



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

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

(11)



1-0026145

(51)⁷ C07D 207/16; A61K 31/445; C07D 405/12; C07D 209/16; A61K 31/40; A61P 31/20 (13) B

(21) 1-2016-01770

(22) 22/10/2014

(86) PCT/EP2014/072690 22/10/2014

(87) WO 2015/059212 30/04/2015

(30) 13189880.1 23/10/2013 EP

(45) 25/11/2020 392

(43) 26/09/2016 342A

(73) Janssen Sciences Ireland UC (IE)

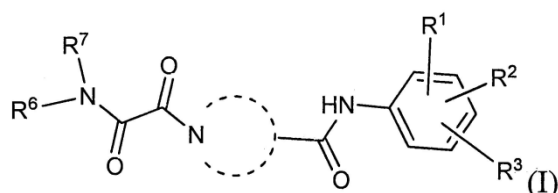
Eastgate Village, Eastgate, Little Island, Co Cork, Ireland

(72) VANDYCK, Koen (BE); HACHÉ, Geerwin Yvonne Paul (BE); KESTELEYN, Bart
Rudolf Romanie (BE); RABOISSON, Pierre Jean-Marie Bernard (FR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT CARBOXAMIT, DƯỢC PHẨM VÀ TỔ HỢP CHỨA NÓ ĐỂ ĐIỀU
TRỊ BỆNH VIÊM GAN B

(57) Sáng chế đề cập đến chất ức chế quá trình sao chép của HBV có công thức (I):



bao gồm các dạng đồng phân lập thể, và muối, hydrat, solvat của nó, trong đó R¹ đến R⁷ có nghĩa như được xác định trong bản mô tả này. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa nó, riêng rẽ hoặc kết hợp với chất ức chế HBV khác, để điều trị bệnh HBV.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất ức chế quá trình sao chép của HBV. Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm và tổ hợp chứa hợp chất này để điều trị HBV.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virut viêm gan B (HBV) là virut có vỏ ngoài, chứa ADN sợi kép một phần (dsDNA) thuộc họ Hepadnavirus (*Hepadnaviridae*). Bộ gen của nó chứa 4 khung đọc chồng lặp: gen tiền lõi/lõi; gen polymeraza; gen L, M, và S, mã hóa 3 protein vỏ ngoài; và gen X.

Khi nhiễm vào vật chủ, bộ gen ADN sợi kép một phần (ADN vòng tháo xoắn; rcDNA) được chuyển hóa thành ADN vòng kín cộng hóa trị (cccDNA) trong nhân của tế bào chủ và các mARN virut sẽ được phiên mã. Khi được tạo vỏ capsit, ARN tiền bộ gen (pgRNA), cũng mã hóa protein lõi và Pol, dùng làm khuôn để phiên mã ngược, tạo ra bộ gen ADN mạch kép (dsDNA) một phần (rcDNA) trong nucleocapsit.

HBV gây dịch bệnh ở các khu vực ở châu Á và châu Phi, và nó là bệnh địa phương ở Trung Quốc. HBV lây nhiễm cho khoảng 2 tỉ người trên thế giới, trong đó khoảng 350 triệu người đã phát triển thành bệnh lây nhiễm mạn tính. Virut gây bệnh viêm gan B và lây nhiễm mạn tính có mối tương quan với nguy cơ phát triển mạnh bệnh xơ gan và caxinom tế bào gan.

Việc lây truyền virut viêm gan B do tiếp xúc với máu hoặc dịch cơ thể có virut, trong khi ADN virut được phát hiện thấy trong nước bọt, nước mắt và nước tiểu của người mang mầm bệnh mạn tính có hiệu giá ADN cao trong huyết thanh.

Hiện nay, đã có vacxin hữu hiệu và được dung nạp tốt, nhưng việc điều trị trực tiếp hiện bị hạn chế ở interferon và các chất kháng virut sau; tenofovir, lamivudin, adefovir, entecavir và telbivudin.

Ngoài ra, heteroaryldihydropyrimidin (HAP) cũng đã được xác định là nhóm chất ức chế HBV trong nuôi cấy mô và trên mô hình động vật (Weber et al., Antiviral Res.

54: 69–78).

WO2013/006394, công bố ngày 10/1/2013, đề cập đến hợp chất sulphamoyl-arylmit có hoạt tính kháng HBV.

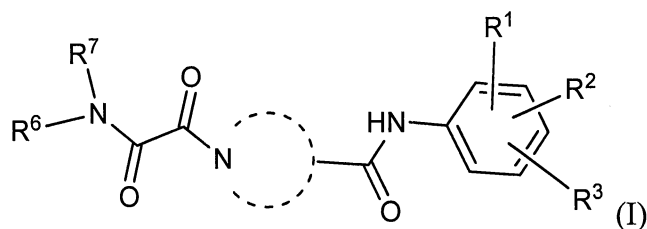
WO/2013/096744, công bố ngày 26/6/2013 đề cập đến hợp chất có hoạt tính kháng HBV.

Trong số các vấn đề mà các chất kháng virus hướng đến HBV có thể gặp phải là độc tính, tính gây đột biến, không có tính chọn lọc, hiệu quả kém, độ sinh khả dụng thấp, và khó tổng hợp.

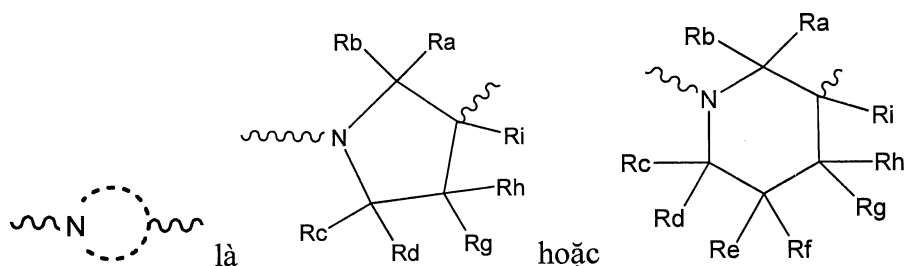
Vì thế, hiện nay vẫn có nhu cầu về các chất ức chế HBV khác có thể khắc phục được ít nhất là một trong số các nhược điểm nêu trên hoặc có các ưu điểm khác như hiệu lực tăng hoặc cửa sổ an toàn tăng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

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



hoặc chất đồng phân lập thể hoặc tautome của nó, trong đó:



mỗi trong số Ra, Rb, Rc, Rd, Re, Rf và Rg độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro và metyl;

Rh là hydro;

Ri là hydro;

R¹, R² và R³ độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, flo, clo, brom, -CHF₂,

CH_2F , $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ và metyl;

R^6 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm $\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl}$ và vòng no có từ 3 đến 7 cạnh tùy ý chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại, mỗi nguyên tử khác loại này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm O, S và N, $\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl}$ hoặc vòng no có từ 3 đến 7 cạnh này được thể tùy ý bằng một hoặc nhiều phần tử thể được chọn từ nhóm bao gồm flo, $\text{C}_1\text{-C}_3\text{alkyl}$ được thể tùy ý bằng một hoặc nhiều flo, $-\text{CN}$, OH;

R^7 là hydro;

hoặc muối được dụng của nó hoặc solvat của nó.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I), và chất mang được dụng.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức (I) để dùng làm thuốc, tốt hơn là để dùng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị nhiễm HBV ở động vật có vú.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tổ hợp của hợp chất có công thức (I), và chất ức chế HBV khác.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Thuật ngữ " $\text{C}_{1-3}\text{alkyl}$ " hoặc $\text{C}_1\text{-C}_4\text{alkyl}$ dưới dạng một nhóm độc lập hoặc một phần của nhóm dùng để chỉ gốc hydrocarbyl có công thức $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ trong đó n là số nằm trong khoảng từ 1 đến 3. Trong trường hợp $\text{C}_{1-3}\text{alkyl}$ được kết hợp với một gốc khác, nó được dùng để chỉ công thức C_nH_{2n} . Nhóm $\text{C}_{1-3}\text{alkyl}$ chứa từ 1 đến 3 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là 1 đến 2 nguyên tử cacbon. $\text{C}_{1-3}\text{alkyl}$ bao gồm toàn bộ các nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 3 nguyên tử cacbon, và vì thế bao gồm ví dụ metyl, etyl, *n*-propyl, và *i*-propyl.

$\text{C}_{1-4}\text{alkyl}$ dưới dạng một nhóm độc lập hoặc một phần của nhóm dùng để chỉ gốc hydrocarbon no mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon như nhóm được định nghĩa cho $\text{C}_{1-3}\text{alkyl}$ và butyl và các nhóm tương tự.

$\text{C}_{1-6}\text{alkyl}$, $\text{C}_{2-6}\text{alkyl}$ và $\text{C}_{3-6}\text{alkyl}$ dưới dạng một nhóm độc lập hoặc một phần của nhóm dùng để chỉ gốc hydrocarbon no mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon, hoặc từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon hoặc từ 3 đến 6 nguyên tử cacbon như

các nhóm được định nghĩa cho C₁₋₄alkyl và pentyl, hexyl, 2-metylbutyl và các nhóm tương tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vòng no có từ 3 đến 7 cạnh” chỉ hydrocacbon vòng no có 3, 4, 5, 6 hoặc 7 nguyên tử cacbon và có đặc điểm chung với xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl và xycloheptyl hoặc C₃-, C₄-, C₅-, C₆- hoặc C₇-xycloalkyl.

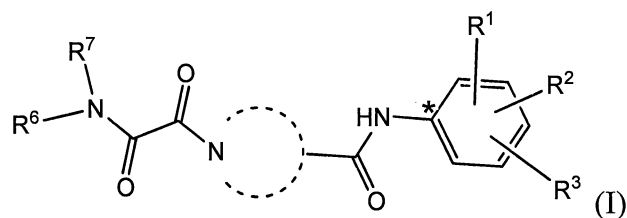
Các vòng no này tùy ý chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại, sao cho ít nhất một nguyên tử cacbon được thay thế bằng nguyên tử khác loại được chọn từ N, O và S, cụ thể là từ N và O. Các ví dụ bao gồm oxetan, tetrahydro-2H-pyranyl, piperidinyl, tetrahydrofuranyl, morpholinyl, thiolan 1,1-dioxit và pyrrolidinyl. Được ưu tiên là hydrocacbon vòng no có 3 hoặc 4 nguyên tử cacbon và 1 nguyên tử oxy. Các ví dụ bao gồm oxetan, và tetrahydrofuranyl.

Thuật ngữ halo và halogen thường để chỉ flo, clo, brom hoặc iot. Halogen được ưu tiên là flo và clo.

Cần lưu ý là các vị trí gốc trên gốc phân tử bất kỳ được sử dụng trong định nghĩa có thể là có vị trí bất kỳ trên gốc đó miễn là nó bền về mặt hóa học. Ví dụ, pyridyl bao gồm 2-pyridyl, 3-pyridyl và 4-pyridyl; pentyl bao gồm 1-pentyl, 2-pentyl và 3-pentyl.

Một liên kết thể hiện bằng  chỉ ra cách gắn của mảnh được nói đến với cấu trúc chính của phân tử.

Các vị trí được chỉ ra trên phenyl (ví dụ ortho, meta và/hoặc para) được chỉ ra so với liên kết nối phenyl với cấu trúc chính. Một ví dụ liên quan đến vị trí của R¹, vị trí bất kỳ được chỉ định so với nitơ (*) được kết hợp với cấu trúc chính:



Khi biến số bất kỳ (ví dụ, halogen hoặc C₁₋₄alkyl) xuất hiện nhiều hơn một lần trong thành phần bất kỳ, thì mỗi định nghĩa độc lập với nhau.

Với việc sử dụng để điều trị bệnh, muối của hợp chất có công thức (I) là muối trong đó ion trái dấu được chấp nhận về mặt dược lý hoặc sinh lý. Tuy nhiên, muối có ion trái dấu không được chấp nhận về mặt dược lý cũng có thể thấy là được sử dụng, ví dụ, trong điều chế hoặc tinh chế hợp chất được dụng có công thức (I). Tất cả các muối, dù được dụng hay không đều được bao gồm trong giới hạn của sáng chế.

Dạng muối cộng được dụng hoặc chấp nhận được về mặt sinh lý mà hợp chất theo sáng chế có thể tạo ra có thể được điều chế thuận lợi bằng cách sử dụng axit thích hợp, như, ví dụ, axit vô cơ như axit hydrohalic, ví dụ axit clohydric hoặc bromhydric; sulfuric; hemisulfuric, nitric; phosphoric và các axit tương tự; hoặc axit hữu cơ như, ví dụ, axit axetic, aspartic, dodexylsulfuric, heptanoic, hexanoic, nicotinic, propanoic, hydroxyaxetic, lactic, pyruvic, oxalic, malonic, succinic, maleic, fumaric, malic, tartaric, xitric, metansulfonic, etansulfonic, benzensulfonic, *p*-toluensulfonic, xyclamic, salixylic, *p*-aminosalixylic, pamoic và các axit tương tự.

Ngược lại, dạng muối cộng axit có thể được chuyển hóa bằng cách xử lý với bazơ thích hợp thành dạng bazơ tự do.

Thuật ngữ “muối” cũng bao gồm các hydrat và dạng cộng dung môi mà hợp chất theo sáng chế có thể tạo ra. Ví dụ về các dạng này là, ví dụ hydrat, alcolat và chất tương tự.

Hợp chất theo sáng chế cũng có thể tồn tại ở tautome của nó. Ví dụ, tautome của nhóm amit ($-C(=O)-NH-$) là rượu imino ($-C(OH)=N-$). Tautome, mặc dù không được chỉ rõ trong công thức cấu trúc được trình bày trong bản mô tả này, cũng được dự định được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ dạng đồng phân hóa học lập thể của hợp chất theo sáng chế, như được sử dụng trong bản mô tả này, xác định cho tất cả các hợp chất có thể được tạo ra từ cùng các nguyên tử được liên kết bằng cùng thứ tự liên kết nhưng có cấu trúc ba chiều khác nhau mà không thể hoán đổi cho nhau, mà hợp chất theo sáng chế có thể có. Trừ khi được đề cập hoặc được quy định khác, chỉ định hóa học của hợp chất bao gồm hỗn hợp của tất cả các dạng đồng phân hóa học lập thể có thể mà hợp chất này có thể có. Hỗn hợp này có thể bao gồm tất cả các chất đồng phân không đối quang và/hoặc chất đồng phân đối ảnh của cấu trúc phân tử cơ bản của hợp chất này. Tất cả

các dạng đồng phân hóa học lập thể của hợp chất theo sáng chế cả ở dạng tinh khiết hoặc trong hỗn hợp với nhau được dự định được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

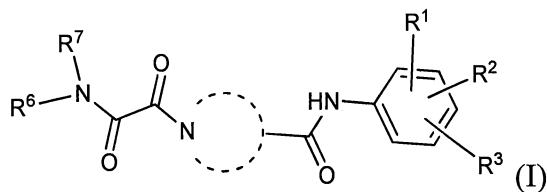
Các dạng đồng phân lập thể tinh khiết của hợp chất và chất trung gian như được đề cập trong bản mô tả này được định nghĩa là chất đồng phân hầu như không chứa các dạng đồng phân đối ảnh hoặc đồng phân không đối quang khác của cùng một cấu trúc phân tử cơ bản của hợp chất hoặc chất trung gian này. Cụ thể, thuật ngữ “tinh khiết về mặt đồng phân lập thể” chỉ hợp chất hoặc chất trung gian có lượng dư đồng phân lập thể ít nhất là 80% (tức là, tối thiểu 90% một chất đồng phân và tối đa 10% các chất đồng phân có thể khác) lên đến lượng dư đồng phân lập thể là 100% (tức là 100% một chất đồng phân và không có chất đồng phân khác), cụ thể hơn, hợp chất hoặc chất trung gian có lượng dư đồng phân lập thể là 90% lên đến 100%, cụ thể hơn nữa là có lượng dư đồng phân lập thể là 94% lên đến 100% và cụ thể nhất là có lượng dư đồng phân lập thể là 97% lên đến 100%. Thuật ngữ “tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh” và “tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang” nên được hiểu theo cách tương tự, mà sau đó, liên quan đến lượng dư đồng phân đối ảnh, có một cách tương ứng lượng dư đồng phân lập thể của hỗn hợp đang xem xét.

Các dạng đồng phân lập thể tinh khiết của hợp chất và chất trung gian theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, chất đồng phân đối ảnh có thể được tách ra khỏi nhau bằng cách kết tinh chọn lọc muối đồng phân không đối quang của chúng với axit hoặc bazơ hoạt động tùy ý. Ví dụ của chúng là axit tartric, axit dibenzoyltartric, axit ditoluoyltartric và axit camphosulfonic. Theo cách khác, chất đồng phân đối ảnh có thể được tách ra bằng kỹ thuật sắc ký bằng cách sử dụng pha tĩnh không đối xứng. Dạng đồng phân hóa học lập thể tinh khiết này cũng có thể thu được từ dạng đồng phân hóa học lập thể tinh khiết tương ứng của nguyên liệu khởi đầu thích hợp, miễn là phản ứng xảy ra theo cách đặc hiệu lập thể. Tốt hơn là, nếu chất đồng phân lập thể đặc hiệu là mong muốn, hợp chất này sẽ được tổng hợp bằng phương pháp điều chế đặc hiệu lập thể. Các phương pháp này sẽ thuận lợi sử dụng nguyên liệu khởi đầu tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh.

Các dạng đồng phân không đối quang có công thức (I) có thể thu được riêng rẽ bằng các phương pháp thông thường. Phương pháp tách vật lý thích hợp có thể thuận lợi được sử dụng là, ví dụ, kết tinh chọn lọc và sắc ký, ví dụ sắc ký cột.

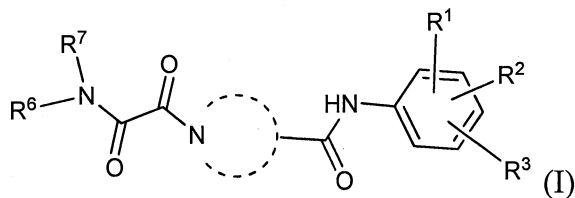
Sáng chế cũng dự định bao gồm tất cả các chất đồng vị của các nguyên tử xuất hiện trên hợp chất theo sáng chế. Chất đồng vị bao gồm các nguyên tử có cùng số nguyên tử nhưng khác số khối. Bằng cách ví dụ và không giới hạn, chất đồng vị của hydro bao gồm triti và đơteri. Chất đồng vị của cacbon bao gồm C-13 và C-14.

Mỗi khi được sử dụng dưới đây, thuật ngữ “hợp chất có công thức (I)”,

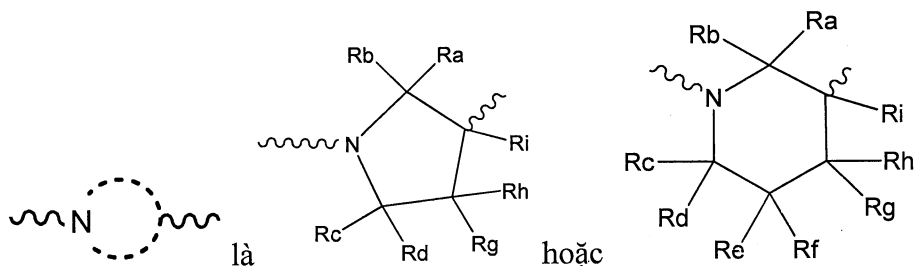


hoặc, “hợp chất theo sáng chế” hoặc thuật ngữ tương tự có nghĩa là bao gồm hợp chất có công thức chung (I), (II), (III), muối, dạng đồng phân lập thể và hỗn hợp triệt quang hoặc phân nhóm bất kỳ của nó.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):



hoặc chất đồng phân lập thể hoặc tautome của nó, trong đó:



mỗi trong số Ra, Rb, Rc, Rd, Re, Rf và Rg độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro và methyl;

Rh là hydro;

Ri là hydro;

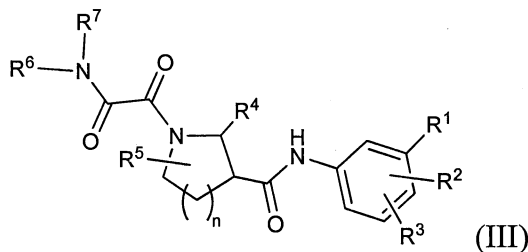
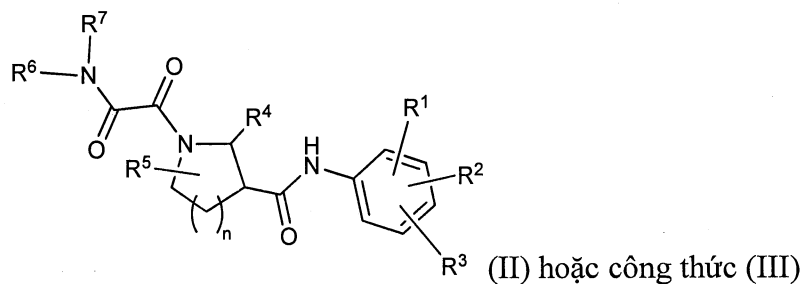
R¹, R² và R³ độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, flo, clo, brom, -CHF₂, -CH₂F, -CF₃, -CN và methyl;

R^6 được chọn từ nhóm bao gồm C_1 - C_6 alkyl và vòng no có từ 3 đến 7 cạnh tùy ý chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại, mỗi nguyên tử khác loại này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm O, S và N, C_1 - C_6 alkyl hoặc vòng no có từ 3 đến 7 cạnh này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm flo, C_1 - C_3 alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều flo, -CN, OH;

R^7 là hydro;

hoặc muối được dụng của nó hoặc solvat của nó.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (II)



hoặc chất đồng phân lập thể hoặc tautome của nó, trong đó:

n là số nguyên 1 hoặc 2;

R^1 , R^2 và R^3 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, flo, clo, brom, -CHF₂, -CH₂F, -CF₃, -CN và metyl;

R^4 và R^5 độc lập được chọn từ hydro hoặc metyl;

R^6 được chọn từ nhóm bao gồm C_1 - C_6 alkyl và vòng no có từ 3 đến 7 cạnh tùy ý chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại, mỗi nguyên tử khác loại này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm O, S và N, C_1 - C_6 alkyl hoặc vòng no có từ 3 đến 7 cạnh này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm flo, C_1 - C_3 alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều flo, -CN, OH;

R^7 là hydro;

hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó.

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (II) hoặc (III), trong đó R^6 được chọn từ nhóm bao gồm C_1 - C_6 alkyl và vòng no có từ 3 đến 7 cạnh tùy ý chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại, mỗi nguyên tử khác loại này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm O, S và N, C_1 - C_6 alkyl hoặc vòng no có từ 3 đến 7 cạnh này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm flo, C_1 - C_3 alkyl, -CN, OH.

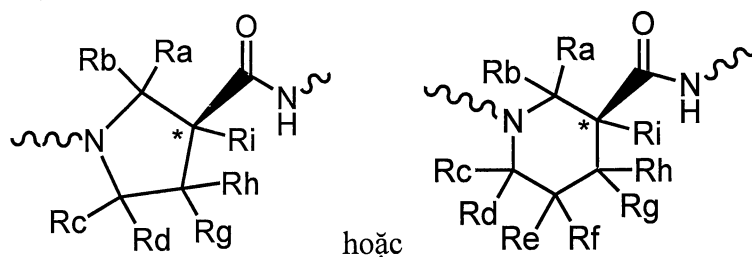
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất trong đó R^1 được chọn từ hydro, flo, clo, -CHF₂, -CN, -CF₃ hoặc metyl. Theo phương án khác, ít nhất hai trong số R^1 , R^2 và R^3 là flo, clo hoặc brom. Theo phương án khác, R^1 không là hydro.

Theo một phương án khác, R^4 là metyl.

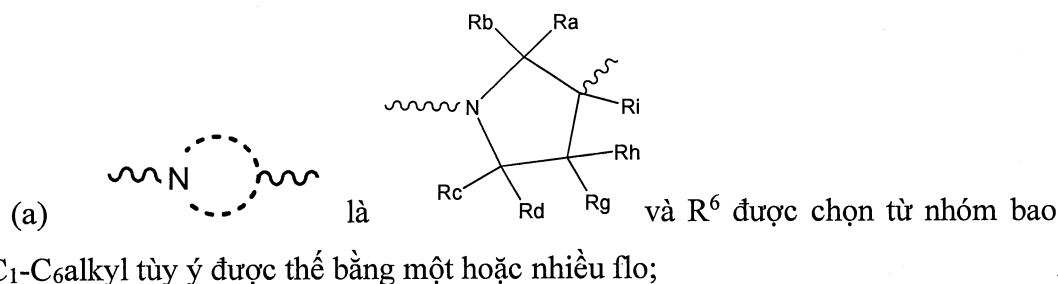
Theo một phương án khác nữa, hợp chất theo sáng chế được bộc lộ trong đó R^6 chứa vòng no có từ 3 đến 7 cạnh tùy ý chứa một nguyên tử oxy, vòng no có từ 3 đến 7 cạnh này tùy ý được thế bằng metyl. Tốt hơn là, R^6 là vòng no có 4 hoặc 5 cạnh chứa một nguyên tử oxy, vòng no có 4 hoặc 5 cạnh này tùy ý được thế bằng metyl.

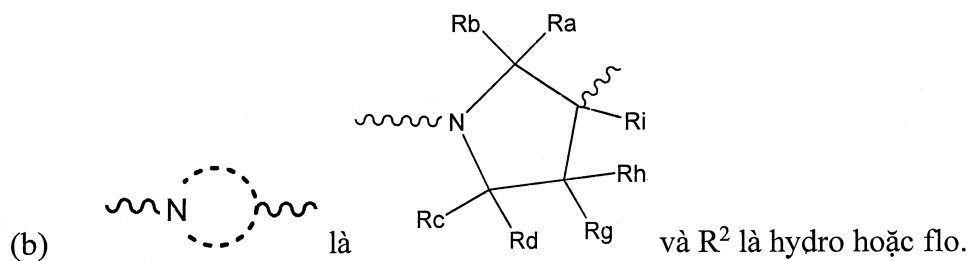
Theo một phương án khác, R^6 là C_1 - C_6 alkyl mạch nhánh tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều flo.

Hợp chất được ưu tiên theo sáng chế được đề xuất trong đó cấu hình hóa học lập thể của nguyên tử (*) là như sau:



Một phương án khác của sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I), (II) hoặc (III) hoặc phân nhóm bất kỳ của nó như được đề cập trong phương án bất kỳ trong số các phương án khác trong đó một hoặc nhiều giới hạn sau đây sử dụng:





(c) R¹ và R³ độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, flo, clo -CN và methyl.

(d) R² là hydro hoặc flo và R¹ và R³ độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, flo, clo và -CN.

(e) R⁶ bao gồm C₃-C₆alkyl mạch nhánh tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều flo, hoặc trong đó R⁶ bao gồm C₃-C₆xycloalkyl trong đó C₃-C₆xycloalkyl này được thế bằng C₁-C₃alkyl được thế bằng một hoặc nhiều flo.

Kết hợp khác của các phương án bất kỳ trong số các phương án cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Hợp chất được ưu tiên theo sáng chế là các hợp chất 1-35 hoặc chất đồng phân lập thể hoặc tautome của nó như được nêu trong Bảng 1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị hoặc phòng ngừa của hợp chất có công thức (I) như được xác định trong bản mô tả này, và chất mang dược dụng. Lượng có hiệu quả phòng ngừa trong ngữ cảnh này là lượng đủ để ngăn ngừa sự nhiễm HBV ở đối tượng có nguy cơ bị nhiễm. Lượng có hiệu quả điều trị trong ngữ cảnh này là lượng đủ để làm ổn định tình trạng nhiễm HBV, để làm giảm sự nhiễm HBV, hoặc tiết trừ sự nhiễm HBV, ở đối tượng bị nhiễm. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình bào chế dược phẩm như được xác định trong bản mô tả này, bao gồm bước trộn kỹ chất mang dược dụng với lượng có hiệu quả điều trị hoặc phòng ngừa của hợp chất có công thức (I), như được xác định trong bản mô tả này.

Vì thế, hợp chất theo sáng chế hoặc phân nhóm bất kỳ của nó có thể được bào chế thành các dạng dược phẩm khác nhau theo mục đích sử dụng. Chế phẩm thích hợp có thể là tất cả các chế phẩm được nêu thường được sử dụng cho thuốc dùng toàn thân. Để bào chế dược phẩm theo sáng chế, lượng có hiệu quả của hợp chất cụ thể, tùy ý ở dạng muối cộng, làm thành phần hoạt tính được kết hợp vào hỗn hợp trộn nhuyển với chất mang dược dụng, chất mang này có thể ở nhiều dạng khác nhau phụ thuộc vào dạng chế phẩm mong muốn để dùng. Các dược phẩm này mong muốn ở dạng liều đơn

thích hợp, đặc biệt là, để dùng qua đường miệng, trực tràng, qua da, hoặc bằng cách tiêm ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, trong quá trình bào chế được phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng, môi trường được bất kỳ trong số các môi trường được thông dụng có thể được sử dụng như, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và môi trường tương tự trong trường hợp chế phẩm lỏng dùng qua đường miệng như hỗn dịch, sirô, cồn ngọt, nhũ tương và dung dịch; hoặc chất mang rắn như tinh bột, đường, cao lanh, chất làm trơn, chất gắn kết, chất làm rã và chất tương tự trong trường hợp bột, viên tròn, viên nang, và viên nén. Do khía cạnh dễ sử dụng, viên nén và viên nang là dạng đơn vị liều dùng qua đường miệng thuận tiện nhất, trong trường hợp này, chất mang rắn được dùng được sử dụng. Với chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa, chất mang thường bao gồm nước vô trùng, ít nhất là phần lớn, mặc dù các thành phần khác, ví dụ, để hỗ trợ tính tan, có thể được bao gồm. Dung dịch tiêm được, ví dụ, có thể được bào chế trong đó chất mang chứa dung dịch nước muối, dung dịch glucoza hoặc hỗn hợp của dung dịch nước muối và glucoza. Hỗn dịch tiêm được cũng có thể được bào chế, trong trường hợp đó chất mang lỏng thích hợp, chất tạo hỗn dịch và các chất tương tự được sử dụng. Cũng được bao gồm là chế phẩm dạng rắn được dự định là được chuyển hóa, ngay trước khi dùng, thành chế phẩm dạng lỏng. Trong chế phẩm thích hợp để dùng qua da, chất mang tùy ý bao gồm chất tăng thấm và/hoặc chất làm ướt thích hợp, tùy ý được kết hợp với chất phụ gia thích hợp có bản chất bất kỳ với tỷ lệ nhỏ, chất phụ gia này không gây tác động có hại đáng kể trên da. Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được dùng bằng cách xông hoặc bơm vào qua đường miệng ở dạng dung dịch, hỗn dịch hoặc bột khô bằng cách sử dụng hệ thống đưa vào cơ thể đã biết trong lĩnh vực bất kỳ.

Đặc biệt thuận lợi khi bào chế được phẩm được nêu trên ở dạng liều đơn vị để thuận lợi cho việc sử dụng và sự đồng nhất về mặt liều lượng. Dạng liều đơn vị như được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ các đơn vị riêng về mặt vật lý thích hợp làm liều đơn vị, mỗi đơn vị chứa lượng định trước của thành phần hoạt tính được tính để tạo ra tác dụng điều trị bệnh mong muốn khi kết hợp với chất mang được dụng yêu cầu. Ví dụ về dạng liều đơn vị như vậy là viên nén (bao gồm viên nén có rãnh hoặc được bọc), viên nang, viên tròn, thuốc đạn, gói bột, viên nhện, dung dịch tiêm được hoặc hỗn dịch và dạng tương tự, và nhiều liều riêng biệt của nó.

Hợp chất có công thức (I) có hoạt tính làm chất ức chế chu kỳ sao chép của HBV và có thể được sử dụng trong điều trị và phòng ngừa sự nhiễm HBV hoặc các

bệnh liên quan đến HBV. Các bệnh liên quan đến HBV bao gồm bệnh xơ gan tiến triển, viêm và hoại tử dẫn đến bệnh xơ gan, bệnh gan giai đoạn cuối, và caxinom tế bào gan.

Do đặc tính kháng virus của chúng, đặc biệt là đặc tính kháng HBV của chúng, hợp chất có công thức (I) hoặc phân nhóm bất kỳ của nó, hữu dụng trong việc ức chế chu kỳ sao chép của HBV, cụ thể là trong điều trị cho động vật máu nóng, cụ thể là người, bị nhiễm HBV, và để phòng ngừa sự nhiễm HBV. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị cho động vật máu nóng, cụ thể là người, bị nhiễm HBV, hoặc có nguy cơ nhiễm HBV, phương pháp này bao gồm việc dùng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của hợp chất có công thức (I).

Vì thế, hợp chất có công thức (I), như được xác định trong bản mô tả này, có thể được dùng làm thuốc, cụ thể là thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa sự nhiễm HBV. Việc sử dụng làm thuốc này hoặc phương pháp điều trị bao gồm việc dùng theo đường toàn thân cho đối tượng bị nhiễm HBV hoặc đối tượng dễ bị nhiễm HBV lượng có hiệu quả chống lại tình trạng bệnh liên quan đến sự nhiễm HBV hoặc lượng có hiệu quả ngăn ngừa sự nhiễm HBV.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa nhiễm HBV.

Nhìn chung, dự định rằng lượng hàng ngày có hiệu quả kháng virus có thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến khoảng 50 mg/kg, hoặc khoảng 0,01 đến khoảng 30 mg/kg thể trọng. Có thể thích hợp khi dùng liều yêu cầu là 2, 3, 4 hoặc nhiều hơn 4 liều dưới liều ở các khoảng nghỉ thích hợp trong cả ngày. Liều dưới liều này có thể được bào chế theo công thức thành dạng liều đơn vị, ví dụ, chứa khoảng 1 đến khoảng 500 mg, hoặc khoảng 1 đến khoảng 300 mg, hoặc khoảng 1 đến khoảng 100 mg, hoặc khoảng 2 đến khoảng 50 mg thành phần hoạt tính trong mỗi dạng liều đơn vị.

Sáng chế đề cập đến hỗn hợp của hợp chất có công thức (I) hoặc phân nhóm bất kỳ của nó, như được xác định trong bản mô tả này với chất kháng HBV khác. Thuật ngữ “hỗn hợp” có thể đề cập đến sản phẩm hoặc kit chứa (a) hợp chất có công thức (I), như được xác định ở trên, và (b) ít nhất một hợp chất khác có khả năng điều trị sự nhiễm HBV (dưới đây được gọi là chất kháng HBV), ở dạng chế phẩm kết hợp để dùng đồng thời, riêng biệt hoặc lần lượt trong điều trị sự nhiễm HBV. Theo một

phương án, sáng chế đề cập đến hỗn hợp của hợp chất có công thức (I) hoặc phân nhóm bất kỳ của nó với ít nhất một chất kháng HBV. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến hỗn hợp của hợp chất có công thức (I) hoặc phân nhóm bất kỳ của nó với ít nhất hai chất kháng HBV. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến hỗn hợp của hợp chất có công thức (I) hoặc phân nhóm bất kỳ của nó với ít nhất ba chất kháng HBV. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến hỗn hợp của hợp chất có công thức (I) hoặc phân nhóm bất kỳ của nó với ít nhất 4 chất kháng HBV.

Thuật ngữ chất kháng HBV cũng bao gồm hợp chất có khả năng điều trị sự nhiễm HBV thông qua sự điều biến miễn dịch. Ví dụ về chất điều biến miễn dịch là interferon- α (IFN- α), interferon- α được peg hóa hoặc chất kích thích hệ thống miễn dịch bẩm sinh như chất chủ vận thụ thể giống Toll 7 và/hoặc 8. Một phương án của sáng chế đề cập đến hỗn hợp của hợp chất có công thức (IA) hoặc phân nhóm bất kỳ của nó, như được xác định trong bản mô tả này với hợp chất điều biến miễn dịch, cụ thể hơn là chất chủ vận thụ thể giống Toll 7 và/hoặc 8.

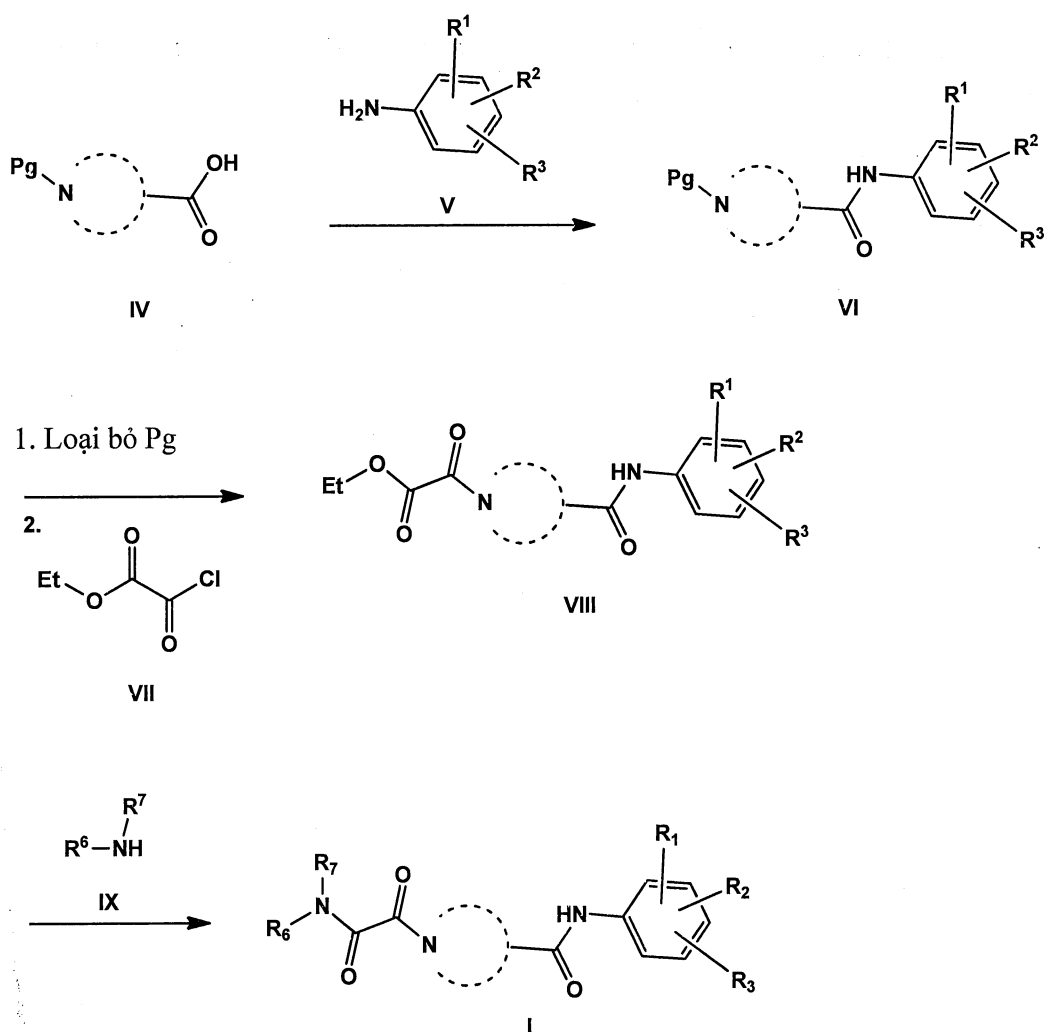
Hỗn hợp của chất kháng HBV đã biết trước đó, như interferon- α (IFN- α), interferon- α được peg hóa, 3TC, adefovir hoặc hỗn hợp của chúng, và hợp chất có công thức (I) hoặc phân nhóm bất kỳ của nó có thể được dùng làm thuốc trong phương pháp trị liệu kết hợp.

Quy trình tổng hợp chung:

Phần tử thế được biểu diễn bằng $R^{1,2,3}$, R^7 hoặc R^6 trong phần tổng hợp chung này có nghĩa là bao gồm phần tử thế bất kỳ hoặc các loại có tính phản ứng thích hợp để biến đổi thành phần tử thế $R^{1,2,3}$ hoặc R^6 bất kỳ theo sáng chế mà không gây khó khăn quá mức cho người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

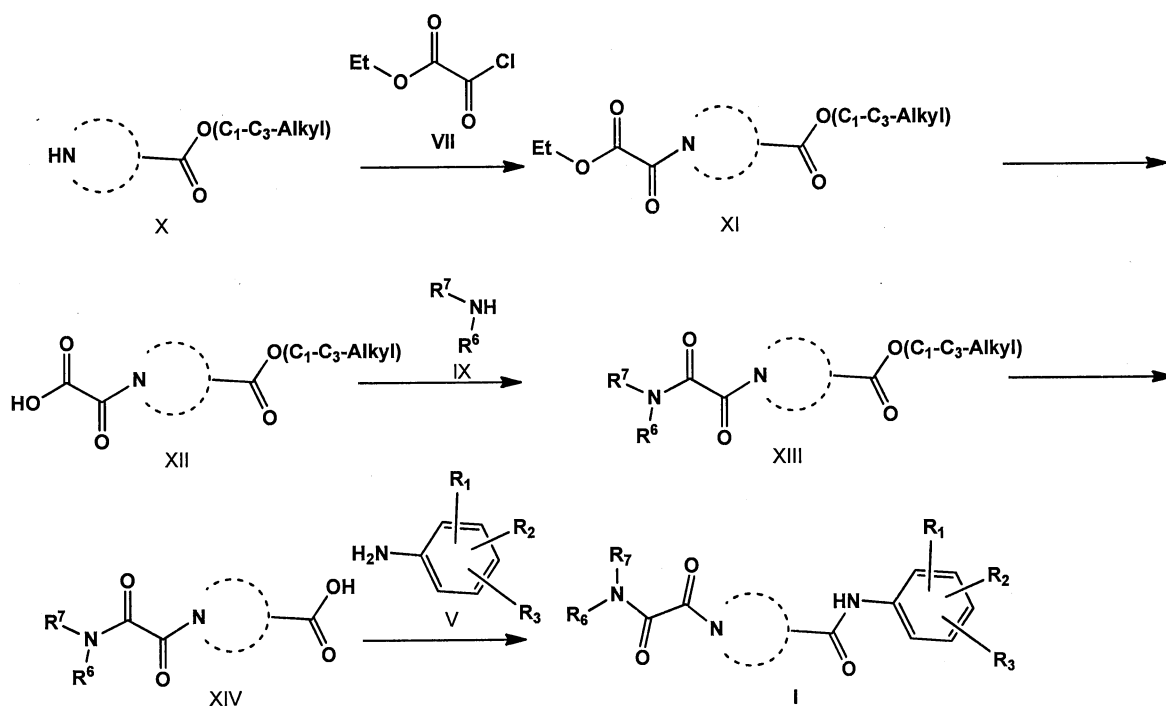
Quy trình tổng hợp có thể có của hợp chất có công thức chung (I) được mô tả trong sơ đồ 1. Axit aminocarboxylic được bảo vệ N (khi Pg là nhóm bảo vệ) có công thức chung (IV) có thể được phản ứng chọn lọc với anilin có công thức chung (V), ví dụ bằng cách bổ sung anilin (V) vào hỗn hợp của hợp chất (IV), và chất ghép cặp (ví dụ HATU) trong dung môi không proton (ví dụ diclometan, DMF), cùng với bazơ hữu cơ (ví dụ triethylamin) thu được hợp chất (VI). Nhóm bảo vệ (Pg) sau đó có thể được khử bảo vệ theo phương pháp đã biết (ví dụ với nhóm boc, việc khử bảo vệ bao gồm bước bổ sung axit mạnh như HCl. Nhóm bảo vệ benzyl được loại bỏ thông qua phản

ứng hydro hóa có xúc tác bằng phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.) tạo thành muối amin mà sau khi loại bỏ dung môi và bổ sung bazơ (ví dụ diisopropyletylamin) có thể được phản ứng thêm trong một bình với etyl clooxoacetat ở nhiệt độ giảm trong dung môi không proton (ví dụ diclometan) để thu được hợp chất (VIII). Nhóm este của hợp chất (VIII) sau đó được thủy phân bằng phương pháp đã biết (ví dụ, bổ sung bazơ chứa nước). Trong một bình, axit mới được tạo thành được tạo ra sau khi giảm độ pH và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm. Nhóm chức axit được chuyển hóa thành nhóm chức amit bằng cách sử dụng chất ghép cặp (ví dụ HATU) trong dung môi không proton (ví dụ diclometan, DMF), cùng với bazơ hữu cơ (ví dụ trietylamin), và amin (IX) thu được hợp chất có công thức (I). Theo cách khác, chức este trong hợp chất (VIII) có thể được chuyển hóa thành amit thông qua phản ứng với amin (IX) trong bình kín, hoặc tùy ý với sự có mặt của lithi bis(trimetylsilyl)amit ở 0°C trong dung môi như THF.

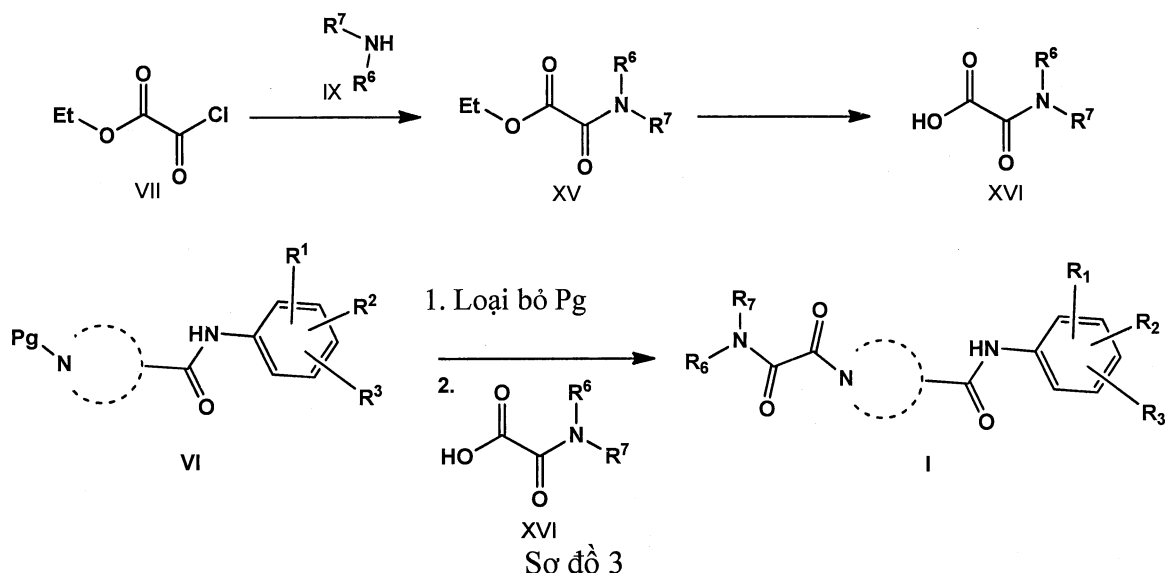


Sơ đồ 1

Sơ đồ 2 mô tả một quy trình khác để tổng hợp hợp chất có công thức chung I. Hợp chất có công thức chung X được cho phản ứng với etyl clooxoacetat, thu được hợp chất có công thức chung XI. Sau phản ứng thủy phân chọn lọc, ví dụ với sự có mặt của bazơ như NaOH ở 0°C trong MeOH, hợp chất XII được tạo ra. Hợp chất này có thể được ghép cặp với amin có công thức chung IX với sự có mặt của chất ghép cặp (ví dụ HATU) trong dung môi không proton (ví dụ diclometan, DMF), cùng với bazơ hữu cơ (ví dụ triethylamin). Theo cách khác, hợp chất XI có thể được chuyển hóa trực tiếp thành hợp chất có công thức chung XIII bằng phản ứng với amin IX (ví dụ trong trường hợp hợp chất IX bằng isopropylamin, trong EtOH ở 60°C) dẫn đến sự hình thành chọn lọc của hợp chất có công thức chung XIII. Việc thủy phân chức este của hợp chất XIII, tạo ra hợp chất có công thức chung XIV, có thể được ghép cặp với amin có công thức chung V, ví dụ dưới sự tác động của chất ghép cặp (ví dụ HATU) trong dung môi không proton (ví dụ diclometan, DMF), cùng với bazơ hữu cơ (ví dụ triethylamin), dẫn đến sự tạo thành hợp chất có công thức chung I.



Sơ đồ 2



Chất phản ứng có công thức chung XVI, có thể được tạo ra bắt đầu từ việc cho ethyl clooxoaxetat phản ứng với amin có công thức chung IX, sau đó thủy phân este, như được thể hiện trong sơ đồ 3. Chất phản ứng XVI này, có thể được ghép cặp với amin, ví dụ thu được sau khi khử bảo vệ hợp chất VI, với sự có mặt của chất ghép cặp (ví dụ HATU) trong dung môi không proton (ví dụ diclometan, DMF), cùng với bazơ hữu cơ (ví dụ trietylamin), thu được hợp chất có công thức chung I.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình chung phương pháp LCMS

Phép đo sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được thực hiện bằng cách sử dụng bơm LC, mảng diot (DAD) hoặc đầu dò UV và cột như được xác định trong các phương pháp tương ứng. Nếu cần, các đầu dò bổ sung được bao gồm (xem bảng các phương pháp dưới đây).

Dòng từ cột được đưa đến thiết bị đo khối phổ (MS) được cấu hình có nguồn ion áp suất khí quyển. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật biết được cách thiết lập các thông số điều chỉnh (ví dụ khoảng quét, thời gian dừng...) để thu được ion cho phép nhận biết trọng lượng phân tử (MW) đơn đồng vị danh nghĩa của hợp chất. Việc thu nhận dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm thích hợp.

Hợp chất được mô tả bằng thời gian lưu thử nghiệm (R_t) và ion. Nếu không được quy định khác trong bảng dữ liệu, ion phân tử được báo cáo tương ứng với $[M+H]^+$ (phân tử được proton hóa) và/hoặc $[M-H]^-$ (phân tử được khử proton). Trong

trường hợp hợp chất không thể ion hóa trực tiếp, loại sản phẩm cộng được quy định (tức là $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$, v.v.). Tất cả kết quả thu được với sự không chắc chắn trong thử nghiệm thường liên quan đến phương pháp sử dụng

Dưới đây, “SQD” có nghĩa là đầu dò tứ cực đơn, “MSD” là đầu dò chọn lọc khối lượng, “RT” là nhiệt độ trong phòng, “BEH” là thể lai etylsiloxan/silic oxit được tạo cầu nối, “DAD” là đầu dò mảng diot, “HSS” là silic oxit nồng độ cao, “Q-ToF” là thiết bị đo khối phổ thời gian bay tứ cực, “CLND” là đầu dò nitơ hóa phát quang, “ELSD” là đầu dò quét ánh sáng bay hơi

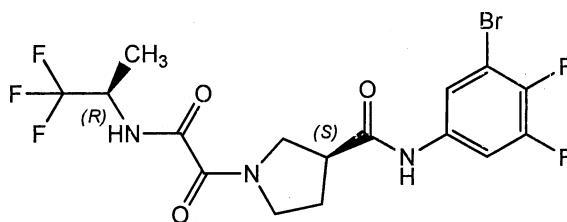
Phương pháp LCMS

(Dòng được thể hiện bằng mL/phút; nhiệt độ cột (T) theo °C; Thời gian chạy theo phút). Thiết bị được sử dụng là Waters: Acquity® UPLC®-DAD và SQD.

Mã phương pháp	Cột	Pha động	Gradient	Dòng chảy ----- Col T	Thời gian chạy
A	Waters: BEH C18 (1,7µm, 2,1 x 50mm)	A: HCOOH 0,1% + CH ₃ OH 5% trong H ₂ O B: CH ₃ CN	Từ 95% A đến 0% A trong 2,5 phút, đến 5% A trong 0,5 phút	0,8 ----- 55	3
B	Waters: BEH C18 (1,7µm, 2,1 x 50mm)	A: CH ₃ COONH ₄ 10mM trong 95% H ₂ O + CH ₃ CN 5% B: CH ₃ CN	Từ 95% A đến 5% A trong 1,3 phút, được giữ trong 0,7 phút.	0,8 ----- 55	2
C	Waters: HSS T3 (1,8µm, 2,1 x 100mm)	A: CH ₃ COONH ₄ 10mM trong 95% H ₂ O + CH ₃ CN 5% B: CH ₃ CN	Từ 100% A đến 5% A trong 2,10 phút, đến 0% A trong 0,90 phút, đến 5% A trong 0,5 phút	0,8 ----- 55	3,5
D	Waters: HSS T3 (1,8µm, 2,1*100mm)	A: CH ₃ COONH ₄ 10mM trong 95% H ₂ O + CH ₃ CN 5% B: CH ₃ CN	Từ 100% A đến 5% A trong 2,10 phút, đến 0% A trong 0,90 phút, đến 5% A trong 0,5 phút	0,7 ----- 55	3,5

Tổng hợp hợp chất:

Hợp chất 1: (S)-N-(3-brom-4,5-diflophenyl)-1-(2-oxo-2-(((R)-1,1,1-triflopropan-2-yl)amino)axetyl)pyrolidin-3-carboxamit



Bước 1. Tổng hợp (S)-N-(3-brom-4,5-diflophenyl)pyrolidin-3-carboxamit

Cho axit N-Boc-(3S)-1-pyrolidin-3-carboxylic [CAS 140148-70-5] (1g, 4,65 mmol), 3-brom-4,5-difloanilin (0,96g, 4,65mmol) và HATU (2,12g, 5,58mmol) vào CH₂Cl₂ (10mL). N,N-diisopropyletylamin (2,4mL, 13,9mmol) được bổ sung và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp được chia tách bằng HCl (1M, dung dịch, 20mL). Lớp hữu cơ được tách và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien heptan/etyl axetat để thu được dầu. Phản ứng khử bảo vệ Boc bằng HCl (6M trong isopropanol, 15 giờ ở nhiệt độ trong phòng) sau đó tạo ra (S)-N-(3-brom-4,5-diflophenyl)pyrolidin-3-carboxamit hydroclorua được sử dụng nguyên dạng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước 2. Tổng hợp (S)-etyl 2-(3-((3-brom-4,5-diflophenyl)carbamoyl)pyrolidin-1-yl)-2-oxoaxetat

Hỗn hợp của (S)-N-(3-brom-4,5-diflophenyl)pyrolidin-3-carboxamit hydroclorua (1,8g), và trietylamin (1,47mL, 10,54mmol) trong CH₂Cl₂ (20mL) được làm lạnh xuống 0°C. Bổ sung nhỏ giọt etyl clo oxoaxetat (0,65mL, 5,8mmol) vào hỗn hợp này, và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong một giờ ở 0°C, sau đó bổ sung etyl axetat (100mL). Lớp hữu cơ được rửa (HCl 1M chứa nước, NaHCO₃ chứa nước, và nước muối), làm khô bằng magie sulfat, chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và dung môi của phần lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Chất trung gian thô được sử dụng nguyên dạng mà không cần tinh chế thêm trong bước tiếp theo.

Bước 3

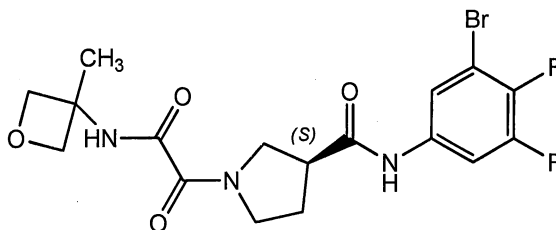
Axit (S)-2-(3-((3-brom-4,5-diflophenyl)carbamoyl)pyrolidin-1-yl)-2-oxoaxetic

được tạo ra sau khi etyl este tương ứng được thủy phân bằng cách sử dụng natri hydroxit trong etanol trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh xuống 0°C. HCl (1M chứa nước) được bổ sung để đưa hỗn hợp đến độ pH xấp xỉ 2. Nước muối (30mL) được bổ sung và hỗn hợp được chia tách bằng etyl axetat (3 x 50mL). Lớp hữu cơ được gom lại, được rửa bằng nước muối (20mL), làm khô bằng natri sulfat, chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc, và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề dưới dạng dầu. Không cần thực hiện bước tinh chế thêm.

Bước 4. Điều chế (*S*)-N-(3-brom-4,5-diflophenyl)-1-(2-oxo-2-(((*R*)-1,1,1-triflopropan-2-yl)amino)axetyl)pyrrolidin-3-carboxamit

Hỗn hợp của axit (*S*)-2-(3-((3-brom-4,5-diflophenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetic (450 mg), HATU (0,499g, 1,31mmol), diisopropyletylamin (463 mg, 3,58mmol), (*R*)-1,1,1-triflo-2-propylamin (135 mg, 1,19mmol), và DMF (8mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Bổ sung etyl axetat (100mL) vào hỗn hợp phản ứng. Lớp hữu cơ được rửa bằng HCl 1M (chứa nước), natri bicacbonat (bão hòa, chứa nước), và nước muối. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế pha đảo (pha tĩnh: RP Vydac Denali C18 - 10 μ m, 200g, 5cm), pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, CH₃CN). Các phân đoạn mong muốn được gom lại và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được hợp chất 1 dưới dạng chất rắn màu trắng. Phương pháp A, Rt = 1,63 phút, m/z = 470,0 (M-H)⁻, khối lượng chính xác: 471,0, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,30 (d, J=7,0 Hz, 3 H), 1,97 - 2,31 (m, 2 H), 3,10 - 3,27 (m, 1 H), 3,39 - 3,96 (m, 4 H), 4,51 - 4,75 (m, 1 H), 7,57 - 7,80 (m, 2 H), 9,26 (br. s., 1 H), 10,41 (br. s., 1 H)

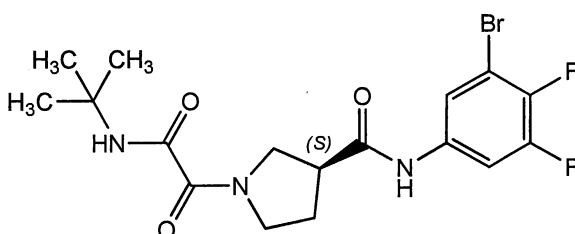
Hợp chất 2: (*S*)-N-(3-brom-4,5-diflophenyl)-1-(2-((3-metyloxetan-3-yl)amino)-2-oxoaxetyl)pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 2 thu được theo phương pháp được mô tả cho hợp chất 1 ngoại trừ, trong bước 4, 3-metyloxetan-3-amin được sử dụng thay cho (*R*)-1,1,1-triflo-2-

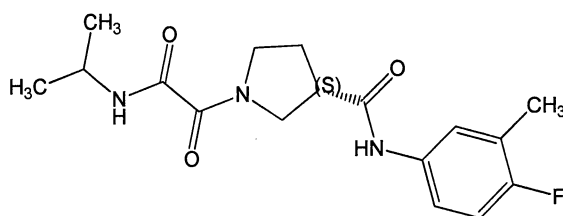
propylamin. Phương pháp A, Rt = 1,44 phút, $m/z = 444,0$ (M-H)⁻, khối lượng chính xác: 445,0. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,46 - 1,57 (m, 6 H), 1,92 - 2,32 (m, 4 H), 3,08 - 3,24 (m, 2 H), 3,43 (dt, $J=12,3, 7,5$ Hz, 1 H), 3,49 - 3,61 (m, 2 H), 3,62 - 3,77 (m, 2 H), 3,78 - 3,90 (m, 2 H), 3,99 (dd, $J=11,8, 7,6$ Hz, 1 H), 4,25 - 4,37 (m, 4 H), 4,58 - 4,70 (m, 4 H), 7,55 - 7,86 (m, 4 H), 9,18 (br. s., 2 H), 10,40 (br. s., 2 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay (rotamer).

Hợp chất 3: (*S*)-N-(3-brom-4,5-diflophenyl)-1-(2-(*tert*-butylamino)-2-oxoaxetyl)pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 3 thu được theo phương pháp được mô tả cho hợp chất 1 ngoại trừ, trong bước 4, 2-metylpropan-2-amin được sử dụng thay cho (*R*)-1,1,1-triflo-2-propylamin. Phương pháp A, Rt = 1,63 phút, $m/z = 430,0$ (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 431,1, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,24 - 1,36 (m, 9 H), 1,91 - 2,29 (m, 2 H), 3,06 - 3,25 (m, 1 H), 3,37 - 4,01 (m, 4 H), 7,60 - 7,80 (m, 2 H), 7,96 - 8,03 (m, 1 H), 10,39 (br. s., 1 H).

Hợp chất 4: (3*S*)-N-(4-flo-3-metylphenyl)-1-{[(1-metyletyl)amino] (oxo)axetyl}pyrrolidin-3-carboxamit



Bước 1. Điều chế axit (*S*)-*tert*-butyl 3-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl) pyrrolidin-1-carboxylat

Cho axit N-Boc-(3*S*)-1-pyrrolidin-3-carboxylic CAS [140148-70-5] (20g, 92,9mmol), 4-flo-3-metylanilin (11,63g, 92,9mmol), và *N, N*-diisopropyletylamin (48mL, 279mmol) vào CH₂Cl₂ (300mL) ở nhiệt độ trong phòng. HATU (42,4g, 111,5mmol) được bổ sung thành các phần nhỏ và hỗn hợp thu được được khuấy ở

nhệt độ trong phòng trong 15 giờ. Hỗn hợp được chia tách bằng HCl (1M, chứa nước, 20mL). Lớp hữu cơ được tách và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien heptan/etyl axetat để thu được dầu. Sau đó khử bảo vệ Boc bằng HCl (6M trong isopropanol, 15 giờ ở nhiệt độ trong phòng) tạo ra (*S*)-N-(4-flo-3-metylphenyl)pyrrolidin-3-carboxamit hydroclorua được sử dụng nguyên dạng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước 2. Điều chế (*S*)-etyl 2-(3-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetat

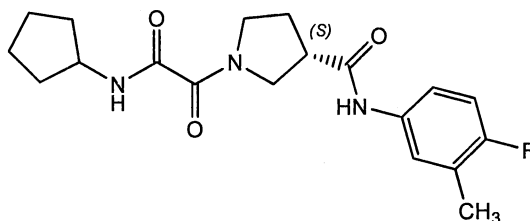
Hỗn hợp của (*S*)-N-(4-flo-3-metylphenyl)pyrrolidin-3-carboxamit hydroclorua (0,5g), và triethylamin (587mg, 5,80mmol) trong CH₂Cl₂ (10mL) được làm lạnh xuống 0°C. Bổ sung nhỏ giọt etyl clooxoaxetat (290mg, 2,13mmol) vào hỗn hợp này, và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong một giờ và 20 phút ở 0°C, sau đó bổ sung etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa (HCl 1M chứa nước, NaHCO₃ chứa nước, và nước muối), làm khô bằng magie sulfat, chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và dung môi của phần lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Chất trung gian thô được sử dụng mà không cần tinh chế thêm trong bước tiếp theo.

Bước 3. Điều chế (3*S*)-N-(4-flo-3-metylphenyl)-1-[[[(1-metyletyl)amino] (oxo)axetyl]pyrrolidin-3-carboxamit

(*S*)-etyl 2-(3-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetat (300mg) được hòa tan trong etanol (8mL) và hỗn hợp này được bổ sung isopropylamin (211mg, 3,58mmol) là dung dịch trong etanol (2mL). Sau 3 giờ, thêm isopropylamin (1mL, 11,64mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong bình kín trong 3 ngày. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế (pha tĩnh: RP Vydac Denali C18, 10μm, 200g, 5cm), pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, CH₃CN). Các phân đoạn được gom lại và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được hợp chất 4 dưới dạng chất rắn màu trắng. Phương pháp A, Rt = 1,35 phút, m/z = 336,4 (M+H)⁺, khối lượng chính xác: 335,2, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,02 - 1,16 (m, 12 H), 1,93 - 2,20 (m, 4 H), 2,18 - 2,22 (m, 6 H), 3,04 - 3,24 (m, 2 H), 3,40 (dt, *J*=12,1, 7,7 Hz, 1 H), 3,48 - 3,60 (m, 2 H), 3,60 - 3,72 (m, 2 H), 3,73 - 3,85 (m, 2 H), 3,85 - 4,01 (m, 3 H),

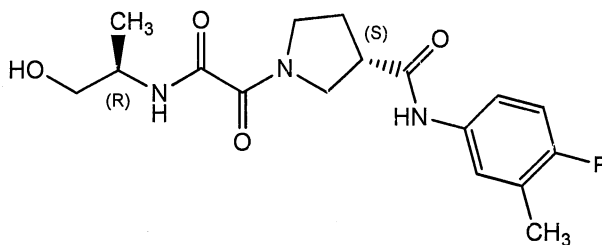
6,97 - 7,14 (m, 2 H), 7,33 - 7,43 (m, 2 H), 7,46 - 7,61 (m, 2 H), 8,44 (s, 1 H), 8,46 (s, 1 H), 10,02 (s, 1 H), 10,05 (s, 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay. Phân tích nhiệt quét vi sai (từ 0 đến 300°C ở 10°C/phút), Pic: 137,99°C.

Hợp chất 5: (*S*)-1-(2-(xyclopentylamino)-2-oxoaxetyl)-*N*-(4-flo-3-metylphenyl)pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 5 thu được theo phương pháp được mô tả cho hợp chất 4 ngoại trừ trong bước 3, xyclopentylamin (10 đương lượng) được sử dụng thay cho isopropylamin và thời gian phản ứng ở nhiệt độ trong phòng là hai ngày thay vì ba ngày. Phương pháp A, Rt = 1,49 phút, $m/z = 362,1$ ($M+H$)⁺, khối lượng chính xác: 361,2, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) □ ppm 1,37 - 1,56 (m, 7 H), 1,57 - 1,72 (m, 4 H), 1,75 - 1,89 (m, 4 H), 1,96 - 2,20 (m, 5 H), 2,18 - 2,23 (m, 6 H), 3,03 - 3,25 (m, 2 H), 3,34 - 3,45 (m, 1 H), 3,48 - 3,59 (m, 2 H), 3,60 - 3,70 (m, 2 H), 3,71 - 3,83 (m, 2 H), 3,87 - 3,97 (m, 1 H), 3,97 - 4,11 (m, 2 H), 6,99 - 7,13 (m, 2 H), 7,38 (dd, $J=8,1$, 3,7 Hz, 2 H), 7,47 - 7,59 (m, 2 H), 8,52 (s, 1 H), 8,54 (s, 1 H), 10,03 (s, 1 H), 10,05 (s, 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay. Phân tích nhiệt quét vi sai (từ 30 đến 300°C ở 10°C/phút), Pic: 163,50 °C.

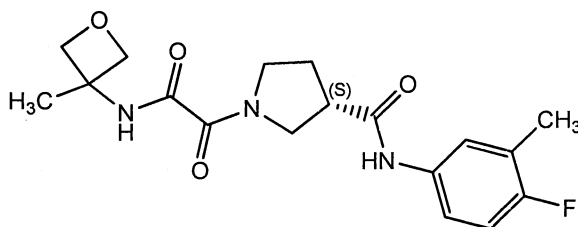
Hợp chất 6: (*S*)-*N*-(4-flo-3-metylphenyl)-1-(2-(((*R*)-1-hydroxypropan-2-yl)amino)-2-oxoaxetyl)pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 6 thu được theo phương pháp được mô tả cho hợp chất 4, ngoại trừ trong bước 3, (*R*)-2-aminopropanol (10 đương lượng) được sử dụng thay cho isopropylamin và thời gian phản ứng ở nhiệt độ trong phòng là hai ngày thay vì ba. Phương pháp A, Rt = 1,14 phút, $m/z = 352,0$ ($M+H$)⁺, khối lượng chính xác: 351,2, ¹H

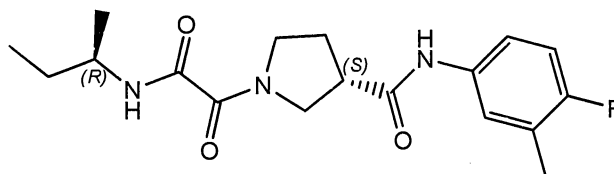
NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,06 (d, $J=6,6$ Hz, 6 H), 1,93 - 2,15 (m, 3 H), 2,18 - 2,22 (m, 6 H), 3,07 - 3,18 (m, 3 H), 3,26 - 3,30 (m, 1 H), 3,32 - 3,46 (m, 4 H), 3,49 - 3,61 (m, 2 H), 3,61 - 3,75 (m, 2 H), 3,76 - 3,90 (m, 4 H), 3,99 (dd, $J=11,7, 7,7$ Hz, 1 H), 4,67 - 4,80 (m, 2 H), 7,00 - 7,11 (m, 2 H), 7,31 - 7,45 (m, 2 H), 7,46 - 7,58 (m, 2 H), 8,29 (s, 1 H), 8,31 (s, 1 H), 10,03 (s, 1 H), 10,05 (s, 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 7: (3*S*)-N-(4-flu-3-metylphenyl)-1-{[(3-metyloxetan-3-yl)amino](oxo)axetyl}pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 7 thu được theo phương pháp được mô tả cho hợp chất 4 ngoại trừ trong bước 3, 3-metyloxetan-3-amin (2 đương lượng) được sử dụng thay cho isopropylamin. Phản ứng được tiến hành ở 50°C trong một tuần thay vì ở nhiệt độ trong phòng trong ba ngày như được mô tả cho hợp chất 4. Phương pháp B, $R_t = 0,73$ phút, $m/z = 364,4$ ($M+H$)⁺, khối lượng chính xác: 363,2, 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,49 - 1,56 (m, 6 H), 1,93 - 2,22 (m, 5 H), 2,19 - 2,21 (m, 6 H), 3,07 - 3,25 (m, 2 H), 3,37 - 3,47 (m, 2 H), 3,50 - 3,60 (m, 2 H), 3,62 - 3,75 (m, 2 H), 3,76 - 3,89 (m, 2 H), 3,98 (dd, $J=11,6, 7,6$ Hz, 1 H), 4,27 - 4,35 (m, 4 H), 4,60 - 4,70 (m, 4 H), 7,01 - 7,11 (m, 1 H), 7,35 - 7,45 (m, 1 H), 7,49 - 7,57 (m, 2 H), 9,20 (br. s., 1 H), 9,25 (s, 1 H), 10,10 (br. s., 1 H), 10,12 (s, 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

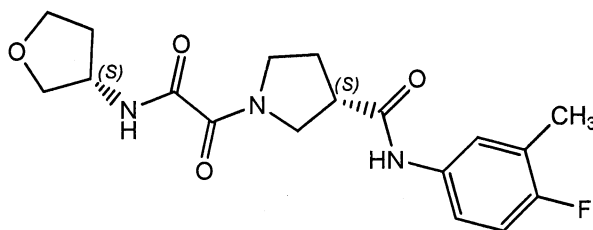
Hợp chất 8: (3*S*)-N-(4-flu-3-metylphenyl)-1-{[(1*R*)-1-metylpropyl]amino}(oxo)axetylpyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 8 thu được theo phương pháp được mô tả cho hợp chất 4, ngoại trừ trong bước 3, (*R*)-butan-2-amin (2 đương lượng) được sử dụng thay cho isopropylamin. Thời gian phản ứng ở nhiệt độ trong phòng là 18 giờ thay vì ba ngày

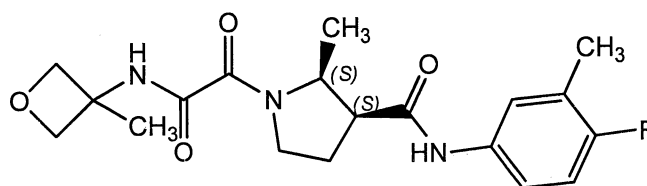
như được mô tả cho hợp chất 4. Phương pháp B, Rt = 0,87 phút, m/z = 348,2 (M-H)⁻, khối lượng chính xác: 349,2, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,77 - 0,87 (m, 6 H), 1,05 - 1,10 (m, 6 H), 1,37 - 1,55 (m, 4 H), 1,93 - 2,27 (m, 4 H), 2,19 - 2,22 (m, 6 H), 3,07 - 3,26 (m, 2 H), 3,37 - 3,46 (m, 1 H), 3,49 - 3,60 (m, 2 H), 3,62 - 3,86 (m, 6 H), 3,96 (dd, *J*=11,7, 7,7 Hz, 1 H), 7,02 - 7,11 (m, 2 H), 7,35 - 7,44 (m, 2 H), 7,49 - 7,56 (m, 2 H), 8,38 (s, 1 H), 8,40 (s, 1 H), 10,03 (s, 1 H), 10,06 (s, 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 9: (3*S*)-N-(4-flu-3-metylphenyl)-1-{oxo[(3*S*)-tetrahydrofuran-3-ylamino]-axetyl}pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 9 thu được theo phương pháp được mô tả cho hợp chất 4, ngoại trừ trong bước 3, (*S*)-tetrahydrofuran-3-amin (2 đương lượng) được sử dụng thay cho isopropylamin. Phản ứng được tiến hành ở 50°C trong 2,5 ngày thay vì ở nhiệt độ trong phòng trong ba ngày như được mô tả cho hợp chất 4. Phương pháp B, Rt = 0,72 phút, m/z = 364,1 (M+H)⁺, khối lượng chính xác: 363,2, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,80 - 1,91 (m, 2 H), 1,96 - 2,26 (m, 6 H), 2,19 - 2,21 (m, 6 H), 3,07 - 3,23 (m, 2 H), 3,36 - 3,45 (m, 1 H), 3,47 - 3,59 (m, 4 H), 3,61 - 3,73 (m, 4 H), 3,74 - 3,85 (m, 6 H), 3,93 (dd, *J*=11,4, 7,7 Hz, 1 H), 4,20 - 4,35 (m, 2 H), 7,01 - 7,12 (m, 2 H), 7,33 - 7,45 (m, 2 H), 7,47 - 7,57 (m, 2 H), 8,80 (s, 1 H), 8,82 (s, 1 H), 10,03 (s, 1 H), 10,05 (s, 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 10: (2*S*, 3*S*)-N-(4-flu-3-metylphenyl)-2-metyl-1-{[(3-metyloxetan-3-yl)-amino](oxo)axetyl}pyrrolidin-3-carboxamit



Bước 1. Điều chế (*S*)-metyl 2-metyl-1-(1-phenyletyl)-4,5-dihydro-1H-pyrrol-3-carboxylat

Hợp chất tiêu đề được điều chế theo phương pháp được nêu trong Tetrahedron Letters, Vol. 33, No. 30, pp. 4311-4312, 1992 và tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó.

Bước 2. Điều chế (2S,3S)-metyl 2-metyl-1-((S)-1-phenyletyl)pyrrolidin-3-carboxylat

Bổ sung axit axetic (2,07mL, 36,2mmol) vào dung dịch (S)-metyl 2-metyl-1-(1-phenyletyl)-4,5-dihydro-1H-pyrrol-3-carboxylat (5,92g, 24,1mmol) trong axetonitril (190mL). Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh xuống 0°C, sau đó bổ sung natri triaxetoxymethylhydrua (7,67g, 36,17mmol) và tiếp tục khuấy ở 0°C trong 3 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, sản phẩm thô được hoàn nguyên trong CH₂Cl₂ và bổ sung Na₂CO₃ (bão hòa, chứa nước). Hỗn hợp được khuấy mạnh. Lớp hữu cơ được loại bỏ, được rửa bằng nước, sau đó được làm khô bằng magie sulfat. Chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và dung môi của phần lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Dầu thô thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien heptan/etyl axetat (100/0 đến 70/30). Các phân đoạn tốt nhất được gom lại và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Dầu được nghiền trong heptan để thu được chất rắn màu trắng, (2S, 3S)-metyl 2-metyl-1-((S)-1-phenyletyl)pyrrolidin-3-carboxylat. Phương pháp C, Rt = 1,75 phút, m/z = 248,4 (M+H)⁺, khối lượng chính xác: 247,2, ¹H NMR (cloroform-*d*) đúng với số liệu được mô tả trong Tetrahedron Letters, Vol. 33, No. 30, pp. 4311-4312, 1992,

Bước 3. Điều chế lithi (2S,3S)-2-metyl-1-((S)-1-phenyletyl)pyrrolidin-3-carboxylat

(2S,3S)-metyl 2-metyl-1-((S)-1-phenyletyl)pyrrolidin-3-carboxylat (100mg, 0,40mmol) được hòa tan trong THF (1,2mL). Bổ sung lithi hydroxit (14mg, 0,61mmol) trong nước cất (200 µL) và metanol (50 µL) vào hỗn hợp này và hỗn hợp trở nên trong. Hỗn hợp thu được được khuấy trong 18 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và phần cặn được sử dụng mà không cần tinh chế thêm trong bước tiếp theo.

Bước 4. Điều chế (2S,3S)-N-(4-flo-3-metylphenyl)-2-metyl-1-((S)-1-phenyletyl)-pyrrolidin-3-carboxamit

Cho 4-flo-3-metylanilin (253mg, 2,02mmol) vào hỗn hợp của lithi (2S,3S)-2-metyl-1-((S)-1-phenyletyl)pyrrolidin-3-carboxylat (472mg), HATU (1,15 g, 3,03mmol), và N,N-diisopropyletylamin (0,7mL, 4,04mmol) trong CH₂Cl₂. Hỗn hợp

được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch được pha loãng trong CH_2Cl_2 và nước, lớp hữu cơ được loại bỏ, được làm khô bằng MgSO_4 và chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký silicagel bằng cách sử dụng gradien heptan/etyl axetat (100/0 đến 70/30). Các phân đoạn tốt nhất được gom lại và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được chất rắn màu trắng, (2S,3S)-N-(4-flo-3-metylphenyl)-2-metyl-1-((S)-1-phenyletyl)pyrrolidin-3-carboxamit. Phương pháp C, $R_t = 1,87$ phút, $m/z = 341,2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺, khối lượng chính xác: 340,2, ^1H NMR (360 MHz, cloroform-*d*) δ ppm 1,26 (d, $J=6,6$ Hz, 3 H), 1,36 (d, $J=7,0$ Hz, 3 H), 1,82 - 1,97 (m, 1 H), 2,02 - 2,18 (m, 1 H), 2,26 (d, $J=1,8$ Hz, 3 H), 2,56 - 2,73 (m, 2 H), 2,76 - 2,88 (m, 1 H), 2,88 - 2,99 (m, 1 H), 4,08 - 4,25 (m, 1 H), 6,85 - 6,98 (m, 1 H), 7,22 - 7,45 (m, 7 H), 9,52 (br. s., 1 H)

Bước 5. Điều chế (2S,3S)-N-(4-flo-3-metylphenyl)-2-metylpyrrolidin-3-carboxamit

Dung dịch chứa (2S,3S)-N-(4-flo-3-metylphenyl)-2-metyl-1-((S)-1-phenyletyl)pyrrolidin-3-carboxamit (395mg, 1,16mmol) trong metanol (20mL) được bổ sung Pd/C 10% (123mg) trong môi trường khí nitơ. Hỗn hợp phản ứng được đặt trong môi trường khí hydro và được khuấy trong 24 giờ. Hydro được loại bỏ, hỗn hợp phản ứng được lọc qua decalit, và phần cặn được cô dưới áp suất giảm để thu được dầu không màu được sử dụng không cần tinh chế thêm trong bước tiếp theo.

Bước 6. Điều chế ethyl 2-((2S,3S)-3-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl)-2-metylpyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetat

Bổ sung nhỏ giọt ethyl oxalyl clorua (0,23mL, 2,06mmol) vào dung dịch (2S,3S)-N-(4-flo-3-metylphenyl)-2-metylpyrrolidin-3-carboxamit (244mg, 1,03mmol) và diisopropyletylamin (0,71mL, 4,12mmol) trong CH_2Cl_2 khan (10mL) trong môi trường khí nitơ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung HCl (0,5M, chứa nước) vào hỗn hợp phản ứng. Lớp hữu cơ được loại bỏ, được rửa bằng NaHCO_3 (dung dịch, bão hòa) và nước muối, làm khô bằng Na_2SO_4 , chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và dung môi của phần lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien heptan/etyl axetat (100/0 đến 30/70) để thu được hợp chất tiêu đề dưới dạng dầu được làm khô trong chân không ở 50°C trong 2 giờ và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Bước 7. Điều chế axit 2-((2S,3S)-3-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl)-2-metylpyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetic

Bổ sung nhỏ giọt NaOH (1M, chứa nước, 1,82mL) vào dung dịch 2-((2S,3S)-3-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl)-2-metylpyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetat (204mg, 0,61mmol) trong etanol (5mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, sau đó được pha loãng trong CH₂Cl₂ và nước. Các lớp được tách và lớp chứa nước được axit hóa bằng HCl (1M, chứa nước), axit kết tủa và được hoàn nguyên trong CH₂Cl₂. Lớp chứa nước được chiết bằng CH₂Cl₂. Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng Na₂SO₄, chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc, và dung môi của phần lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề. Phương pháp C, Rt = 1,02 phút, m/z = 307,0 (M-H)⁻, khối lượng chính xác: 308,1.

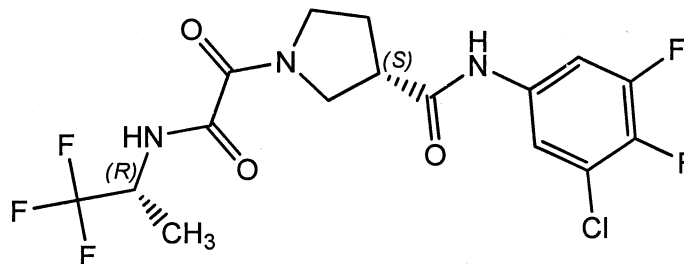
Bước 8. Điều chế (2S,3S)-N-(4-flo-3-metylphenyl)-2-metyl-1-[[[(3-metyloxetan-3-yl)amino](oxo)axetyl]pyrrolidin-3-carboxamit

Bổ sung 3-metyloxetan-3-amin (36mg, 0,42mmol) vào dung dịch chứa axit 2-((2S,3S)-3-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl)-2-metylpyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetic (128mg, 0,42mmol), HATU (236,79mg, 1,5 đương lượng) và DIPEA (145μL, 2 đương lượng) trong CH₂Cl₂ (5mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được bổ sung CH₂Cl₂ và HCl (1M, chứa nước). Các lớp được tách và lớp hữu cơ được rửa bằng NaHCO₃ (bão hòa, chứa nước) và nước muối. Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng Na₂SO₄, chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và phần lọc được cô dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế (pha tĩnh: RP X-Bridge Prep C18 OBD-10 μm, 30 x 150 mm), pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, CH₃CN). Các phân đoạn tốt nhất được gom lại và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được hợp chất tiêu đề 10.

Phương pháp C, Rt = 1,46 phút, m/z = 376,0 (M-H)⁻, khối lượng chính xác: 377,2, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,99 - 1,05 (m, 6 H), 1,53 (m, *J*=4,2 Hz, 6 H), 1,86 - 2,05 (m, 2 H), 2,18 - 2,23 (m, 6 H), 2,25 - 2,36 (m, 2 H), 3,02 - 3,23 (m, 2 H), 3,38 - 3,70 (m, 3 H), 3,83 - 3,95 (m, 1 H), 4,27 - 4,35 (m, 4 H), 4,46 - 4,57 (m, 1 H), 4,60 - 4,66 (m, 4 H), 4,81 - 4,94 (m, 1 H), 6,99 - 7,12 (m, 2 H), 7,33 - 7,42 (m, 2

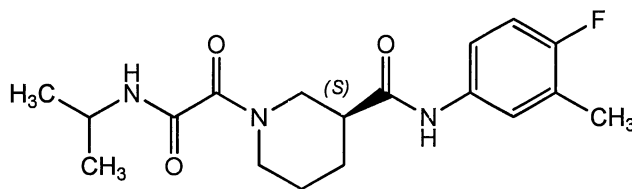
H), 7,45 - 7,55 (m, 2 H), 9,17 (s, 1 H), 9,26 (s, 1 H), 9,94 (s, 1 H), 10,00 (s, 1 H), là hỗn hợp có tỷ lệ 1/1 của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 11: (S)-N-(3-clo-4,5-diflophenyl)-1-(2-oxo-2-(((R)-1,1,1-triflopropan-2-yl)amino)axetyl)pyrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 11 thu được theo phương pháp được mô tả cho hợp chất 1, bước 1, ngoại trừ 3-clo-4,5-difloanilin được sử dụng thay cho 3-brom-4,5-difloanilin. Phản ứng ghép cặp để thu được hợp chất tiêu đề được thực hiện theo quy trình được mô tả cho hợp chất 13, bước 2, ngoại trừ (R)-1,1,1-triflo-2-propylamin được sử dụng thay cho 1-(triflometyl)-xyclopropanamin. Phương pháp B, Rt = 1,02 phút, m/z = 426,1 (M-H)⁺, khối lượng chính xác: 427,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,30 (d, J=7,0 Hz, 3 H) 1,98 - 2,28 (m, 2 H) 3,07 - 3,27 (m, 1 H) 3,41 - 4,04 (m, 4 H) 4,54 - 4,75 (m, 1 H) 7,46 - 7,72 (m, 2 H) 9,17 - 9,33 (m, 1 H) 10,43 (m, 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 12: (3S)-N-(4-flo-3-metylphenyl)-1-{[(1-metyletyl)amino] (oxo)axetyl} piperidin-3-carboxamit



Bước 1. Điều chế (S)-tert-butyl 3-((4-flo-3-metylphenyl) carbamoyl)piperidin-1-carboxylat

Hỗn hợp của axit (S)-1-boc-piperidin-3-carboxylic CAS [88495-54-9] (9g, 39,3mmol), 4-flo-3-metylanilin (4,91g, 39,3mmol), và CH₂Cl₂ (90mL) được làm lạnh xuống 0°C, sau đó bổ sung diisopropyletylamin (20,5mL, 117,8mmol) và HATU (17,9g, 47,1mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 0°C trong 2 giờ, sau đó bổ sung axit xitric (bão hòa, chứa nước, 100mL), NaHCO₃ (bão hòa, chứa nước, 100mL), và

nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô bằng Na_2SO_4 , chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng gradien ete dầu mỏ/ etyl axetat (từ 100/1 đến 3/1). Các phân đoạn tốt nhất được gom lại và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. ^1H NMR (400 MHz, cloroform- d) δ ppm 1,26 - 1,37 (m, 1 H), 1,39 (s, 9 H), 1,59 (qd, $J=12,1, 3,4$ Hz, 1 H), 1,69 (d, $J=13,2$ Hz, 1 H), 1,91 (d, $J=12,6$ Hz, 1 H), 2,19 (d, $J=1,8$ Hz, 3 H), 2,40 (tt, $J=11,0, 3,7$ Hz, 1 H), 2,75 (t, $J=11,7$ Hz, 1 H), 2,97 (br. s., 1 H), 3,86 (d, $J=13,1$ Hz, 1 H), 4,03 (br. s., 1 H), 7,05 (t, $J=9,3$ Hz, 1 H), 7,31 - 7,42 (m, 1 H), 7,51 (dd, $J=7,0, 2,3$ Hz, 1 H), 9,97 (s, 1 H)

Phản ứng khử bảo vệ sau đó của nhóm boc có thể thực hiện bằng cách bổ sung CH_2Cl_2 (100mL) và HCl (100mL, trong dioxan) ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ để thu được chất trung gian (S)-N-(4-flo-3-metylphenyl)piperidin-3-carboxamit hydroclorua.

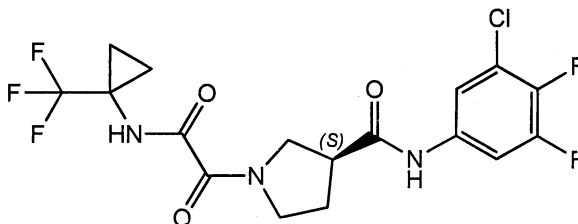
^1H NMR (400 MHz, cloroform- d) δ ppm 1,49 - 1,87 (m, 3 H), 1,95 - 2,08 (m, 1 H), 2,19 (d, $J=2,0$ Hz, 3 H), 2,80 - 2,93 (m, 2 H), 3,00 (q, $J=10,4$ Hz, 1 H), 3,17 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H), 3,29 (d, $J=11,0$ Hz, 1 H), 7,07 (t, $J=9,2$ Hz, 1 H), 7,35 - 7,45 (m, 1 H), 7,52 (dd, $J=7,0, 2,3$ Hz, 1 H), 8,90 (d, $J=11,2$ Hz, 1 H), 9,12 (m, $J=9,5$ Hz, 1 H), 10,31 (s, 1 H)

Bước 2.

Điều chế hợp chất 12 theo quy trình tương tự như trong bước tổng hợp 2 của hợp chất 4 ngoại trừ (S)-N-(4-flo-3-metylphenyl)piperidin-3-carboxamit hydroclorua được sử dụng trong phản ứng với etyl clooxoaxetat thay cho (S)-N-(4-flo-3-metylphenyl)pyrrolidin-3-carboxamit hydroclorua. Sau đó, trong bước 3 tiếp theo trong phương pháp được mô tả cho hợp chất 4, isopropylamin được sử dụng trong bình kín để thu được hợp chất 12, Phương pháp C, Rt = 1,47 phút, $m/z = 350,2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, khối lượng chính xác: 349,2. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,03 - 1,12 (m, 12 H) 1,30 - 1,52 (m, 2 H) 1,60 - 1,71 (m, 2 H) 1,71 - 1,81 (m, 2 H) 1,92 - 2,09 (m, 2 H) 2,17 - 2,21 (m, 6 H) 2,38 - 2,46 (m, 1 H) 2,53 - 2,58 (m, 1 H) 2,69 - 2,81 (m, 2 H) 3,03 (t, $J=11,5$ Hz, 1 H) 3,26 (dd, $J=13,3, 10,5$ Hz, 1 H) 3,68 (d, $J=13,3$ Hz, 1 H) 3,77 (d, $J=13,3$ Hz, 1 H) 3,83 - 3,96 (m, 2 H) 4,18 (d, $J=12,9$ Hz, 1 H) 4,36 (d, $J=12,9$ Hz, 1 H)

7,02 - 7,09 (m, 2 H) 7,33 - 7,44 (m, 2 H) 7,50 (d, $J=6,9$ Hz, 2 H) 8,47 - 8,58 (m, 2 H) 9,96 (s, 2 H), hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 13: (S)-N-(3-clo-4,5-diflophenyl)-1-(2-oxo-2-((1-(triflometyl) xyclopropyl) amino)axetyl)pyrolidin-3-carboxamit



Bước 1. Điều chế (S)-*t*-butyl 3-((3-clo-4,5-diflophenyl)carbamoyl) pyrolidin-1-carboxylat

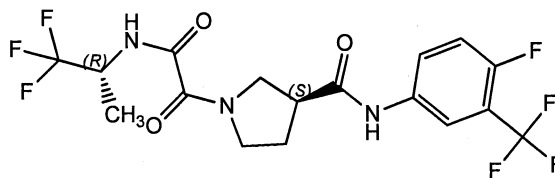
Hợp chất tiêu đề được điều chế theo quy trình trong bước 1 để tổng hợp hợp chất 1 ngoại trừ 3-clo-4,5-difloanilin được sử dụng thay cho 3-brom-4,5-difloanilin. Phản ứng khử bảo vệ nhóm Boc và phản ứng với etyl clooxoaxetat sau đó tiến hành theo phương pháp đã mô tả.

Bước 2. Điều chế (S)-N-(3-clo-4,5-diflophenyl)-1-(2-oxo-2-((1-(triflometyl) xyclopropyl)amino)axetyl)pyrolidin-3-carboxamit

Dung dịch axit (S)-2-(3-((3-clo-4,5-diflophenyl)carbamoyl)pyrolidin-1-yl)-2-oxoaxetic (0,33g, 0,99mmol) trong DMF (10mL) được làm lạnh xuống 5°C. Sau đó diisopropyletylamin (0,513mL, 2,98mmol) và 1-(triflometyl)-xyclopropanamin (0,092mL, 0,992mmol) được bổ sung và được khuấy ở 5°C. Bổ sung nhỏ giọt dung dịch HATU (0,414 g, 1,091mmol) trong DMF (2mL) ở 5°C. Dung dịch được khuấy ở 5°C trong 1 giờ. Phản ứng được làm dừng bằng nước và được trung hòa bằng HCl (1M, chứa nước), nước muối (15mL) được bổ sung và hợp chất được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được loại bỏ, được làm khô bằng MgSO₄, chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được chất rắn. Chất rắn được hòa tan trong CH₃CN bằng nhiệt và được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường. Kết tủa được loại bỏ bằng cách lọc và phân lọc được cô dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh silicagel bằng cách sử dụng gradien heptan/etyl axetat (30/70 đến 0/100). Các phân đoạn mong muốn được thu gom và được cho bay hơi đến khô để thu được hợp chất 13 dưới dạng chất rắn màu trắng.

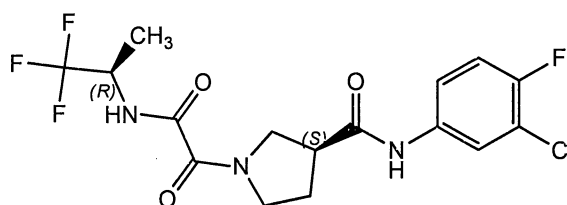
Phương pháp B, Rt = 1,02 phút, $m/z = 438,1$ (M-H)⁻, khối lượng chính xác: 439,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,04 - 1,13 (m, 2 H) 1,22 - 1,31 (m, 2 H) 1,97 - 2,27 (m, 2 H) 3,09 - 3,24 (m, 1 H) 3,36 - 4,00 (m, 4 H) 7,49 - 7,72 (m, 2 H) 9,44 (s, 1 H) 10,43 (br. s., 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 14: (S)-N-(4-flu-3-(triflometyl)phenyl)-1-(2-oxo-2-(((R)-1,1,1-triflopropan-2-yl)amino)axetyl)pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 14 thu được theo phương pháp được mô tả cho hợp chất 1, ngoại trừ, trong bước 1, 4-flu-3-(triflometyl)anilin được sử dụng thay cho 3-brom-4,5-difloanilin. Phản ứng ghép cặp để thu được hợp chất tiêu đề được thực hiện theo quy trình được mô tả cho hợp chất 13, bước 2, ngoại trừ (R)-1,1,1-triflo-2-propylamin được sử dụng thay cho 1-(triflometyl)-xyclopropanamin. Phương pháp B, Rt = 1,01 phút, $m/z = 442,1$ (M-H), khối lượng chính xác: 443,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,30 (d, $J=7,0$ Hz, 3 H), 1,87 - 2,37 (m, 2 H), 3,13 - 3,27 (m, 1 H), 3,37 - 3,98 (m, 4 H), 4,34 - 4,77 (m, 1 H), 7,41 - 7,55 (m, 1 H), 7,76 - 7,90 (m, 1 H), 8,01 - 8,25 (m, 1 H), 9,27 (br. s., 1 H), 10,50 (br. s., 1 H)

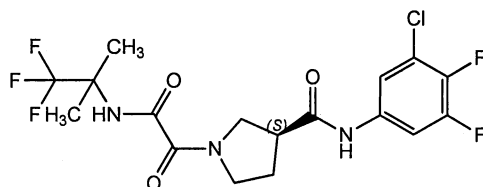
Hợp chất 15: (S)-N-(3-clo-4-flophenyl)-1-(2-oxo-2-(((R)-1,1,1-triflopropan-2-yl)amino)axetyl)pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 15 thu được theo phương pháp được mô tả để tổng hợp hợp chất 1, ngoại trừ, trong bước 1, 3-clo-4-floanilin được sử dụng thay cho 3-brom-4,5-difloanilin. Phản ứng ghép cặp để thu được hợp chất tiêu đề được thực hiện theo quy trình được mô tả cho hợp chất 13, bước 2, ngoại trừ (R)-1,1,1-triflo-2-propylamin được sử dụng thay cho 1-(triflometyl)-xyclopropanamin. Phương pháp B, Rt = 0,96 phút, $m/z = 408,1$ (M-H)⁻, khối lượng chính xác: 409,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-

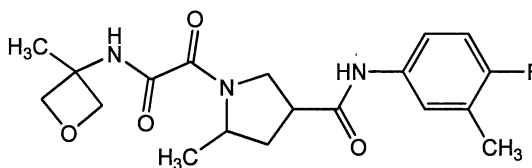
d_6) δ ppm 1,30 (d, $J=7,0$ Hz, 3 H), 1,91 - 2,30 (m, 2 H), 3,10 - 3,27 (m, 1 H), 3,38 - 4,02 (m, 4 H), 4,52 - 4,71 (m, 1 H), 7,32 - 7,41 (m, 1 H), 7,43 - 7,51 (m, 1 H), 7,86 - 7,99 (m, 1 H), 9,26 (br. s., 1 H), 10,34 (br. s., 1 H), hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 16: (S)-N-(3-clo-4,5-diflophenyl)-1-(2-oxo-2-((1,1,1-triflo-2-metylpropan-2-yl)amino)axetyl)pyrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 16 được điều chế theo phương pháp điều chế hợp chất 13 ngoại trừ 1,1,1-triflo-2-metylpropan-2-amin được sử dụng trong bước 2, thay vì 1-(triflometyl)-xyclopropanamin. Phương pháp B, Rt = 1,08 phút, $m/z = 440,1$ (M-H)⁺, khối lượng chính xác: 441,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,54 (s, 6 H) 1,98 - 2,31 (m, 2 H) 3,06 - 3,28 (m, 1 H) 3,40 - 3,97 (m, 4 H) 7,50 - 7,80 (m, 2 H) 8,56 (m, 1 H) 10,44 (br. s., 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Tổng hợp hợp chất 17: N-(4-flo-3-metylphenyl)-5-metyl-1-(2-((3-metyloxetan-3-yl)amino)-2-oxoaxetyl)pyrolidin-3-carboxamit



Bước 1. Điều chế axit 1-(*t*-butoxycacbonyl)-5-metylpyrolidin-3-carboxylic

Hợp chất tiêu đề được điều chế dưới dạng hỗn hợp của chất đồng phân không đối quang theo phương pháp được tìm thấy trong WO2010059658 (p. 211), bắt đầu từ methyl 2-clo-5-metyl-1H-pyrol-3-carboxylat đã mô tả trong ấn phẩm của Foley, L., Tetrahedron Letters 1994, vol. 35, p. 5989.

Bước 2. Điều chế *t*-butyl 4-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl)-2-metylpyrolidin-1-carboxylat

Bổ sung 4-flo-3-metylanilin (1,09g, 8,72mmol) vào dung dịch axit 1-(*t*-butoxycacbonyl)-5-metylpyrolidin-3-carboxylic (2g, 8,72mmol), DIPEA (4,33mL,

26,17mmol), và HATU (4,98 g, 14,09mmol) trong CH₂Cl₂ (50mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được chia tách bằng nước. Lớp hữu cơ được loại bỏ, được làm khô bằng MgSO₄, chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc, và dung môi của phần lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel thu được hợp chất tiêu đề. Phương pháp C, Rt = 1,96 phút, m/z = 335,0 (M-H)⁻, và 1,98 phút, m/z = 335,1 (M-H)⁻ khối lượng chính xác: 336,2.

Bước 3: Điều chế etyl 2-(4-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl)-2-metylpyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetat

Bổ sung nhỏ giọt TFA vào dung dịch chứa *t*-butyl 4-((4-flo-3-metylphenyl)-carbamoyl)-2-metylpyrrolidin-1-carboxylat trong CH₂Cl₂ trong môi trường khí nitơ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và sản phẩm thô được hoàn nguyên trong CH₂Cl₂ và NaOH (1M, chứa nước). Hỗn hợp được khuấy mạnh trong 5 phút. Các lớp được tách và lớp chứa nước được chiết bằng CH₂Cl₂. Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng MgSO₄, chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và phần lọc được cô dưới áp suất giảm để thu được dầu. Dầu này được bổ sung CH₂Cl₂ khan (50mL), và triethylamin (1,09 g, 7,83mmol). Bổ sung nhỏ giọt etyl oxalyl clorua (0,44mL, 3,92mmol) vào dung dịch tạo thành ở nhiệt độ trong phòng, sau đó khuấy trong 18 giờ. Bổ sung HCl (0,5M, chứa nước) vào hỗn hợp phản ứng. Lớp hữu cơ được loại bỏ, làm khô bằng MgSO₄, chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và phần lọc được cô để thu được dầu, được làm khô trong chân không ở 50°C trong 4 giờ và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Bước 4. Điều chế axit 2-(4-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl)-2-metylpyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetic

Phản ứng thủy phân este của etyl 2-(4-((4-flo-3-metylphenyl)carbamoyl)-2-metylpyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetat đạt được theo phương pháp đã mô tả trong bước 7 của hợp chất 10.

Bước 5. Điều chế N-(4-flo-3-metylphenyl)-5-metyl-1-(2-((3-metyloxetan-3-yl)amino)-2-oxoaxetyl)pyrrolidin-3-carboxamit

Hợp chất tiêu đề được điều chế theo quy trình trong bước 8 trong tổng hợp hợp chất 10. Các chất đồng phân được phân lập bằng SFC điều chế (pha tĩnh: Whelk-O (R,

R) 20 x 250mm), pha động: CO₂, EtOH/iPrOH (50/50) với iPrNH₂ 0,2%). Các phân đoạn mong muốn được thu gom, và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được hợp chất 17a (119mg), 17b (116mg), 17c (78mg), và 17d (94mg) được gọi tên theo thứ tự rửa giải.

Hợp chất	Phương pháp LC-MS, Rt (phút)	m/z (M+H) ⁺	Cấu hình
17a	C, 1,39	378,2	(3R,5S) hoặc (3S,5R)
17b	C, 1,39	378,2	(3R,5S) hoặc (3S,5R)
17c	C, 1,37	378,2	(3S,5S) hoặc (3R,5R)
17d	C, 1,37	378,2	(3S,5S) hoặc (3R,5R)

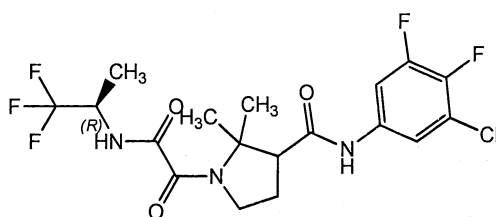
Hợp chất 17a: ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,21 (d, *J*=6,3 Hz, 3 H), 1,26 (d, *J*=6,2 Hz, 3 H), 1,53 (s, 3 H), 1,54 (s, 3 H), 1,75 (ddd, *J*=12,7, 10,1, 8,1 Hz, 1 H), 1,87 (ddd, *J*=13,0, 7,5, 5,6 Hz, 1 H), 2,19 - 2,22 (m, 6 H), 2,41 (dt, *J*=12,6, 7,5 Hz, 1 H), 2,46 - 2,53 (m, 1 H), 3,01 - 3,12 (m, 2 H), 3,52 (dd, *J*=12,2, 7,9 Hz, 1 H), 3,65 (dd, *J*=11,4, 9,8 Hz, 1 H), 3,90 (dd, *J*=12,2, 8,1 Hz, 1 H), 4,01 - 4,07 (m, 1 H), 4,09 (dd, *J*=11,4, 7,5 Hz, 1 H), 4,29 - 4,35 (m, 4 H), 4,37 - 4,48 (m, 1 H), 4,62 - 4,67 (m, 4 H), 7,05 - 7,09 (m, 2 H), 7,37 - 7,42 (m, 2 H), 7,49 - 7,53 (m, 2 H), 9,19 (s, 1 H), 9,23 (s, 1 H), 10,02 (s, 1 H), 10,04 (s, 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 17b: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,21 (d, *J*=6,2 Hz, 3 H), 1,26 (d, *J*=6,2 Hz, 3 H), 1,49 - 1,56 (m, 6 H), 1,75 (ddd, *J*=12,7, 10,0, 8,0 Hz, 1 H), 1,87 (ddd, *J*=13,0, 7,4, 5,8 Hz, 1 H), 2,17 - 2,23 (m, 6 H), 2,41 (dt, *J*=12,7, 7,5 Hz, 1 H), 2,45 - 2,54 (m, 1 H), 2,96 - 3,13 (m, 2 H), 3,52 (dd, *J*=12,1, 7,9 Hz, 1 H), 3,65 (dd, *J*=11,4, 9,8 Hz, 1 H), 3,91 (dd, *J*=12,2, 8,0 Hz, 1 H), 3,98 - 4,15 (m, 2 H), 4,27 - 4,36 (m, 4 H), 4,37 - 4,49 (m, 1 H), 4,59 - 4,70 (m, 4 H), 7,07 (t, *J*=9,1 Hz, 2 H), 7,34 - 7,44 (m, 2 H), 7,46 - 7,55 (m, 2 H), 9,18 (s, 1 H), 9,22 (s, 1 H), 10,01 (s, 1 H), 10,03 (br. s., 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 17c: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,13 - 1,27 (m, 6 H), 1,51 (s, 3 H), 1,53 (s, 3 H), 1,86 (ddd, *J*=12,3, 6,8, 2,9 Hz, 1 H), 1,98 (dd, *J*=12,0, 6,9 Hz, 1 H), 2,07 - 2,17 (m, 2 H), 2,18 - 2,23 (m, 6 H), 3,26 - 3,31 (m, 2 H), 3,58 - 3,70 (m, 2 H), 3,84 (dd, *J*=11,7, 7,9 Hz, 1 H), 3,92 - 4,01 (m, 1 H), 4,17 - 4,26 (m, 1 H), 4,27 - 4,36 (m, 4 H), 4,54 - 4,62 (m, 1 H), 4,61 - 4,66 (m, 4 H), 7,01 - 7,12 (m, 2 H), 7,32 - 7,43 (m, 2 H), 7,47 - 7,57 (m, 2 H), 9,17 (s, 1 H), 9,20 (s, 1 H), 10,03 (s, 1 H), 10,07 (s, 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 17d: ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,20 (d, $J=6,5$ Hz, 3 H), 1,21 (d, $J=6,5$ Hz, 3 H), 1,51 (s, 3 H), 1,53 (s, 3 H), 1,86 (ddd, $J=12,3, 6,8, 2,9$ Hz, 1 H), 1,98 (dd, $J=12,1, 6,8$ Hz, 1 H), 2,10 - 2,18 (m, 2 H), 2,18 - 2,23 (m, 6 H), 3,28 - 3,32 (m, 2 H), 3,60 - 3,68 (m, 2 H), 3,84 (dd, $J=11,6, 7,9$ Hz, 1 H), 3,97 (dd, $J=11,7, 7,8$ Hz, 1 H), 4,18 - 4,26 (m, 1 H), 4,28 - 4,35 (m, 4 H), 4,56 - 4,61 (m, 1 H), 4,62 - 4,67 (m, 4 H), 7,03 - 7,11 (m, 2 H), 7,35 - 7,42 (m, 2 H), 7,48 - 7,55 (m, 2 H), 9,19 (s, 1 H), 9,22 (s, 1 H), 10,04 (s, 1 H), 10,09 (s, 1 H), là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 18: N-(3-clo-4,5-diflo-phenyl)-2,2-dimetyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrolidin-3-carboxamit



Hỗn hợp của diethyl fumarat (19,05mL / 113,848mmol) và 2-nitropropan (10,2mL / 113,8mmol) được xử lý bằng KF/alumin bazơ (20g). Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm và hỗn hợp được lọc. Phần lọc được cô thu được diethyl 2-(1-metyl-1-nitro-etyl)butandioat thô (20g) được sử dụng nguyên dạng.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,10 - 1,22 (m, 6 H) 1,54 (s, 3 H) 1,58 (s, 3 H) 2,55 - 2,76 (m, 2 H) 3,52 (dd, $J=11,00, 3,96$ Hz, 1 H) 3,99 - 4,13 (m, 4 H).

Bổ sung Pd/C (10%) (448,04mg/0,421mmol) vào dung dịch diethyl 2-(1-metyl-1-nitro-etyl)butandioat thô (2200mg, 8,42mmol), trietyl amin (1,17mL/8,42mmol) và ethanol (100mL) dưới dòng nitơ. Hỗn hợp thu được được khuấy trong môi trường khí hydro ở nhiệt độ môi trường đến khi 3 đương lượng hydro được hấp thụ. Chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc bằng dicalit và phần lọc được làm bay hơi để thu được etyl 2,2-dimetyl-5-oxo-pyrrolidin-3-carboxylat (1,05g) dưới dạng chất rắn được sử dụng nguyên dạng. Hỗn hợp của etyl 2,2-dimetyl-5-oxo-pyrrolidin-3-carboxylat (750mg/4,05mmol) và chất phản ứng lawesson (983mg/2,43mmol) trong toluen trên rây phân tử (15mL) được làm ấm đến 70°C trong 1 giờ, được làm lạnh và được cô trong chân không, thu được phần cặn rắn. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký cột silicagel (gradient rửa giải: EtOAc-heptan 0:100 đến 100:0) thu được

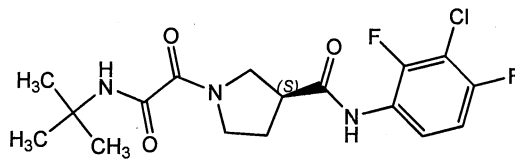
ethyl 2,2-dimethyl-5-thioxo-pyrrolidin-3-carboxylat (432mg) dưới dạng bột màu vàng nhạt, được sử dụng nguyên dạng. Phương pháp B, $R_t = 0,66$ phút, $m/z = 202,1$ ($M+H$)⁺, khối lượng chính xác: 201,1, Ethyl 2,2-dimethyl-5-thioxo-pyrrolidin-3-carboxylat (100mg, 0,5mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran (2mL). Hỗn hợp này được bổ sung ethanol (2mL) và hỗn hợp được khuấy qua đêm. Hỗn hợp được lọc bằng dicalit, được rửa bằng ethanol và cô trong chân không thu được ethyl 2,2-dimethylpyrrolidin-3-carboxylat thô (50mg) dưới dạng bột màu be được sử dụng nguyên dạng.

Bổ sung nhỏ giọt ethyl oxalyl clorua (65,35 μ L/0,58mmol) vào dung dịch ethyl 2,2-dimethylpyrrolidin-3-carboxylat thô (50mg, 0,29mmol) và DIPEA (0,25mL/1,46mmol) trong CH₂Cl₂ (2mL) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch NaHCO₃ (5mL) và CH₂Cl₂ (5mL) bão hòa được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng và các lớp được tách. Lớp hữu cơ được làm khô trên MgSO₄, được lọc, và làm bay hơi đến khô. Phần cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien rửa giải từ heptan đến EtOAc. (100:0 đến 0:100). Các phân đoạn mong muốn được cô trong chân không thu được ethyl 1-(2-etoxy-2-oxo-axetyl)-2,2-dimethyl-pyrrolidin-3-carboxylat (80mg) là dầu không màu, trong được sử dụng nguyên dạng. Ethyl 1-(2-etoxy-2-oxo-axetyl)-2,2-dimethyl-pyrrolidin-3-carboxylat (80mg, 0,29mmol) được hòa tan trong ethanol (1mL/17,13mmol) và được làm lạnh trên bề đá. NaOH (0,59mL/1M/0,59mmol) được bổ sung, và hỗn hợp được khuấy trong khi tiếp tục làm lạnh trong 10 phút. HCl (0,59mL, 1M, 0,59mmol) được bổ sung nhỏ giọt dưới điều kiện làm lạnh. Hỗn hợp được cô trong chân không. Phần cặn được chia tách giữa nước và Me-THF. Lớp hữu cơ được tách, làm khô (Na₂SO₄), lọc và cô trong chân không, thu được axit 2-(3-etoxyacabonyl-2,2-dimethyl-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-axetic (70mg) dưới dạng dầu được sử dụng nguyên dạng. Dung dịch axit 2-(3-etoxyacabonyl-2,2-dimethyl-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-axetic (70mg, 0,29mmol) trong DMF (10mL) được làm lạnh xuống 5°C trong bề đá. Sau đó, DIPEA (0,15mL, 0,75 g/mL, 0,86mmol) và (R)-1,1,1-triflo-2-propylamin (39,05mg, 0,35mmol) được bổ sung và được khuấy. Dung dịch HATU (120,36mg, 0,32mmol) trong DMF (5mL) được bổ sung nhỏ giọt trong khi tiếp tục làm lạnh. Dung dịch thu được được khuấy trong 1 giờ dưới điều kiện làm lạnh. Phản ứng được làm dừng bằng nước và được trung hòa bằng dung dịch HCl 1N. Nước muối

(10mL) được bổ sung và hợp chất được chiết bằng EtOAc (3 X 20mL). Chất hữu cơ kết hợp được làm khô bằng Na_2SO_4 , được lọc và làm bay hơi đến khô. Chất này được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh trên silic oxit Heptan/EtOAc (100/0-0/100). Các phân đoạn mong muốn được thu gom và được cho bay hơi đến khô để thu được etyl 2,2-dimetyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxylat (70mg) dưới dạng chất rắn màu trắng được sử dụng nguyên dạng. Etyl 2,2-dimetyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxylat (70mg, 0,21mmol) được hòa tan trong THF (5mL). Hỗn hợp này được bổ sung LiOH (17,7mg, 0,74mmol) trong nước (5mL). MeOH (0,2mL) được bổ sung để hòa tan toàn bộ chất phản ứng. Hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, nó được cô trong chân không cho đến khi chỉ còn nước. Tiếp theo, HCl (0,74mL, 1M, 0,74mmol) được bổ sung và hỗn hợp này được chiết bằng Me-THF (3 X 10mL). Chiết phẩm kết hợp được rửa bằng nước muối (20mL), được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và cô trong chân không thu được axit 2,2-dimetyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxylic (45mg) dưới dạng bột màu trắng được sử dụng nguyên dạng. Axit 2,2-dimetyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxylic (45mg, 0,15mmol), 3-clo-4,5-diflo-anilin (58,02mg, 0,29mmol), HATU (110,3mg, 0,29mmol) và DIPEA (0,12mL, 0,75 g/mL, 0,73mmol) được hòa tan trong DMF (0,34mL, 4,34mmol). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Thêm DIPEA (0,12mL, 0,75 g/mL, 0,73mmol) được bổ sung và hỗn hợp được lắc ở 60°C trong 2 giờ. Hỗn hợp này được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien rửa giải từ heptan đến EtOAc. (100:0 đến 0:100) và bằng HPLC điều chế (Pha tĩnh: Uptisphere C18 ODB - 10 μm , 200g, 5cm, Pha động: dung dịch NH_4HCO_3 0,25% trong nước, MeOH). Các phân đoạn mong muốn được cô trong chân không, được bay hơi đồng thời hai lần bằng cách sử dụng MeOH và được làm khô trong lò chân không ở 55°C trong 24 giờ thu được N-(3-clo-4,5-diflo-phenyl)-2,2-dimetyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxamit (6,3mg) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^1H NMR (400 MHz, cloroform-d) δ ppm 1,35 - 1,39 (m, 3 H), 1,46 - 1,49 (m, 3 H), 1,69 - 1,80 (m, 3 H), 2,01 - 2,20 (m, 1 H), 2,23 - 2,43 (m, 1 H), 2,58 - 2,74 (m, 1 H), 3,86 - 4,09 (m, 1 H), 4,20 - 4,47 (m, 1 H), 4,48 - 4,67 (m, 1 H), 7,08 (s, 1 H), 7,28 - 7,36 (m, 1 H), 7,41 -

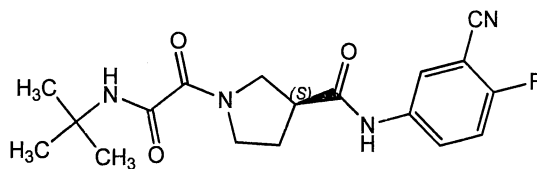
7,49 (m, 1 H), 7,49 - 7,65 (m, 1 H). LC phương pháp B; Rt: 1,11 phút. m/z: 454,2 (M-H)- Khối lượng chính xác: 455,1

Hợp chất 19: (3S)-1-[2-(tert-butylamino)-2-oxo-axetyl]-N-(3-clo-2,4-diflo-phenyl)pyrolidin-3-carboxamit



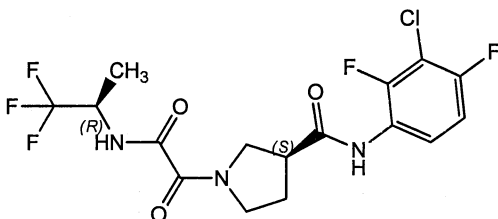
Etyl 2-[(3S)-3-[(3-clo-2,4-diflo-phenyl)carbamoyl]pyrolidin-1-yl]-2-oxo-axetat thu được tương tự như được mô tả cho (S)-etyl 2-(3-((3-brom-4,5-diflophenyl)-carbamoyl) pyrolidin-1-yl)-2-oxoaxetat bằng cách sử dụng 3-clo-2,4-diflo-anilin thay cho 3-brom-4,5-difloanilin trong bước 1. Etyl 2-[(3S)-3-[(3-clo-2,4-diflo-phenyl)carbamoyl]pyrolidin-1-yl]-2-oxo-axetat (0,6 g, 1,66mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran (15mL). Bổ sung tert-butylamin (0,18 g, 2,49mmol) vào hỗn hợp và hỗn hợp thu được được làm lạnh trong bể đá. Sau đó, bổ sung nhỏ giọt lithi bis(trimetylsilyl)amit (1M trong toluen) (4,99mL, 1M, 4,99mmol) trong thời gian 5 phút. Hỗn hợp thu được được khuấy trong 1 giờ trong khi tiếp tục làm lạnh. Sau đó, nó được làm dừng bằng cách sử dụng NH₄Cl (bão hòa / 50mL). Hỗn hợp này được chiết bằng EtOAc (3 X 50mL). Chiết phẩm kết hợp được rửa bằng nước muối (50mL), được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và cô dưới áp suất giảm. Phần cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien rửa giải từ heptan đến EtOAc. (100:0 đến 0:100) và qua HPLC điều chế (Pha tĩnh: RP XBridge Prep C18 OBD-10µm, 30x150 mm, Pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, MeOH) thu được hợp chất 19 (136mg) dưới dạng bột màu trắng. Phương pháp B, Rt = 0,95 phút, m/z = 386,2 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 387,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,31 (s, 9 H), 1,85 - 2,30 (m, 2 H), 3,15 - 4,33 (m, 5 H), 7,26 - 7,34 (m, 1 H), 7,65 - 7,86 (m, 1 H), 8,00 (m, 1 H), 10,08 (br. s., 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 20: (3S)-1-[2-(tert-butylamino)-2-oxo-axetyl]-N-(3-xyano-4-flophenyl)-pyrolidin-3-carboxamit



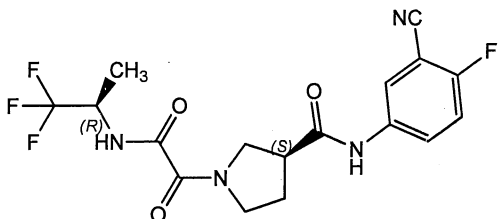
Hợp chất 20 được điều chế tương tự như được mô tả cho hợp chất 19, bằng cách sử dụng 5-amino-2-fluorobenzonitril thay cho 3-clo-2,4-difluor-anilin trong bước 1. Phương pháp D, Rt = 1,66 phút, m/z = 359,1 (M-H)⁺, Khối lượng chính xác: 360,2, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,30 (m, 9 H), 1,92 - 2,29 (m, 2 H), 3,06 - 3,27 (m, 1 H), 3,34 - 4,01 (m, 4 H), 7,38 - 7,58 (m, 1 H), 7,77 - 7,89 (m, 1 H), 7,91 - 8,07 (m, 1 H), 8,09 - 8,19 (m, 1 H), 10,32 - 10,59 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 21: (3S)-N-(3-clo-2,4-difluorophenyl)-1-[(1R)-2,2,2-trifluoro-1-methylethyl]pyrrolidin-3-carboxamide



Hợp chất 21 được điều chế tương tự như được mô tả cho hợp chất 19, bằng cách sử dụng (R)-1,1,1-trifluoro-2-propylamin thay cho tert-butylamin. Phương pháp B, Rt = 0,97 phút, m/z = 426,2 (M-H)⁺, Khối lượng chính xác: 427,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,27 - 1,33 (m, 3 H), 1,95 - 2,28 (m, 2 H), 3,33 - 4,00 (m, 5 H), 4,52-4,72 (m, 1 H), 6,97 - 7,48 (m, 1 H), 7,60 - 7,91 (m, 1 H), 9,01 - 9,47 (m, 1 H), 9,90 - 10,28 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

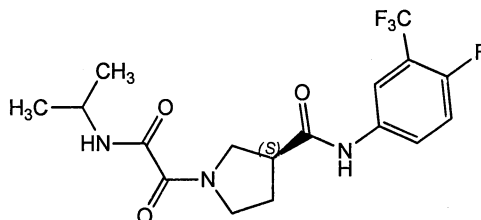
Hợp chất 22: (3S)-N-(3-cyano-4-fluorophenyl)-1-[(1R)-2,2,2-trifluoro-1-methylethyl]pyrrolidin-3-carboxamide



Hợp chất 22 được điều chế tương tự như được mô tả cho hợp chất 20, bằng cách sử dụng (R)-1,1,1-trifluoro-2-propylamin thay cho tert-butylamin. Phương pháp B,

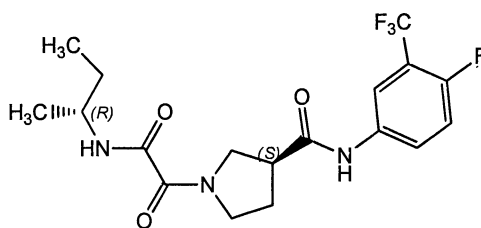
Rt = 0,87 phút, $m/z = 399,2$ (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 400,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,30 (d, J=7,0 Hz, 3 H), 1,96 - 2,30 (m, 2 H), 3,11 - 3,28 (m, 1 H), 3,38 - 4,00 (m, 4 H), 4,41 - 4,77 (m, 1 H), 7,42 - 7,56 (m, 1 H), 7,78 - 7,90 (m, 1 H), 8,04 - 8,23 (m, 1 H), 9,26 (br. s., 1 H), 10,50 (br. s., 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 23: (3S)-N-[4-flu-3-(triflometyl)phenyl]-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]pyrrolidin-3-carboxamit



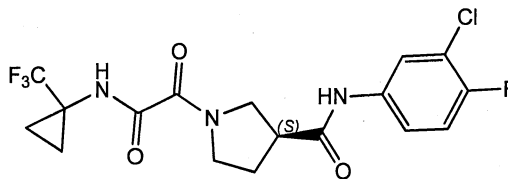
Hợp chất 23 được điều chế tương tự như được mô tả cho hợp chất 14, bằng cách sử dụng isopropylamin thay cho (R)-1,1,1-triflo-2-propylamin. Phương pháp B, Rt = 0,94 phút, $m/z = 388,2$ (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 389,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,00 - 1,17 (m, 6 H), 1,94 - 2,30 (m, 2 H), 3,10 - 3,26 (m, 1 H), 3,35 - 4,02 (m, 5 H), 7,36 - 7,58 (m, 1 H), 7,75 - 7,95 (m, 1 H), 8,04 - 8,19 (m, 1 H), 8,36 - 8,53 (m, 1 H), 10,37 - 10,63 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 24: (3S)-N-[4-flu-3-(triflometyl)phenyl]-1-[2-[(1R)-1-metylpropyl]amino]-2-oxo-axetyl]pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 24 được điều chế tương tự như được mô tả cho hợp chất 14, bằng cách sử dụng (R)-(-)-2-aminobutan thay cho (R)-1,1,1-triflo-2-propylamin. Phương pháp B, Rt = 0,99 phút, $m/z = 402,2$ (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 403,2. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,76 - 0,88 (m, 3 H), 1,00 - 1,15 (m, 3 H), 1,35 - 1,53 (m, 2 H), 1,94 - 2,29 (m, 2 H), 3,11 - 3,26 (m, 1 H), 3,37 - 4,01 (m, 5 H), 7,40 - 7,53 (m, 1 H), 7,79 - 7,89 (m, 1 H), 8,05 - 8,16 (m, 1 H), 8,29 - 8,46 (m, 1 H), 10,35 - 10,60 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

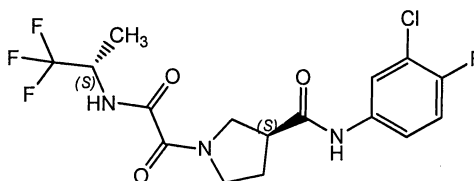
Hợp chất 25: (3S)-N-(3-clo-4-flo-phenyl)-1-[2-oxo-2-[[1-(triflometyl)xcyclopropyl]amino]axetyl]pyrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 25 được điều chế tương tự như được mô tả cho hợp chất 15, bằng cách sử dụng 1-(triflometyl)xcyclopropan-1-amin thay cho (R)-1,1,1-triflo-2-propylamin.

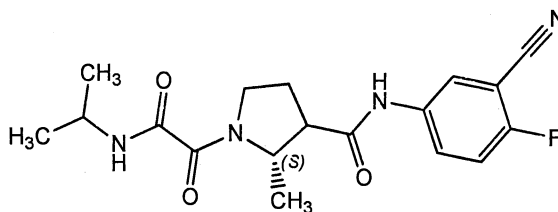
Phương pháp B, Rt = 0,97 phút, m/z = 420,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 421,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,95 - 1,14 (m, 2 H), 1,22 - 1,29 (m, 2 H), 1,95 - 2,29 (m, 2 H), 3,09 - 3,24 (m, 1 H), 3,34 - 3,98 (m, 4 H), 7,32 - 7,41 (m, 1 H), 7,42 - 7,53 (m, 1 H), 7,88 - 7,97 (m, 1 H), 9,44 (s, 1 H), 10,19 - 10,35 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 26: (3S)-N-(3-clo-4-flo-phenyl)-1-[2-oxo-2-[[1(S)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 26 được điều chế tương tự như được mô tả cho hợp chất 15, bằng cách sử dụng (S)-1,1,1-triflo-2-propylamin thay cho (R)-1,1,1-triflo-2-propylamin. Phương pháp B, Rt = 0,97 phút, m/z = 408,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 409,1 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,26 - 1,37 (m, 3 H), 1,95 - 2,29 (m, 2 H), 3,10 - 3,27 (m, 1 H), 3,34 - 3,98 (m, 4 H), 4,52 - 4,71 (m, 1 H), 7,32 - 7,41 (m, 1 H), 7,43 - 7,52 (m, 1 H), 7,86 - 7,99 (m, 1 H), 9,17 - 9,33 (m, 1 H), 10,22 - 10,35 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay

Hợp chất 27: (2S)-N-(3-xyano-4-flo-phenyl)-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]-2-metyl-pyrolidin-3-carboxamit



(2S,3S)-methyl 2-methyl-1-((S)-1-phenylethyl)pyrrolidin-3-carboxylat (1,9g, 7,68mmol) được hòa tan trong metanol (50mL). Bổ sung hỗn hợp này vào Pd/C (10%/0,82g, 0,77mmol) trong môi trường khí nitơ. Hỗn hợp được khuấy trong môi trường khí hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Hỗn hợp thu được được lọc bằng nút dicalit và được rửa bằng cách sử dụng metanol (100mL). Phần lọc được cô trong chân không thu được methyl (2S,3S)-2-methylpyrrolidin-3-carboxylat (830mg) dưới dạng dầu trong. Bổ sung nhỏ giọt ethyl 2-clo-2-oxo-axetat (1,3mL, 11,59mmol) vào dung dịch methyl (2S,3S)-2-methylpyrrolidin-3-carboxylat (0,83g, 5,8mmol) và diisopropyletylamin (4,99mL, 28,98mmol) trong diclometan khô (5mL) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ.

Bổ sung NaHCO_3 chứa nước, bão hòa (5mL) vào hỗn hợp phản ứng và các lớp được tách. Sau đó, nó được chiết bằng diclometan (2X10mL). Chiết phẩm kết hợp được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô trong chân không. Sản phẩm thô thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien rửa giải từ heptan đến EtOAc. (100:0 đến 0:100). Các phân đoạn mong muốn được cô trong chân không thu được methyl (2S,3S)-1-(2-etoxy-2-oxo-axetyl)-2-methyl-pyrrolidin-3-carboxylat (890mg) dưới dạng dầu màu vàng.

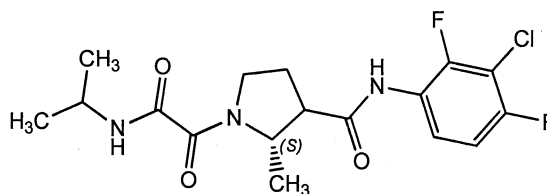
Methyl (2S,3S)-1-(2-etoxy-2-oxo-axetyl)-2-methyl-pyrrolidin-3-carboxylat (250mg, 1mmol) được hòa tan trong etanol (10mL) và isopropylamin (1698 μL , 19,94mmol) và hỗn hợp được khuấy ở 60°C trong 2 giờ. Hỗn hợp được cô trong chân không. Dầu thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien rửa giải từ heptan đến EtOAc. (100:0 đến 0:100). Các phân đoạn mong muốn được cô dưới áp suất giảm thu được methyl (2S)-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]-2-methyl-pyrrolidin-3-carboxylat (380mg) dưới dạng dầu trong được sử dụng nguyên dạng.

Methyl (2S)-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]-2-methyl-pyrrolidin-3-carboxylat (0,38 g, 1,48mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran (10mL) và hỗn hợp

này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được bổ sung LiOH (178mg, 7,41mmol) trong nước (2mL), sau đó là metanol (2mL). Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau đó, HCl (1M trong H₂O) (7,41mL, 1M, 7,41mmol) được bổ sung và hỗn hợp được cô trong chân không cho đến khi chỉ còn nước. Nước (5mL) được bổ sung và dung dịch này được chiết bằng 2-methyl-tetrahydrofuran (3 x 15mL). Chiết phẩm kết hợp được rửa bằng nước muối (15mL), được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và cô trong chân không thu được axit (2S)-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]-2-metyl-pyrolidin-3-carboxylic (312mg) được sử dụng nguyên dạng.

Axit (2S)-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]-2-metyl-pyrolidin-3-carboxylic (104mg, 0,43mmol) được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (1mL). Sau đó HATU (0,18g, 0,47mmol) được bổ sung và hỗn hợp này được khuấy trong 20 phút. Sau đó, DIPEA (0,22mL, 0,75g/mL, 1,29mmol) được bổ sung, sau đó là 5-amino-2-flobenzonitril (0,12g, 0,86mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 50°C trong 4 giờ. Sau đó, hỗn hợp này được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và được phun trực tiếp lên nút silic oxit. Hỗn hợp được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien rửa giải từ heptan đến EtOAc. (100:0 đến 0:100) và sau đó là HPLC điều chế (Pha tĩnh: RP SunFire Prep C18 OBD-10µm, 30x150mm, Pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, MeOH) Các phân đoạn mong muốn được cô dưới áp suất giảm và được bay hơi đồng thời hai lần với metanol (2 X 15mL) và được làm khô trong lò chân không ở 55°C trong 18 giờ thu được hợp chất 27 (57mg) là bột màu trắng. Phương pháp B, Rt = 0,81 (31%) và 0,83 phút (69%), m/z = 359,2 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 360,2

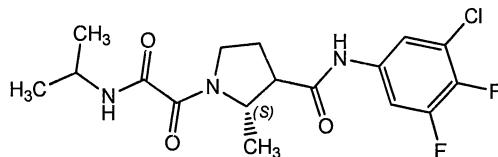
Hợp chất 28: (2S)-N-(3-clo-2,4-diflo-phenyl)-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]-2-metyl-pyrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 28 được điều chế từ axit (2S)-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]-2-metyl-pyrolidin-3-carboxylic tương tự như được mô tả cho hợp chất 27, bằng cách sử dụng

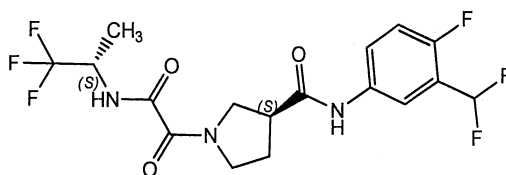
dùng 3-clo-2,4-diflo-anilin thay cho 5-amino-2-flobenzonitril. Phương pháp B, Rt = 0,91 (48%) và 0,92 phút (52%), m/z = 386 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 387,1.

Hợp chất 29: (2S)-N-(3-clo-4,5-diflo-phenyl)-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]-2-metyl-pyrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 29 được điều chế từ axit (2S)-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]-2-metyl-pyrolidin-3-carboxylic tương tự như được mô tả cho hợp chất 27, bằng cách sử dụng 3-clo-4,5-diflo-anilin thay cho 5-amino-2-flobenzonitril. Hỗn hợp đồng phân không đối quang 29 (63mg) được tách bằng SFC điều chế (Pha tĩnh: Chiralpak Diacel AD 20 x 250mm, Pha động: CO₂, MeOH với iPrNH₂ 0,2%), thu được 29a (rửa giải lần hai, 20mg) và 29b (rửa giải lần thứ nhất, 13,2mg sau đó tinh chế thêm bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien rửa giải từ heptan đến iPrOH. (100:0 đến 65:35)). 29: Phương pháp B, 0,98 (42 %) và 1,02 phút (58%), m/z = 386 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 387,1. 29a: Phương pháp D, Rt = 1,89, m/z = 386,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 387,1; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,95 - 1,05 (m, 3 H), 1,06 - 1,16 (m, 6 H), 1,82 - 2,11 (m, 1 H), 2,14 - 2,44 (m, 1 H), 3,04 - 3,26 (m, 1 H), 3,35 - 4,10 (m, 3 H), 4,32 - 4,97 (m, 1 H), 7,33 - 7,85 (m, 2 H), 8,20 - 8,73 (m, 1 H), 10,07 - 10,68 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay. 29b: Phương pháp B, Rt = 0,97 m/z = 386,2 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 387,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,03 - 1,14 (m, 6 H), 1,23 - 1,31 (m, 3 H), 1,93 - 2,11 (m, 1 H), 2,14 - 2,30 (m, 1 H), 2,72 - 2,93 (m, 1 H), 3,30-4,70 (m, 4 H), 7,56 - 7,73 (m, 2 H), 8,28 - 8,54 (m, 1 H), 10,22 - 10,60 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

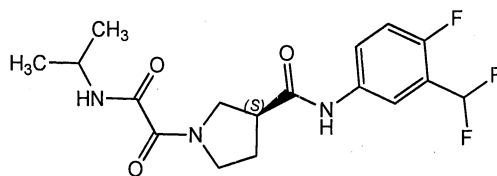
Hợp chất 30: (3S)-N-[3-(diflometyl)-4-flo-phenyl]-1-[2-oxo-2-[(1S)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrolidin-3-carboxamit



Etyl 2-[(3S)-3-[[3-(diflometyl)-4-flo-phenyl]carbamoyl]pyrolidin-1-yl]-2-oxo-

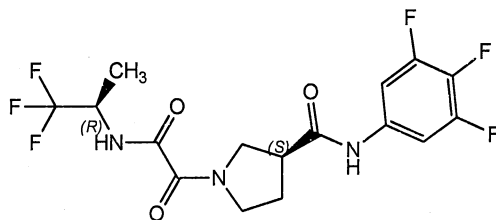
axetat được điều chế tương tự như được mô tả cho (S)-etyl 2-(3-((3-brom-4,5-diflo-phenyl)carbamoyl) pyrrolidin-1-yl)-2-oxoaxetat bằng cách sử dụng 3-(diflometyl)-4-flo-anilin thay cho 3-brom-4,5-difloanilin. Hợp chất 30 được điều chế từ etyl 2-[(3S)-3-[[3-(diflometyl)-4-flo-phenyl]carbamoyl]pyrrolidin-1-yl]-2-oxo-axetat tương tự như được mô tả để tổng hợp hợp chất 19 từ etyl 2-[(3S)-3-[(3-clo-2,4-diflo-phenyl)carbamoyl]pyrrolidin-1-yl]-2-oxo-axetat bằng cách sử dụng (S)-1,1,1-triflo-2-propylamin thay cho tert-butylamin. Phương pháp B, Rt = 0,92 phút, m/z = 424,1 (M-H)⁺, Khối lượng chính xác: 425,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,19 - 1,40 (m, 3 H), 1,92 - 2,30 (m, 2 H), 3,08 - 3,27 (m, 1 H), 3,37 - 4,03 (m, 4 H), 4,47 - 4,78 (m, 1 H), 7,20 (m, J=54,4 Hz, 1 H), 7,29 - 7,41 (m, 1 H), 7,55 - 7,80 (m, 1 H), 7,86 - 8,04 (m, 1 H), 9,25 (br. s., 1 H), 10,30-10,40 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 31: (3S)-N-[3-(diflometyl)-4-flo-phenyl]-1-[2-(isopropylamino)-2-oxo-axetyl]pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 31 được điều chế tương tự như được mô tả cho hợp chất 30, bằng cách sử dụng isopropylamin thay cho (S)-1,1,1-triflo-2-propylamin. Phương pháp B, Rt = 0,83 phút, m/z = 370,2 (M-H)⁺, Khối lượng chính xác: 371,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,75 - 1,42 (m, 6 H), 1,95 - 2,29 (m, 2 H), 3,05 - 3,26 (m, 1 H), 3,36 - 4,04 (m, 5 H), 7,20 (m, J=54,1,1 H), 7,28 - 7,37 (m, 1 H), 7,63 - 7,78 (m, 1 H), 7,87 - 8,03 (m, 1 H), 8,40-8,50 (m, 1 H), 10,25-10,41 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 32: (3S)-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]-N-(3,4,5-triflophenyl)pyrrolidin-3-carboxamit



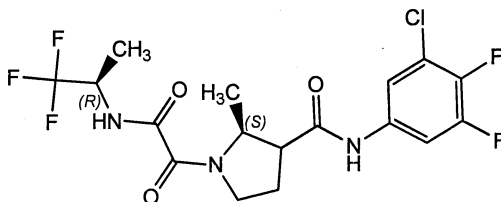
Axit Boc-(3S)-1-pyrolidin-3-carboxylic (1,5 g, 6,97mmol) và 3,4,5-trifloanilin (2,51 g, 17,05mmol) và HATU (3,18 g, 8,36mmol) được hòa tan trong DMF (5mL). Hỗn hợp này được bổ sung N,N-diisopropyletylamin (3,6mL, 0,75 g/mL, 20,91mmol). Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tải lên cột và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien rửa giải từ heptan đến EtOAc. (100:0 đến 0:100). Các phân đoạn mong muốn được cô trong chân không tạo ra tert-butyl (3S)-3-[(3,4,5-triflophenyl)carbamoyl]pyrolidin-1-carboxylat (2,32 g). Phương pháp B, Rt = 1,13 phút, m/z = 343,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 344,1. HCl (6M trong iPrOH, 10mL, 6M, 60mmol) được bổ sung vào tert-butyl (3S)-3-[(3,4,5-triflophenyl)carbamoyl]pyrolidin-1-carboxylat (2,3g, 6,35mmol) trong CH₂Cl₂ (50mL) và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng được cô. Phần cặn được hấp thụ vào trong CH₂Cl₂ (40mL) và kết tủa trắng tạo thành được thu gom trên thiết bị lọc thủy tinh và được làm khô trong lò chân không ở 55°C tạo ra (3S)-N-(3,4,5-triflophenyl)pyrolidin-3-carboxamit hydroclorua (1600mg) dưới dạng bột màu trắng sáng được sử dụng nguyên dạng. Phương pháp B, Rt = 0,69 phút, m/z = 243,0 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 244,1.

Bổ sung Ethyl 2-clo-2-oxo-axetat (1,98mL, 1,22g/mL, 17,69mmol) vào dung dịch chứa (R)-1,1,1-triflo-2-propylamin (2 g, 17,69mmol) và trietylamin (4,9mL, 35,37mmol) trong CH₂Cl₂ (20mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ. NaOH (1M trong H₂O) (26,5mL, 1M, 26,53mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy mạnh trong 2 giờ. Lớp hữu cơ được loại bỏ và lớp chứa nước được axit hóa bằng HCl. Hợp chất được chiết bằng dietylete (4 X 25mL). Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng Na₂SO₄, được lọc và làm bay hơi đến khô thu được axit 2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetic (2,72 g) dưới dạng bột màu trắng.

(3S)-N-(3,4,5-triflophenyl)pyrolidin-3-carboxamit hydroclorua (200mg) và axit 2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetic (118mg, 0,64mmol) được hòa tan trong DMF (2mL). HATU (266,74mg, 0,7mmol) và DIPEA (0,44mL, 0,75g/mL, 2,55mmol) lần lượt được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được tải lên cột và được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký cột silicagel (ethyl axetat trong heptan từ 0% đến 100%) để thu được hợp chất 32 (83mg) dưới dạng bột màu trắng. Phương pháp B, Rt = 1,04 phút, m/z = 410,1 (M-H)⁻,

Khối lượng chính xác: 411,1. Phân tích nhiệt quét vi sai: nhiệt độ sôi ở 197,3°C (Từ 30 đến 300 °C ở 10°C/phút). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,30 (d, J=7,0 Hz, 3 H), 1,92 - 2,30 (m, 2 H), 3,09 - 3,26 (m, 1 H), 3,38 - 3,99 (m, 4 H), 4,50-4,70 (m, 1 H), 7,40-7,60 (m, 2 H), 9,20-9,31 (m, 1 H), 10,42-10,49 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 33: (2S)-N-(3-clo-4,5-diflo-phenyl)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[(1R)-(2,2,2-triflo-1-metyl-etyl)amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxamit



Metyl (2S,3S)-1-(2-etoxy-2-oxo-axetyl)-2-metyl-pyrrolidin-3-carboxylat (2200mg, 9,04mmol) trong metanol (50mL) được làm lạnh trong bể đá. Bổ sung nhỏ giọt NaOH (1M trong H₂O) (9,95mL, 1M, 9,95mmol) vào hỗn hợp này và hỗn hợp được khuấy trong 30 phút. Phản ứng được làm dừng bằng HCl (1M trong H₂O) (9,5mL, 1M, 9,5mmol) và được cô để giữ lại 20mL phần cạn. Phần cạn được chiết bằng 2-metyl THF (2 x 20mL). Lóp hữu cơ kết hợp được làm khô (Na₂SO₄) và được làm bay hơi đến khô để thu được axit 2-[(2S,3S)-3-metoxycacbonyl-2-metyl-pyrrolidin-1-yl]-2-oxo- axetic (1930mg) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

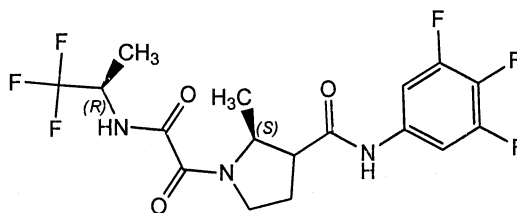
Dung dịch chứa axit 2-[(2S,3S)-3-metoxycacbonyl-2-metyl-pyrrolidin-1-yl]-2-oxo-axetic (800mg, 3,64mmol) trong DMF (4mL, 51,44mmol) và (R)-1,1,1-triflo-2-propylamin (494mg, 4,37mmol) được làm lạnh xuống 0°C trong bể đá. Sau đó HATU (1524mg, 4,01mmol) được bổ sung trong khi tiếp tục làm lạnh. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 0°C trong 30 phút và đạt đến nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tải lên cột và được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký cột silicagel (etyl axetat trong heptan từ 0% đến 100%) để thu được metyl (2S,3S)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxylat (1000mg) là dầu không màu. Phương pháp D, Rt = 1,59 phút, m/z = 309,3 (M-H)⁺, Khối lượng chính xác: 310,1.

Metyl (2S,3S)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxylat (400mg, 1,29mmol) được khuấy trong

metanol (10mL) ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung nhỏ giọt NaOH (1M trong H₂O) (1,35mL, 1M, 1,35mmol) vào hỗn hợp này và hỗn hợp được khuấy trong 20 giờ. Sau 20 giờ, thêm NaOH (1M trong H₂O) (0,26mL, 1M, 0,26mmol) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Phản ứng được làm dừng bằng HCl (1M trong H₂O) (1,61mL, 1M, 1,61mmol) và được cô để giữ lại 3mL phần cạn. Phần cạn được chiết bằng 2-metyl THF (2 x 20mL). Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô (Na₂SO₄) và được làm bay hơi đến khô để thu được axit (2S,3S)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxylic (440mg) dưới dạng chất rắn màu trắng sau khi để yên.

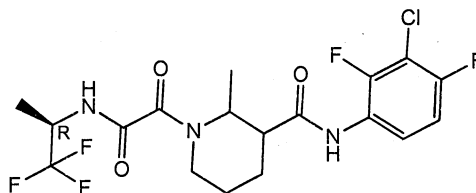
Dung dịch chứa axit (2S,3S)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxylic (190mg, 0,64mmol) trong DMF (2mL) và 3-clo-4,5-difloanilin (115,4mg, 0,71mmol) được làm lạnh xuống 0°C trong bể đá. Sau đó HATU (292,6mg, 0,77mmol) được bổ sung, trong khi tiếp tục làm lạnh. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 0°C trong 30 phút và đạt đến nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tải lên cột và được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký cột silicagel (etyl axetat trong heptan từ 0% đến 100 %) và thông qua HPLC điều chế (Pha tĩnh: RP XBridge Prep C18 OBD-10µm, 30x150mm, Pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, CH₃CN) thu được hợp chất 33a (40mg) và hợp chất 33b (33mg).
 33a: (2S,3R)-N-(3-clo-4,5-diflo-phenyl)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxamit. Phương pháp B, Rt = 1,06 phút, m/z = 440,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 441,1. 33b: (2S,3S)-N-(3-clo-4,5-diflo-phenyl)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]pyrrolidin-3-carboxamit. Phương pháp B, Rt = 1,11 phút, m/z = 440,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 441,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,99 - 1,05 (m, 3 H), 1,26 - 1,34 (m, 3 H), 1,95 - 2,06 (m, 1 H), 2,23 - 2,39 (m, 1 H), 3,11 - 3,27 (m, 1 H), 3,38 - 3,84 (m, 2 H), 4,46 - 4,87 (m, 2 H), 7,60 - 7,69 (m, 2 H), 9,17 - 9,43 (m, 1 H), 10,24 - 10,51 (m, 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 34: (2S)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]-N-(3,4,5-triflophenyl)pyrrolidin-3-carboxamit



Hợp chất 34a (44mg) và 34b (52mg) được điều chế tương tự như được mô tả cho hợp chất 33a và 33 b, bằng cách sử dụng 3,4,5-trifloanilin thay cho 3-clo-4,5-difloanilin. 34a: (2S,3R)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]-N-(3,4,5-triflophenyl)pyrrolidin-3-carboxamit Phương pháp B, Rt = 1,02 phút, m/z = 424,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 425,1. 34b: (2S,3S)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]-N-(3,4,5-triflophenyl)pyrrolidin-3-carboxamit. Phương pháp B, Rt = 1,05 phút, m/z = 424,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 425,1, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,99 - 1,05 (m, 3 H), 1,26 - 1,34 (m, 3 H), 1,92 - 2,07 (m, 1 H), 2,19 - 2,41 (m, 1 H), 3,08 - 3,28 (m, 1 H), 3,38 - 3,85 (m, 2 H), 4,45 - 4,87 (m, 2 H), 7,43 - 7,57 (m, 2 H), 9,30 (br. s., 1 H), 10,41 (br. s., 1 H) là hỗn hợp của các chất đồng phân quay.

Hợp chất 35: N-(3-clo-2,4-diflo-phenyl)-2-metyl-1-[2-oxo-2-[[[(1R)-2,2,2-triflo-1-metyl-etyl]amino]axetyl]piperidin-3-carboxamit



Etyl 1-(2-etoxy-2-oxo-axetyl)-2-metyl-piperidin-3-carboxylat được điều chế từ etyl 2-metyl-piperidin-3-carboxylat, tương tự như được mô tả cho metyl (2S,3S)-1-(2-etoxy-2-oxo-axetyl)-2-metyl-pyrolidin-3-carboxylat từ metyl (2S,3S)-2-metylpyrrolidin-3-carboxylat. Hợp chất 35 được điều chế tương tự như được mô tả cho hợp chất 33, bắt đầu từ etyl 1-(2-etoxy-2-oxo-axetyl)-2-metyl-piperidin-3-carboxylat thay vì metyl (2S,3S)-1-(2-etoxy-2-oxo-axetyl)-2-metyl-pyrolidin-3-carboxylat và bằng cách sử dụng 3-clo-2,4-diflo-anilin thay cho 3-clo-4,5-difloanilin. Hợp chất 35 (550mg) được tách trong các chất đồng phân không đối quang 35a, 35b, 35c và 35d thông qua SFC điều chế (Pha tĩnh: Chiralpak Daicel IC 20 x 250 mm, Pha động: CO₂, EtOH với iPrNH₂ 0,2%). Hợp chất 35a ((2S,3S) hoặc (2R,3R)), rửa giải lần đầu trên

SFC, 70mg), Phương pháp D, Rt = 1,86 phút, m/z = 454,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 455,1. Hợp chất 35b ((2S,3S) hoặc (2R,3R), rửa giải lần hai trên SFC, 88mg)

Phương pháp D, Rt = 1,87 phút, m/z = 454,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 455,1.

Hợp chất 35c ((2S,3R) hoặc (2R,3S), rửa giải lần ba trên SFC, 86mg), Phương pháp D, Rt = 1,89 phút, m/z = 454,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 455,1. Hợp chất 35d ((2S,3R) hoặc (2R,3S), rửa giải lần bốn trên SFC, 106mg), Phương pháp D, Rt = 1,88 phút, m/z = 454,1 (M-H)⁻, Khối lượng chính xác: 455,1.

Ví dụ sinh học – hoạt tính kháng HBV của hợp chất có công thức (I)

Hoạt tính kháng HBV được xác định bằng cách sử dụng dòng tế bào được chuyển nhiễm ổn định, HepG2.2.15. Dòng tế bào này đã mô tả là tiết nồng độ cao tương đối phù hợp của các hạt virion HBV, mà được thể hiện là gây ra cả sự nhiễm cấp tính và mãn tính và bệnh ở tinh tinh.

Về tính kháng virus, tế bào thử nghiệm được xử lý hai lần trong ba ngày bằng hợp chất được pha loãng theo dãy trong đĩa 96 giếng với 2 lần lặp lại. Sau 6 ngày xử lý, hoạt tính kháng virus được xác định bằng cách định lượng ADN của HBV được tinh chế từ virion được tiết bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và bộ môi và mẫu dò đặc hiệu HBV.

Hoạt tính kháng HBV cũng được xác định bằng cách sử dụng dòng tế bào HepG2.117, dòng tế bào sản xuất HBV ổn định, theo cách cảm ứng, sao chép HBV khi vắng mặt doxycyclin (hệ Tet-off). Với thử nghiệm kháng virus, sự sao chép của HBV được cảm ứng, sau đó là xử lý với hợp chất được pha loãng theo dãy trong đĩa 96 giếng với hai lần lặp lại. Sau 3 ngày xử lý, hoạt tính kháng virus được xác định bằng cách định lượng ADN HBV nội bào bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và bộ môi và mẫu dò đặc hiệu HBV.

Độc tính tế bào của hợp chất được kiểm tra bằng cách sử dụng tế bào HepG2, được ủ trong 4 ngày với sự có mặt của hợp chất. Khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm Resazurin. Kết quả được thể hiện trong bảng 1.

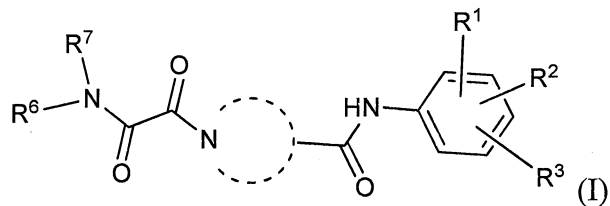
Bảng 1

Hợp chất số	HepG2 2.15 EC50 (μM)	HepG2 117 EC50 (μM)	HepG2 4 ngày CC50 (μM)
1	0,020	0,018	>25
2	0,070	0,033	>25
3	0,141	0,026	>25
4	0,126	0,071	>25
5	0,112	0,046	>25
6	0,301	0,257	>25
7	0,067	0,117	>25
8	0,065	0,038	>25
9	0,120	0,134	>25
10	0,008	0,009	>25
11	0,032	0,017	>25
12	0,321	0,115	>25
13	0,020	0,035	>25
14	0,064	0,045	>25
15	0,025	0,047	>25
16	0,058	0,035	>25
17a	>1	>1	>25
17b	0,918	0,796	>25
17c	>1	>1	>25
17d	0,070	0,032	>25
18		0,670	>25
19	0,496	0,449	>25
20	0,289	0,645	>25

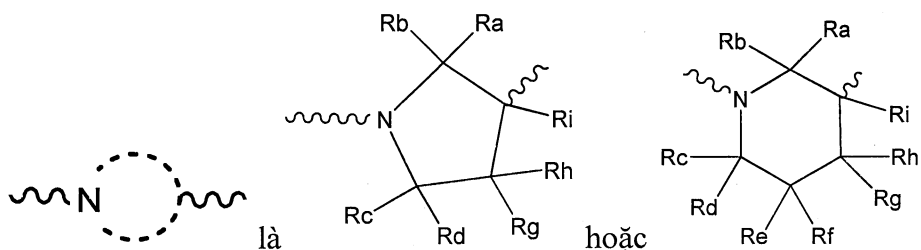
Hợp chất số	HepG2 2.15 EC50 (μM)	HepG2 117 EC50 (μM)	HepG2 4 ngày CC50 (μM)
21	0,063	0,063	>25
22	0,110	0,128	>25
23	0,380	0,575	>25
24	0,134	0,384	>25
25	0,042	0,031	>25
26	0,168	0,122	>25
27	0,119	0,126	>25
28	0,050	0,083	>25
29a	0,010	0,011	>25
29b	>1	>1	>25
29	0,018	0,048	>25
30	0,161	0,125	>25
31	0,134	0,143	>25
32		0,052	>25
33a		>0,5	>25
33b		0,005	>25
34a		>0,5	>25
34b		0,004	>25
35a	>1	>1	>25
35b	0,195	0,483	>25
35c	>1	>1	>25
35d	>1	>1	>25

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I):



hoặc chất đồng phân lập thể hoặc tautome của nó, trong đó:



mỗi trong số Ra, Rb, Rc, Rd, Re, Rf và Rg độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro và metyl;

Rh là hydro;

Ri là hydro;

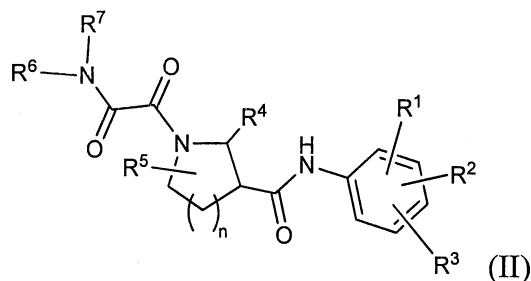
R¹, R² và R³ độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, flo, clo, brom, -CHF₂, -CH₂F, -CF₃, -CN và metyl;

R⁶ được chọn từ nhóm bao gồm C₁-C₆alkyl và vòng no có từ 3 đến 7 cạnh tùy ý chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại, mỗi nguyên tử khác loại này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm O, S và N, C₁-C₆alkyl hoặc vòng no có từ 3 đến 7 cạnh này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm flo, C₁-C₃alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều flo, CN, OH;

R⁷ là hydro;

hoặc muối được dụng của nó hoặc solvat của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức (II):



hoặc chất đồng phân lập thể hoặc tautome của nó, trong đó:

n là số nguyên 1 hoặc 2;

R^1 , R^2 và R^3 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, flo, clo, brom, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ và metyl;

R^4 và R^5 độc lập được chọn từ hydro hoặc metyl;

R^6 được chọn từ nhóm bao gồm C_1 - C_6 alkyl và vòng no có từ 3 đến 7 cạnh tùy ý chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại, mỗi nguyên tử khác loại này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm O, S và N, C_1 - C_6 alkyl hoặc vòng no có từ 3 đến 7 cạnh này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm flo, C_1 - C_3 alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều flo, $-\text{CN}$, OH;

R^7 là hydro;

hoặc muối được dụng của nó hoặc solvat của nó.

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó R^1 được chọn từ hydro, flo, clo, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$ hoặc metyl.

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó ít nhất hai trong số R^1 , R^2 và R^3 là flo, clo hoặc brom.

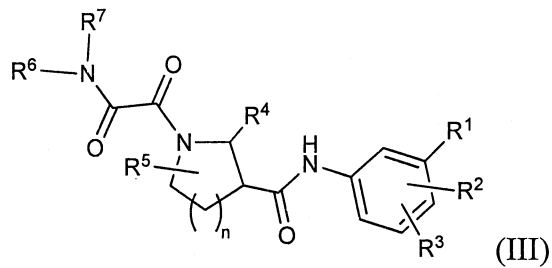
5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó R^4 là metyl.

6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó R^6 là vòng no có từ 3 đến 7 cạnh tùy ý chứa một nguyên tử oxy, vòng no có từ 3 đến 7 cạnh này tùy ý được thế bằng metyl.

7. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó R^6 là vòng no có 4 hoặc 5 cạnh chứa một nguyên tử oxy, vòng no có 4 hoặc 5 cạnh này tùy ý được thế bằng metyl.

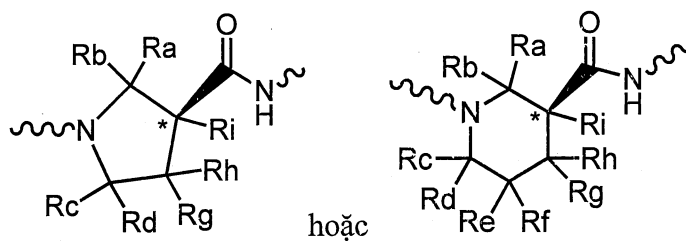
8. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó R^6 là C_1 - C_6 alkyl mạch nhánh tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều flo.

9. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hợp chất này có công thức (III):

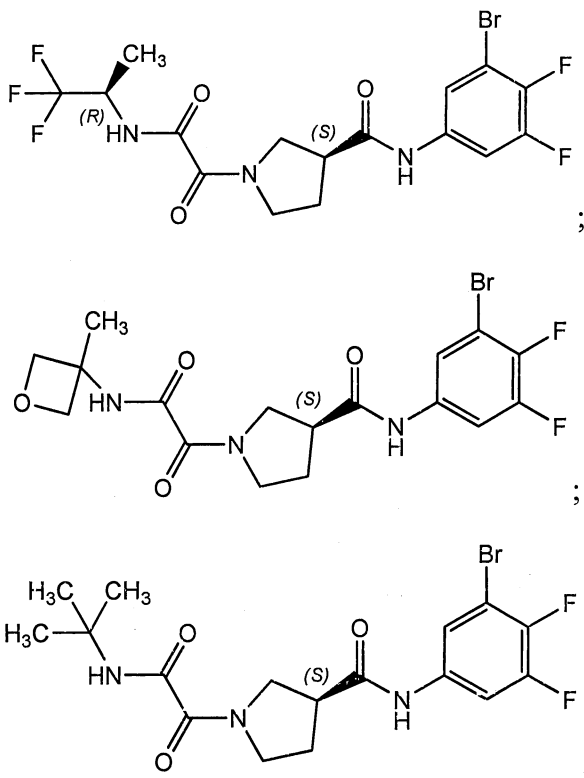


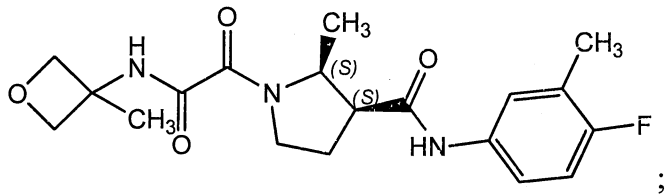
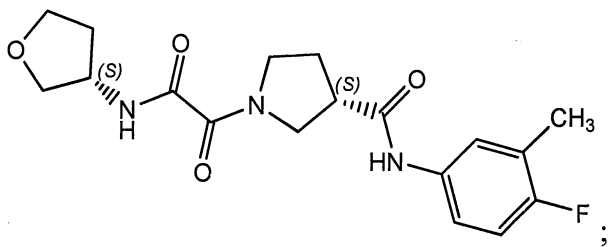
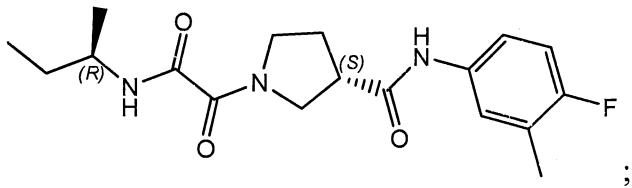
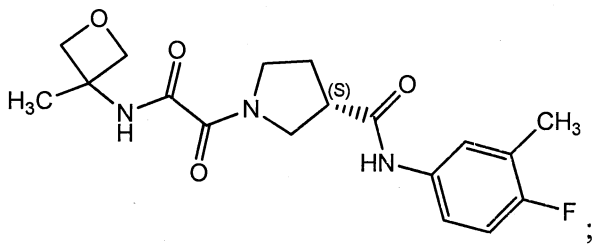
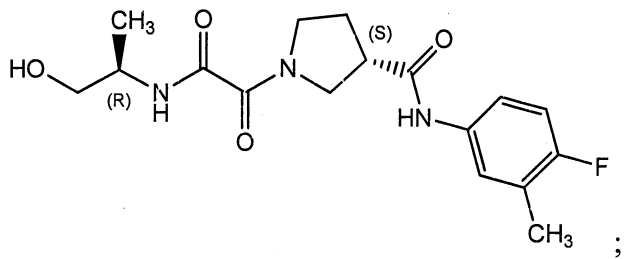
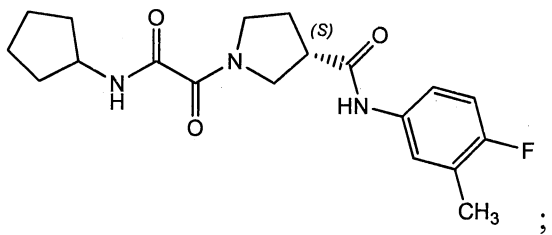
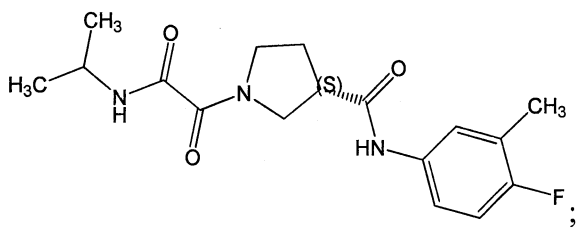
trong đó R¹ không phải là hydro.

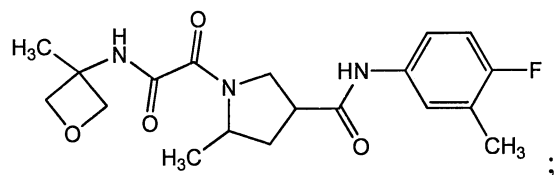
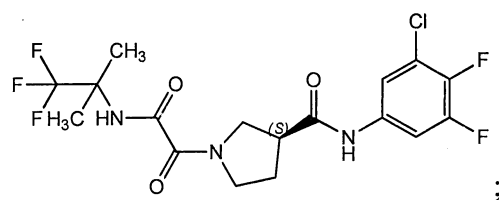
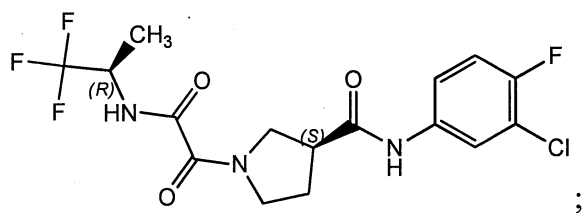
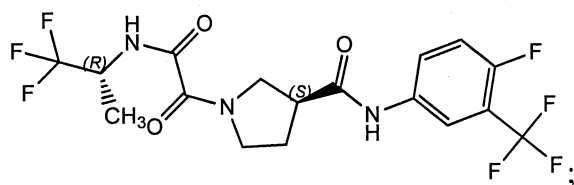
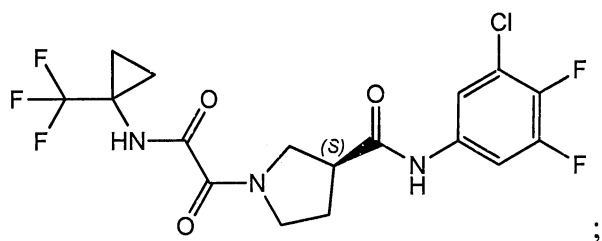
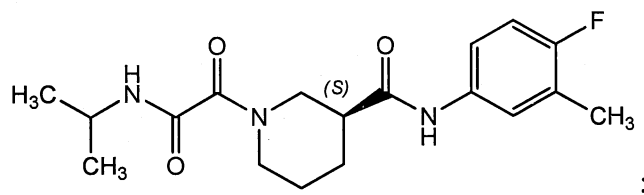
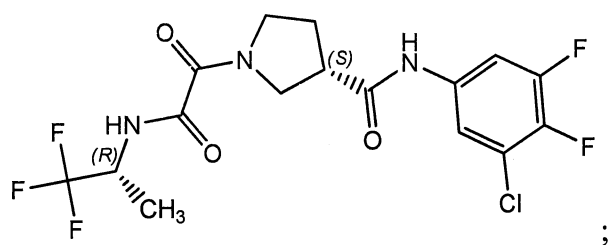
10. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cấu hình hóa học lập thể của nguyên tử (*) là như sau:

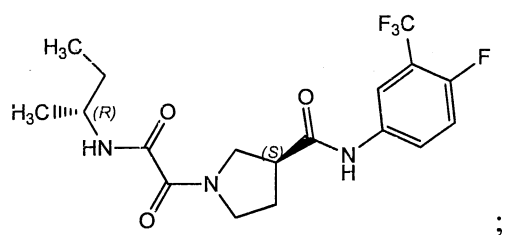
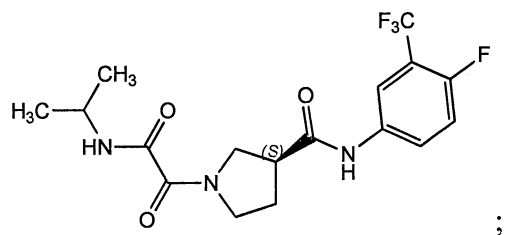
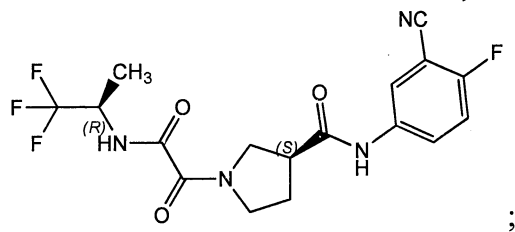
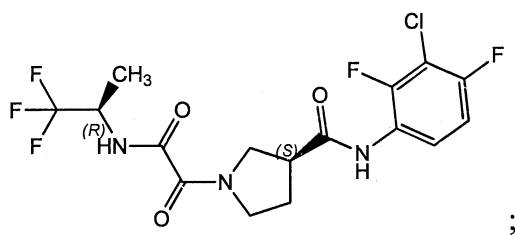
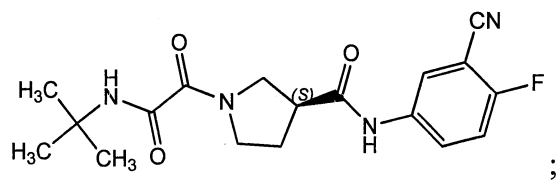
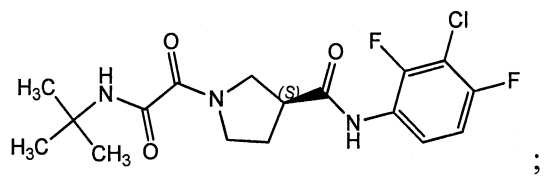
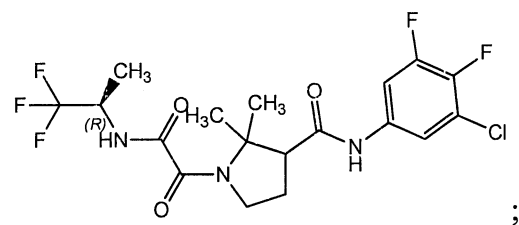


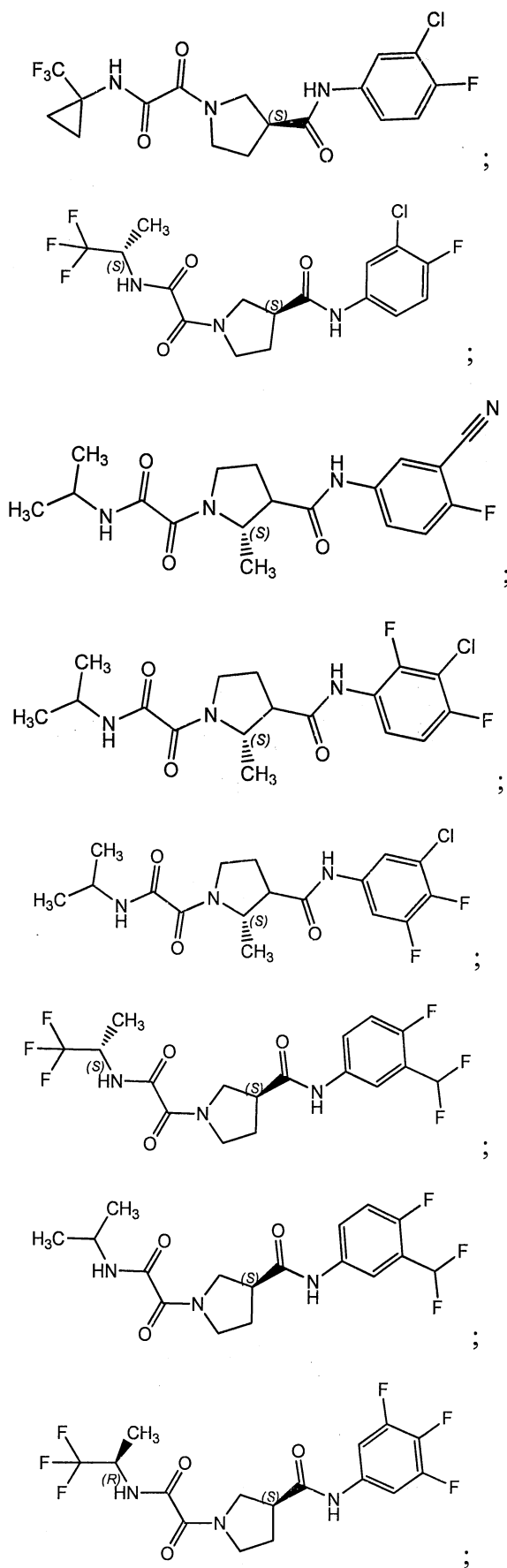
11. Hợp chất có công thức:

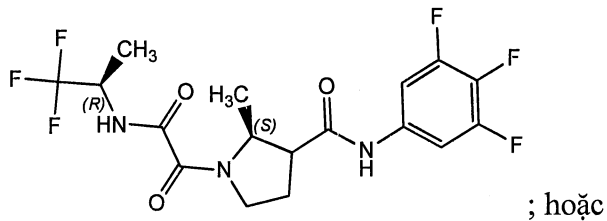
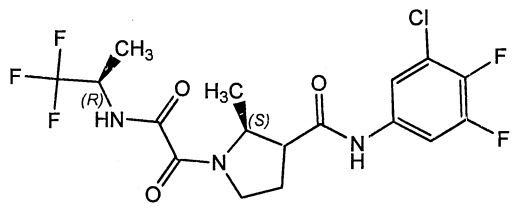




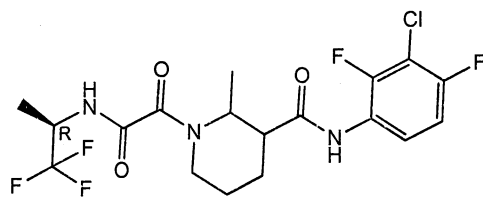








; hoặc



;

hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

12. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, và chất mang được dụng.

13. Tổ hợp chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 và ít nhất một chất kháng HBV khác.