

制备作为荧光示踪剂的吡嗪羧酸类衍生物的方法

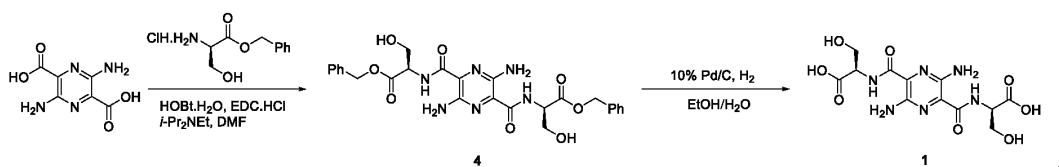
技术领域

本发明涉及制备 3,6-二氨基-2,5-双{N-(1R)-1-羧基-2-羟基乙基}氨基甲酰基}吡嗪的方法、用于所述制备方法的中间体化合物以及制备所述中间体化合物的方法。

背景技术

吡嗪类衍生物作为荧光示踪剂在评估肾功能方面具有潜在的应用前景。作为一种极具临床应用价值的荧光示踪剂，3,6-二氨基-2,5-双{N-(1R)-1-羧基-2-羟基乙基}氨基甲酰基}吡嗪（化合物 1）的研究得到了广泛的关注，但是目前该化合物的合成路线报道极少。

2011 年，Raghavan Rajagopalan 等人对化合物 1 的合成进行了优化，减少了反应步骤（J. Med. Chem. 2011, 54, 5048–5058）。在该合成方法中，作为原料的 3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸经酰胺化、钯催化氢化等步骤得到化合物 1：



其中，酰胺化反应以 D-丝氨酸苄酯盐酸盐为反应底物，得到中间体 4，再经钯/碳催化氢化反应生成化合物 1。由于 D-丝氨酸苄酯盐酸盐和钯/碳的商业价格昂贵，导致产品的生产成本较高。此外，氢化反应不仅对生产设备和场地有较高要求，而且氢气是易燃易爆气体，操作十分危险，存在极大的安全隐患。由于氢化反应使用了钯/碳，处理不当会导致贵金属残留，因而存在药物安全风险。

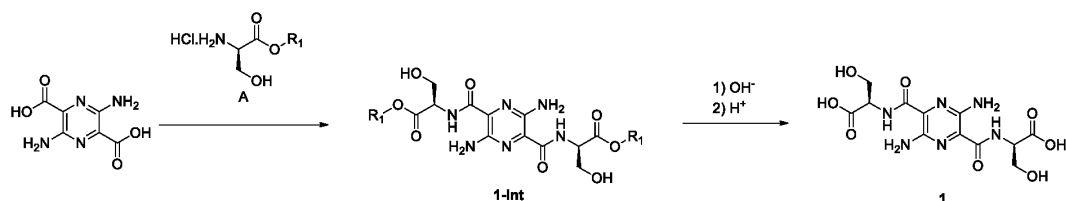
因此，仍然需要开发具有高安全性和高成本效益的适合 3,6-二氨基-2,5-双{N-(1R)-1-羧基-2-羟基乙基}氨基甲酰基}吡嗪的工业化生产的方法。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术中存在的问题，提供一种用于制备 3,6-二氨基-2,5-双{N-(1R)-1-羧基-2-羟基乙基}氨基甲酰基}吡嗪的新方法。

本发明人通过改变酰胺化反应底物，具体而言，使用成本低廉的式 A 的 D-丝氨酸酯类盐酸盐为底物，并通过优化反应条件，首次制备了式 1-Int 的中间体化合物。所述中间体化合物可以发生酯水解反应，经酸化后即可得到化合物 1。因此，本发明的制备方法不需要钯催化氢化反应，从而极大地提高了工业生产的安全性，避免了钯/碳催化剂导致的贵金属残留的风险。本发明人还发现该酯水解反应中可以产生手性杂质。本发明人意外地发现，通过调整酯水解反应的条件，特别是选择合适的溶剂，可以提高化合物 1 的手性纯度。本发明的制备方法具有成本更低，安全性好，贵金属残留风险低以及产物手性纯度高的优势。

在第一方面，本发明提供制备式 1 的 3,6-二氨基-2,5-双{N-(1R)-1-羧基-2-羟基乙基}氨基甲酰基}吡嗪的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

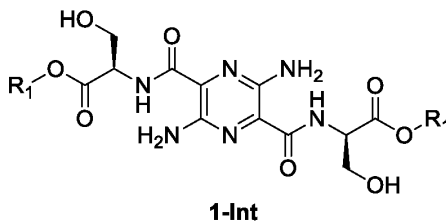


其中 R₁ 在每次出现时独立地选自 C₁₋₈ 烷基、C₂₋₈ 烯基、C₂₋₈ 炔基和 C₃₋₈ 环烷基；

步骤 S1. 使式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸和酰胺缩合剂在第一有机溶剂中进行酰胺化反应，以得到式 1-Int 的中间体；

步骤 S2. 使所述式 1-Int 的中间体在碱性条件下在溶剂中水解，然后酸化反应混合物，以得到所述式 1 的 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪，其中所述溶剂是水、或水和第二有机溶剂的混合物。

在第二方面，本发明提供式 1-Int 的化合物：



其中每个 R_1 可以相同或不同，且独立地选自 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基和 C_{3-8} 环烷基。所述式 1-Int 的化合物可以作为用于制备化合物 1 的中间体。

在第三方面，本发明提供制备所述式 1-Int 的化合物的方法。

具体实施方式

定义

除非在下文中另有定义，本文中所用的所有技术术语和科学术语的含义意图与本领域技术人员通常所理解的相同。提及本文中使用的技术意图指在本领域中通常所理解的技术，包括那些对本领域技术人员显而易见的技术的变化或等效技术的替换。虽然相信以下术语对于本领域技术人员很好理解，但仍然阐述以下定义以更好地解释本发明。

如本文中所使用，术语“包括”、“包含”、“具有”、“含有”或“涉及”及其在本文中的其它变体形式为包含性的(inclusive)或开放式的，且不排除其它未列举的元素或方法步骤，尽管其它未列举的元素或方法步骤不一定存在(即，这些术语也涵盖术语“基本上由……组成”和“由……组成”)。

如本文中所使用，术语“烷基”是指直链或支链的饱和脂肪族烃基。术语“ C_{1-8} 烷基”指具有 1 至 8 个碳原子的直链或支链的烷基。例如，如本文中所使用，术语“ C_{1-6} 烷基”指具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链的烷基(例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基或正己基)。术语“ C_{1-3} 烷基”指具有 1 至 3 个碳原子的直链或支链的烷基，包括甲基、乙基、正丙基和异丙基。

如本文中所使用，术语“ C_{2-8} 烯基”意指包含一个或多个双键的直链或支链的单价烃基，其具有 2 至 8 个碳原子(例如“ C_{2-6} 烯基”或“ C_{2-3} 烯基”)。可以提及的烯基的实例包括但不限于例如乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基、2-甲基-2-丙烯基、4-甲基-3-戊烯基。

如本文中所使用，术语“ C_{2-8} 炔基”表示包含一个或多个三键的直链或支链的单价烃基，其具有 2 至 8 个碳原子(例如“ C_{2-6} 炔基”或“ C_{2-3} 炔基”)。可以提及的炔基的实例包括但不限于乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-戊炔基、2-己炔基、3-己炔基等。

如本文中所使用,术语“C₃₋₈环烷基”是指具有3至8个环碳原子的饱和烃环。所述环烷基适合地具有3至7个碳原子,例如3至6个(“C₃₋₆环烷基”)、4至6个(“C₄₋₆环烷基”)、或5至6个(“C₅₋₆环烷基”)碳原子。可以提及的环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基(环)。

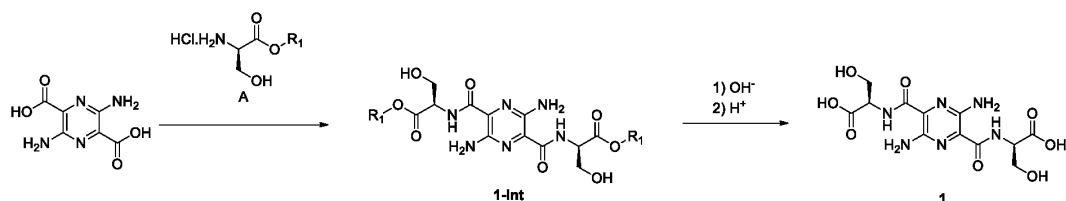
如果取代基被描述为“独立地选自”一组基团,则各取代基独立于另一者被选择。因此,各取代基可与另一(其他)取代基相同或不同。

如本文中所使用,术语“一个或多个”意指在合理条件下的1个或超过1个,例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个。

如本文中所使用,术语“室温”是指约20至25°C。

术语“约”是指在所述数值的±10%范围内,优选±5%范围内,更优选±2%范围内。

在第一方面,本发明提供制备式1的3,6-二氨基-2,5-双{N-(1R)-1-羧基-2-羟基乙基}氨基甲酰基}吡嗪的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:



其中 R₁ 在每次出现时独立地选自 C₁₋₈ 烷基、C₂₋₈ 烯基、C₂₋₈ 炔基和 C₃₋₈ 环烷基;

步骤 S1. 使式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸和酰胺缩合剂在第一有机溶剂中进行酰胺化反应,以得到式 1-Int 的中间体;

步骤 S2. 使所述式 1-Int 的中间体在碱性条件下在溶剂中水解,然后酸化反应混合物,以得到所述式 1 的 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪,其中所述溶剂是水、或水和第二有机溶剂的混合物。

优选地, R₁ 在每次出现时独立地为 C₁₋₆ 烷基,优选为 C₁₋₃ 烷基,更优选为甲基或乙基。

在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述酰胺化反应是通过将所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、所述 3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸和所述酰胺缩合剂在低温条件下滴加到所述第一有机溶剂中,然后混合来进行的,以得到

所述式 1-Int 的中间体。

在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述低温条件为约-10°C 至 10°C,优选约-5°C 至 5°C,更优选约 0°C 至 5°C,特别优选约 0°C 至 2°C 的温度。

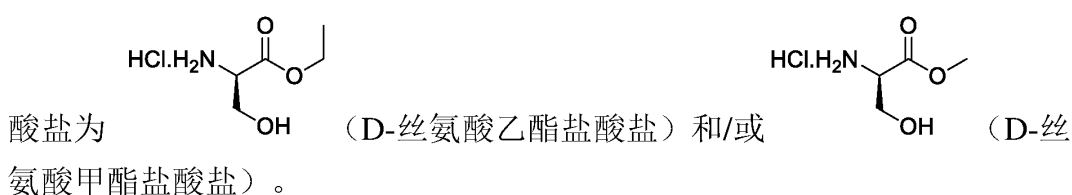
在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述混合是在室温下进行。在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述混合为在室温下搅拌约 8 小时或更长时间,优选约 24 小时或更长时间。

在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述第一有机溶剂为极性有机溶剂,例如选自二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈、二氯甲烷、四氢呋喃和乙醇中的一种、两种或更多种,优选为 DMF。

对所述步骤 S1 中使用的酰胺缩合剂没有特别的限制,其可以为常用的酰胺缩合剂。在一些优选的实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述酰胺缩合剂为三乙胺、1-羟基苯并三氮唑(HOBt)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)的组合。

在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,将所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、所述 2,5-二甲酸-3,6-二氨基吡嗪、三乙胺、HOBt 和 EDC.HCl 在约 0°C 至 5°C、优选约 0°C 至 2°C 下滴加到 DMF 中,然后在室温下搅拌,以得到所述式 1-Int 的中间体。例如,所述搅拌可以持续例如约 24 小时。

在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐是由所述式 A 表示的单一化合物的形式。在另一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐是各自由所述式 A 表示的两种或更多种不同化合物的混合物的形式。优选地,所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐为



本发明人通过使用式 A 的 D-丝氨酸酯类盐酸盐为酰胺化反应的底物,并通过优化反应条件,首次制备了式 1-Int 的中间体化合物。本发明人发现在低温条件下进行滴加反应物和酰胺缩合剂到所述第一有机溶剂中的操作有利于所述中间体的形成和高收率。有利的低温条件是约 0°C 至 5°C 的温度,约 0°C 至 2°C 的温度有助于达到更高的收率。本发明人还发现在所述酰胺化反应中可能存在溶剂效应,所述第一有机溶剂会影响式 1-Int 的中间

体化合物的形成和收率。优选地，所述第一有机溶剂是 DMF。

所制备的式 1-Int 的中间体化合物可以通过后处理分离。在一些实施方案中，所述后处理包括：旋蒸除去所述第一有机溶剂，然后用水和适合的溶剂（例如乙酸乙酯）多次萃取剩余物；以饱和 NaHCO₃ 水溶液和 KHSO₄ 水溶液洗涤合并的有机相，浓缩有机相，然后通过柱层析分离。

在一些实施方案中，在所述步骤 S2 中，使所述式 1-Int 的中间体在碱性条件下并且在适合的温度下在所述溶剂中水解，然后酸化反应混合物，以得到 3,6-二氨基-2,5-二{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨甲酰基}吡嗪，其中所述溶剂是水、或水和第二有机溶剂的混合物。

优选地，所述第二有机溶剂为极性有机溶剂，例如选自四氢呋喃、甲醇、乙腈、乙醇、1,4-二氧六环及其任意组合，更优选为四氢呋喃、乙腈或 1,4-二氧六环。

本发明人发现在步骤 S2 的酯水解反应中会产生手性杂质。本发明人意外地发现，在一些特定的溶剂中，所述酯水解反应能够提供更有利的化合物 1 的手性纯度和收率。手性纯度可以由 dr 值(即，非对映体比例)来表示。在本发明方法的步骤 S2 中，所述式 1 的 3,6-二氨基-2,5-二{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨甲酰基}吡嗪可以具有由如下的 dr 值表示的手性纯度：约 80:20 至约 94:6，优选约 95:5 至约 99:1，例如约 96:4、约 97:3 或约 98:2。

在一些实施方案中，在所述步骤 S2 中，所述溶剂为水。在一些此类实施方案中，所述水解在合适的温度下进行，例如不超过约 20°C，例如约 1 至 15°C，特别是约 5 至 10°C 的温度。

在另一些实施方案中，在所述步骤 S2 中，所述溶剂为水和所述第二有机溶剂的混合物。在一些此类实施方案中，在所述步骤 S2 中，所述水解在不超过 20°C 的温度下进行，例如约 -10°C 至 15°C，特别是约 -5°C 至 10°C，例如 -5°C 至 0°C 或约 0°C 至 5°C 的温度。

在另一些此类实施方案中，所述溶剂为水和乙腈的混合物。

在另一些此类实施方案中，所述溶剂为水和选自四氢呋喃、甲醇、乙醇和 1,4-二氧六环中的一种的混合物。在一些优选地实施方案中，所述溶剂为水和四氢呋喃或 1,4-二氧六环的混合物。优选地，所述水解在约 -10°C 至 10°C，优选约 -5°C 至 5°C，更优选约 -5°C 至 0°C 的温度下进行。

在一些上文所述的实施方案中，在所述步骤 S2 中，所述溶剂包含碱金

属氢氧化物，例如选自 LiOH、NaOH 和 KOH 中的一种、两种或更多种，优选 LiOH。

所述水解可以例如搅拌的混合（例如持续约 1 至 8 小时）下进行。

在一些实施方案中，在所述步骤 S2 中，所述酸化是在所述水解完成后，通过用酸调节反应混合物的 pH 值来进行的。例如，可以通过用 TLC 监测反应进程，直至反应底物消失，来指示所述水解的完成。

在一些实施方案中，所述 pH 值为约 2 至 4，优选约 3。

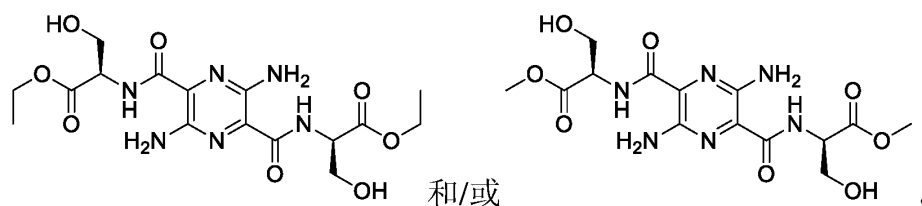
在一些实施方案中，在所述步骤 S2 中，在所述酸化之后，再将反应混合物混合（例如通过搅拌）适当的时间，例如约 1 至 4 小时，优选约 2 小时。

本发明提供如上文所述的方法，其中在所述步骤 S2 中，使所述式 1-Int 的中间体在碱金属氢氧化物的存在下在水或水和乙腈的混合物中，在不超过约 20°C 的温度下水解，在所述水解完成后用酸调节反应混合物的 pH 值至约 3 并继续搅拌，以得到 3,6-二氨基-2,5-二{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨甲酰基}吡嗪。

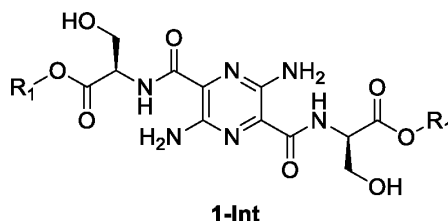
本发明还提供如上文所述的方法，其中在所述步骤 S2 中，使所述式 1-Int 的中间体在碱金属氢氧化物的存在下在水和四氢呋喃或 1,4-二氧六环的混合物中，在约 -10°C 至 10°C（例如约 -5°C 至 5°C，特别是约 -5°C 或 0°C）的温度下水解，在所述水解完成后用酸调节反应混合物的 pH 值至约 3 并再搅拌约 2 小时，以得到 3,6-二氨基-2,5-二{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨甲酰基}吡嗪。

所述酸可以是选自醋酸、三氟乙酸、硫酸、柠檬酸和盐酸中的一种、两种或更多种。

在一些实施方案中，在所述步骤 S2 中，所述式 1-Int 的中间体为由所述式 1-Int 表示的单一化合物的形式。在另一些实施方案中，在所述步骤 S2 中，所述式 1-Int 的中间体为各自由所述式 1-Int 表示的两种或更多种不同化合物的混合物的形式。优选地，所述式 1-Int 的中间体为



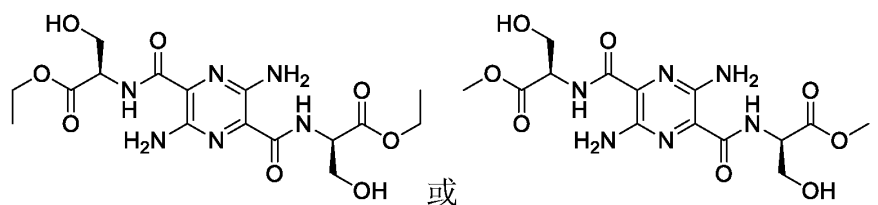
在第二方面，本发明提供式 1-Int 的化合物：



其中每个 R_1 可以相同或不同，且独立地选自 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基和 C_{1-8} 环烷基。

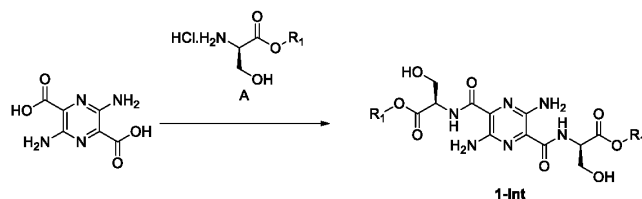
在一些优选的实施方案中，每个 R_1 可以相同或不同，且独立地选自 C_{1-6} 烷基，优选为 C_{1-3} 烷基，更优选为甲基或乙基。

在一些实施方案中，所述式 1-Int 的化合物为：



本发明人首次制备了所述式 1-Int 的中间体化合物。通过所述中间体化合物的酯水解反应和随后的酸化即可得到化合物 1，从而避免了现有技术方法所使用的钯催化氢化反应，极大地提高了工业生产的安全性，避免了钯/碳催化剂导致的贵金属残留的风险。

在第三方面，本发明提供所述式 1-Int 的化合物的方法，其特征在于，所述方法包括以下反应步骤：



其中 R_1 在每次出现时独立地选自 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基和 C_{1-8} 环烷基，优选为 C_{1-6} 烷基，更优选为 C_{1-3} 烷基，更优选为甲基或乙基；

步骤 S1. 使式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、2,5-二甲酸-3,6-二氨基吡嗪和酰胺缩合剂在第一有机溶剂中进行酰胺化反应，得到所述式 1-Int 的化合物。

在一些优选的实施方案中， R_1 在每次出现时独立地为 C_{1-6} 烷基，优选为 C_{1-3} 烷基，更优选为甲基或乙基。

在一些实施方案中，在所述步骤 S1 中，所述酰胺化反应是通过将所述

式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、所述 3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸和所述酰胺缩合剂在低温条件下滴加到所述第一有机溶剂中,然后混合来进行的,以得到所述式 1-Int 的中间体。

在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述低温条件为约-10°C 至 10°C,优选约-5°C 至 5°C,更优选约 0°C 至 5°C,特别优选约 0°C 至 2°C 的温度。

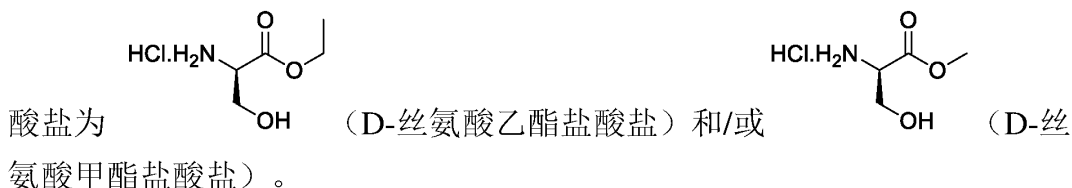
在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述混合是在室温下进行。在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述混合为在室温下搅拌约 8 小时或更长时间,优选约 24 小时或更长时间。

在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述第一有机溶剂为极性有机溶剂,例如选自二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈、二氯甲烷、四氢呋喃和乙醇中的一种、两种或更多种,优选为 DMF。

对所述步骤 S1 中使用的酰胺缩合剂没有特别的限制,其可以为常用的酰胺缩合剂。在一些优选的实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述酰胺缩合剂为三乙胺、1-羟基苯并三氮唑(HOBt)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)的组合。

在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,将所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、所述 2,5-二甲酸-3,6-二氨基吡嗪、三乙胺、HOBt 和 EDC.HCl 在约 0°C 至 5°C、优选约 0°C 至 2°C 下滴加到 DMF 中,然后在室温下搅拌约 24 小时,以得到所述式 1-Int 的中间体。

在一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐是由所述式 A 表示的单一化合物的形式。在另一些实施方案中,在所述步骤 S1 中,所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐是各自由所述式 A 表示的两种或更多种不同化合物的混合物的形式。优选地,所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐为



所制备的式 1-Int 的中间体化合物可以通过后处理分离。在一些实施方案中,所述后处理包括:旋蒸除去所述第一有机溶剂,然后用水和适合的溶剂(例如乙酸乙酯)多次萃取剩余物;以饱和 NaHCO₃ 水溶液和 KHSO₄ 水溶液洗涤合并的有机相,浓缩有机相,然后通过柱层析分离。

有益效果

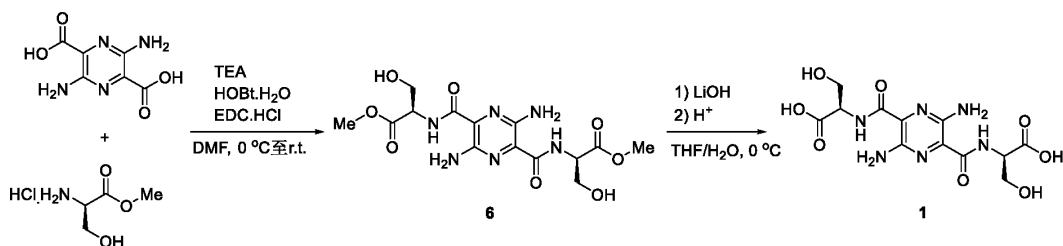
本发明人首次制备了式 1-Int 的中间体化合物，其通过酯水解反应和酸化后可得到目标化合物 1，避免了现有技术方法所使用的钯催化氢化反应。本发明的制备方法具有成本更低，安全性高，贵金属残留风险低以及产物手性纯度高的优势。

实施例

以下结合实施例进一步描述本发明，但提供这些实施例并非意图限制本发明的范围。

本发明实施例中未注明具体条件的实验方法，通常为常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件；未注明来源的试剂，通常为通过商业途径可购得的常规试剂或者可以由已知的试剂通过常规方法制备得到。

实施例 1: 3,6-二氨基-2,5-双[N-(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪的制备



(1) 酰胺化反应

在 0°C 条件下，分别将 D-丝氨酸甲酯盐酸盐 (18g)、三乙胺 (12g)、3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸 (20g)、HOBt (14g) 和 EDC.HCl (19g) 滴加入 DMF (1000mL) 中，然后将反应液在室温 (r.t.) 下搅拌 24 小时。反应结束后，旋蒸除去 DMF，将剩余物用水和乙酸乙酯多次萃取，以饱和 NaHCO₃ 水溶液和 KHSO₄ 水溶液洗涤合并的有机相，再将有机相浓缩，经柱层析分离，得到中间体 6 (28g，收率为 70%)。

LCMS: r.t. = 6.9 min, [M+H]⁺ = 401.1。

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.51 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.76 (s, 4H), 5.32 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 4.58 (dt, J = 7.9, 3.7 Hz, 2H), 3.90 (ddd, J = 11.0, 5.6, 3.9 Hz, 2H), 3.75 (ddd, J = 11.1, 5.4, 3.7 Hz, 2H), 3.69 (s, 6H)。

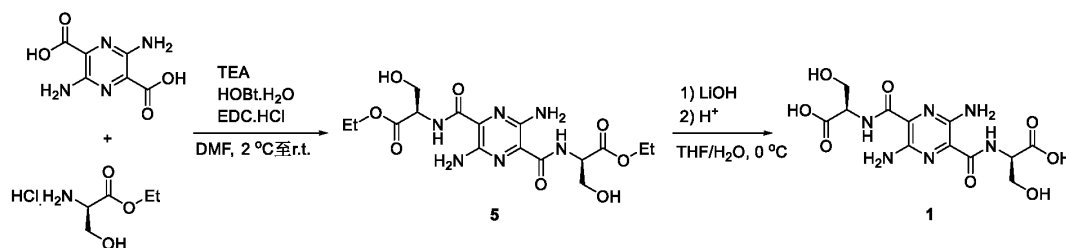
(2) 水解反应

将中间体 6 (20g) 的四氢呋喃溶液与 LiOH (5.0g) 水溶液混合, 在 0°C 下搅拌 2 小时。用 TLC 监测反应进程, 当反应底物消失后, 用三氟乙酸水溶液将反应液酸化 (调节 pH 至约 3), 继续搅拌 2 小时, 得到红色浑浊液。将该红色液体过滤, 洗涤滤饼并烘干, 得到目标化合物 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪 (17.7g, 收率为 95%, dr=98:2)。

LCMS: r.t. = 2.9 min, [M+H]⁺ = 373.1。

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.47 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.78 (s, 4H), 4.45 (dt, J = 7.8, 3.7 Hz, 2H), 3.88 (dd, J = 10.9, 3.9 Hz, 2H), 3.74 (dd, J = 11.0, 3.7 Hz, 2H)。

实施例 2: 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪的制备



(1) 酰胺化反应

在 2°C 下, 分别将 D-丝氨酸乙酯盐酸盐 (19g)、三乙胺 (12g)、3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸 (20g)、HOBt (14g) 和 EDC.HCl (19g) 滴加入 DMF (800mL) 中, 然后将反应液在室温下搅拌 24 小时。反应结束后, 旋蒸除去 DMF, 将剩余物用水和乙酸乙酯多次萃取, 以饱和 NaHCO₃ 水溶液和 KHSO₄ 水溶液洗涤合并的有机相, 再将有机相浓缩, 经柱层析分离, 得到中间体 5 (32.5g, 收率为 75%)。

LCMS: r.t. = 6.6 min, [M+H]⁺ = 429.2。

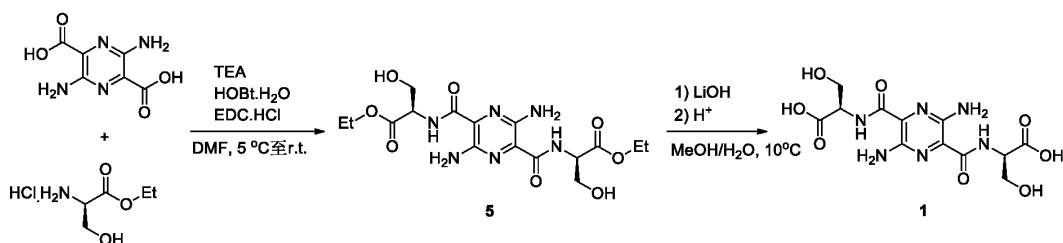
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.50 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.76 (s, 4H), 5.31 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 4.55 (dt, J = 7.9, 3.8 Hz, 2H), 4.15 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.89 (ddd, J = 11.1, 5.7, 4.0 Hz, 2H), 3.75 (ddd, J = 11.0, 5.3, 3.6 Hz, 2H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H)。

(2) 水解反应

将中间体 5 (21g) 的四氢呋喃溶液与 LiOH (5.0g) 水溶液混合, 在 0°C

下搅拌 2 小时。用 TLC 监测反应进程，当反应物消失后，用醋酸水溶液将反应液酸化（调节 pH 至约 3），继续搅拌 2 小时，得到红色浑浊液。将该红色液体过滤，洗涤滤饼并烘干，得到目标化合物 3,6-二氨基-2,5-二{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪(18g，收率为 96%，dr=98:2)。其表征数据同实施例 1 步骤(2)所记载。

实施例 3: 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪的制备



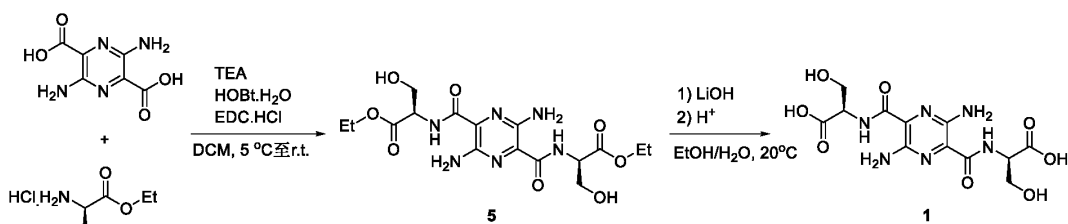
(1) 酰胺化反应

在 5°C 下，分别将 D-丝氨酸乙酯盐酸盐（19g）、三乙胺（12g）、3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸（20g）、HOBt（14g）和 EDC.HCl（19g）滴加入 DMF（800mL）中，然后将反应液在室温下搅拌 24 小时。反应结束后，旋蒸除去 DMF，将剩余物用水和乙酸乙酯多次萃取，以饱和 NaHCO₃ 水溶液和 KHSO₄ 水溶液洗涤合并的有机相，再将有机相浓缩，经柱层析分离，得到中间体 5（28g，收率为 65%）。其表征数据同实施例 2 步骤(1)所记载。

(2) 水解反应

将中间体 5（21g）的甲醇溶液与 LiOH（5g）混合，在 10°C 下搅拌 2 小时。用 TLC 监测反应进程，当反应物消失后，用三氟乙水溶液将反应液酸化（调节 pH 至约 3），继续搅拌 2 小时，得到红色浑浊液。将该红色液体过滤，洗涤滤饼并烘干，得到目标化合物 3,6-二氨基-2,5-二{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪(11g，收率为 60%，dr=80:20)。其表征数据同实施例 1 步骤(2)所记载。

实施例 4: 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪的制备



(1) 酰胺化反应

在 5°C 下，分别将 D-丝氨酸乙酯盐酸盐 (19g)、三乙胺 (12g)、3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸 (20g)、HOBt (14g) 和 EDC.HCl (19g) 滴加入二氯甲烷 (1200mL) 中，然后将反应液在室温下搅拌 24 小时。反应结束后，旋蒸除去二氯甲烷，将剩余物用水和乙酸乙酯多次萃取，以饱和 NaHCO₃ 水溶液和 KHSO₄ 水溶液洗涤合并的有机相，再将有机相浓缩，经柱层析分离，得到中间体 5 (5.2g，收率为 12%)。其表征数据同实施例 2 步骤(1)所记载。

(2) 水解反应

将中间体 5 (43g) 的乙醇溶液与 LiOH (12g) 混合，在 20°C 下搅拌 2 小时。用 TLC 监测反应进程，当反应物消失后，用三氟乙酸水溶液将反应液酸化 (调节 pH 至约 3)，继续搅拌 2 小时，得到红色浑浊液。将该红色液体过滤，洗涤滤饼并烘干，得到目标化合物 3,6-二氨基-2,5-二{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪 (14g，收率为 38%，dr=82:18)。其表征数据同实施例 1 步骤(2)所记载。

实施例 5: 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪的制备

将按照实施例 1 步骤(1)制备的中间体 6 (20g) 的乙腈溶液与 NaOH (6.0g) 水溶液混合，在 20°C 下搅拌 2 小时。用 TLC 监测反应进程，当反应底物消失后，用醋酸水溶液将反应液酸化 (调节 pH 至约 3)，继续搅拌 2 小时，得到红色浑浊液。将该红色液体过滤，洗涤滤饼并烘干，得到目标化合物 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪 (16.7g，收率为 90%，dr=92:8)。其表征数据同实施例 1 步骤(2)所记载。

实施例 6: 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪的制备

将按照实施例 2 步骤(1)制备的中间体 5 (20g) 的 1,4-二氧六环溶液与

KOH (14g) 水溶液混合, 在-5°C 下搅拌 8 小时。用 TLC 监测反应进程, 当反应底物消失后, 用盐酸将反应液酸化 (调节 pH 至约 3), 继续搅拌 2 小时, 得到红色浑浊液。将该红色液体过滤, 洗涤滤饼并烘干, 得到目标化合物 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪 (15.3g, 收率为 88%, dr=95:5)。其表征数据同实施例 1 步骤(2)所记载。

实施例 7: 3,6-二氨基-2,5-双{N-(1R)-1-羧基-2-羟基乙基}氨基甲酰基}吡嗪的制备

将按照实施例 3 步骤(1)制备的中间体 5 (21g)的甲醇溶液与 LiOH (5g) 混合, 在 0°C 下搅拌 2 小时。用 TLC 监测反应进程, 当反应物消失后, 用三氟乙水溶液将反应液酸化 (调节 pH 至约 3), 继续搅拌 2 小时, 得到红色浑浊液。将该红色液体过滤, 洗涤滤饼并烘干, 得到目标化合物 3,6-二氨基-2,5-二{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪 (11g, 收率为 60%, dr=86:14)。其表征数据同实施例 1 步骤(2)所记载。

实施例 8: 3,6-二氨基-2,5-双{N-(1R)-1-羧基-2-羟基乙基}氨基甲酰基}吡嗪的制备

将按照实施例 2 步骤(1)制备的中间体 5 (20g) 的水溶液与 KOH (14g) 水溶液混合, 在 10°C 下搅拌 3 小时。用 TLC 监测反应进程, 当反应底物消失后, 用三氟乙酸水溶液将反应液酸化 (调节 pH 至约 3), 继续搅拌 2 小时, 得到红色浑浊液。将该红色液体过滤, 洗涤滤饼并烘干, 得到目标化合物 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪 (16g, 收率为 92%, dr=98:2)。其表征数据同实施例 1 步骤(2)所记载。

实施例 9: 3,6-二氨基-2,5-双{N-(1R)-1-羧基-2-羟基乙基}氨基甲酰基}吡嗪的制备

将按照实施例 2 步骤(1)制备的中间体 5 (20g) 的水溶液与 KOH (14g) 水溶液混合, 在 20°C 下搅拌 3 小时。用 TLC 监测反应进程, 当反应底物消失后, 用三氟乙酸水溶液将反应液酸化 (调节 pH 至约 3), 继续搅拌 2 小时, 得到红色浑浊液。将该红色液体过滤, 洗涤滤饼并烘干, 得到目标化合物 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪 (16g,

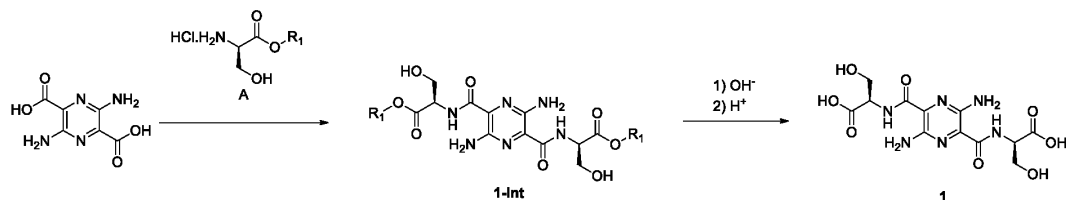
收率为 92%， $dr=95:5$ ）。其表征数据同实施例 1 步骤(2)所记载。

除本文中描述的实施方案外，根据前述描述，本发明的多种修改对本领域技术人员而言会是显而易见的。这样的修改也意图落入所附权利要求书的范围内。

本申请中所引用的各参考文献(包括所有专利、专利申请、期刊文章、书籍及任何其它公开)均以其整体援引加入本文。

权 利 要 求 书

1. 制备式 1 的 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：



其中 R_1 在每次出现时独立地选自 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基和 C_{3-8} 环烷基，优选为 C_{1-6} 烷基，更优选为 C_{1-3} 烷基，更优选为甲基或乙基；

步骤 S1. 使式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸和酰胺缩合剂在第一有机溶剂中进行酰胺化反应，以得到式 1-Int 的中间体；

步骤 S2. 使所述式 1-Int 的中间体在碱性条件下在溶剂中水解，然后酸化反应混合物，以得到所述式 1 的 3,6-二氨基-2,5-双{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨基甲酰基}吡嗪，其中所述溶剂是水、或水和第二有机溶剂的混合物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在所述步骤 S1 中，所述酰胺化反应是通过将所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、所述 3,6-二氨基吡嗪-2,5-二甲酸和所述酰胺缩合剂在低温条件下滴加到所述第一有机溶剂中，然后混合来进行的，以得到所述式 1-Int 的中间体。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，在所述步骤 S1 中，所述低温条件为约 -10°C 至 10°C ，优选约 -5°C 至 5°C ，更优选约 0°C 至 5°C ，特别优选约 0°C 至 2°C 的温度。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法，其特征在于，在所述步骤 S1 中，所述混合是在室温下进行。

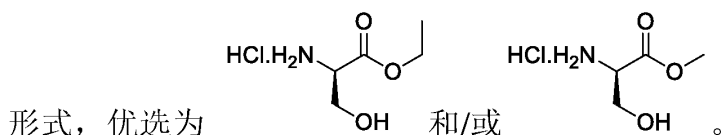
5. 根据权利要求 2 至 4 中任一项所述的方法，其特征在于，在所述步骤 S1 中，所述混合为在室温下搅拌约 8 小时或更长时间，优选约 24 小时或更长时间。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法, 其特征在于, 在所述步骤 S1 中, 所述第一有机溶剂为极性有机溶剂, 例如选自二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈、二氯甲烷、四氢呋喃和乙醇中的一种、两种或更多种, 优选为 DMF。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法, 其特征在于, 在所述步骤 S1 中, 所述酰胺缩合剂为三乙胺、1-羟基苯并三氮唑(HOBt)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)的组合。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的方法, 其特征在于, 在所述步骤 S1 中, 将所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、所述 2,5-二甲酸-3,6-二氨基吡嗪、三乙胺、HOBt 和 EDC.HCl 在约 0°C 至 5°C、优选约 0°C 至 2°C 下滴加到 DMF 中, 然后在室温下搅拌, 以得到所述式 1-Int 的中间体。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法, 其特征在于, 在所述步骤 S1 中, 所述式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐是由所述式 A 表示的单一化合物的形式, 或者各自由所述式 A 表示的两种或更多种不同化合物的混合物的形式, 优选为



10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其特征在于, 在所述步骤 S2 中, 使所述式 1-Int 的中间体在碱性条件并且在适合的温度下在所述溶剂中水解, 然后酸化反应混合物, 以得到 3,6-二氨基-2,5-二{N-[(1R)-1-羧基-2-羟基乙基]氨甲酰基}吡嗪。

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述第二有机溶剂为极性有机溶剂, 特别是选自四氢呋喃、甲醇、乙腈、乙醇、1,4-二氧六环及其任意组合, 优选为四氢呋喃、乙腈、1,4-二氧六环。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的方法, 其特征在于, 在所述步骤 S2 中, 所述溶剂为水。

13. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的方法，其特征在于，在所述步骤 S2 中，所述溶剂为水和所述第二有机溶剂的混合物。

14. 根据权利要求 1 至 13 中任一项所述的方法，其特征在于，在所述步骤 S2 中，所述溶剂包含碱金属氢氧化物，例如选自 LiOH、NaOH 和 KOH 中的一种、两种或更多种，优选为 LiOH。

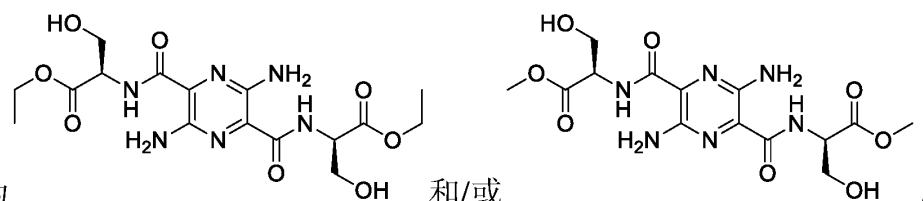
15. 根据权利要求 1 至 14 中任一项所述的方法，其特征在于，在所述步骤 S2 中，所述酸化是在所述水解完成后，通过用酸调节反应混合物的 pH 值来进行的。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述 pH 值为约 2 至 4，优选约 3。

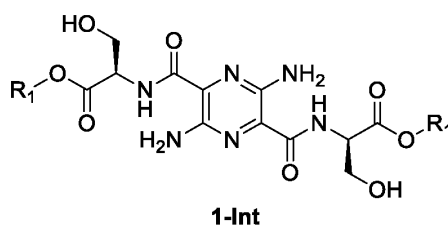
17. 根据权利要求 1 至 16 中任一项所述的方法，其特征在于，在所述步骤 S2 中，在所述酸化之后，再将反应混合物混合约 1 至 4 小时，优选约 2 小时。

18. 根据权利要求 15 至 17 中任一项所述的方法，其特征在于，所述酸为选自醋酸、三氟乙酸、硫酸、柠檬酸和盐酸中的一种、两种或更多种。

19. 根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的方法，其特征在于，在所述步骤 S2 中，所述式 1-Int 的中间体为由所述式 1-Int 表示的单一化合物的形式，或者各自由所述式 1-Int 表示的两种或更多种不同化合物的混合物的形式，优选为

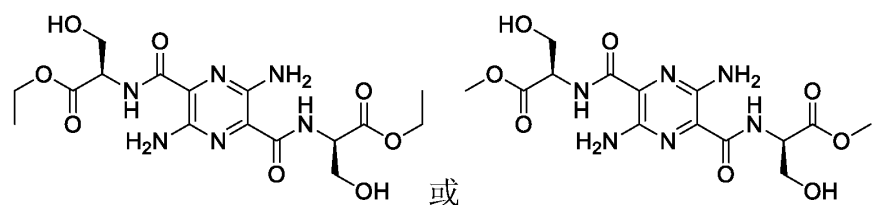


20. 式 1-Int 的化合物：

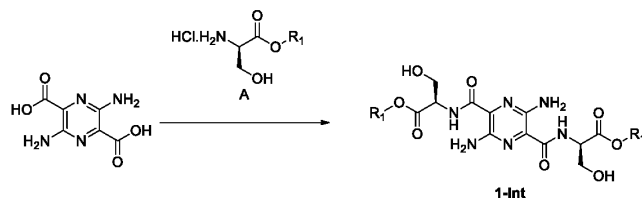


其中每个 R_1 可以相同或不同，且独立地选自 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{2-8} 炔基和 C_{3-8} 环烷基，优选为 C_{1-6} 烷基，更优选为 C_{1-3} 烷基，更优选为甲基或乙基。

21. 根据权利要求 20 所述的化合物，其为：



22. 制备权利要求 20 或 21 的式 1-Int 的化合物的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：



步骤 S1. 使式 A 的 D-丝氨酸酯盐酸盐、2,5-二甲酸-3,6-二氨基吡嗪和酰胺缩合剂在第一有机溶剂中进行酰胺化反应，得到所述式 1-Int 的化合物；
优选地，其中所述步骤 S1 如权利要求 2 至 9 中任一项所述。