 °C durante la noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se inactivó cuidadosamente con NaHCO₃ sat. ac. (3100 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se extrajo con 10% de MeOH/EtOAc (2 x 5000 mL) y 10% de MeOH/DCM (5000 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron en vacío para proporcionar 271 g de material crudo. El análisis de RMN indicó aproximadamente 80% de pureza, con señales de NaCNBH₃ presentes. El residuo se disolvió en DCM (12 L) y IPA (770 ml). La mezcla se lavó con una mezcla de NaHCO₃ sat. ac. (2700 ml) y agua (770 ml). La fase acuosa se extrajo con DCM (1200 ml). Los orgánicos se combinaron y se concentraron en vacío para proporcionar 298 g (191 g de activo, 97%) como un sólido amarillo. La HPLC-MS indicó 88.0% de pureza. La ¹H RMN indicó aproximadamente 60% de pureza, con aproximadamente 27% en peso de IPA y aproximadamente 8% en peso de Intermedio A.

El crudo obtenido de esa manera (290 g, 235 mmol) se diluyó en MeOH caliente (750 mL) y se agregó acetonitrilo (15 L) de forma continua mientras que evapora una forma de azeótropo de la mezcla. Después de aproximadamente 10 L de solvente se evaporó la mezcla restante que contiene una goma similar al precipitado se agitó durante 4 d adicionales a temperatura ambiente.

La fase líquida se decantó de la goma similar al residuo. Al residuo se agregó 2.5 L de acetonitrilo y después de agitación durante 1h y se decantó el acetonitrilo. El crudo obtenido de esa manera (aproximadamente 175 g) se sometió a una purificación final mediante cromatografía HPLC [CelluCoat 250x100 mm, 10 μm; fase móvil: MeOH/MeCN/TEA = 95:5:0.1; cantidad inyectada: 1.0 g/ciclo; tiempo de ciclo: 3.5 min]. Rendimiento del compuesto del título: 148 g (77%).

LC/MS: m/z 743.5 [M+H]⁺

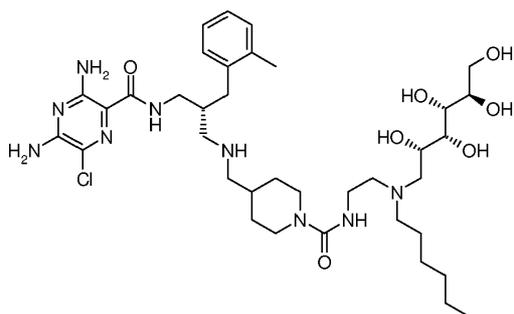
¹H RMN (600 MHz, DMSO; en caso de picos atropisoméricos, solo se reportó el cambio del atropisómero principal) δ 0.80 (t, 3H), 1.34 - 1.4 (m, 2H), 1.09 - 1.24 (m, 6H), 1.34 - 1.4 (m, 2H), 2.00 (s, 1H), 2.00 (s, 1H), 2.24 (s, 3H), 2.36 - 2.42 (m, 1H), 2.43 - 2.49 (m, 4H), 2.51 - 2.54 (m, 1H), 2.56 - 2.64 (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 RMN (151 MHz, 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 quiral (método A; heptano/IPA/TEA 75:25:0.1): 98.9% de ee, Rt = 14.75 min (R), 18.63 min (S).

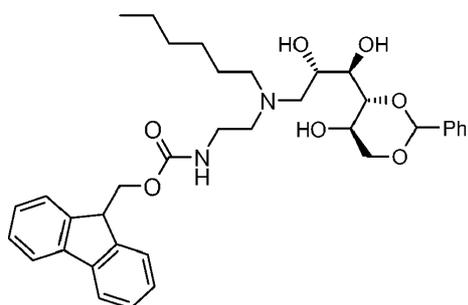
Ejemplo 3

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa 1:

2-(((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)(hexil)amino)etilcarbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



5

En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se colocó clorhidrato de N-(2-aminoetil)carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (1.50 g, 4.71 mmol, 1.0 equiv), (2R,4aR,7R,8R,8aS)-2-fenilhexahidro-2H-pirano[3,2-d][1,3]dioxina-6,7,8-triol (1.51 g, 5.63 mmol, 1.20 equiv), metanol (30 mL). Después de agitación la mezcla anterior durante 30 min, se agregó NaBH₃CN (590 mg, 9.39 mmol, 2.00 equiv), AcOH (570 mg, 9.49 mmol, 2.0 equiv). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego se agregó hexanal (530 mg, 5.29 mmol, 1.50 equiv), seguido por más NaBH₃CN (450 mg, 7.16 mmol, 2.00 equiv). La solución resultante se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Luego se concentró bajo vacío. La mezcla resultante se lavó con agua, se extrajo con acetato de etilo y las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre Na₂SO₄. Los sólidos se filtraron. Esto resultó en 1.6 g (73%) del compuesto del título como aceite amarillo claro.

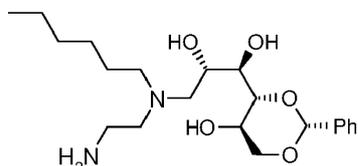
10

15 LC/MS: m/z 619 [M+H]⁺

¹H RMN (300 MHz, 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).

Etapa 2:

20 (1R,2S)-3-((2-aminoetil)(hexil)amino)-1-[(2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il]propano-1,2-diol



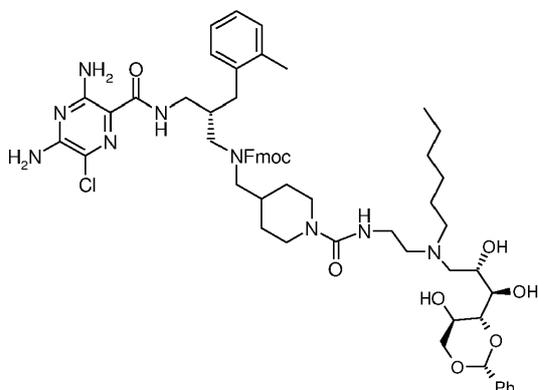
25

En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se colocó N-(2-(((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-[(2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il]propil)(hexil)amino)etil)carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (1.6 g, 2.59 mmol, 1.0 equiv), metanol (10 mL), dietilamina (5 mL). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El residuo se aplicó sobre una columna en gel de sílice y se eluyó con amoniaco/MeOH (1:100). Esto resultó en 600 mg (59%) del compuesto del título como sólido amarillo.

LC/MS: m/z 397 [M+H]⁺

Etapa 3:

(S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(2-(((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)hexil)amino)etilcarbamoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo

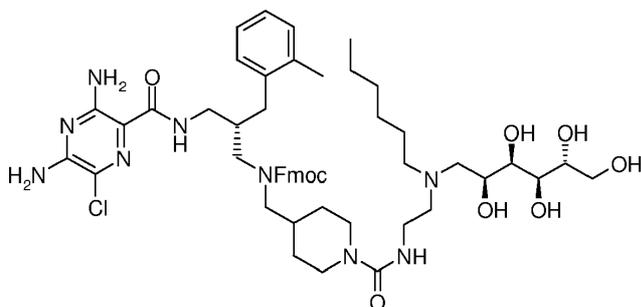


- 5 En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se colocó (S)-(9H-fluoren-9-il)metil -3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil(piperidin-4-ilmetil)carbamato (Intermedio B, 400 mg, 0.60 mmol, 1.0 equiv), trietilamina (177 mg, 1.75 mmol, 3.0 equiv), trifosgeno (173 mg, 0.58 mmol, 1.0 equiv) en DCM (5 mL). La solución resultante se agitó durante 0.5 h a temperatura ambiente. La mezcla resultante se lavó con 3x10 mL de agua. La mezcla resultante se concentró bajo vacío para dar el intermedio cloroformamida que se agregó en forma de gotas (dissolved en DCM) a una solución de trietilamina (177 mg, 1.75 mmol, 3.0 equiv) y (1R,2S)-3-[(2-aminoetil)(hexil)amino]-1-[(2R,4R, 5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3 -dioxan-4-il]propano-1,2-diol (347 mg, 0.88 mmol, 1.50 equiv) en DCM (5 mL) se agitaron durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró en vacío. El residuo se purificó mediante TLC preparativa con DCM/MeOH (10:1). Esto resultó en 145 mg (22%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

15 LC/MS: m/z 1090 [M+H]⁺

Etapa 4:

(S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etilcarbamoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo

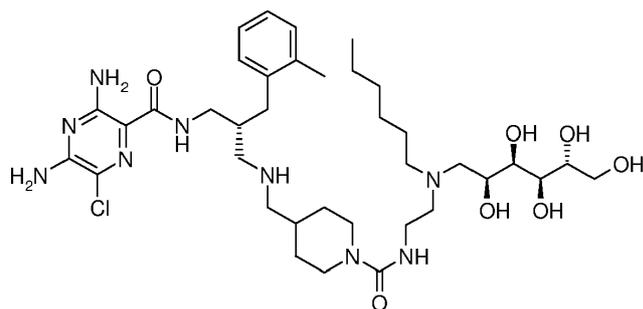


- 20 En un frasco de 8 mL, se colocó (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(2-(((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)hexil)amino)etilcarbamoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (144 mg, 0.13 mmol, 1.0 equiv), etanol (0.5 mL), HCl 4M (3 mL). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró bajo vacío. Esto resultó en 120 mg (crudo) del compuesto del título como aceite amarillo.

25 LC/MS: m/z 1002 [M+H]⁺

Etapa 5:

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etilcarbamoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



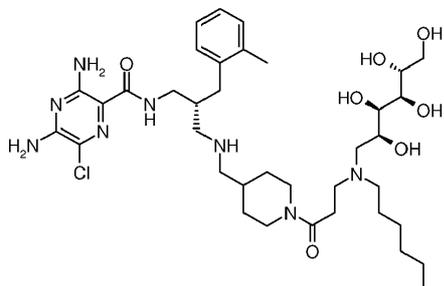
5 En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se colocó (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etilcarbamoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de 9H-fluoren-9-il)metilo (120 mg, 0.12 mmol, 1.0 equiv), dietilamina (2 mL) en N,N-dimetilformamida (4 mL). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró bajo vacío. El producto crudo (100 mg) se purificó mediante Prep-HPLC con las siguientes condiciones (2#-AnalyseHPLC-SHIMADZU(HPLC-10)): Columna, XBridge Prep C18 OBD Columna, 5 μ m, 19*150 mm.; fase móvil, WATER con 0.05% de TFA y ACN (23.0% de ACN hasta 33.0% en 15 min); Detector, MS,UV 254 nm. Esto resultó en 8 mg (7%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

10 LC/MS: m/z 780 [M+H]⁺

¹H RMN (300 MHz, 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)

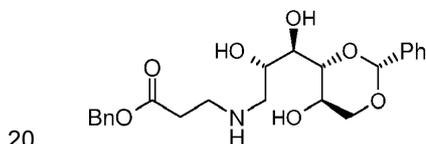
Ejemplo 4

15 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa 1 :

3-((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propilamino)propanoato de bencilo

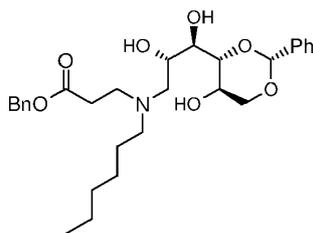


25 En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se colocó 3-aminopropanoato de bencilo de ácido 4-metilbenceno-1-sulfónico (2.00 g, 5.69 mmol, 1.0 equiv), (2R,4aR,7R,8R,8aS)-2-fenil-hexahidro-2H-pirano[3,2-d][1,3]dioxina-6,7,8-triol (2.29 g, 8.54 mmol, 1.5 equiv), metanol (30 mL). Después de 30 min, se agregó NaBH₃CN (720 mg, 11.46 mmol, 2.00 equiv), AcOH (680 mg, 11.32 mmol, 2.0 equiv). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua. Las capas orgánicas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Los sólidos se filtraron. La eliminación de los solventes en vacío resultó en 1.9 g (77%) el compuesto del título como aceite incoloro que se utilizó en la siguiente etapa directamente.

LC/MS: m/z 967 [M+H]⁺

30 Etapa2:

3-(((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)(hexil)amino)propanoato de bencilo

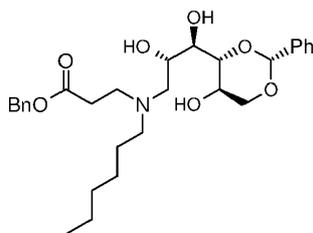


- 5 En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se colocó 3-[[[(2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-[(2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il]propil]amino]propanoato de bencilo (1.90 g, crudo), hexanal (660 mg, 6.59 mmol, 1.5 equiv), metanol (30 mL). Después de 30 min, se agregaron NaBH₃CN (550 mg, 8.75 mmol, 2.0 equiv) y AcOH (530 mg, 8.83 mmol, 2.0 equiv). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua, las capas orgánicas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Los sólidos se filtraron. El residuo se aplicó sobre una columna en gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo/éter de petróleo (1:2). Esto resultó en 1.3 g (57%) de 3-[[[(2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-[(2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il]propil](hexil)amino]propanoato de bencilo como aceite amarillo claro.

10 LC/MS: m/z 516 [M+H]⁺

Etapa3:

ácido 3-(((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)(hexil)amino)propanoico

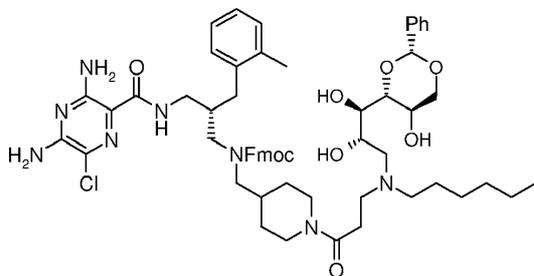


- 15 En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se colocó 3-[[[(2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-[(2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il]propil](hexil)amino]propanoato de bencilo (1.3 g, 2.52 mmol, 1.0 equiv), Pd/C (5 wt%, 700 mg), etanol (20 mL). A la mezcla anterior, H₂ (g). La solución resultante se agitó bajo atmósfera de H₂ durante la noche a temperatura ambiente. Los sólidos se filtraron. El filtrado se concentró bajo vacío. Esto resultó en 0.5 g (47%) de ácido 3-[[[(2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-[(2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il]propil](hexil)amino]propanoico como aceite incoloro.

20 LC/MS: m/z 426 [M+H]⁺

Etapa 4:

(S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(3-(((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)(hexil)amino)propanoilo)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



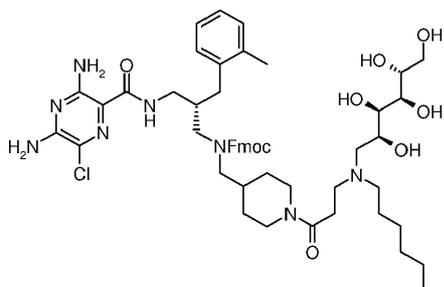
- 25 En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se colocó ácido 3-[[[(2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-[(2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il]propil](hexil)amino]propanoico (381.49 mg, 0.90 mmol, 3.00 equiv), 3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil(piperidin-4-ilmetil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo (Intermedio B, 200.0 mg, 0.30 mmol, 1.0 equiv), HATU (170.5 mg, 0.45 mmol, 1.5 equiv), DIEA (57.9 mg, 0.45 mmol, 1.5 equiv), N,N-dimetilformamida (5 mL). La solución resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se agregó agua a la mezcla anterior y la suspensión se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con solución salina. La mezcla se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Los sólidos se filtraron y el filtrado se evaporó en vacío. El residuo se purificó mediante TLC preparativa (DCM:MeOH=10:1). Las fracciones relevantes se
- 30

recolectaron y después de la eliminación de los volátiles resultó en 200 mg (62%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 1076 [M+H]⁺

Etapas 5:

- 5 (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(3-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo

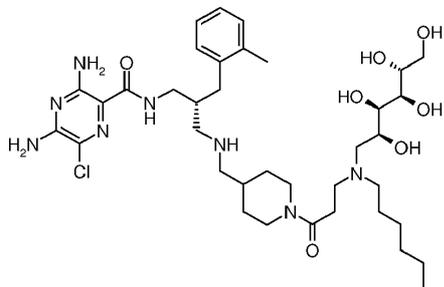


- 10 En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se colocó (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(3-(((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)(hexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (etapa 4, 200 mg, 0.19 mmol, 1.0 equiv) y solución de HCl (4M en etanol, 2 mL). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La evaporación de los volátiles resultó en 200 mg del compuesto del título crudo como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 987 [M+H]⁺

Etapas 6:

- 15 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



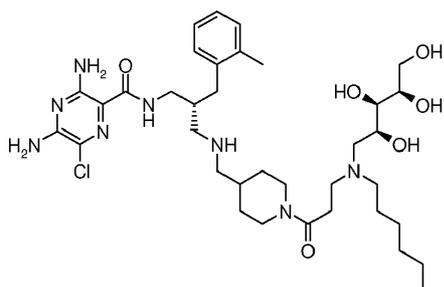
- 20 En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se colocó (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(3-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (etapa 5200 mg, 0.20 mmol, 1.00 equiv), metanol (6 mL), dietilamina (3 mL). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró bajo vacío. El producto crudo (100 mg) se purificó mediante Prep-HPLC con las siguientes condiciones (Prep-HPLC-019): Columna, XSelect CSH Prep C18 OBD Columna, 5 μm, 19*150 mm; fase móvil, WATER con 0.05% de TFA y MeCN (22.0% de MeCN hasta 30.0% en 8 min, hasta 100% en 1 min, se mantuvo 100% en 1 min, se bajó a 22% en 2 min); Detector, UV 254/220 nm. Esto resultó en 38 mg (21%) de ácido 3,5-diamino-6-cloro-N-[(2R)-3-[[1-(3-[hexil[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil]amino]propanoil)piperidin-4-il]metil]amino)-2-[(2-metilfenil)metil]propil]pirazina-2-carboxamida; trifluoroacético como un sólido amarillo.

- 30 ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): 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]⁺

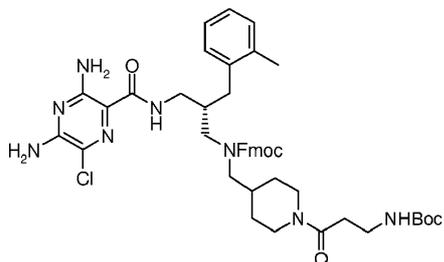
Ejemplo 5

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa1:

(1-(3-tert-butoxycarbonylamino)propanoilo)piperidin-4-il)metil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo



5

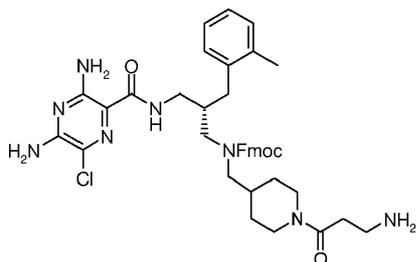
Un matraz (25 mL) se cargó con 3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil(piperidin-4-il)metil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo (Intermedio B, 300 mg, 0.45 mmol), ácido 3-(tert-butoxicarbonylamino)propanoico (100 mg, 0.53 mmol), DIPEA (145 mg, 1.13 mmol), HATU (342 mg, 0.9 mmol) y se agregó DMF (10 mL). La reacción se agitó durante 6 h a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con 25 mL de acetato de etilo y se lavó mediante agua (3 x 25 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La precipitación se filtro y el filtrado se concentró bajo vacío. El producto crudo obtenido se purificó mediante una columna en gel de sílice con diclorometano/metanol (20:1, v/v) para proporcionar el compuesto del título (280 mg, 67%) como sólido amarillo claro.

10

LC/MS: m/z 839 [M+H]⁺

15 Etapa2:

(1-(3-aminopropanoilo)piperidin-4-il)metil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo



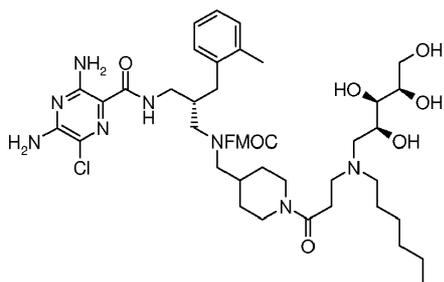
20

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se colocó (1-(3-tert-butoxycarbonylamino)propanoilo)piperidin-4-il)metil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo (etapa 1, 216 mg, 0.26 mmol, 1.0 equiv) y cloruro de hidrógeno (4M en metanol, 5 mL). La solución resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La evaporación de los volátiles resultó en 190 mg del compuesto del título crudo como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 739 [M+H]⁺

25 Etapa3:

(S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(3-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoilo)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo

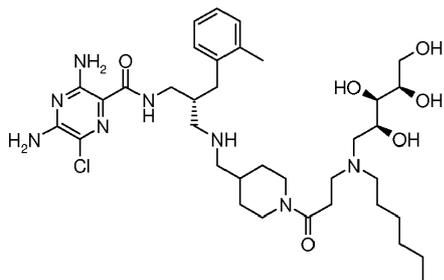


- 5 En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se colocó (1-(3-aminopropanoil)piperidin-4-il)metil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo (etapa 2, 190 mg, 0.26 mmol, 1.0 equiv), (3R,4S,5R)-oxano-2,3,4,5-tetrol (39 mg, 0.26 mmol, 1.0 equiv), metanol (6 mL). Después de 30 min, se agregó NaBH₃CN (66 mg, 1.05 mmol, 4.0 equiv) lentamente a 0 °C. La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego se agregó hexanal (39 mg, 0.39 mmol, 1.0 equiv), seguido por más NaBH₃CN (66 mg, 1.05 mmol, 4.0 equiv). La solución resultante se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. El solvente se eliminó para dar el producto crudo, que se utilizó en la siguiente etapa directamente sin purificación adicional.

10 LC/MS: m/z 957 [M+H]⁺

Etapa 4:

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



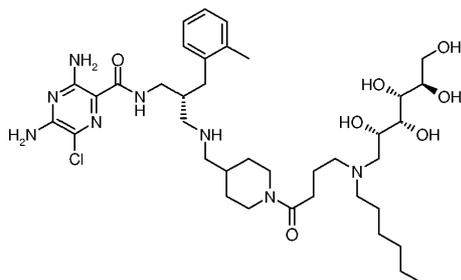
- 15 En un matraz de fondo redondo de 50 mL se colocó (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(3-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (etapa 3, 230 mg, 0.24 mmol, 1.00 equiv), metanol (5 mL), dietilamina (0.5 mL). La solución resultante se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. El producto crudo se purificó mediante Prep-HPLC con las siguientes condiciones (Prep-HPLC-019): Columna, XSelect CSH Prep C18 OBD Columna, 5 μm, 19*150 mm.; fase móvil, WATER con 0.05% de TFA y MeCN (18.0% de MeCN hasta 35.0% en 8 min, hasta 100.0% en 1 min, se conserva a 100.0% en 1 min, se bajó a 18.0% en 2 min); Detector, UV 254/220 nm. Esto resultó en 36.9 mg (16%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 735 [M+H]⁺

- 25 ¹H RMN (300 MHz, 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).

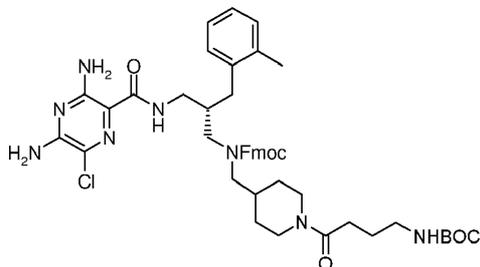
Ejemplo 6

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(4-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa1:

((1-(4-((tert-butoxicarbonil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo

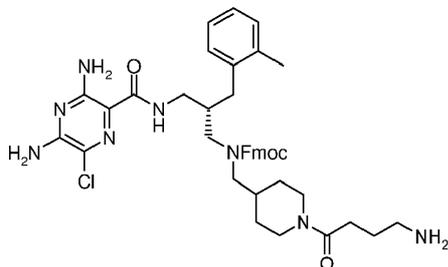


- 5 En un matraz de fondo redondo de 50 mL se colocó (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(piperidin-4-ilmetil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo (Intermedio B, 900mg, 1.35 mmol), ácido 4-((tert-butoxicarbonil)amino)butanoico (821 mg, 4.04 mmol), HATU (2305 mg, 6.06 mmol), y DIEA (1.06 mL, 6.06 mmol) en DMF (10 mL) para dar una solución amarilla. La solución resultante se agitó a 25 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 mL), y se lavó de forma secuencial con agua (50 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó en vacío para proporcionar producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice, se eluyó por un gradiente de 20 a 70% de EtOAc en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron hasta secado para proporcionar el compuesto del título (834 mg, 73%) como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 853 [M+H]⁺

15 Etapa2:

(1-(4-aminobutanoil)piperidin-4-il)metil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo

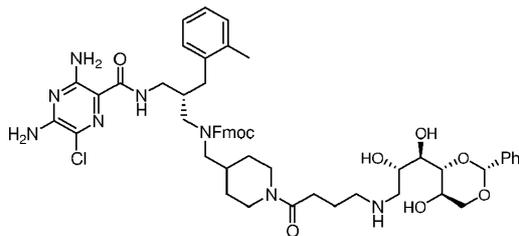


- 20 ((1-(4-((tert-butoxicarbonil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo (etapa 1, 834 mg, 0.98 mmol) se disolvió en una solución metanólica de HCl (4M) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se evaporó en vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 753 [M+H]⁺

Etapa3:

- 25 (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(4-((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propilamino)butanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



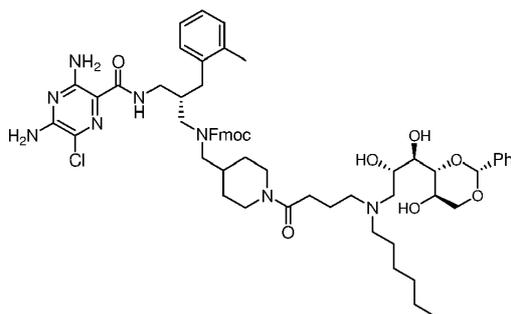
- 30 En un matraz de fondo redondo de 25 mL se colocó (1-(4-aminobutanoil)piperidin-4-il)metil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo (etapa 2, 250 mg, 0.33 mmol, 1.0 equiv), D-glucosa(2R,4aR,7R,8R,8aS)-2-fenil-hexahidro-2H-pirano[3,2-d][1,3]dioxina-6,7,8-triol protegido

5 con acetal (133 mg, 0.50 mmol, 1.5 equiv) y metanol (5 mL). La mezcla se agitó durante 30 min, luego se agregaron NaBH₃CN (41 mg, 0.65 mmol, 2.0 equiv) y AcOH (40 mg, 0.67 mmol, 2.00 equiv). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El solvente se eliminó bajo presión reducida para proporcionar 210 mg (crudo) de (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(4-((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propilamino)butanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 1005 [M+H]⁺

Etapa 4:

10 (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(4-((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)(hexil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo

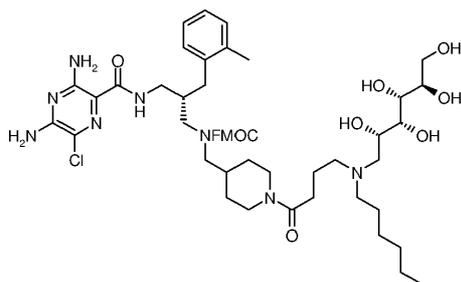


15 (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(4-((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propilamino)butanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (210 mg, crudo) se disolvió en MeOH (5 mL), se agregó hexanal (42 mg, 0.42 mmol, 2.00 equiv), seguido por NaBH₃CN (26 mg, 0.41 mmol, 2.00 equiv) y AcOH (25 mg, 0.42 mmol, 2.00 equiv). La mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y luego se concentró bajo vacío. El residuo se tomó con agua y se extrajo con 3x20 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas y se concentraron bajo vacío y resultaron en 152 mg (67%) del compuesto del título como un aceite amarillo crudo.

LC/MS: m/z 1089 [M+H]⁺

20 Etapa 5:

(S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(4-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo

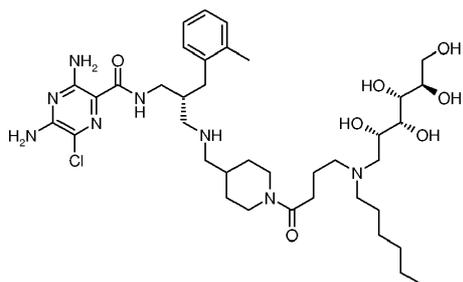


25 En un matraz de fondo redondo de 25 mL se colocó (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(4-((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)(hexil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (etapa 4, 152 mg, 0.14 mmol, 1.00 equiv), HCl (4M en etanol, 5 mL) y etanol (1 mL). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La evaporación de los volátiles resultó en 138 mg del compuesto del título crudo como aceite amarillo.

30 LC/MS: m/z 1002 [M+H]⁺

Etapa 6:

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(4-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



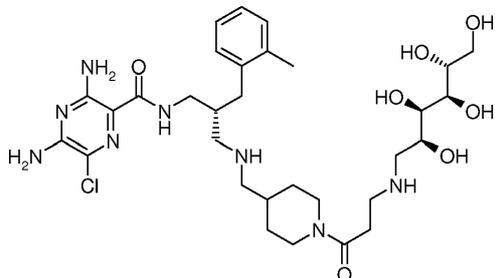
5 En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se colocó (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(4-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (etapa 4, 138 mg, 0.14 mmol, 1.0 equiv), dietilamina (2 mL), N,N-dimetilformamida (2 mL). La solución resultante se agitó durante durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró bajo vacío. El producto crudo (110 mg) se purificó mediante HPLC preparativa con las siguientes condiciones: Columna, XSelect CSH Prep C18 OBD Columna, 5 μ m, 19*150 mm,; fase móvil, WATER con 0.05% de TFA y MeCN (23% de MeCN hasta 30% en 8 min, hasta 100% en 1 min, se mantuvo a 100% en 1 min, bajó a 23.0% en 2 min); Detector, uv 254/220 nm. 15.7 mg (13%) del compuesto del título como trifluoroacetato se obtuvo como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 779.5 [M+H]⁺

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): 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).

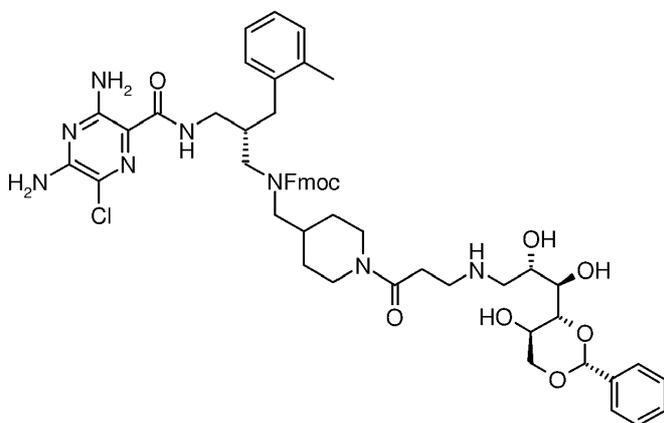
15 Ejemplo 7

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-2-(2-metilbencil)-3-((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexilamino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa1:

20 (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(3-((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propilamino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



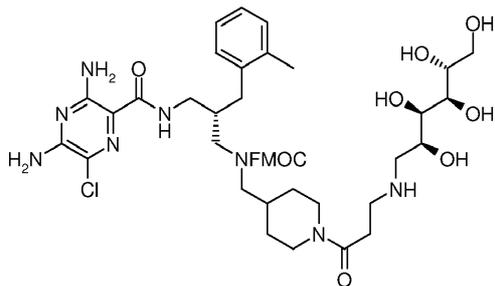
25 En un matraz de fondo redondo de 25 mL se colocó 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida (Ejemplo 5/etapa 2, 20 mg, 0.27 mmol, 1.0 equiv,) y el D-glucosa (2R,4aR,7R,8R,8aS)-2-fenilhexahidropirano[3,2-

d][1,3]dioxina-6,7,8-triol protegido con acetal (218 mg, 0.81 mmol, 3.0 equiv) en metanol (5 mL). La solución resultante se agitó durante 0.5 h a temperatura ambiente. Se agregó NaBH₃CN (34 mg, 0.54 mmol, 2.0 equiv), AcOH (30 mg, 0.50 mmol, 2.0 equiv). La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La activación con agua y trabajo extractivo resultó después de la eliminación de los solventes en 220 mg del compuesto del título crudo como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 992 [M+H]⁺

Etapa 2:

(S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexilamino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo

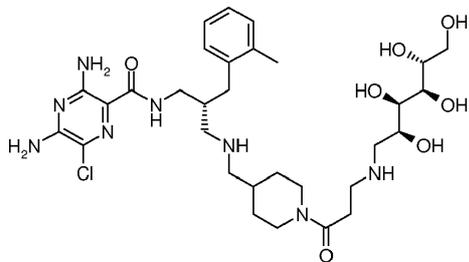


En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se colocó (S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil((1-(3-((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propilamino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (etapa 1, 200 mg, 0.20 mmol, 1.0 equiv), etanol (1.5 mL) y HCl (4M en etanol, 5 mL). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente y luego se concentró bajo vacío. 180 mg del compuesto del título crudo se obtuvo como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 904 [M+H]⁺

Etapa3:

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-2-(2-metilbencil)-3-((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexilamino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)propil)pirazina-2-carboxamida



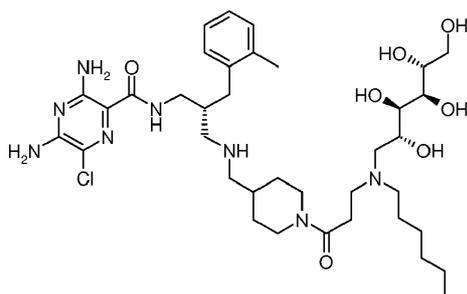
En un matraz de fondo redondo de 25 mL se colocó N-[(2S)-3-[(3,5-diamino-6-cloro-3,4-dihidropirazin-2-il)formamido]-2-[(2-metilfenil)metil]propil]-N-[[1-(3-[[2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil]amino]propanoil)piperidin-4-il]metil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetil (etapa 2, 180 mg, 0.20 mmol, 1.0 equiv), a dietilamina (2 mL) y N,N-dimetilformamida (4 mL). La solución resultante se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y después se concentró bajo vacío. El producto crudo (150 mg) se purificó mediante HPLC preparativa utilizando las siguientes condiciones: Columna, XBridge Prep C18 OBD Columna, 5 μm, 19*150 mm.; fase móvil, agua con 0.05% de TFA y ACN (16.0% de ACN hasta 26.0% en 15 min); Detector, MS,UV 254/220 nm. Esto resultó en 15.5 mg (10%) del trifluoroacetato del compuesto del título como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 681.4 [M+H]⁺

¹H RMN (300 MHz, 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).

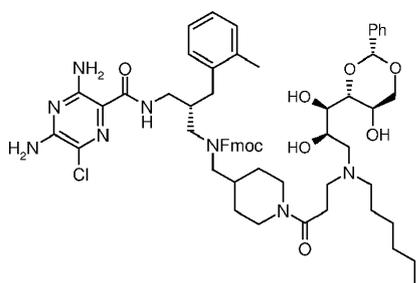
Ejemplo 8

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa 1:

5 ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)((1-(3-(((2R,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



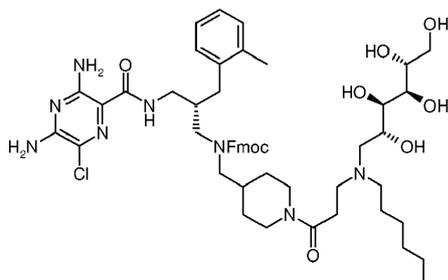
10 Se agregó cianoborohidruo de sodio (57.0 mg, 0.91 mmol) en forma de porción a una mezcla de hexanal (45.5 mg, 0.45 mmol) y ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)((1-(3-(((2R,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo [preparado por un procedimiento análogo a como se describe por ejemplo 7/etapa 1; comenzando desde el D-manitol (2R,4aR,7S,8R,8aS)-2-fenilhexahidropirano[3,2-d][1,3]dioxina-6,7,8-triol] protegido con acetal (300 mg, 0.30 mmol) en MeOH (20 mL). La solución resultante se agitó a 25 °C durante 4 h. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante TLC preparativa (DCM: MeOH = 25: 1) para proporcionar ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)((1-(3-(((2R,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (270 mg, 83%) como una goma amarilla.

LC/MS: m/z 1076 [M+H]⁺

20 ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): 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).

Etapa 2:

((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)((1-(3-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxi)hexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo

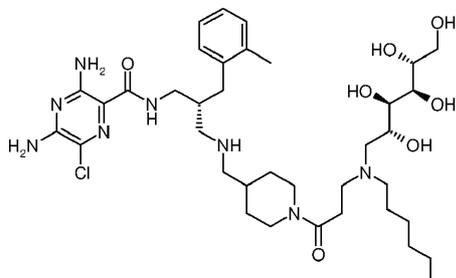


25 ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)((1-(3-(((2R,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (270 mg, 0.25 mmol) se agregó a HCl (4M, ac., 15 mL) en etanol (5 mL). Después de agitación a 25 °C durante 2 h la mezcla se concentró bajo presión reducida y se produjo el compuesto del título (200 mg, 81%) como un aceite amarillo.

LC/MS: m/z 987 [M+H]⁺

Etapa 3:

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



5

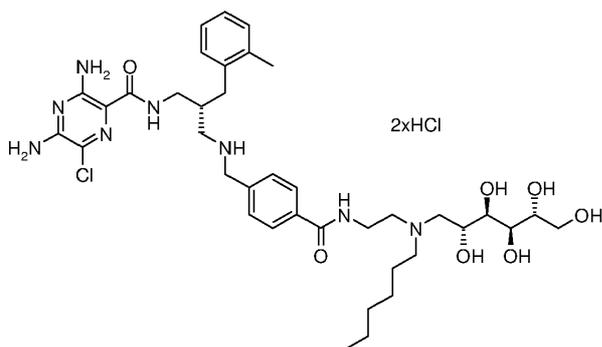
Se agregó dietilamina (3 mL) a ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)((1-(3-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metil (etapa 2, 200 mg, 0.20 mmol) en DMF (6 mL). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2 horas. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa Columna: X Bridge C18, 19*150 mm, 5 um; Fase móvil A: Agua/0.05% de TFA, Fase móvil B: ACN; Índice de flujo: 20 mL/min; Gradiente: 30% B a 70% B en 10 min; 254 nm, como eluyentes. Las fracciones que contienen el compuesto deseado se evaporaron hasta secado para proporcionar 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida (23.5 mg) como una goma amarilla.

15 LC/MS: m/z 765.4 [M+H]⁺

¹H RMN (300 MHz, 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).

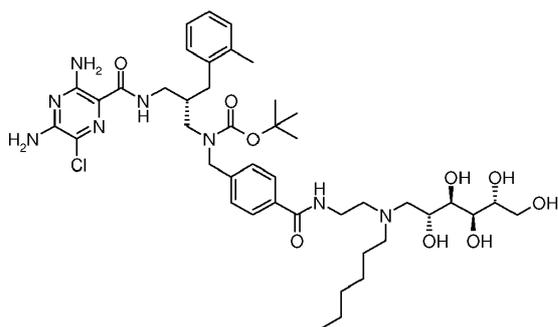
Ejemplo 9

20 Diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa 1

25 ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de tert-butilo



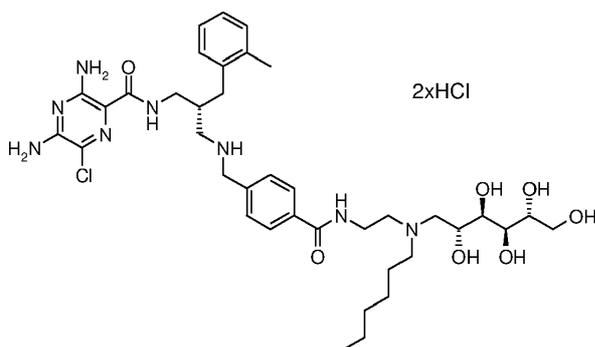
5 (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de (S)-tert-butilo (Intermedio E, 500 mg, 0.70 mmol), (3S,4S,5S,6R)-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraol (254 mg, 1.41 mmol) y DIPEA (0.123 mL, 0.70 mmol) se disolvieron en MeOH (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregaron cianoborohidruro de sodio (133 mg, 2.11 mmol) y ácido acético (0.040 mL, 0.70 mmol) y se continuó la agitación durante 18 h y luego a 50 °C durante 30 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se desactivó mediante adición de HCl 3 M (ac), se agitó durante 15 min y luego se concentró en vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (50 mL) y 8% de NaHCO₃ (ac) (50 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3x50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El compuesto se purificó mediante HPLC preparativa sobre una Kromasil C8 (10 µm 250x50 ID mm) utilizando un gradiente de 20 - 60% de acetonitrilo en tampón de H₂O/MeCN/AcOH 95/5/0.2 durante 20 minutos con un flujo de 100 mL/min. Los compuestos se detectaron mediante UV a 268 nm. El compuesto se recolectó y se secó por congelamiento para producir el compuesto del título (195 mg, 32%) como un sólido incoloro.

15 LC/MS: m/z 873.6 [M+H]⁺

1H RMN (500 MHz, 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 (s a, 2H), 7.04 - 7.18 (m, 6H), 7.72 (d, 2H), 7.78 - 7.99 (m, 1H), 8.27 - 8.37 (m, 1H).

20 Etapa 2

Diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



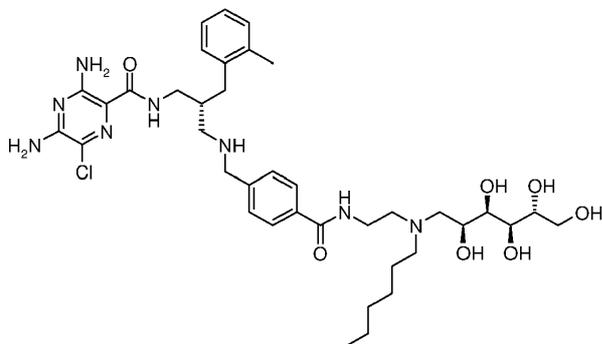
25 A un frasco enfriado en baño de hielo de MeOH (5 mL, 124 mmol) se agregó cloruro de acetilo (1.42 mL, 20 mmol) en forma de gotas. La mezcla se agitó durante 5 min y luego se agregó ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de tert-butilo (190 mg, 0.22 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h y luego se evaporó en vacío. El residuo se disolvió en agua y se secó por congelamiento para producir el compuesto del título (184 mg, 100%) como un sólido pálido.

30 LC/MS: m/z 773.4 [M+H]⁺

1H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) 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 (s a, 1H).

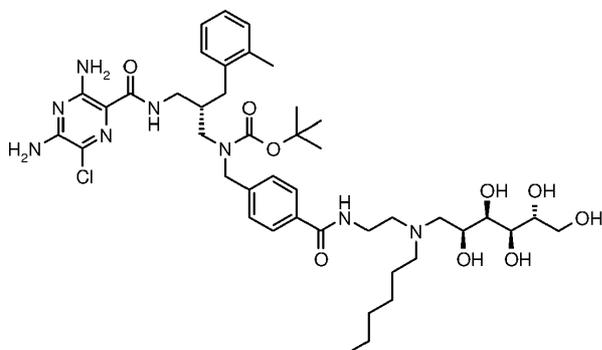
35 Ejemplo 10

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)encil)amino)-2-(2-metilencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa 1

- 5 ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)encil)carbamato de tert-butilo



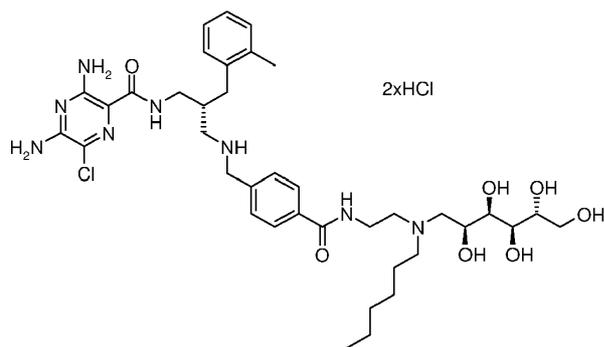
- 10 (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)encil)carbamato de (S)-tert-butilo (Intermedio E, 1.25 g, 1.76 mmol), (3R,4S,5S,6R)-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraol (0.635 g, 3.52 mmol) y DIPEA (0.308 mL, 1.76 mmol) se disolvieron en MeOH (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregaron cianoborohidruo de sodio (0.332 g, 5.29 mmol) y ácido acético (0.101 mL, 1.76 mmol) y se continuó la agitación durante 40 h a 50 °C. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se desactivo mediante adición de 8% de NaHCO₃ (ac), se agitó durante 30 min y se concentró en vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (100 mL) y 8% de NaHCO₃ (ac) (100 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2x100 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El compuesto se purificó mediante HPLC preparativa sobre una Kromasil C8 (10 μm 250x50 ID mm) utilizando un gradiente de 20 - 60% de acetonitrilo en tampón de H₂O/MeCN/AcOH 95/5/0.2 durante 20 minutos con un flujo de 100 mL/min. Los compuestos se detectaron mediante UV a 268 nm. El compuesto se recolectó y se secó por congelamiento para producir ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)encil)carbamato de tert-butilo (1.26 g, 82%) como un sólido blanco.

LC/MS: m/z 873.6 [M+H]⁺

- 25 ¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 2H), 7.03 - 7.19 (m, 6H), 7.72 (d, 2H), 7.78 - 8 (m, 1H), 8.24 - 8.37 (m, 1H).

Etapa 2

Diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)encil)amino)-2-(2-metilencil)propil)pirazina-2-carboxamida



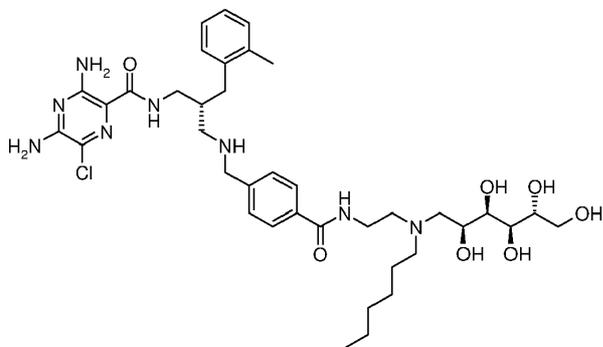
Se agregó cloruro de acetilo (5.69 mL, 80.0 mmol) en forma de gotas a un matraz enfriado en baño de hielo de MeOH (20 mL). La mezcla se agitó durante 5 min y luego se agregó ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-hexil)amino)etil)carbamoil)encil)carbamoato de tert-butilo (1.26 g, 1.44 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h y luego se evaporó en vacío. El residuo se disolvió en agua y se secó por congelamiento para producir diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-hexil)amino)etil)carbamoil)encil)amino)-2-(2-metilencil)propil)pirazina-2-carboxamida (1.29 g, 106%) como un sólido pálido.

10 LC/MS: m/z 773.4 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 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 (s a, 1H), 9.41 (s a, 1H), 9.70 (d, 1H).

15 Etapa 3

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-hexil)amino)etil)carbamoil)encil)amino)-2-(2-metilencil)propil)pirazina-2-carboxamida



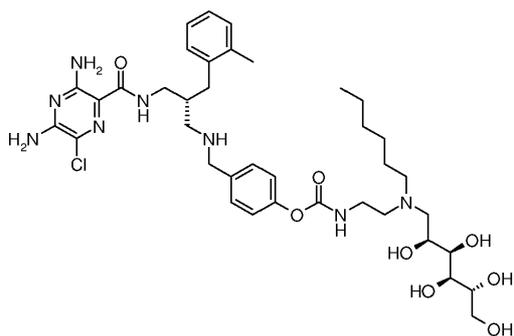
20 Diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-hexil)amino)etil)carbamoil)encil)amino)-2-(2-metilencil)propil)pirazina-2-carboxamida (1.23 g, 1.45 mmol) se disolvió en agua y se basificó mediante adición de Na₂CO₃ al 10% (ac) a Ph ~11. El producto se extrajo con EtOAc (6x70 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío para producir un semisólido/aceite. El residuo se disolvió en acetonitrilo/agua y se secó por congelamiento para producir 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-hexil)amino)etil)carbamoil)encil)amino)-2-(2-metilencil)propil)pirazina-2-carboxamida (1.08 g, 96%) como un sólido pálido.

25 LC/MS: m/z 773.4 [M+H]⁺

30 ¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 2H), 7.04 - 7.14 (m, 4H), 7.40 (d, 2H), 7.74 (d, 2H), 8.26 - 8.37 (m, 2H).

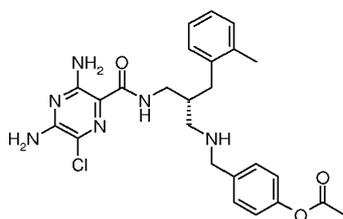
Ejemplo 11

carbamoato de 4-(((R)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilencil)propilamino)metil)fenil 2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-hexil)amino)etilo



Etapa1:

Acetato de (R)-4-((3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propilamino)metil)fenilo

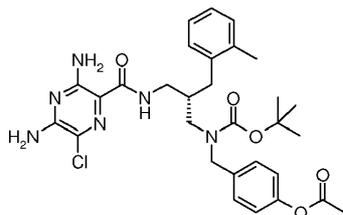


- 5 En un matraz de pera de 50 mL se cargó (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (Intermedio A, 1.6 g, 4.59 mmol) y acetato de 4-formilfenilo (0.753 g, 4.59 mmol) agregado a DCM (30 mL) para dar una solución amarilla. Después de agitación durante 1 h se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (3.89 g, 18.4 mmol) y se continuó la agitación durante la noche. La mezcla se diluyó con DCM y se lavó con agua y solución salina. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó en vacío para proporcionar acetato de (R)-4-(((3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)fenilo crudo (1.70 g, 75%) como un sólido amarillo. El producto se utilizó en la siguiente etapa directamente sin purificación adicional.

LC/MS: m/z 467 [M+H]⁺

Etapa2:

- 15 Acetato de (S)-4-((tert-butoxicarbonil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)fenilo



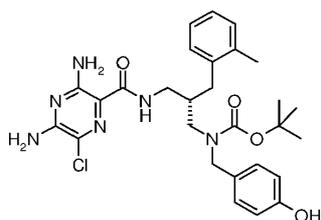
- 20 Se agregó a $(\text{BOC})_2\text{O}$ (1.07 mL, 4.59 mmol) una mezcla de acetato de (R)-4-(((3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)fenilo (1.9 g, 3.82 mmol) y Na_2CO_3 (0.81 g, 7.65 mmol) en la mezcla los solventes dioxano (25 mL)/agua (8 mL) a 0 °C. se dejó que la mezcla alcanza temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc, y se lavó con solución salina saturada. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice utilizando un gradiente de 10 a 40% de EtOAc en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron hasta secado para proporcionar el compuesto del título (1.30 g, 57%) como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 597 [M+H]⁺

- 25 ¹H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 1.47 (s, 9H), 2.25 - 2.251 (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).

Etapa 3:

3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil(4-hidroxibencil)carbamato de (S)-tert-butilo

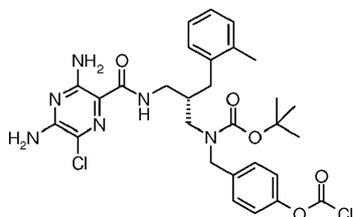


- 5 Se agregó en forma de gotas NaOH (0.174 g, 4.35 mmol) en agua (8 mL) a una solución fría de acetato de (S)-4-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-chloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)fenilo (1.3 g, 2.18 mmol) en MeOH (20 mL). La solución de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se acidificó con HCl 2M ac. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc y la fase orgánica se lavó con agua y solución salina, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar el compuesto del título crudo (1.20 g, 99%) como sólido amarillo .

LC/MS: m/z 555 [M+H]⁺

Etapa 4:

- 10 Carbonocloridato de (S)-4-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-chloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)fenilo

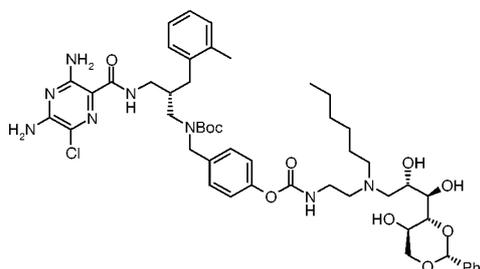


- 15 En un matraz de fondo redondo de 50 mL se agregó (3-(3,5-diamino-6-chloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-hidroxibencil)carbamato de (S)-tert-butilo (250 mg, 0.45 mmol), DIEA (0.354 mL, 2.03 mmol) a THF (10 mL) para dar una solución amarilla. La mezcla se enfrió con un baño de hielo y se agregó trifosgeno (200 mg, 0.68 mmol). Después de agitación durante 1 h la mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo con EtOAc (3 x 20 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar el compuesto del título (250 mg, 90%) como aceite amarillo.

LC/MS: m/z 617 [M+H]⁺

- 20 Etapa 5:

((S)-3-(3,5-diamino-6-chloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-(((2-(((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)(hexil)amino)etil)carbamoil)oxi)bencil)carbamato de tert-butilo

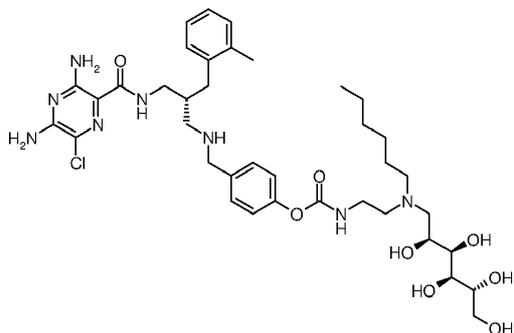


- 25 En un matraz de fondo redondo de 50 mL se agregó (1R,2S)-3-((2-aminoetil)(hexil)amino)-1-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propano-1,2-diol (Ejemplo 3/etapa 2, 96 mg, 0.24 mmol) y DIEA (0.064 mL, 0.36 mmol) disuelto en THF (10 mL) lo que resulta en una solución incolora. Se agregó carbonocloridato de (S)-4-(((tert-butoxycarbonyl)(3-(3,5-diamino-6-chloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)fenilo (etapa 4, 150 mg, 0.24 mmol) a 0 °C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (20 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 20 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron en vacío. El residuo se purificó mediante TLC preparativa (DCM: MeOH = 10: 1), para proporcionar el compuesto del título (200 mg, 84%) como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 977 [M+H]⁺

Etapa 6:

carbamato de 4-(((R)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propilamino)metil)fenil 2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil



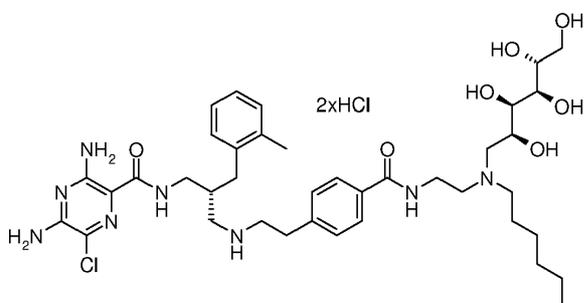
5 En un matraz de fono redondo de 25 mL se agregó ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-(((2-(((2S,3R)-2,3-dihidroxi-3-((2R,4R,5R)-5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxan-4-il)propil)(hexil)amino)etil)carbamoil)oxi)bencil)carbamato de tert-butilo (etapa 5, 200 mg, 0.20 mmol) a EtOH (1 mL) para dar una solución amarilla. Se agregó HCl ac. (4M, 3 mL) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (columna Waters XBridge Prep C18 OBD, 5 μ de sílice, 50 mm de diámetro, 150 mm de longitud), utilizando un gradiente para reducir la polaridad del agua (0.05% de TFA) y MeCN como eluyente. Las fracciones que contienen el compuesto deseado se evaporaron hasta secado para proporcionar el compuesto del título (28.0 mg, 13%) como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 789.4 [M+H]⁺

15 ¹H RMN (300 MHz, 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).

Ejemplo 12

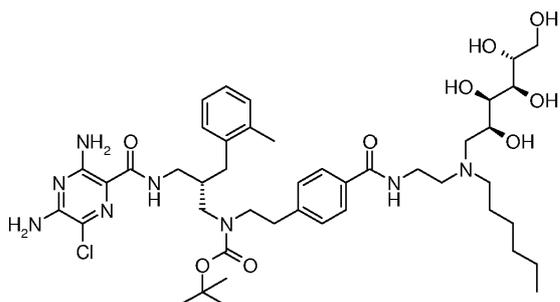
Diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-(((R)-3-(((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



20 Etapa 1

EN06927-61

((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-(((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetil)carbamato de tert-Butilo



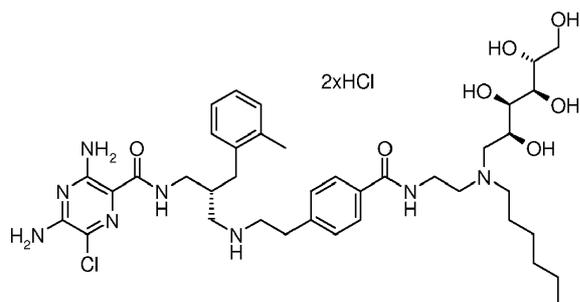
(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)fenetil)carbamato de (S)-tert-butilo (Intermedio D, 500 mg, 0.69 mmol), (3R,4S,5S,6R)-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraol (249 mg, 1.38 mmol) y DIPEA (0.121 mL, 0.69 mmol) se disolvieron en MeOH (5 mL) y se agitaron a 50 °C durante 40 min antes de adición de cianoborohidruro de sodio (130 mg, 2.07 mmol) y ácido acético (0.044 mL, 0.76 mmol). Se continuó la agitación a 50 °C durante 21 h y la mezcla de reacción luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción se desactivó mediante adición de 8% de NaHCO₃ (ac). La mezcla se diluyó en EtOAc (50 mL) y 8% de NaHCO₃ (ac) (50 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (4x50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El compuesto se purificó mediante HPLC preparativa sobre una Kromasil C8 (10 µm 250x50 ID mm) utilizando un gradiente de 20 - 60% de acetonitrilo en tampón de H₂O/MeCN/AcOH 95/5/0.2 durante 20 minutos con un flujo de 100 mL/min. Los compuestos se detectaron mediante UV a 265 nm. El compuesto se recolectó y se secó por congelamiento para producir el compuesto del título (385 mg, 63%) como un sólido pálido.

LC/MS: m/z 887.6 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 2H), 7.06 - 7.19 (m, 6H), 7.72 (d, 2H), 7.8 - 7.97 (m, 1H), 8.24 - 8.34 (m, 1H).

Etapa 2

Diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



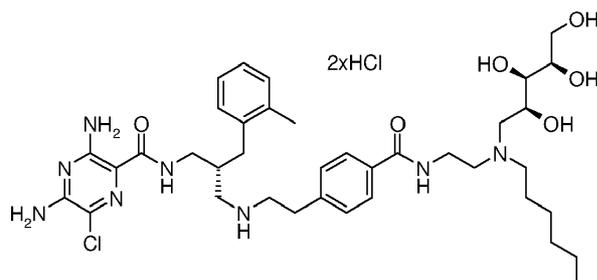
Se agregó cloruro de acetilo (1.42 mL, 20 mmol) en forma de gotas a una solución de MeOH enfriada en baño de hielo (5 mL, 124 mmol). La solución se agitó durante 5 min y luego se agregó a ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetil)carbamato de tert-butilo (etapa 1, 385 mg, 0.43 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 h y luego se concentró en vacío. El residuo se disolvió en agua y se secó por congelamiento para producir el compuesto del título (369 mg, 99%) como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 787.4 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 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).

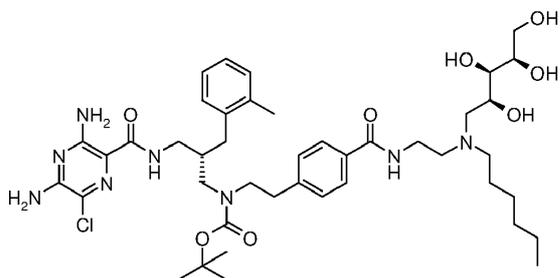
Ejemplo 13

Diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa 1:

((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)fenetil)carbamato de tert-butilo



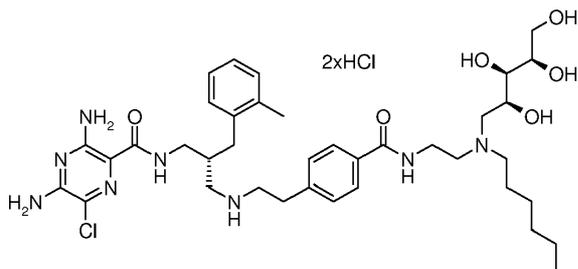
5 (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)fenetil)carbamato de (S)-tert-butilo (Intermedio D, 500 mg, 0.69 mmol), (2R,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipental (208 mg, 1.38 mmol) y DIPEA (0.121 mL, 0.69 mmol) se disolvieron en MeOH (5 mL) y se agitaron a 50 °C durante 40 min antes de adición de cianoborohidruro de sodio (130 mg, 2.07 mmol) y ácido acético (0.044 mL, 0.76 mmol). Se continuó la agitación a 50 °C durante 21 h y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción se desactivó mediante adición de 8% de NaHCO₃ (ac). La mezcla se diluyó en EtOAc (50 mL) y 8% de NaHCO₃ (ac) (50 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (4x50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El compuesto se purificó mediante HPLC preparativa sobre una Kromasil C8 (10 µm 250x50 ID mm) utilizando un gradiente de 20 - 60% de acetonitrilo en tampón de H₂O/MeCN/AcOH 95/5/0.2 durante 20 minutos con un flujo de 100 mL/min. Los compuestos se detectaron mediante UV a 265 nm. El compuesto se recolectó y se secó por congelamiento para producir ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)fenetil)carbamato de tert-butilo (374 mg, 63%) como un sólido pálido.

LC/MS: m/z 857.6 [M+H]⁺

20 ¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 2H), 7.05 - 7.2 (m, 6H), 7.72 (d, 2H), 7.8 - 7.97 (m, 1H), 8.23 - 8.34 (m, 1H).

Etapa 2:

Diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



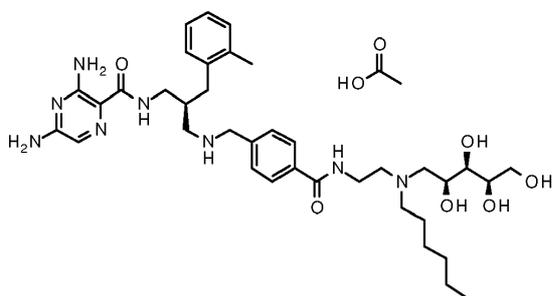
25 Se agregó cloruro de acetilo (1.42 mL, 20.0 mmol) en forma de gotas a una solución de MeOH enfriada con hielo (5 mL, 123.59 mmol). La solución se agitó durante 5 min y luego se agregó a ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)fenetil)carbamato de tert-butilo (374 mg, 0.44 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 h y luego se concentró en vacío. El residuo se disolvió en agua y se secó por congelamiento para producir diclorhidrato de 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida (361 mg, 100%) como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z 757.4 [M+H]⁺

35 ¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 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).

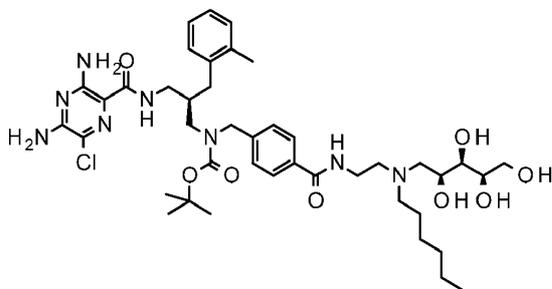
Ejemplo 14

ácido acético de 3,5-diamino-6-cloro-N-((S)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)encil)amino)-2-(2-metilencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa 1

- 5 ((R)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)encil)carbamato de tert-butilo



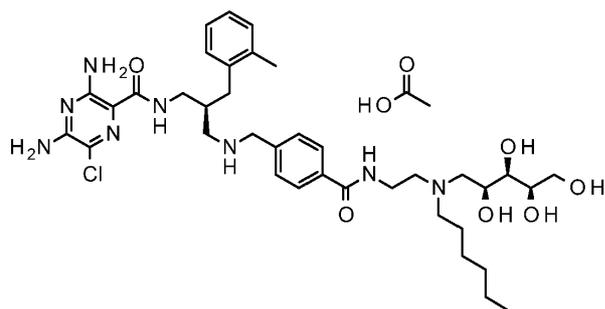
- 10 (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)encil)carbamato de (R)-tert-butilo, (Intermedio H) (163 mg, 0.23 mmol), (2R,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentanal (69.0 mg, 0.46 mmol) y DIPEA (0.040 mL, 0.23 mmol) se disolvieron en MeOH (4 mL) y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregaron cianoborohidruro de sodio (14.44 mg, 0.23 mmol) y ácido acético (0.039 mL, 0.69 mmol) y la reacción se calentó a 50 °C durante 20 h y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción se desactivó mediante adición de 8 % de NaHCO₃ (ac) y se agitó durante 30 min. El solvente se concentró en vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (25 mL) y 8 % de NaHCO₃ (ac) (25 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2x25 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El compuesto se purificó mediante HPLC preparativa sobre una Kromasil C8 (10 µm 250x20 ID mm) utilizando un gradiente de 30 - 70 % de acetonitrilo en tampón de H₂O/ACN/AcOH 95/5/0.2, durante 20 minutos con un flujo de 19 mL/min. Los compuestos se detectaron mediante UV a 265 nm. Las fracciones del producto se recolectaron y se secaron por congelamiento para producir ((R)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)encil)carbamato de tert-butilo (127 mg, 65.5 %) como un sólido.

- 25 ¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 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]⁺

Etapa 2

ácido acético de 3,5-diamino-6-cloro-N-((S)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)encil)amino)-2-(2-metilencil)propil)pirazina-2-carboxamida



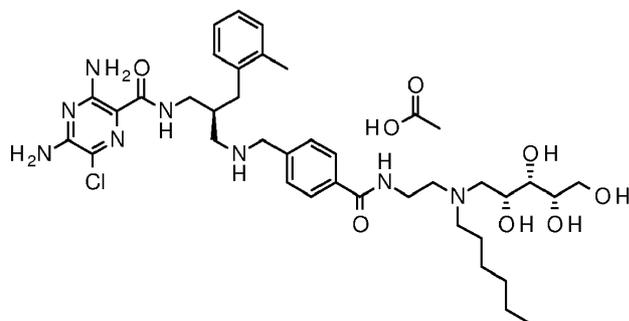
Se agregó cloruro de acetilo (0.711 mL, 10 mmol) en forma de gotas a un frasco enfriado en baño de hielo de MeOH (2.5 mL, 61.79 mmol) y se agitó durante 5 min antes de adición de ((R)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de tert-butilo (127 mg, 0.15 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y luego se concentró en vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (25 mL) y 5 % de Na₂CO₃ (ac) (25 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (5x25 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El compuesto se purificó mediante HPLC preparativa sobre una Kromasil C8 (10 μm 250x20 ID mm) utilizando un gradiente de 5 - 45 % de acetonitrilo en tampón de H₂O/ACN/AcOH 95/5/0.2, durante 20 minutos con un flujo de 19 mL/min. Los compuestos se detectaron mediante UV a 268 nm. El producto se secó por congelamiento para producir 3,5-diamino-6-cloro-N-((S)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida (100 mg, 82 %) como un sólido pálido.

¹H RMN (500 MHz, 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 (c, 1H), 3.62 - 3.71 (m, 2H), 3.74 (d, 1H), 6.96 (s a, 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]⁺

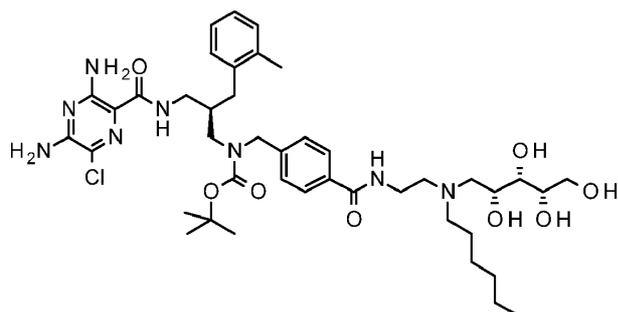
Ejemplo 15

20 Ácido acético de 3,5-diamino-6-cloro-N-((S)-3-((4-((2-(hexil((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa 1

25 ((R)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de tert-butilo



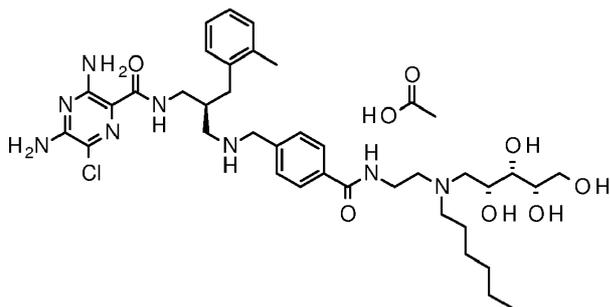
(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de (R)-tert-butilo, (Intermedio G) (163 mg, 0.23 mmol), (2S,3R,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipental (69.0 mg, 0.46 mmol) y DIPEA (40.1 μ l, 0.23 mmol) se disolvieron en MeOH y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregaron cianoborohidruro de sodio (14.44 mg, 0.23 mmol) y ácido acético (39.5 μ l, 0.69 mmol) y la reacción se calentó a 50 °C durante 20 h y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción se desactivó mediante adición de 8 % de NaHCO₃ (ac) y se agitó durante 30 min. El solvente se concentró en vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (25 mL) y 8 % de NaHCO₃ (ac) (25 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (5x25 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El compuesto se purificó mediante HPLC preparativa sobre una Kromasil C8 (10 μ m 250x20 ID mm) utilizando un gradiente de 30 - 70% de acetonitrilo en tampón H₂O/ACN/AcOH 95/5/0.2, durante 20 minutos con un flujo de 19 mL/min. Los compuestos se detectaron mediante UV a 265 nm. Las fracciones del producto se recolectaron y se secaron por congelamiento para producir ((R)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de tert-butilo (135 mg, 69.7 %) como un sólido.

¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) 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 (s a, 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 [M+H]⁺

Etapa 2

Ácido acético de 3,5-diamino-6-cloro-N-((S)-3-((4-((2-(hexil((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



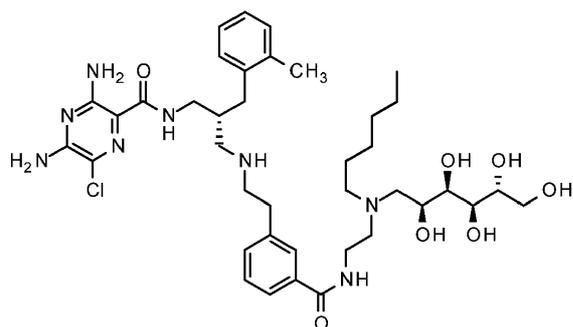
Se agregó en forma de gotas cloruro de acetilo (0.711 mL, 10 mmol) a un frasco enfriado en baño de hielo de MeOH (2.5 mL, 61.79 mmol) y se agitó durante 5 min antes de adición de ((R)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexil((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de tert-butilo (135 mg, 0.16 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y luego se evaporó en vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (25 mL) y 5 % de Na₂CO₃ (ac) (25 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (5x25 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El compuesto se purificó mediante HPLC preparativa sobre una Kromasil C8 (10 μ m 250x20 ID mm) utilizando un gradiente de 5 - 45 % de acetonitrilo en tampón de H₂O/ACN/AcOH 95/5/0.2, durante 20 minutos con un flujo de 19 mL/min. Los compuestos se detectaron mediante UV a 268 nm. El producto se secó por congelamiento para producir 3,5-diamino-6-cloro-N-((S)-3-((4-((2-(hexil((2R,3S,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida (93 mg, 70.2 %) como un sólido pálido.

¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) 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 (c, 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 [M+H]⁺

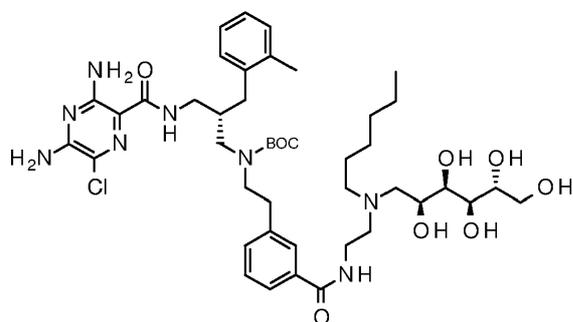
Ejemplo 16

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-(3-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



Etapa 1

(S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil(3-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoi)fenetil)carbamato de tert-butilo



5

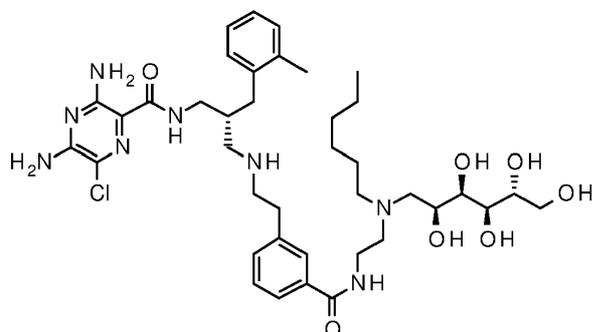
10

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se agregó (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil(3-(2-(hexilamino)etil)carbamoi)fenetil) carbamato de (S)-tert-butilo (intermedio D, 370 mg, 0.51 mmol) y (3R,4S,5S,6R)-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraol (138 mg, 0.77 mmol) en MeOH (15 mL) para dar una solución amarilla. Después de agitación la mezcla anterior durante 30 min se agregó NaCNBH₃ (32.1 mg, 0.51 mmol). La solución resultante se agitó a 50 °C durante 16 horas. El solvente se eliminó bajo presión reducida para dar producto crudo ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil(3-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoi)fenetil)carbamato de tert-butilo (500 mg, 110%) como sólido amarillo. El producto se utilizó en la siguiente etapa directamente sin purificación adicional.

LC/MS: m/z 887 [M+H]⁺

15 Etapa 2

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-(3-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoi)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida



20

25

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se agregó ((S)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil(3-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoi)fenetil)carbamato de tert-butilo (500 mg, 0.56 mmol) en HCl/MeOH (20 mL, 0.56 mmol) para dar una solución amarilla. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (columna Waters XBridge Prep C18 OBD, 5 μ de sílice, 50 mm de diámetro, 150 mm de longitud), utilizando mezclas polares reducidas de agua (que contienen 0.1% de NH₄HCO₃) y MeCN como eluyentes. Las fracciones que contienen el compuesto deseado se evaporaron hasta secado para proporcionar 3,5-

diamino-6-cloro-N-((R)-3-((3-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida (87 mg, 20%) como un sólido amarillo.

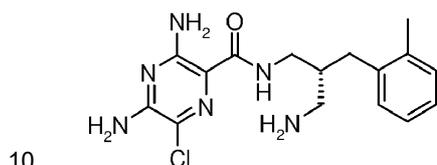
LC/MS: m/z 788 [M+H]⁺

5 ¹H RMN (300 MHz, 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).

Síntesis de Intermedios

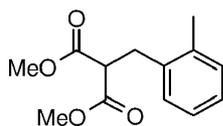
Intermedio A

(R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida



Etapa 1:

2-(2-metilbencil)malonato de dimetilo



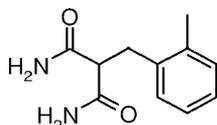
15 Un reactor se cargó con malonato de dimetilo (6.00 kg, 45.4 mol) y metanol (21.3 L). Se agregó 25% de NaOMe/MeOH (10.37 L, 45.2 mol) durante 10 minutos y luego se agregó bencilcloruro de 2-metilo (4.26 kg, 30.3 mol) durante 1.5 h, manteniendo una temperatura de reacción por debajo de 30 °C. Se agregó NH₄Cl (53.1 L) a la reacción, lo que resulta en pH 8.5. El producto se extrajo con acetato de isopropilo (3 x 25 L) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con 10% de solución salina (10 L) y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite (8.63 kg, 68 wt%, 83%). El compuesto del título obtenido de esta manera
20 contenía malonato dialquilado. Pureza mediante HPLC: 86%.

LC/MS: m/z 237 [M+H]⁺

¹H-RMN (DMSO-d₆, 270 MHz) δ 7.17-7.05 (4H, m), 3.60 (6h, s), 3.82 (1H, t), 3.12 (2H, s), 2.21 (3H, s); ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 270 MHz) δ 169.5, 136.6, 136.3, 130.8, 129.5, 127.3, 126.4, 52.8, 52.0, 31.8, 19.4.

Etapa 2

25 2-(2-Metilbencil)malonamida



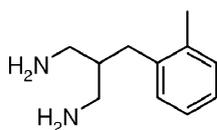
30 Un reactor se cargó con dimetil-2-(2-metilbencil)malonato (etapa 1, 5.9 kg, 68% en peso, 17.0 mol) y metanol (14.8 L). Se agregó 34% de hidróxido de amonio (24 L, 36 equiv.) y la reacción se agitó a 25 °C hasta que se consideró completa mediante análisis de HPLC. Los sólidos se filtraron y luego se agregó MTBE (15.3 L). Después de 30 min los sólidos se filtraron, se lavaron con MTBE (2 x 15.3 L) y se secaron bajo presión reducida a 60 °C para dar el compuesto del título como un sólido blanco (3.2 kg, 91%).

LC/MS: m/z 206.9 [M+H]⁺

¹H-RMN (DMSO-d₆, 270 MHz) δ 7.32-7.21 (2H, s a), 7.15-7.00 (6H, m), 3.33 (1H, t), 2.96 (2H, d), 2.28 (3H, s); ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 270 MHz) δ 171.0, 137.5, 136.0, 129.9, 128.9, 126.1, 125.6, 53.2, 32.5, 19.1.

35 Etapa 3

2-(2-Metilbencil)propano-1,3-diamina



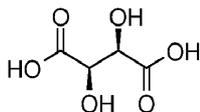
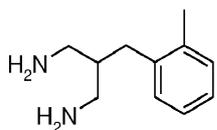
Un reactor se cargó con 2-(2-metilbencil)malonamida (1.32 kg, 6.40 mol) y THF (5.4 L). La mezcla viscosa se enfrió a 0 °C y se agregó borano-THF 1M (25.6 L, 25.6 mol) durante 2 h, manteniendo una temperatura de reacción por debajo de 2 °C. La reacción se calentó a 15 °C y luego se agitó a 50 °C durante la noche. Cuando el análisis de HPLC indicó menos de 8% de material de partida restante, la mezcla de reacción se desactivó en KOH 4M (8 L), manteniendo una temperatura por debajo de 30 °C. La capa orgánica se concentró bajo presión reducida y la capa acuosa se extrajo dos veces con MTBE (2 x 10 L). Los extractos de MTBE combinados se agregaron a la capa orgánica concentrada y las capas orgánicas combinadas luego se cargaron a una solución de HCl 6M (10 L), manteniendo una temperatura por debajo de 30°C. La fase acuosa se lavó con MTBE (10 L) y luego se basificó con KOH 6M (12 L). La fase acuosa se extrajo dos veces con THF (10 L y luego 5 L) y la fase orgánica combinada se concentró bajo presión reducida. Se agregó tolueno (5 L) y luego se destiló en azeótropo para eliminar cualquier agua residual. La mezcla se trituró con tolueno (5 L) y los sólidos se filtraron y se lavaron con tolueno (3 L). El filtrado se concentró bajo presión reducida produciendo el compuesto del título como la amina libre (1.13 kg, 70% de rendimiento). Pureza mediante HPLC: 91%.

LC/MS: m/z 179.0 [M+H]⁺

¹H-RMN (CDCl₃, 270 MHz) 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, s a); ¹³C-RMN (CDCl₃, 270 MHz) δ 139.0, 136.3, 130.5, 129.9, 126.2, 125.9, 44.7, 43.8, 34.3, 19.6.

Etapa 4

L-tartrato de 2-(2-Metilbencil)propano-1,3-diamina



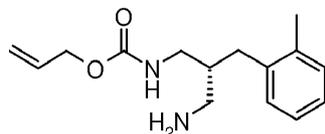
A diamina cruda (de la etapa 3) (1.62 kg, 9.1 mol) se agregó etanol (4 L). Se agregó una solución de ácido L-tartárico (1.62 kg, 10.8 mol) disuelto en etanol (11 L), manteniendo la temperatura por debajo de 40 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 3 d y luego los sólidos se filtraron, se lavaron con etanol (2 x 2 L) y se secaron bajo presión reducida a 50 °C para dar el compuesto del título como su sal de mono- L-tartrato (3.21 kg, rendimiento cuantitativo). Pureza mediante HPLC: 92.2%.

LC/MS: m/z 179.0 [M+H]⁺

¹H-RMN (D₂O, 270 MHz) 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); ¹³C-RMN (D₂O, 270 MHz) 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.

Etapa 5

(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (R)-Alilo (1-(R))



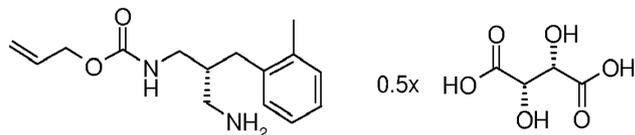
Un reactor se cargó con sal de L-tartrato de 2-(2-metilbencil)propano-1,3-diamina (3.57 kg, 10.9 mol) y agua (17 L). Se agregó NaOH 10M (17 L, 170 mol), manteniendo una temperatura de reacción por debajo de 25 °C. La mezcla se agitó durante 30 min a 25 °C durante 3 d y luego se agregó 2-MeTHF (14 L). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con 2-MeTHF (14 L). La fase orgánica combinada se secó (sulfato de sodio), se filtró y se concentró bajo presión reducida produciendo la diamina libre. Un reactor se cargó con la diamina libre, 2-MeTHF (37.4 L) y carbonato de dialilo (1.80 kg, 12.6 mol). Se agregó lipasa Amano PS IM inmovilizada (5.61 kg, 3 wt equivalentes) en porciones durante 30 min y la temperatura se fijó a 30 °C. After 4 días, la ¹H RMN indicó menos de 5% de material de partida y la mezcla de reacción fue clara se filtró a través de Celita y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (2.68 kg, 82% de ee, 100% de rendimiento). Pureza mediante HPLC: 84.7%.

LC/MS: m/z 263.1 [M+H]⁺

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 270 MHz) δ 7.15-7.05 (4H, m), 5.99-5.81 (1H, m), 5.80-5.60 (1H, s a), 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, s a); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 270 MHz) 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.

Etapa 6

- 5 Sal de 1-(R) D-tartrato de (3-amino-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (R)-alilo.



- 10 Se agregó (3-amino-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (R)-alilo crudo (2.68 kg, 10.2 mol) a EtOH (7.1 L). Se agregó una solución de ácido D-tartárico (1.53 kg, 10.2 mol) en EtOH (8 L) manteniendo la temperatura por debajo de 25 °C. Después de aproximadamente 1 h se empezó a formar un precipitado y la mezcla se le permitió agitar durante la noche. Se agregó MeCN (5 L) a 25 °C y los sólidos se filtraron, se lavaron con MeCN (2 x 5 L) y se secaron bajo presión reducida a 40 °C para proporcionar 2.94 kg del compuesto del título sal de ((R) D-tartrato, 100% de rendimiento) en una relación estequiométrica base/di-ácido= 2:1. Pureza mediante HPLC: 91.6%.

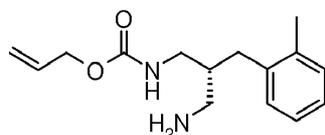
LC/MS: m/z 263.1 [M+H]⁺

- 15 $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6 , 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); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d_6 , 270 MHz) 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 quiral (método A): 88.3% de ee; r.t. = 11.14 min (S), 14.57 min (R).

Etapa 7

- 20 (3-amino-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (R)-alilo



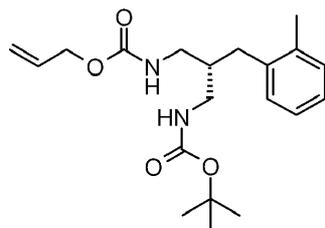
- 25 A un recipiente de 50 L bajo nitrógeno se agregó agua (14.7 L) y MTBE (14.7 L), este se siguió mediante la adición de la sal de (1-(R)) D-tartrato de (3-amino-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (R)-alilo (etapa 6, 2940 g). 10M NaOH (14.7 L) se agregó a la mezcla y la temperatura se mantuvo por debajo de 30 °C. La mezcla se agitó durante 30 mins, los orgánicos se separaron y la acuosa se re-extrajo con MTBE (14.7 L). Una porción de los orgánicos se concentró en vacío (1 L) para dar un rendimiento extrapolado de 1779 g, 95%.

LC/MS: m/z 263.1 [M+H]⁺

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 270 MHz) 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).

- 30 Etapa 8

(2-(2-metilbencil)propano-1,3-diil)dicarbamato de (S)-alilo de tert-butilo



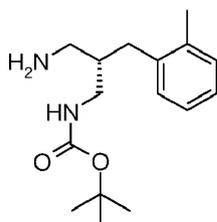
- 35 A un recipiente de 50 L bajo nitrógeno se agregó (3-amino-2-(2-metilbencil)propil) carbamato de (R)-Alilo (1740 g) disuelto en MTBE (29.4 L). Este se siguió mediante la adición de trietilamina (922 mL). La mezcla se enfrió a 0 °C y se trató con BOC-ahídrido (1600 mL, 1518 g) disuelto en MTBE (3.48 L). La reacción se calentó a 20 °C y se agitó durante 2 h. La reacción se juzgó completa mediante $^1\text{H RMN}$. La reacción se cargó con agua (8.7 L) y se agitó durante 15 min. Los orgánicos se separaron y se lavaron con 5% de ácido cítrico (8.7 L) y solución salina (8.7 L)

antes de secado sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró en vacío produciendo el compuesto del título (2320 g, 94%). ^1H RMN indicó una pureza de >90%.

^1H RMN (CDCl_3 , 270 MHz) 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).

5 Etapa 9

(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-tert-butilo

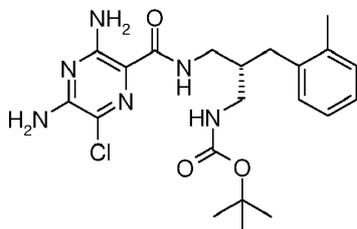


10 A un recipiente de 50 L bajo nitrógeno se agregó (2-(2-metilbencil)propano-1,3-dil)dicarbamato de (S)-alil tert-butilo (2330 g) disuelto en DCM (12.9 L) y MeOH (10.3 L), este se siguió mediante la adición de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (148.4 g). La mezcla de reacción se enfrió a 5 °C y se cargó con NaBH_4 (729 g) en porciones durante un período de 2 h. La reacción se calentó a 20 °C y se agitó durante 2 h, La mezcla de reacción se desactivó cuidadosamente en agua (46.6 L) y luego se agitó durante 20 min. Los orgánicos se separaron y la acuosa se re-extrajo con DCM (23.6 L). Los orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron en vacío para dar el compuesto del título (1679 g, 100% de rendimiento (~80% puro por ^1H RMN)

15 ^1H RMN (CDCl_3 , 270 MHz) δ 7.02-7.15 (m, 4H), 5.22 (s a, 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 (s a, 2H).

Etapa 10

Carbamato de (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)



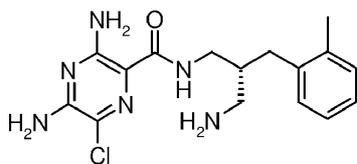
20 A un recipiente de 5 L bajo nitrógeno se agregó ácido 3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxílico (100 g), HBTU (202.8 g), THF (1200 mL) y DIPEA (111 mL). La reacción se le permitió agitar durante 24 h a temperatura ambiente. A la reacción se agregó (3-amino-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-tert-butilo (etapa 9, 148.6 g) disuelto en THF (1.49 L). Se debe notar que la reacción de exoterma en 10 °C durante la adición. La reacción se le permitió agitar durante 24 h a temperatura ambiente, La LC/MS indicó 5% de aducto restante. La mezcla se calentó a 35 °C
25 durante 4 h. la LC/MS indicó 2% de aducto restante. La reacción se agitó durante una 1 h adicional antes de enfriar a temperatura ambiente y se concentró en vacío. El residuo se tomó en acetato de etilo (1.5 L) y MTBE (1.5 L) y se lavó con NaHCO_3 saturado (1 L), 5% de ácido cítrico (700 mL) y solución salina (700 mL). Los orgánicos se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se tomó en MTBE (1L) y se volvieron a a concentrar antes de ser tomados en MTBE (500 mL) y éter de dietilo (500 mL) y se filtraron para eliminar las sales de DIPEA. El filtrado se concentró y el análisis indicó que permanecen algunas de las sales de DIPEA. El residuo se volvió a triturar con MTBE (750 mL) y éter de dietilo (750 mL) y de nuevo se filtró. El filtrado se concentró para dar el
30 compuesto del título (225 g, 94% (representando el solvente y TMU).

LC/MS: m/z 349.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

35 ^1H RMN (CDCl_3 , 270 MHz) δ 7.46 (t, 1H), 7.13 (m, 4H), 5.52 (t, 1H), 5.22 (s a, 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).

Etapa 11

3,5-Diamino-N-[(2R)-3-amino-2-(2-metilbencil)propil]-6-cloropirazina-2-carboxamida

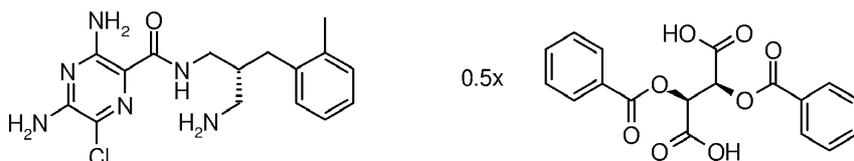


5 A un matraz de pestaña de 20 L bajo nitrógeno se agregó (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil) carbamato de (S)-tert-butilo (etapa 10, 2215 g) en dioxano (6 L). La mezcla se agitó durante 20 min hasta que se completó la disolución. A la reacción luego se agregó HCl 4M en dioxano (10 L). La reacción evolucionó una cantidad considerable de gas y la temperatura se elevó a 35 °C antes se aplicó enfriamiento. Un precipitado oleoso viscoso se observó en la reacción. La LC/MS de la mezcla de reacción después de 1 h indicó reacción completa. El licor de sobrenadante se decanto y se concentró en vacío. El sólido viscoso oleoso se disolvió en agua (6 L) y se combinó con el sobrenadante concentrado disuelto el agua (2 L). El acuoso se lavó con MTBE (5 L). El acuoso luego se basificó con NaOH 10 M (2 L) y se extrajo con 2-Me-THF (4 x 10 L). Los orgánicos se secaron, se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo luego se concentró de MTBE (2 x 4 L) para eliminar 2-MeTHF residual. El sólido se trituró con MTBE:heptano (9 L:1.8 L) y se dejó gitar durante el fin de semana. El sólido se filtró y se secó en el horno a 40 °C produciendo el compuesto del título (1657 g, 96%).

10 ¹H RMN (CDCl₃, 270 MHz) δ 7.60 (t, 1H), 7.08-7.15 (m, 4H), 5.75 (s a, 2H), 5.12 (s a, 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).

15 Etapa 12

(2R,3S)-2-benzoil-3-(benzoiloxi)succinato de (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida



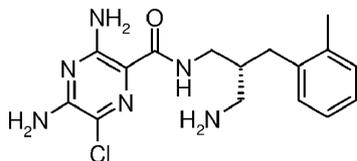
20 A un recipiente de 5 L bajo nitrógeno se agregó 3,5-Diamino-N-[(2R)-3-amino-2-(2-metilbencil)propil]-6-cloropirazina-2-carboxamida (127.4 g) y metanol (892 mL). La mezcla se calentó gentilmente a 30 °C hasta que todo el sólido se ha disuelto. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agregó ácido (+)-dibenzoil-D-tartárico (65.5 g) en metanol (458 mL). La reacción se dejó agitar, después de ~2h el sólido empezó a precipitar. La reacción se le permitió agitar durante el fin de semana. Se agregó acetato de isopropilo (1.5 L) a la mezcla y se continuó la agitación durante 4 h. el precipitado luego se filtró y se lavó con acetato de isopropilo (2 x 1L). El sólido luego se seco en el horno durante 3 d a 40 °C. Un total de 147.5 g (74%) se obtuvo en la relación estequiométrica base/diácido = 2:1.

25 ¹H RMN (CDCl₃, 270 MHz): δ 7.60 (t, 1H), 7.08-7.15 (m, 4H), 5.75 (s a, 2H), 5.12 (s a, 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 quiral (método A): 98.7% de ee, Rt = 11.93 min (R), 14.24 min (S).

30 Etapa 13

(R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida



35 (2R, 3S)-2-benzoil-3-(benzoiloxi)succinato de (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (20 g, 38.46 mmol) se suspendió en 2-metil-THF (200 mL) y agua (200 mL) y se enfrió con un baño de hielo. Se agregó lentamente hidróxido de sodio, 1 M (42.3 mL, 42.31 mmol) y la mezcla luego se agitó a 40 °C hasta que se ha disuelto todo el material. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con 2-metil-THF (2x200 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución salina (200 mL), se secaron con un separador de fase y se evaporaron en vacío para producir (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (13.3 g, 99%) como un sólido pálido.

40 LC/MS: m/z: 349.3 [M+H]⁺.

ES 2 679 618 T3

¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 1.50 (s a, 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 (s a, 2H), 7.04 - 7.17 (m, 4H), 8.14 (t, 1H).

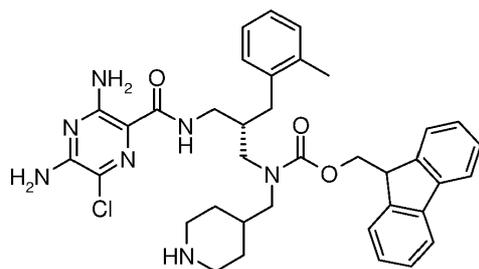
HPLC quiral (método B): 99.3% de ee, Rt = 11.55 min (S), 13.28 min (R).

$[\alpha]_D^{20}$:

5 +11.8 (c 1.0, MeCN).

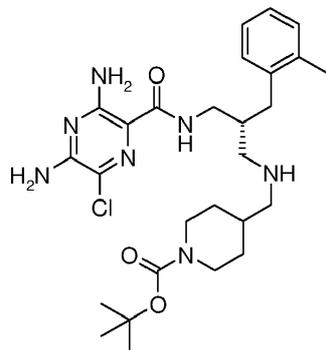
Intermedio B

3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil(piperidin-4-ilmetil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo



10 Etapa 1:

4-((3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propilamino)metil)piperidina-1-carboxilato de (R)-tert-butil



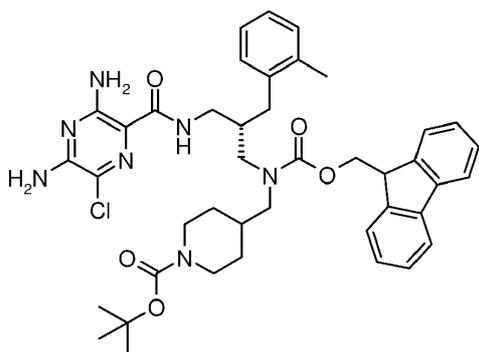
15 En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se colocó una mezcla de 4-formilpiperidina-1-carboxilato de tert-butilo (122 mg, 0.57 mmol, 1.00 equiv) y 3,5-diamino-N-[(2R)-3-amino-2-[(2-metilfenil)metil]propil]-6-cloropirazina-2-carboxamida (Intermedio A, 200 mg, 0.57 mmol, 1.0 equiv) en diclorometano (5 mL), la mezcla se agitó durante 1 h. Luego se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (486 mg, 2.29 mmol, 4.00 equiv). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se lavó con 3x10 mL de agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo vacío. Esto resultó en 250 mg (80%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

20

LC/MS: m/z: 546 [M+H]⁺.

Etapa 2:

4-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)piperidina-1-carboxilato de (S)-tert-butilo

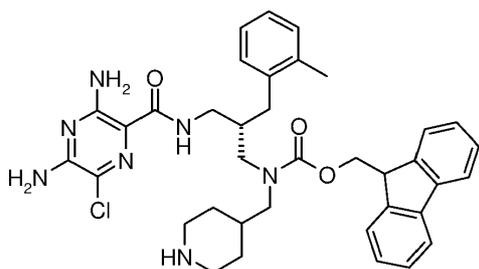


- 5 Se agregó Fmoc-cloruro (19 mg, 0.07 mmol, 1.00 equiv) en dioxano (2.0 mL) en forma de gotas a una mezcla de (4-((3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propilamino)metil)piperidina-1-carboxilato de R)-tert-butilo (etapa 1, 40 mg, 0.07 mmol, 1.0 equiv) y Na₂CO₃ (12 mg, 0.11 mmol, 1.5 equiv) en agua/dioxano (1:2, 3 mL). La solución resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, se extrajo con 3x5 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la eliminación de los solventes en vacío 42 mg (75%) del compuesto del título se obtuvo como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z: 768 [M+H]⁺

Etapa 3:

- 10 3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil(piperidin-4-ilmetil)carbamato de (S)-(9H-fluoren-9-il)metilo

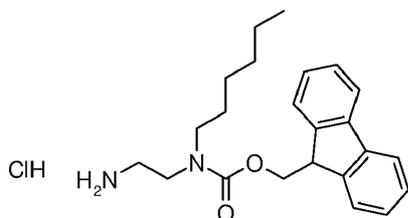


- 15 En un matraz de fondo redondo de 25 mL se colocó una solución de 4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)piperidina-1-carboxilato de (S)-tert-butilo (etapa 2, 20 mg, 0.03 mmol, 1.0 equiv) en HCl/MeOH (4M, 3 mL). La solución resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró bajo vacío. Esto resultó en 15 mg (86%) de N-[(2S)-3-[(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-il)formamido]-2-[(2-metilfenil)metil]propil]-N-(piperidin-4-ilmetil)carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo como un sólido amarillo.

LC/MS: m/z: 668 [M+H]⁺

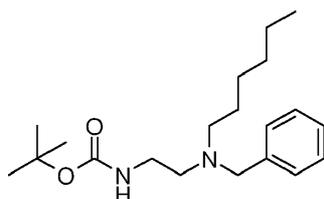
- 20 Intermedio C

Clorhidrato de (2-aminoetil)(hexil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



Etapa 1

(2-(bencil(hexil)amino)etil)carbamato de tert-butilo



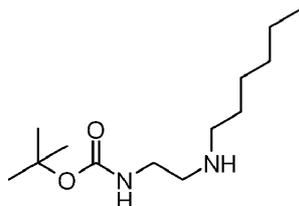
5 N-bencilhexan-1-amina (2.69 g, 14.1 mmol), (2-oxoetil)carbamato de tert-butilo (4.48 g, 28.1 mmol) y DIPEA (2.46 mL, 14.1 mmol) se disolvió en MeOH (20 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 45 min. Se agregaron cianoborohidruro de sodio (1.77 g, 28.1 mmol) y ácido acético (0.806 mL, 14.1 mmol) y se continuó la agitación durante 18 h. La reacción se desactivo mediante adición de 8% de NaHCO₃ (ac) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se concentró en vacío. El residuo se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc (2x100 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre dos columnas Biotage® KP-SIL 100g. Un gradiente de 5 - 50% de EtOAc en heptano para 12 CV se utilizó como la fase móvil. El producto se recolectó y se evaporó en vacío para producir (2-(bencil(hexil)amino)etil)carbamato de tert-butilo (3.19 g, 68%) como un aceite incoloro.

LC/MS: m/z: 335.6 [M+H]⁺

1H RMN (500 MHz, CDCl₃) 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).

Etapa 2

15 (2-(hexilamino)etil)carbamato de tert-butilo

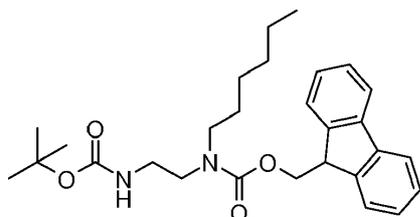


20 Se agregó (2-(bencil(hexil)amino)etil)carbamato de tert-butilo (3.19 g, 9.54 mmol) se disolvió en MeOH (25 mL) y 20% Pd(OH)₂/C (0.201 g, 0.29 mmol). La reacción se hidrogenó en un hidrogenador Buchi a 4 bar y temperatura ambiente durante 18 h. La reacción se detuvo. Se agregó más del 20% de Pd(OH)₂/C (200 mg, 0.28 mmol) y se continuó la hidrogenación durante 6 h, se detiene la hidrogenación. El catalizador se filtro, se lavó con MeOH y el filtrado se concentró en vacío. El residuo se disolvió en MeOH (15 mL), se agregó 20% de Pd(OH)₂/C (250 mg, 0.36 mmol) y se continuó la hidrogenación a 4 bar y temperatura ambiente durante 16 h. El catalizador se filtro, se lavó con MeOH y el filtrado se evaporó en vacío. La reacción se disolvió de nuevo una vez en MeOH, se agregó 20% de Pd(OH)₂/C (250 mg, 0.36) y se continuó la hidrogenación durante 3 días. El catalizador se filtro, se lavó con MeOH y el filtrado se evaporó en vacío para producir (2-(hexilamino)etil)carbamato de tert-butilo (2.38 g, 102%) como un aceite incoloro.

25 1H RMN (500 MHz, CDCl₃) 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 (s a, 1H).

Etapa 3

30 (2-((tert-butoxicarbonil)amino)etil)(hexil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



35 A una solución enfriada con baño de hielo de (2-(hexilamino)etil)carbamato de tert-butilo (2.38 g, 9.74 mmol) en DCM (40 mL) se agregaron DIPEA (1.79 mL, 10.2 mmol) y carbonocloridato de (9H-fluoren-9-il)metilo (2.65 g, 10.2 mmol). La reacción se agitó con enfriamiento durante 10 min y luego a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregó agua (20 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con DCM (2x20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con un separador de fase y se evaporaron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100 g. Un gradiente de 5 - 30% de EtOAc en

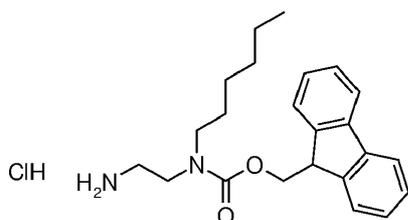
heptano durante 9 CV seguido por 30% de EtOAc en heptano sobre 3 CV se utilizaron como fase móvil. El producto se recolectó utilizando la longitud de onda 264 nm. Las fracciones recolectadas se evaporaron en vacío para producir (2-((tert-butoxicarbonil)amino)etil)(hexil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metil (3.70 g, 81%) como un aceite incoloro.

5 LC/MS: m/z: 467.4 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 1H), 7.3 - 7.36 (m, 2H), 7.41 (t, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.77 (d, 2H).

Etapa 4

10 Clorhidrato de 2-aminoetil)(hexil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



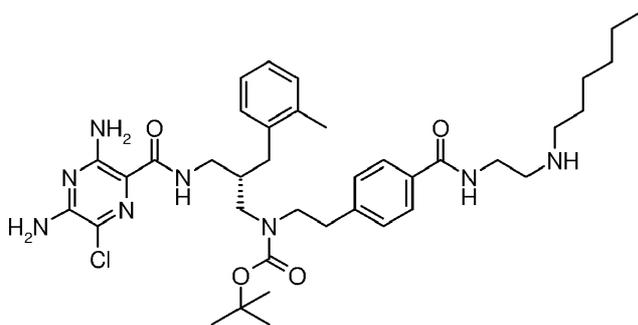
Se agregó en forma de gotas cloruro de acetilo (2.84 mL, 40.0 mmol) a un frasco enfriado en baño de hielo de MeOH (10 mL, 247 mmol) y se agitó durante 5 min. Esta solución luego se agregó a (2-((tert-butoxicarbonil)amino)etil)(hexil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (3.7 g, 7.93 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 h. El solvente se concentró en vacío para producir clorhidrato de (2-aminoetil)(hexil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (2.92 g, 91%) como un sólido blanco.

15 LC/MS: m/z: 367.3 [M+H]⁺

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) 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).

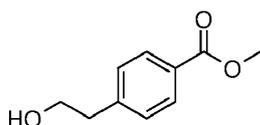
20 Intermedio D

(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoyl)fenetil)carbamato de (S)-tert-butilo



Etapa 1

25 4-(2-hidroxi)etil)benzoato de metilo



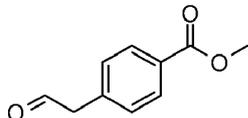
Se disolvió ácido 4-(2-Hidroxi)etil)benzoico (2.41 g, 14.5 mmol) en MeOH (5 mL) y se agregó H₂SO₄ (0.06 mL, 1.13 mmol). La reacción se calentó en un microondas a 120 °C durante 1 h y luego se evaporó en vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (150 mL), se lavó con 8% de NaHCO₃ (ac) (150 mL), solución salina (50 mL), se secó con un separador de fase y se evaporó en vacío para producir 4-(2-hidroxi)etil)benzoato de metilo (2.41 g, 92%) como un aceite pálido.

30 LC/MS: m/z: 181.0 [M+H]⁺

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 2.94 (t, 2H), 3.88 - 3.94 (m, 5H), 7.32 (d, 2H), 7.97 - 8.02 (m, 2H).

Etapa 2

4-(2-oxoetil)benzoato de metilo

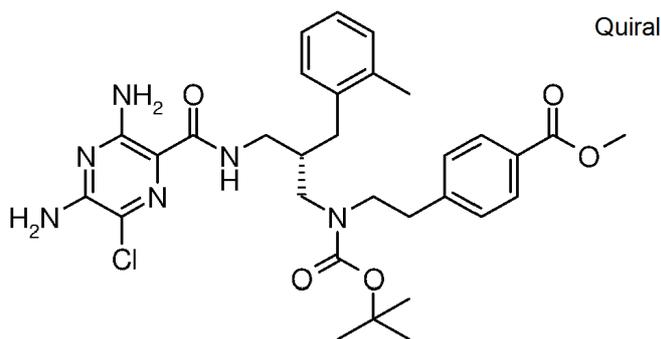


- 5 4-(2-hidroxiethyl)benzoato de metilo (2.41 g, 13.37 mmol) se disolvió en DCM (50 mL) y se agregó peryodinano de Dess-Martin (6.24 g, 14.7 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y luego se desactivo mediante adición de 15% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/\text{NaHCO}_3$ 3:2 (ac) (50 mL) y se agitó vigorosamente durante 30 min. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (2x50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con un separador de fase y se evaporaron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100g. Un gradiente de 5 - 40% de EtOAc en heptano sobre 9 CV seguido por 50% de EtOAc en heptano sobre 3 CV se utilizaron como fase móvil. El producto se recolectó utilizando la longitud de onda 245 nm. El producto se recolectó y se evaporó en vacío para producir 4-(2-oxoetil)benzoato de metilo (0.880 g, 36.9%) como un sólido amarillo.

^1H RMN (500 MHz, 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).

15 Etapa 3

4-(2-((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)etil)benzoato de (S)-metilo



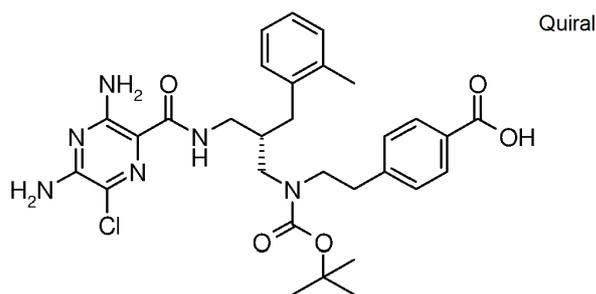
- 20 (R)-3,5-Diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (Intermedio A, 2.00 g, 5.56 mmol), 4-(2-oxoetil)benzoato de metilo (1.09 g, 6.12 mmol) y DIPEA (0.971 mL, 5.56 mmol) se disolvieron en MeOH (4 mL) y se agitaron a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se agregaron cianoborohidruro de sodio (1.05 g, 16.7 mmol) y ácido acético (0.318 mL, 5.56 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se desactivo mediante adición de 8% de NaHCO_3 (ac). La reacción se diluyó con EtOAc (100 mL), se agitó durante 30 min y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (100 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución salina (50 mL), se secaron con un separador de fase y se evaporaron en vacío. El residuo se disolvió en DCM (20 mL) y se agregó BOC_2O (1.290 mL, 5.56 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5.5 h y luego se concentró en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100g. Un gradiente de 10 - 80% de EtOAc en heptano sobre 10 CV se utilizó como fase móvil. El producto se recolectó utilizando la longitud de onda 270 nm. El producto pico se recolectaron y se evaporó en vacío para producir 4-(2-((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)etil)benzoato de (S)-metilo (1.84 g, 54%) como un sólido pálido.

LC/MS: m/z: 611.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 (s a, 2H), 7.05 - 7.17 (m, 4H), 7.21 (d, 2H), 7.82 (d, 2H), 7.85 - 7.94 (m, 1H).

35 Etapa 4

Ácido (S)-4-(2-((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)etil)benzoico



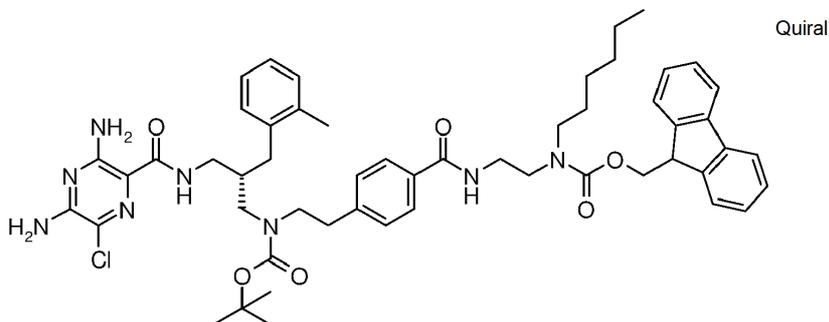
4-(2-((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)etil)benzoato de (S)-Metil (1.84 g, 2.56 mmol) se disolvió en MeOH (20 mL) y se agregó hidróxido de sodio (3.37 mL, 12.8 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El solvente (MeOH) luego se concentró en vacío. Se agregaron agua (50 mL) y MeTHF (50 mL) y el pH se ajustó a ~2 con 3 M HCl (ac). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con L-MeTHF (50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío para producir ácido (S)-4-(2-((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)etil)benzoico (1.53 g, 100%) como un sólido pálido.

LC/MS: m/z: 597.4 [M+H]⁺

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) 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 (s a, 1H).

Etapa 5

4-((2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(hexil)amino)etil)carbamoil)fenetil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-tert-Builo



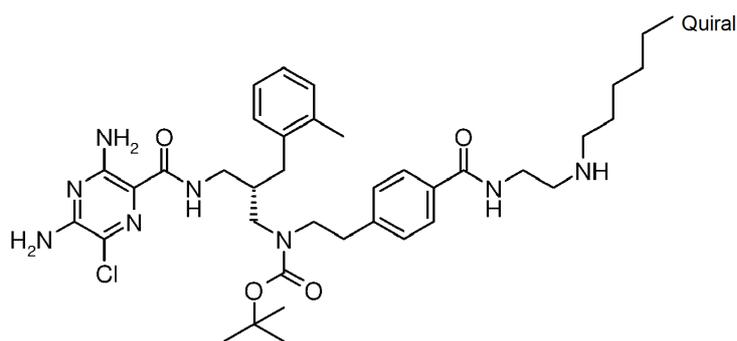
Ácido (S)-4-(2-((tert-Butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)etil)benzoico (1.24 g, 1.77 mmol), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (0.623 g, 1.94 mmol) y DIPEA (1.54 mL, 8.83 mmol) se disolvieron en DCM (30 mL) y se agitaron a temperatura ambiente durante 5 min antes de adición de clorhidrato de (2-aminoetil)(hexil)carbamoil)fenetil(9H-fluoren-9-il)metilo (Intermedio C, 0.95 g, 2.12 mmol). La reacción se agitó durante 2.5 h. La reacción se lavó con 8% de NaHCO₃ (ac) (150 mL). La fase acuosa se extrajo con DCM (150 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con un separador de fase y se evaporaron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100g. Un gradiente de 20 - 80% de EtOAc en heptano sobre 9 CV seguido por 80% de EtOAc en heptano sobre 3 CV se utilizaron como fase móvil. El producto se recolectó y se evaporó en vacío para producir 4-((2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(hexil)amino)etil)carbamoil)fenetil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-tert-butilo (1.56 g, 93%) como un sólido pálido.

LC/MS: m/z: 945.6 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 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).

Etapa 6

(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-((hexilamino)etil)carbamoil)fenetil)carbamato de (S)-tert-butilo



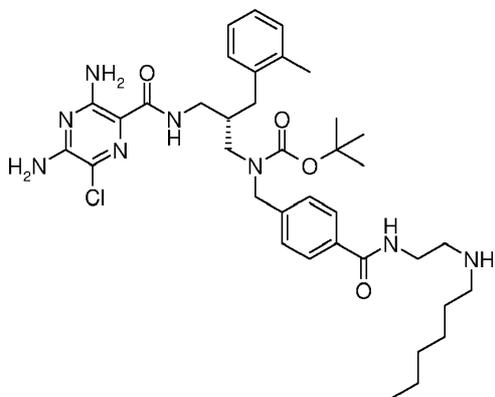
5 4-((2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(hexil)amino)etil)carbamoil)fenetil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-tert-butilo (1.59 g, 1.68 mmol) se disolvió en THF (15 mL) y se agregó piperidina (1.67 mL, 16.8 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y luego se concentró en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100 g. Un gradiente de 4 - 8% de (amoníaco 2 M en MeOH) en DCM sobre 5 CV seguido por 8% de (amoníaco 2 M en MeOH) en DCM sobre 10 CV se utilizaron como fase móvil. El producto se recolectó y se evaporó en vacío para producir (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)fenetil)carbamato de (S)-tert-butilo (1.03 g, 85%) como un sólido pálido.

10 LC/MS: m/z: 723.6 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 2H), 7.05 - 7.2 (m, 7H), 7.73 (d, 2H), 7.79 - 7.97 (m, 1H), 8.32 (t, 1H).

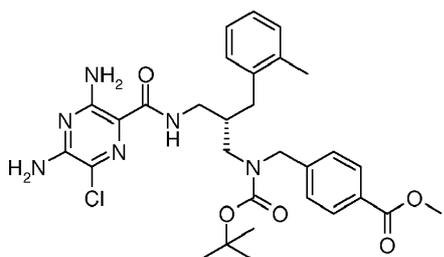
Intermedio E

15 (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de (S)-tert-butilo



Etapa 1

20 4-(((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)benzoato de (S)-metilo



25 (R)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (Intermedio A, 2.17 g, 6.22 mmol), 4-formilbenzoato de metilo (1.12 g, 6.84 mmol) y DIPEA (1.09 mL, 6.22 mmol) se disolvieron en MeOH (15 mL) y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 h. Luego se agregaron cianoborohidruro de sodio (0.782 g, 12.4 mmol) y ácido acético (0.392 mL, 6.84 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Al monitorizar

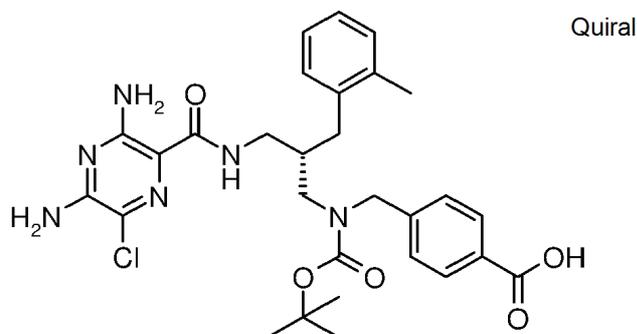
mediante análisis LCMS se mostró conversión incompleta, se agregó 4-formilbenzoato de metilo (200 mg, 1.22 mmol) y se continuó la agitación durante 3 h. Luego se agregaron de nuevo 4-formilbenzoato de metilo (200 mg, 1.22 mmol) y cianoborohidruro de sodio (200 mg, 3.18 mmol) y se continuó la agitación durante 18 h. La reacción se desactivó mediante adición de 8% de NaHCO₃ (ac). El solvente se concentró en vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (250 mL) y 8% de NaHCO₃ (ac) 250 mL), se agitó y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (250 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío. El residuo se disolvió en DCM (50 mL), se agregó BOC₂O (1.63 g, 7.46 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se concentró en vacío y luego se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100g. Un gradiente de 20 - 80% de EtOAc en heptano sobre 12 CV se utilizó como fase móvil. El producto se recolectó utilizando la longitud de onda 265 nm. El pico de producto se evaporó en vacío para producir 4-(((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)benzoato de (S)-metilo (2.85 g, 77%) como un sólido.

LC/MS: m/z: 597.5 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, 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 (s a, 2H), 7.04 - 7.17 (m, 4H), 7.22 (d, 2H), 7.76 - 7.96 (m, 3H).

Etapa 2

Ácido (S)-4-(((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)benzoico



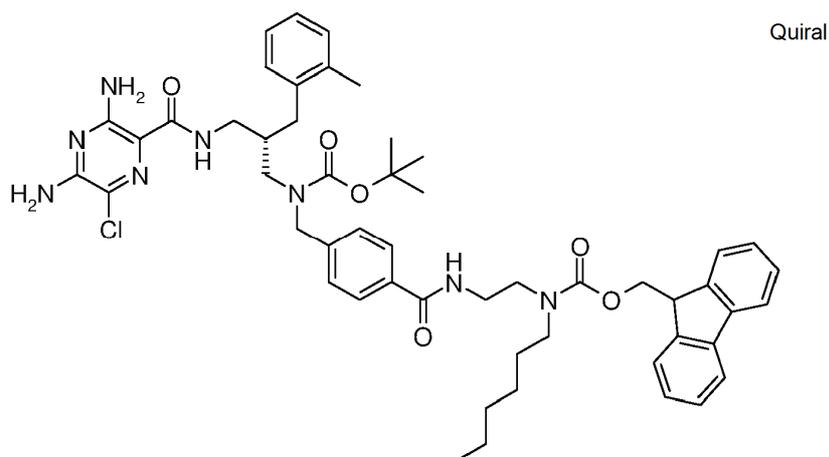
Se disolvió 4-(((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)benzoato de (S)-metilo (2.85 g, 4.77 mmol) se agregó MeOH (40 mL) e hidróxido de sodio, 3.8 M (6.28 mL, 23.9 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y el solvente (MeOH) luego se concentró en vacío. Se agregaron agua (75 mL) y MeTHF (75 mL) y el pH se ajustó a \approx 2 con HCl 3 M (ac). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con MeTHF (75 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con un separador de fase y se evaporaron en vacío para producir ácido (S)-4-(((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)benzoico (2.75 g, 99%) como un sólido.

LC/MS: m/z: 583.4 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) 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 (s a, 2H), 7.03 - 7.17 (m, 4H), 7.19 (d, 2H), 7.78 - 8 (m, 3H), 12.85 (s a, 1H).

Etapa 3

4-((2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(hexil)amino)etil)carbamoil)bencil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamoil) de (S)-tert-butilo



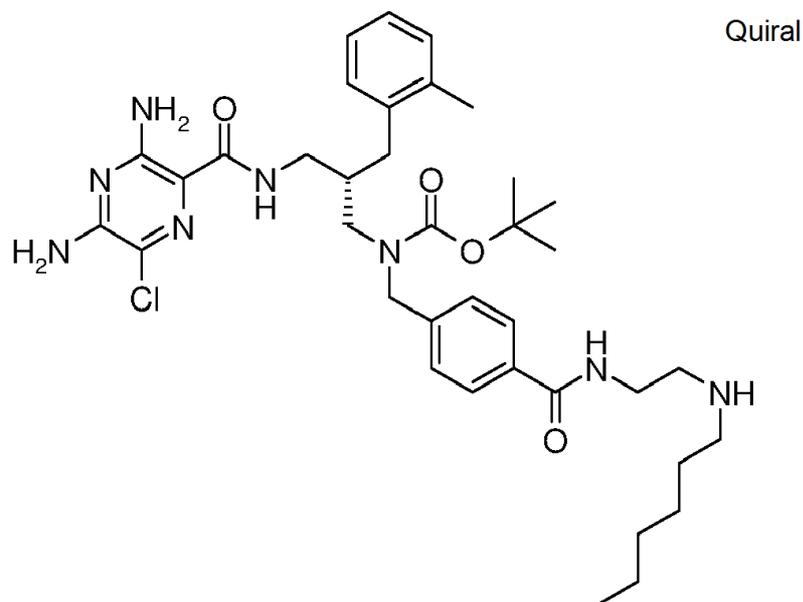
Ácido (S)-4-(((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)benzoico (1.61 g, 2.76 mmol), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (0.975 g, 3.04 mmol) y DIPEA (2.41 mL, 13.8 mmol) se disolvieron en DCM (150 mL) y se agitaron a temperatura ambiente durante 5 min antes de adición de clorhidrato de (2-aminoetil)(hexil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (Intermedio C, 1.48 g, 3.31 mmol). La reacción se agitó durante 1.5 h. La reacción se lavó con 8% de NaHCO₃ (ac) (100 mL). La fase acuosa se extrajo con DCM (100 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con un separador de fase y se evaporaron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100g. Un gradiente de 20 - 80% de EtOAc en heptano sobre 12 CV seguido por 80% de EtOAc en heptano sobre 3 CV se utilizaron como fase móvil. El producto se recolectó y se evaporó en vacío para producir 4-(((2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(hexil)amino)etil)carbamoil)bencil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-tert-butilo (2.38 g, 93%) como un sólido pálido.

LC/MS: m/z: 931.5 [M+H]⁺

1H RMN (500 MHz, 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 (s a, 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).

Etapa 4

(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de (S)-tert-butilo



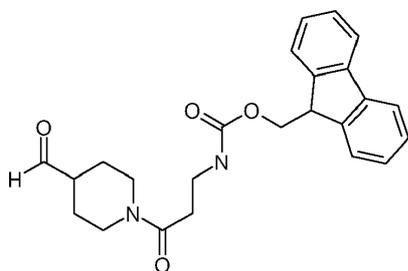
5 4-((2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(hexil)amino)etil)carbamoil)bencil(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (S)-tert-butilo (2.38 g, 2.55 mmol) se disolvió en THF (25 mL) y se agregó piperidina (2.53 mL, 25.6 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. El solvente se evaporó en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100 g. Un gradiente de 2.5 - 8% de (amoníaco 2 M en MeOH) en DCM sobre 9 CV seguido por 8% de (amoníaco 2 M en MeOH) en DCM sobre 3 CV se utilizaron como fase móvil. El producto se recolectó y se evaporó en vacío para producir (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de (S)-tert-butilo (1.60 g, 88%) como un sólido pálido.

LC/MS: m/z: 709.5 [M+H]⁺

10 ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) 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 (s a, 2H), 7.04 - 7.19 (m, 6H), 7.72 (d, 2H), 7.79 - 7.98 (m, 1H), 8.28 - 8.35 (m, 1H).

Intermedio F

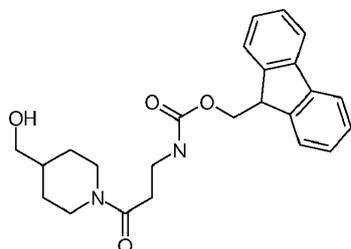
(3-(4-formilpiperidin-1-il)-3-oxopropil)carbamato de 9H-fluoren-9-il)metilo



15

Etapa 1:

3-(4-(hidroximetil)piperidin-1-il)-3-oxopropilcarbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



20 A una solución agitada de piperidin-4-ilmetanol (200 mg, 1.74 mmol), ácido 3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)propanoico (541 mg, 1.74 mmol) y HATU (660 mg, 1.74 mmol) en DMF seco (5 mL) se agregó DIPEA (0.910 mL, 5.21 mmol). La mezcla amarilla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 mL) y se lavó con 15% de solución de NaCl ac (50 mL) y 30% de solución de NaCl ac (50 mL). Los solventes se evaporaron y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa. Después de secado por congelamiento se volvió a disolver el residuo en DCM y se agregó heptano. La evaporación produjo el compuesto del título como un sólido incoloro (378 mg, 53%).

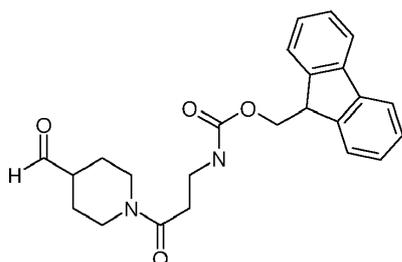
25

LC/MS: m/z: 409 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, 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 pico), 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).

30 Etapa 2

(3-(4-formilpiperidin-1-il)-3-oxopropil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo

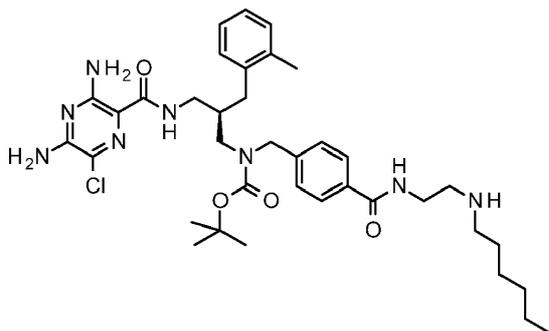


- 5 A una solución de 3-(4-(hidroximetil)piperidin-1-il)-3-oxopropilcarbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (362 mg, 0.89 mmol) en DCM (5 mL) se agregó peryodinao de Dess-Martin sólido (413 mg, 0.97 mmol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 h. A la mezcla de reacción se agregó 10% de Na₂S₂O₃ (3 mL), 10% de NaHCO₃ (3 mL) y DCM (2 mL), la mezcla se agitó vigorosamente durante 10 min y se dejó sedimentar. Las capas se separaron y la fase acuosa que contenía sales insolubles se extrajo de forma repetida con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y los solventes se evaporaron para dar el producto crudo (440 mg) que se utilizó sin purificación adicional.

LC/MS: m/z: 407 [M+H]⁺

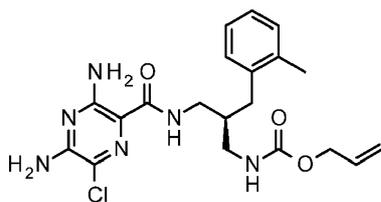
10 Intermedio G

(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)bencil)carbamatato de (R)-tert-butilo



Etapa 1

- 15 (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamatato de (R)-alilo



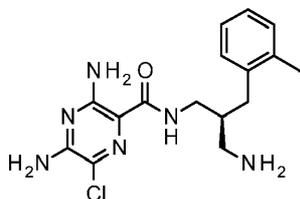
- 20 (3,5-diamino-6-cloropirazin-2-il)(1H-imidazol-1-il)metanona, (858 mg, 3.59 mmol) y (3-amino-2-(2-metilbencil)propil)carbamatato de (R)-alilo (Intermedio A, Etapa 5) (990 mg, 3.77 mmol) se suspendieron en NMP (15 mL) y se calentaron a 100 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron EtOAc (50 mL) y agua (50 mL), se agitaron y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2x50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con HCl 0.1 M (ac) (50 mL), agua (2x50 mL), solución salina (50 mL), se secaron con un separador de fase y se evaporaron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100g. Un gradiente de 20 - 80 % de EtOAc en heptano sobre 9 CV se utilizó como fase móvil. El producto se recolectó utilizando la longitud de onda 270 nm.
- 25 Las fracciones recolectadas se agruparon y se evaporaron en vacío para producir (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamatato de (R)-alilo (714 mg, 45.9 %) como un sólido pálido.

¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) 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 (s a, 2H), 7.04 - 7.15 (m, 3H), 7.21 - 7.25 (m, 1H), 7.28 (t, 1H), 8.00 (t, 1H).

- 30 LC/MS: m/z 433.3 [M+H]⁺

Etapa 2

(S)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida



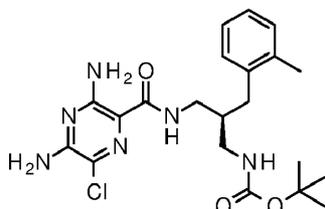
5 (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (R)-alil (694 mg, 1.60 mmol), 1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (688 mg, 4.41 mmol), acetato de paladio (II) (14.4 mg, 0.06 mmol) y trifenilfosfina (50.5 mg, 0.19 mmol) se disolvieron en DCM (7 mL) y se calentaron a 35 °C durante 1.5 h. Se formó una suspensión. Se agregaron DCM (50 mL) y 5 % de Na₂CO₃ (ac) (50 ml) y la mezcla se agitó durante 15 min. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con un separador de fase y se evaporaron en vacío. El compuesto se purificó mediante HPLC preparativa sobre una Kromasil C8 (10 µm 250x50 ID mm) utilizando un gradiente de 5 - 45 % de acetonitrilo ien tampón H₂O/MeCN/AcOH 95/5/0.2 durante 20 minutos con un flujo de 100 mL/min. Los compuestos se detectaron mediante UV a 270 nm. Las fracciones del producto se recolectaron y se secaron por congelamiento para producir 586 mg de la sal de ácido acético. La sal se agitó en EtOAc (50 mL) y 5 % de Na₂CO₃ (ac) durante 15 min y las fases luego se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3x50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío para producir (S)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (411 mg, 73.5 %) como un sólido amarillo claro. Pureza quiral: 60 % de ee, determinada con columna SFC quiral: ChiralPak IC (150x4.6 mm), 3 µm de tamaño de partícula, fase móvil: 20 % de MeOH/DEA 100:0.5 en CO₂, 120 bar, índice de flujo 4 mL/min.

20 ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 1.73 (s a, 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 (s a, 2H), 7.28 - 7.41 (m, 4H), 8.39 (t, 1H).

LC/MS: m/z 349.2 [M+H]⁺

Etapa 3

(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (R)-tert-butilo



25 (S)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (1.19 g, 3.41 mmol), BOC₂O (0.871 mL, 3.75 mmol) y DIPEA (0.596 mL, 3.41 mmol) se disolvieron en DCM (100 mL) y se agitaron a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se lavó con HCl 0.1 M (ac), se secó con un separador de fase y se evaporó en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100g. Un gradiente de 30 - 70 % de EtOAc en heptano sobre 9 CV seguido por 70 % de EtOAc en heptano sobre 3 CV se utilizaron como fase móvil. El producto se recolectó utilizando la longitud de onda 268 nm. El producto se evaporó en vacío para producir (1.150 g, 75 %) como un sólido pálido.

El enantiómero se purificó utilizando HPLC quiral preparativa (Columna: ChiralPak AY (250x20 mm), 20 µm de tamaño de partícula, fase móvil: heptano/EtOH/TEA 20/80:0.1, índice de flujo 120 mL/min). El primer compuesto de elución se recolectó para producir 866 mg, pureza quiral: 98.6 % de ee. Rotación óptica

35 $[\alpha]_D^{20} = -6$

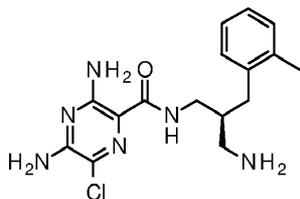
(acetoneitrilo, c=1).

¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) 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 (s a, 2H), 7.04 - 7.15 (m, 3H), 7.22 (d, 1H), 8.01 (t, 1H).

LC/MS: m/z 449.2 [M+H]⁺

40 Etapa 4

(S)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida



Se agregó cloruro de acetilo (1.422 mL, 20 mmol) en forma de gotas a un matraz enfriado en baño de hielo de MeOH (5 mL, 123.59 mmol). La mezcla se agitó durante 5 min y luego se agregó a un matraz de (S)-3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)carbamato de (R)-tert-butilo (866 mg, 1.93 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 min y luego se evaporó en vacío. El residuo se agitó en EtOAc (125 mL) y 8 % de NaHCO₃ (ac) (125 mL) durante 15 min. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3x125 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ (s), se filtraron y se evaporaron en vacío para producir (S)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (459 mg, 68.2 %) como un sólido pálido. Pureza quiral: 99 % de ee, determinada con columna SFC quiral: Lux C4 (150x4.6 mm), 3 μm de tamaño de partícula, fase móvil: 35 % de EtOH/NH₃ 100:0.5 en CO₂, 120 bar, índice de flujo 4 mL/min. Rotación óptica

$$[\alpha]_D^{20} = -45.9$$

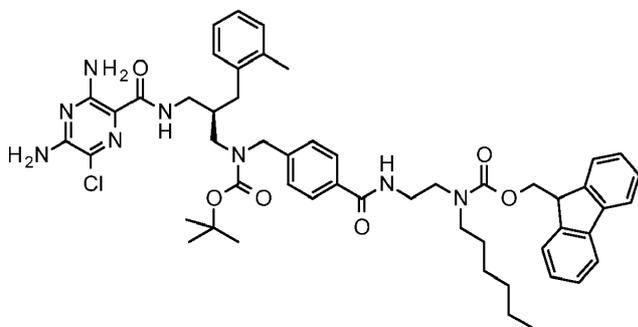
(CHCl₃, c=1).

¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 1.57 (s a, 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 (s a, 2H), 7.04 - 7.17 (m, 4H), 8.14 (t, 1H).

LC/MS: m/z 349.2 [M+H]⁺

Etapas 5

(2-(4-(((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)benzamido)etil)(hexil)carbamato de (R)-(9H-fluoren-9-il)metilo



(S)-3,5-diamino-N-(3-amino-2-(2-metilbencil)propil)-6-cloropirazina-2-carboxamida (215 mg, 0.62 mmol), (2-(4-formilbenzamido)etil)(hexil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (Intermedio H) (293 mg, 0.59 mmol) y DIPEA (0.103 mL, 0.59 mmol) se disolvieron en MeOH (5 mL) y se agitaron a temperatura ambiente durante 1.5 h. Luego se agregaron cianoborohidruro de sodio (38.8 mg, 0.62 mmol) y ácido acético (0.101 mL, 1.76 mmol) y se continuó la agitación durante 3 h. La reacción se desactivó mediante adición de 8 % de NaHCO₃ (ac). Se agregaron DCM (25 mL) y 8 % de NaHCO₃ (ac) (25 mL), se agitaron y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con DCM (25 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con un separador de fase y se evaporaron en vacío.

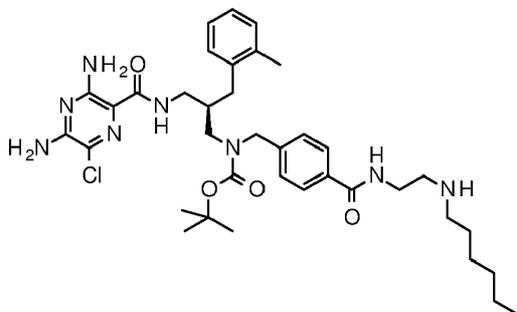
El residuo y BOC₂O (0.150 mL, 0.65 mmol) se disolvieron en DCM (5 mL) y se agitaron a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se concentró en vacío. El producto se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 50g. Un gradiente de 50 - 100 % de EtOAc en heptano sobre 9 CV se utilizó como fase móvil. El producto se recolectó utilizando la longitud de onda 265 nm. Las fracciones del producto se evaporaron en vacío para producir (2-(4-(((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)benzamido)etil)(hexil)carbamato de (R)-(9H-fluoren-9-il)metilo (511 mg, 93 %) como una película incolora.

¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) 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 [M+H]⁺

Etapa 6

(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de (R)-tert-butilo



5

(2-(4-(((tert-butoxicarbonil)(3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)amino)metil)benzamido)etil) (hexil)carbamato de (R)-(9H-fluoren-9-il)metilo (511 mg, 0.55 mmol) se disolvió en THF (5 mL) y se agregó piperidina (0.543 mL, 5.49 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El solvente se evaporó en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 50 g. Un gradiente de 2.5 - 8 % de (amoníaco 2 M en MeOH) en DCM sobre 9 CV seguido por 8 % de (amoníaco 2 M en MeOH) en DCM sobre 3 CV se utilizaron como fase móvil. El producto se recolectó y se evaporó en vacío para producir (3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-metilbencil)propil)(4-((2-(hexilamino)etil)carbamoil)bencil)carbamato de (R)-tert-butilo (326 mg, 84 %) como un sólido pálido.

10

15

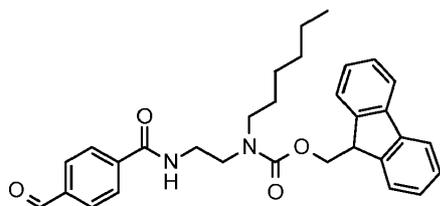
¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 0.84 (t, 3H), 1.12 - 1.45 (m, 17H), 2.20 (s, 3H), 2.24 - 2.36 (m, 1H), 2.51 - 2.58 (m, 2H), 2.69 (t, 2H), 2.92 - 3.05 (m, 1H), 3.05 - 3.4 (m, 7H), 4.22 - 4.37 (m, 1H), 4.38 - 4.54 (m, 1H), 6.97 (s a, 2H), 7.03 - 7.18 (m, 6H), 7.72 (d, 2H), 7.79 - 7.98 (m, 1H), 8.28 - 8.35 (m, 1H).

LC/MS: m/z 709.4 [M+H]⁺

Intermedio H

20

(2-(4-formilbenzamido)etil)(hexil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



25

30

Ácido 4-formilbenzoico (0.81 g, 5.40 mmol) y 4-metilmorfolina (1.424 mL, 12.95 mmol) se disolvieron en THF (10 mL) y se enfriaron con un baño de hielo. Se agregó en forma de gotas carbonocloridato de Isobutilo (0.700 mL, 5.40 mmol), la mezcla se agitó durante 30 min y se agregó clorhidrato de (9H-fluoren-9-il)metil (2-aminoetil)(hexil)carbamato (Intermedio C) (1.739 g, 4.32 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 h. La suspensión resultante se extrajo entre EtOAc (50 mL) y agua (50 mL). La fase orgánica se lavó con 5 % de ácido cítrico (2x50 mL), 10 % de Na₂CO₃ (ac) (50 mL), solución salina (50 mL), se secó con Na₂SO₄ (s), se filtró y se evaporó en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash automatizada sobre una columna Biotage® KP-SIL 100g. Un gradiente de 20 - 80 % de EtOAc en heptano sobre 9 CV seguido por 80 % de EtOAc en heptano sobre 3 CV se utilizaron como fase móvil. El producto se recolectó utilizando la longitud de onda 260 nm. El producto picos se evaporaron en vacío para producir (2-(4-formilbenzamido)etil)(hexil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (1.690 g, 79 %) como un sólido blanco.

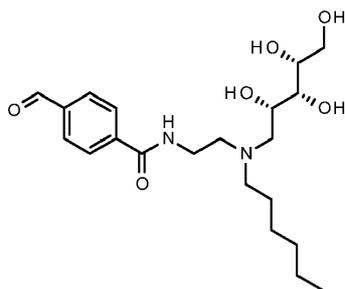
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 0.82 - 0.95 (m, 3H), 1.08 - 1.46 (m, 8H), 3.02 - 3.21 (m, 3H), 3.48 - 3.64 (m, 3H), 4.16 - 4.25 (m, 1H), 4.51 - 4.74 (m, 2H), 7.2 - 7.42 (m, 5H), 7.5 - 7.67 (m, 3H), 7.75 (d, 2H), 7.93 (c, 3H), 10.06 (s, 1H).

35

LC/MS: m/z 499.5 [M+H]⁺

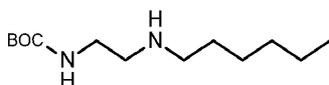
Intermedio I

4-formil-N-(2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)benzamida



Etapa 1

2-(hexilamino)etilcarbamato de tert-butilo



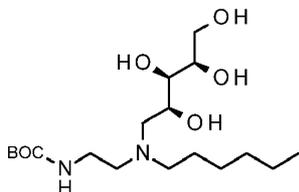
- 5 En un matraz de pestaña de 10 l se cargó hexilamina (1020 mL, 7.76 mol), Na₂CO₃ (206 g, 1.94 mol) y MeCN (2560 mL). La mezcla se calentó a 70 °C durante 1 h. A la mezcla se cargó una solución de 2-bromoetilcarbamato de tert-butilo (371.3 g, 289.6 g de activo, 1.29 mol) en MeCN (740 ml) lentamente, durante 1 ½ h. La reacción se agitó a 70 °C durante la noche. La reacción se enfrió a 50 °C y se concentró en vacío. Al residuo sólido agitado se cargó agua (2100 mL) y EtOAc (4200 ml). Las capas se separaron y las fases orgánicas se lavaron con agua (3 x 2100 ml). Las
- 10 fases orgánicas se concentraron en vacío y se azeotropizaron de forma secuencial con agua (3 x 870 ml) y EtOH (3 x 870 ml) para proporcionar 368.6 g (315.8 g de activo, rendimiento cuantitativo) de la etapa 1 como un aceite claro.

1H-RMN (270 MHz, CDCl₃) δ 4.95 (1H, s a), 3.29 - 3.19 (m, 2H), 2.71 (t, 2H), 2.58 (t, 2H), 1.50 - 1.40 (m a, 11H), 1.35 - 1.23 (m, 6H), 0.89 (t, 3H).

LC/MS: m/z 245 [M+H]⁺

15 Etapa 2

2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etilcarbamato de tert-butilo



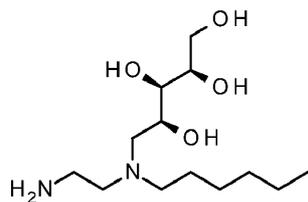
- 20 En un matraz de pestaña de 10 l se cargó D-xilosa (124.3 g, 0.83 mol), 2-(hexilamino)etilcarbamato de tert-butilo (etapa 1, 181.8 g, 155.8 g de activo, 0.49 mol), EtOH (5000 ml) y DIPEA (110.8 ml, 0.64 mol). La mezcla se calentó a 35 °C durante 1 h, hasta que se disolvió. A la solución se cargó AcOH (36.5 mL, 0.64 mol) y la mezcla resultante se agitó a 35 °C durante 15 min. A esta se cargó NaCNBH₃ (56.1 g, 0.89 mol), en forma de porciones durante 5 min a 35 °C. No se observó exotermia o evolución del gas. La reacción se agitó a 35 °C durante la noche. A esta se cargó NaCNBH₃ (8.0 g, 0.13 mol) y se agitó a 35 °C durante 3 h. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla se cargó NaHCO₃ sat. ac. (1600 mL) durante 10 min, se observó una reacción ligeramente exotérmica. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante el fin de semana. El H se eliminó en vacío y se combinó con una segunda tanda de la misma escala (181.8 g etapa 1) para tratamiento final. A la mezcla se cargó NaCl (311 g). Las fases orgánicas se extrajeron con 10% de MeOH/DCM (3 x 3000 ml) y las fases orgánicas combinadas se concentraron en vacío. El residuo resultante se purificó a través de cromatografía (SiO₂, 7 kg), se empacó, se cargó y se eluyó con 5% de MeOH/DCM + 0.2% de NH₃ 7 N en MeOH (35 L), 50% de MeOH/DCM + 0.2% de NH₃ 7 N en MeOH (75 L), luego se enjuagó con 65% de MeOH/DCM + 0.2% de NH₃ 7 N en MeOH (20 L). Las fracciones que contienen producto se combinaron, se evaporaron en vacío y se azeotropizaron con MeOH (2 x 500 mL) para proporcionar 387 g (366 g de activo, 76%) del compuesto del subtítulo como una goma amarilla.
- 25
- 30

- 35 1H-RMN (270 MHz, DMSO-d₆) δ 6.80 (s a, 1H), 4.80 - 4.30 (m a, 3H), 4.22 - 4.05 (m a, 1H), 3.74 - 3.60 (m a, 1H), 3.59 - 3.48 (m, 1H), 3.47 - 3.20 (m, 6H), 3.08 - 2.87 (m a, 2H), 2.70 - 2.45 (m a, 3H), 1.51 - 1.35 (m, 10H), 1.32 - 1.16 (m, 7H), 0.85 (t, 3H).

LC/MS: m/z 401 [M+H]⁺

Etapa 3

(2R,3R,4S)-5-((2-aminoetil)(hexil)amino)pentano-1,2,3,4-tetraol



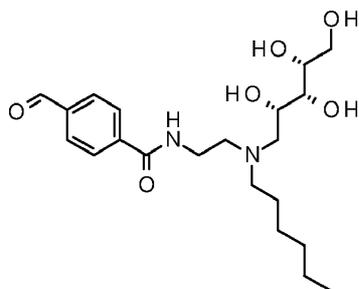
5 A una solución de 2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etilcarbamato de tert-butilo (etapa 2, 365 g, 345 g de activo, 0.91 mol) en MeOH (520 ml) a temperatura ambiente se cargó HCl 4 M en dioxano (1710 ml, 6.84 mol) durante 30 min, manteniendo una temperatura < 31 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La mezcla de reacción se concentró en vacío para proporcionar 485.1 g (306 g de activo, 95%) del compuesto del subtítulo como un alquitrán negro púrpura.

¹H-RMN (270 MHz, DMSO-d₆) δ 8.41 (s a, 3H), 4.20 - 3.00 (m a, 16H), 1.77 - 1.62 (m a, 2H), 1.37 - 1.17 (m a, 6H), 0.87 (t a, 3H).

10 MS ES: m/z 279 [M+H]⁺

Etapa 4

4-formil-N-(2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipenil)amino)etil)benzamida



15 A un matraz de pestaña de 5 L se cargó ácido 4-formilbenzoico (107.6 g, 0.72 mol) y DMF (1400 ml) a temperatura ambiente. A este se cargó 4-metilmorfolina (255.5 ml, 2.3 mol). La mezcla se enfrió a -15 °C durante 5 min. A este se cargó clorofornato de isobutilo (93.4 ml, 0.71 mol) durante 15 min, manteniendo una temperatura de reacción < -10 °C. La reacción se agitó a -10 °C a -15 °C durante 1 h. En un matraz separado, (2R,3R,4S)-5-((2-aminoetil)(hexil)amino)pentano-1,2,3,4-tetraol (etapa 3, 383.9 g, 245.7 g de activo, 0.71 mol) se disolvió en DMF (1400 ml) y 4-metilmorfolina (123 ml, 1.1 mol) a 45 °C durante 1 h. A la mezcla ahídrida mezclada se cargó la etapa 3 que contenía la mezcla durante 15 min, manteniendo una temperatura de reacción < -5 °C. La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla de reacción se cargó NaHCO₃ sat. ac. (2500 ml) lentamente, durante 30 min. La mezcla resultante se concentró en vacío. Al residuo se cargó sat. ac. NaHCO₃ (1200 ml) y se agitó con DCM (4900 ml) durante 10 min a RT. Las capas se separaron y la acuosa se extrajo con 13% de MeOH/DCM (2870 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ sat. ac. (1200 ml) y se concentraron en vacío para proporcionar 395.3 g. El residuo se combinó con 10 g de material crudo recuperado de una reacción de escala de intermedio y se purificó mediante cromatografía [SiO₂, 3 kg; se cargó y empacó con 5% de MeOH/DCM; se eluyó con 5% de MeOH/DCM (30 L), 10% de MeOH/DCM (20 L), 20% de MeOH/DCM (10 L), 30% de MeOH/DCM (30 L), 40% de MeOH/DCM (20 L) y 100% de MeOH (80 L)]. Las fracciones del producto se combinaron (100 L) y se concentraron en vacío para proporcionar 138.4 g (112 g de activo, 39% de rendimiento) del compuesto del subtítulo. ¹H RMN indicó 81.4% en peso de actividad con aproximadamente 5.5% de la impureza de formilbenzamida restante. El análisis HPLC-MS indicó 97.4% de pureza. Las fracciones mezcladas (20 L) se combinaron y se concentraron en vacío para proporcionar 46 g del material con una pureza de 74.5% mediante HPLC. Estas se volvieron a purificar mediante cromatografía (SiO₂, 600 g), eluyendo con 10%-30% de MeOH/DCM (18 L). las fracciones de producto se combinaron y se concentraron en vacío para proporcionar 21.0 g adicionales (20.3 g de activo, 44%) del compuesto del subtítulo.

¹H-RMN (270 MHz, DMSO-d₆): δ 10.08 (s, 1H), 8.60 (t, 1H), 8.02 (d, 2H), 7.97 (d, 2H), 4.70 - 4.20 (m a, 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 (m a, 2H), 1.19 - 1.08 (m, 6H), 0.79 (t, 3H).

LC/MS: m/z 411 [M+H]⁺

40 Desimetrización enzimática de 2-(2-metilbencil)propano-1,3-diamina.

Se investigó la desimetrización enzimática de 2-(2-metilbencil)propano-1,3-diamina utilizando carbonato de dialilo y un rango de lipasas inmovilizadas.

5 Cribado de lipasa inmovilizada: A una solución de 2-(2-metilbencil)propano-1,3-diamina (0.60 g, 3.37 mmol) en 1,4-dioxano (30 mL) se agregó carbonato de dialilo (0.507 mL, 3.53 mmol). Se agregaron alícuotas de 1.0 ml de esta solución a tubos de ensayo de 10 mL con tapa de rosca que contienen las enzimas (0.02 g) descritas en la Tabla 1. Los tubos se agitaron a 500 rpm/30 °C durante 3 días. Se tomaron muestras de cada tubo y se analizaron mediante HPLC de fase inversa (4.6 x 50 mm Thermoquest Hypercarb, detección UV a 260 nm) y HPLC quiral (4.6 x 250 mm Chiralpak IC3, detección UV a 260 nm).

Seis de las lipasas cribadas mostraron una conversión superior al 20% después de 3 días (Tabla 1).

10 Tabla 1.

Enzima	Conversión ¹	Relación R/S ²
IMM CALB (Candida Antartica Lipase B)	33.2	0.87
IMM CALBY (Candida Antartica Lipase B)	52.8	0.81
Novozym 435 (Candida Antartica Lipase B)	75.8	1.76
Amano Lipase PS-C1 (Pseudomonas Cepacia Lipasa)	31.4	9.8
Amano Lipase PS-IM (Pseudomonas Cepacia Lipasa)	21.2	5.0
Amano Lipase PS-D (Pseudomonas Cepacia Lipasa)	33.4	12.3
Sin enzima (Control)	-	-

La conversión a carbamato de monoalilo se indica en % del área de HPLC.

²Las relaciones R/S se indican en % de enantiómero R de área dividido con % de enantiómero S de área a partir de HPLC quiral.

15 Cribado de solvente con Amano Lipase PS-IM: Se realizó un cribado de solvente con Amano Lipase PS-IM en 20 volúmenes relativos de solventes con 1,1 equivalentes de dialilcarbonato, 1 masa equivalente de Amano PS-IM y 0.1 g de 2-(2-metilbencil)propano-1,3-diamina. Después de 6 días a 30 °C, los experimentos se muestrearon utilizando los mismos métodos que se describen para el cribado de lipasa (Tabla 2). La 2-(2-metilbencil)propano-1,3-diamina no era muy soluble en solventes no polares, tales como metil-t-butil-éter, heptanos y ciclohexano. Sin embargo, la adición de THF a cada uno de los solventes permitió que la diamina se disolviera y se probaron las mezclas de solventes 1:1 anteriores. Los resultados sugirieron que 2-MeTHF dio la mejor enantioselectividad, a pesar de alguna reacción de fondo. Con el fin de minimizar la carboxilación de fondo en 2-MeTHF, se llevó a cabo un experimento a 20 granal a 30°C con exceso de Amano Lipase PS-IM (3 equivalentes de masa de lipasa inmovilizada, 1.2 equivalentes de carbonato de dialilo, 20 vol de 2-MeTHF). La reacción se completó en 3 días y, después del tratamiento, se aisló (R)-monoalilcarbamato 1- (R) con 85% de ee. La conversión del producto bruto en la sal de D-tartrato correspondiente en etanol aumentó el exceso enantiomérico hasta el 91.0% (rendimiento total del 58% a partir de la 25 diamina).

Table 2

ES 2 679 618 T3

Solvente	Conversión ¹	Relación R/S ²
TBME:THF (1:1)	72.8	6.25
Heptano: THF (1:1)	88.4	5.45
Ciclohexano:THF (1:1)	89.8	6.81
Tolueno	52.5	6.63
THF	36.8	4.91
MeTHF	86.2	7.06
MeTHF (sin enzima)	24.8	-

¹ la conversión a carbamato de monoalilo se indica en % del área de HPLC.

²Las relaciones R/S se indican en % de enantiómero R de área dividido con % de enantiómero S de área a partir de HPLC quiral.

Prueba de cámara utilizando Canal de sodio ENaC

5 Se mantuvieron células epiteliales bronquiales primarias humanas diferenciadas en la interfaz aire-líquido (ALI) en soportes permeables al pozo (MatTek Corporation, MA, EE.UU., cat No. AIR-100-SNP) en cultivo ALI en una incubadora humidificada a 37 °C. y 5% de CO₂. El medio basolateral (MatTek Corporation, MA, EE.UU. cat no AIR-100-MM-ASY) se cambió cada dos días. El moco o líquido formado en el lado apical se aspiró suavemente cada dos días para mantener la viabilidad y el rendimiento de las células.

10 La tensión transepitelial entre la membrana luminal/apical y la basolateral se midió en la cámara de uso que constaba de cámaras de uso vertical, fabricadas internamente, pinzas DVC-1000 V/C con preamplificadores (World Precision Instruments), kits de electrodo (EK1 World Precision Instruments), Power Lab con el software Chart5, baño de agua con circulación externa y sistema de distribución y regulación de gas carbogen. Los electrodos utilizados en la configuración se fundieron manualmente utilizando 4% de agarosa en 0.9% de NaCl estéril de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

15 Las cámaras de uso se ensamblaron con una membrana vacía snapwell (Costar 3407) y electrodos contenidos en el tampón Krebs (SIGMA-ALDRICH cat no K3753) durante una hora a 37 °C en presencia de 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono. Después de esta etapa de equilibrio, el sistema fue compensado por la resistencia del fluido y la compensación de entrada.

20 Antes del experimento, los cultivos de ALI se evaluaron para resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER) con el dispositivo EndOhm (World Precision Instruments), se utilizaron células que exhibían una resistencia entre 400-600 ohmios.

Las cámaras equilibradas se volvieron a ensamblar con un snapwell que contenía células ALI y después de 20 minutos de estabilización, se agregaron dosis acumulativas de los compuestos en el lado apical de la membrana. Después de la dosis final, se agregó 10 µM de Benzamil para alcanzar el máximo.

25 Todos los compuestos de prueba, que incluyen el compuesto de referencia, se diluyeron a partir de soluciones madre de 10 mM en DMSO al 100% y se agregaron a placas opacas de 96 pozos (Greiner, Cat. No. 651201). Se prepararon series de dilución de 12 dosis en DMSO, comenzando con 3 µM seguido de 10 veces las etapas de dilución.

30 Se utilizó Chart5 para el software de Windows para medir el valor de la corriente de cortocircuito después de cada adición de compuesto. Los datos se transfirieron a Excel y se analizaron utilizando IDBS XLfit® 5.2 (ID Business Solutions Ltd). La concentración molar del compuesto de prueba o de referencia que produce el 50% de inhibición (curva IC50) se obtuvo al ajustar los datos a una función logística de 4 parámetros de la forma:

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

A La meseta inferior de la curva, es decir, el valor y mínimo final

B La parte superior de la meseta de la curva, es decir, el valor y máximo final

C El valor $\log_{10}x$ en un valor y del 50%.

D El factor de pendiente de Hill.

x Los valores x conocidos.

5 La Tabla 1 muestra los valores de pIC_{50} para los Ejemplos 1 a 14.

Tabla 1

Ejemplo No.	pIC_{50}	Ejemplo No.	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

Permeabilidad intestinal mucosal estimada con monocapas de células Caco-2

10 Se cultivan células Caco-2 en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) en insertos de membrana de policarbonato Transwell de 96 pozos durante 15 días hasta que se alcanza la confluencia y la diferenciación. Después de la evaluación de la integridad por medición de la resistencia eléctrica a través de la monocapa, las células se lavan dos veces con HBSS (HEPES 25 mM, pH 7.4) y se incuban a 37 °C durante 30 minutos.

15 Las soluciones madre de los compuestos de prueba en DMSO se diluyen con HBSS (que contiene 100 μ M de Amarillo Lucifer) para alcanzar la concentración final de 10 μ M; todas las incubaciones se realizan por duplicado. Para determinar la tasa de transporte del fármaco en la dirección apical a la basolateral (A a B) se agregan 100 μ L de soluciones del compuesto de prueba al compartimento apical del inserto Transwell. El compartimento basolateral se llena con 300 μ L de HBSS.

Para la determinación del transporte basolateral a apical (B a A), el compartimento basolateral se llena con 300 μ L de solución del compuesto de prueba y se agregan 100 μ L de HBSS al compartimento apical.

20 Después de incubar la placa a 37 °C durante 2 h, se retiran 50 μ L de cada compartimento y se transfieren a placas de 96 pozos para medir la fluorescencia en un lector de placa adecuado a 485 nm de excitación y 530 nm de emisión para monitorizar la integridad de la monocapa. Para el análisis de permeabilidad del compuesto de prueba se agregan 3 volúmenes de metanol frío a cada muestra de tampón y las muestras se centrifugan a 4 °C durante 15 minutos. Se utiliza una alícuota de 5 μ L del sobrenadante para el análisis LC/MS/MS.

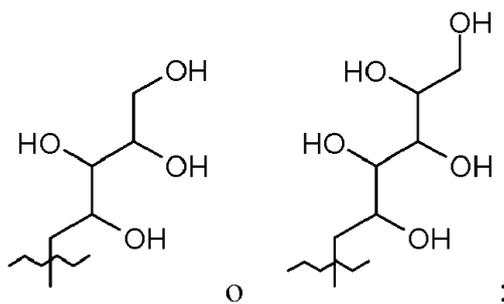
25 La permeabilidad aparente (P_{app} , en unidades de cm/s) se puede calcular utilizando la siguiente ecuación

$$P_{app} = \frac{V_A}{\text{Área} \times \text{tiempo}} \times \frac{[\text{fármaco}]_{\text{aceptor}}}{[\text{fármaco}]_{\text{inicial,donador}}}$$

en la que V_A es el volumen (en mL) en el pozo receptor (0.3 mL para apial a basolateral), Area es el área superficial de la membrana (0.143 cm² para HTS el spermeable de 96 pozos Transwell) y el tiempo es tiempo total de transporte en s.

30 Se midió la permeabilidad aparente en la dirección apical a la basolateral (Mediana A a B P_{app} , 1E-6.cm/s) para cada uno de los Ejemplos 1 a 16. No se pudo detectar ninguna permeabilidad aparente para ninguno de los

Ejemplos en la dirección apical a basolateral. Los compuestos que exhiben baja permeabilidad pueden ser más deseables para la administración de inhibidores de ENaC a través de administración por inhalación.



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R² es n-hexilo.

5 7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado de:

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-2-(2-metilbencil)-3-(((1-(3-(((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metil)amino)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

10 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etilcarbamoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

15 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(4-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)butanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-2-(2-metilbencil)-3-((1-(3-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexilamino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)propil)pirazina-2-carboxamida;

20 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((1-(3-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)propanoil)piperidin-4-il)metilamino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

25 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

4-(((R)-3-(3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxamido)-2-(2-carbamato de metilbencil)propilamino)metil)fenil 2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etilo;

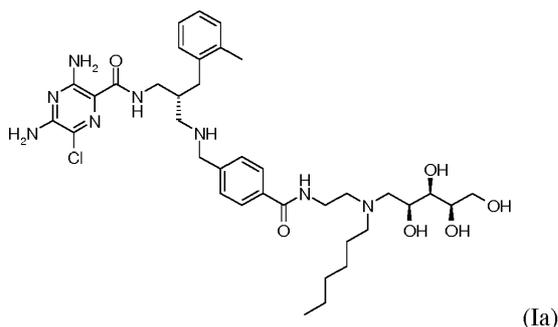
3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

30 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)fenetil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es:

35 3,5-diamino-6-cloro-N-((R)-3-((4-((2-(hexil((2S,3R,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)etil)carbamoil)bencil)amino)-2-(2-metilbencil)propil)pirazina-2-carboxamida, y que tiene la fórmula (1a):



, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en terapia.
11. Un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el tratamiento de un estado de enfermedad mediado por ENaC.
- 10 12. Un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de un estado de enfermedad mediado por ENaC.
- 15 13. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el estado de enfermedad mediado por ENaC incluye enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis quística, asma, bronquitis crónica y bronquiectasia.
14. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el estado de enfermedad mediado por ENaC es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) o fibrosis quística.
- 20 15. Una combinación que comprende un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y uno o más agentes seleccionados de la lista que comprende:
- un agonista del beta-adrenoceptor;
 - un antagonista del receptor muscarínico;
 - un antagonista del receptor muscarínico de articulación y agonista del beta-adrenoceptor;

25 • un agonista del receptor de tipo toll (tal como un agonista TLR7 o TLR9);

 - un antagonista de adenosina;
 - un agonista del receptor de glucocorticoides (esteroide o no esteroide);
 - un antagonista de p38;
 - un antagonista de IKK2;

30 • un antagonista de PDE4;

 - un modulador de la función del receptor de quimioquina (tal como un antagonista del receptor de CCR1, CCR2B, CCR5, CXCR2 o CXCR3);
 - un antagonista de CRTh2; o
 - un osmolito, tal como solución salina hipertónica.