



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C07D 209/26; A61K 31/404; A61P 31/12 (13) B

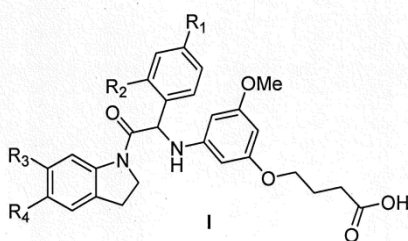


1-0030915

- (21) 1-2018-04334 (22) 31/03/2017
(86) PCT/EP2017/057661 31/03/2017 (87) WO 2017/167951 05/10/2017
(30) 16163488.6 01/04/2016 EP
(45) 25/01/2022 406 (43) 25/12/2018 369A
(73) 1. JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (US)
1125 Trenton-Harbourton Road, Titusville, NJ New Jersey 08560, United States of America
2. KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (BE)
Waaistraat 6, bus 5105 3000 Leuven, Belgium
(72) KESTELEYN, Bart Rudolf Romanie (BE); RABOISSON, Pierre Jean-Marie Bernard (FR); BONFANTI, Jean-François (FR); BARDIOT, Dorothee Alice Marie-Eve (FR); MARCHAND, Arnaud Didier M (FR).
(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT INDOLIN ĐƯỢC THỂ DÙNG LÀM CHẤT ỨC CHẾ SỰ SAO CHÉP CỦA VIRUT DENGUE VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất indolin được thể có công thức (I), cũng như đề cập đến hợp chất này dùng làm thuốc, cụ thể là dùng làm thuốc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm virus dengue. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm hoặc dược phẩm kết hợp của hợp chất, đề cập đến dược phẩm hoặc dược phẩm kết hợp dùng làm thuốc, cụ thể là để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm virus dengue. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình điều chế hợp chất này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất indolin được thể có công thức (I), cũng như đề cập đến hợp chất này dùng làm thuốc, cụ thể là dùng làm thuốc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm virus dengue. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm hoặc dược phẩm kết hợp của hợp chất, đề cập đến dược phẩm hoặc dược phẩm kết hợp dùng làm thuốc, cụ thể là để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm virus dengue. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình điều chế hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Flavivirus, do muỗi hoặc ve truyền, gây ra các bệnh nhiễm nguy hiểm đến tính mạng ở người, như bệnh viêm não và bệnh sốt xuất huyết. Bốn typ huyết thanh khác biệt, song liên quan mật thiết, của flavivirus dengue là đã biết, lần lượt được ký hiệu là DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4. Dengue là dịch bệnh có tính địa phương ở hầu hết các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới, chủ yếu ở các khu vực đô thị và bán đô thị. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), 2,5 tỷ người trong đó 1 tỷ trẻ em có nguy cơ bị nhiễm DENV (WHO, 2002). Có khoảng 50 đến 100 triệu ca sốt dengue [DF], một nửa triệu ca mắc bệnh dengue nặng (tức là sốt xuất huyết dengue [DHF] và hội chứng sốc dengue [DSS]), và hơn 20.000 ca tử vong trên thế giới mỗi năm. DHF trở thành nguyên nhân hàng đầu gây nhập viện và tử vong ở trẻ em trong các vùng dịch địa phương. Nói chung, dengue là nguyên nhân phổ biến nhất của bệnh do arbovirus. Gần đây, do sự bùng phát rộng ở các quốc gia châu Mỹ la-tinh, Đông Nam Á và tây Thái Bình Dương (bao gồm Braxin, Puerto Rico, Venezuela, Cam-pu-chia, Indonexia, Việt Nam, Thái Lan), số ca dengue tăng lên đáng kể trong các năm qua. Không chỉ số ca dengue lây truyền tới các khu vực mới, mà sự bùng phát có xu hướng nặng hơn.

Mặc dù có tiến bộ trong việc phát triển các vaccin phòng ngừa dengue với khả năng sử dụng vaccin Dengvaxia[®], nhưng vẫn gặp phải rất nhiều khó khăn. Các khó khăn này bao gồm sự tồn tại của hiện tượng gọi là sự tăng cường phụ thuộc vào kháng thể (antibody-dependent enhancement: ADE). Sự phục hồi sau khi nhiễm một typ huyết thanh tạo ra tính miễn dịch suốt đời đối với typ huyết thanh đó song chỉ mang lại sự

phòng ngừa một phần và tạm thời đối với bệnh nhiễm tiếp theo bởi một trong ba typ huyết thanh còn lại.

Sau khi nhiễm typ huyết thanh khác, các kháng thể khác loại tồn tại trước đó tạo ra các phức chất với typ huyết thanh virus dengue vừa nhiễm mà không trung hòa tác nhân gây bệnh này. Thay vào đó, lõi vào tế bào của virus được tin là được tạo điều kiện thuận lợi, dẫn đến sự sao chép virus không kiểm soát và hiệu giá virus có đỉnh cao hơn. Trong cả nhiễm tiên phát và nhiễm thứ phát, hiệu giá virus cao hơn có liên quan đến bệnh dengue nặng hơn. Do kháng thể người mẹ dễ dàng đi vào trẻ nhỏ qua đường bú, đây có thể là một trong số các lý do khiến trẻ em bị ảnh hưởng nhiều hơn bởi bệnh dengue nặng so với người trưởng thành.

Ở những nơi có hai hoặc nhiều typ huyết thanh lưu hành đồng thời, còn gọi là các vùng dịch có tính địa phương cao, nguy cơ bệnh dengue nặng là cao hơn đáng kể do gia tăng nguy cơ mắc bệnh nhiễm thứ phát nặng hơn. Hơn nữa, trong trường hợp dịch có tính địa phương cao, khả năng phát sinh các chủng độc hơn sẽ gia tăng, điều này lại làm tăng khả năng sốt xuất huyết dengue (DHF) hoặc hội chứng sốc dengue.

Các muỗi mang virus dengue, bao gồm *Aedes aegypti* và *Aedes albopictus* (muỗi vằn), di chuyển về phía bắc địa cầu. Theo Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ (Centers for Disease Control and Prevention: CDC), cả hai loài muỗi này hiện có mặt ở khắp miền nam Texas. Sự lan truyền về phía bắc của muỗi mang virus dengue không chỉ giới hạn ở Mỹ, mà còn được quan sát thấy ở châu Âu.

Dengvaxia[®], vaccin dengue do Sanofi Pasteur sản xuất, đầu tiên được phê chuẩn tại Mexico và chờ sự phê chuẩn ở nhiều quốc gia. Tuy nhiên, vaccin này vẫn rất cần được cải thiện do hiệu quả có hạn, đặc biệt đối với DENV-1 và DENV-2, hiệu quả thấp ở các đối tượng chưa tiếp xúc với flavivirus và chế độ định liều quá dài.

Mặc dù có những thiếu sót này, vaccin này là nhân tố thay đổi cuộc chơi trong trường hợp dịch có tính địa phương do nó sẽ mang lại sự phòng ngừa cho phần lớn dân số, song có thể không mang lại sự phòng ngừa cho các trẻ nhỏ, đối tượng chịu ảnh hưởng lớn nhất bởi dengue. Ngoài ra, chế độ định liều và hiệu quả rất hạn chế ở các đối tượng chưa tiếp xúc với flavivirus khiến cho nó không thích hợp và có thể không đáng giá/hiệu quả kinh tế đối với du khách từ các khu vực không có dịch địa phương đến các

khu vực có dịch địa phương dengue. Các thiếu sót nêu trên của vacxin dengue là lý do tại sao cần có thuốc kháng virus dengue dự phòng tiền phơi nhiễm.

Hơn nữa, hiện nay, các thuốc kháng virus đặc hiệu để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm virus sốt dengue là không khả dụng. Rõ ràng, vẫn rất cần có các thuốc để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm virus ở động vật, cụ thể là ở người và đặc biệt là đối với các bệnh nhiễm virus do Flavivirus gây ra, cụ thể là do virus Dengue gây ra. Rất cần có các hợp chất có hiệu nghiệm kháng virus tốt, không có tác dụng phụ hoặc có tác dụng phụ ở mức thấp, hoạt tính phổ rộng đối với nhiều typ huyết thanh virus Dengue, độc tính thấp và/hoặc các đặc tính dược động học hoặc dược lực học tốt.

WO-2010/021878 bộc lộ các dẫn xuất 2-phenylpyrrolidin và indolin làm chất đối kháng thụ thể mentol để điều trị bệnh viêm và bệnh trung ương. WO-2013/045516 bộc lộ các dẫn xuất indol và indolin dùng để điều trị các bệnh nhiễm virus dengue.

Sáng chế đề xuất các hợp chất, các dẫn xuất indolin được thế, có hoạt tính hiệu nghiệm cao đối với cả bốn (4) typ huyết thanh của virus Dengue.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên việc phát hiện bất ngờ rằng ít nhất một trong số các vấn đề nêu trên có thể được giải quyết bằng các hợp chất theo sáng chế.

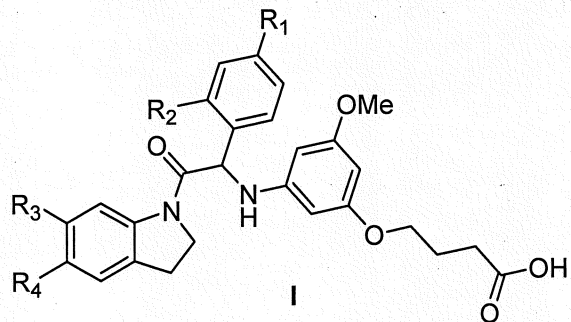
Sáng chế đề xuất các hợp chất đã được chứng minh là có hoạt tính kháng virus hiệu nghiệm đối với cả bốn (4) typ huyết thanh hiện đã biết. Sáng chế cũng chứng minh rằng các hợp chất này ức chế hữu hiệu sự tăng sinh của virus Dengue (DENV). Do đó, các hợp chất này cấu thành nên lớp hợp chất hiệu nghiệm có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh nhiễm virus ở động vật, động vật có vú và người, cụ thể là để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh nhiễm virus Dengue.

Bản mô tả cũng đề cập đến việc sử dụng các hợp chất này làm thuốc và sử dụng chúng để sản xuất dược phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh nhiễm virus, cụ thể là các virus thuộc họ virus Dengue ở động vật hoặc động vật có vú, cụ thể là ở người. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế các hợp chất này và phương pháp sản xuất dược phẩm chứa chúng với lượng hữu hiệu.

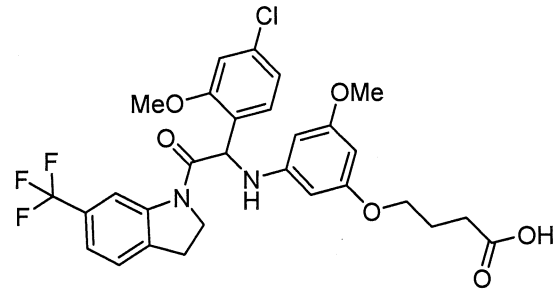
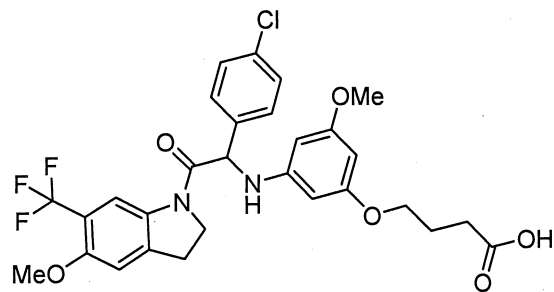
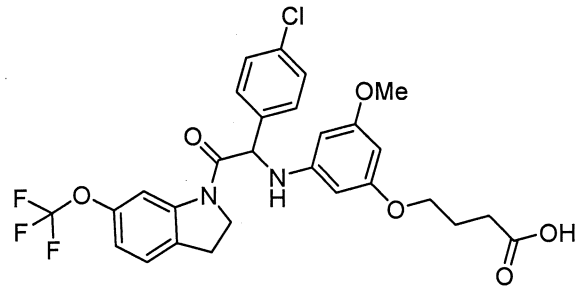
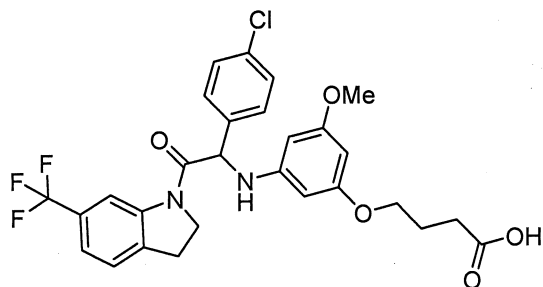
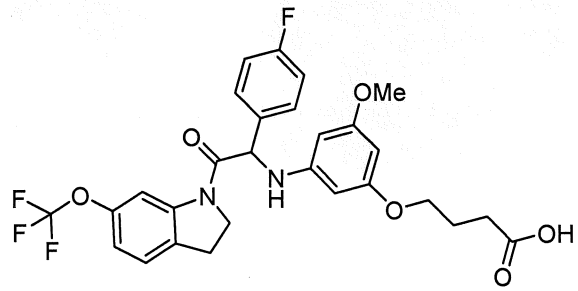
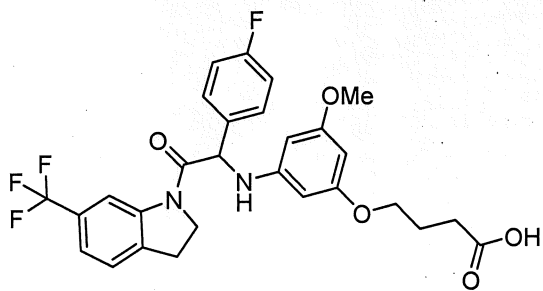
Bản mô tả cũng đề cập đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh nhiễm virus dengue bằng cách cho bệnh nhân có nhu cầu dùng lượng hữu hiệu của một hoặc

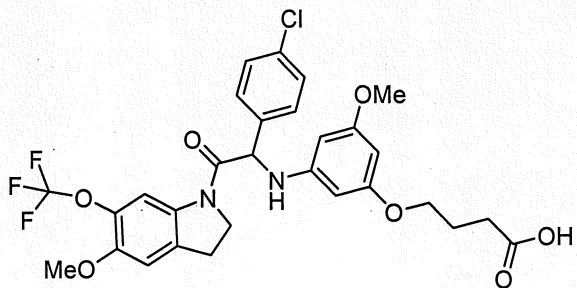
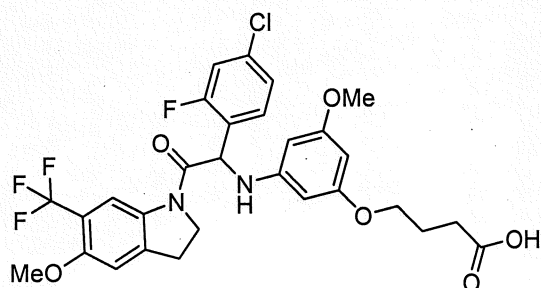
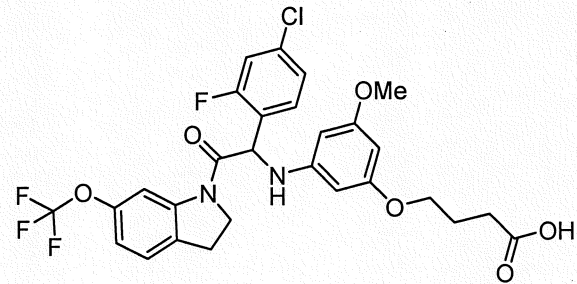
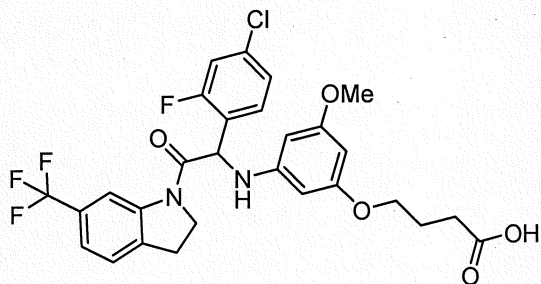
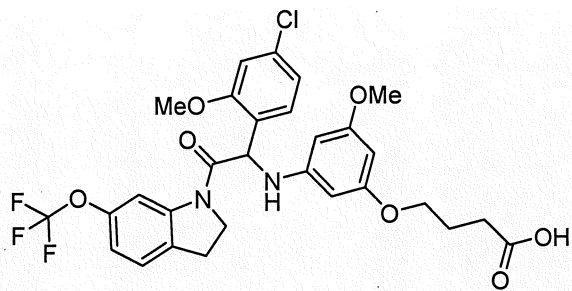
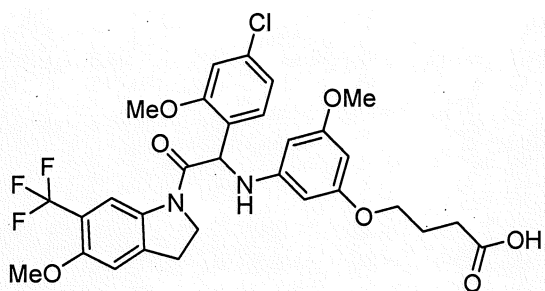
nhieu hợp chất này, hoặc muối được dụng của chúng tùy ý kết hợp với một hoặc nhiều thuốc khác, như chất kháng virus khác.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), dạng đồng phân lập thể, muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó:

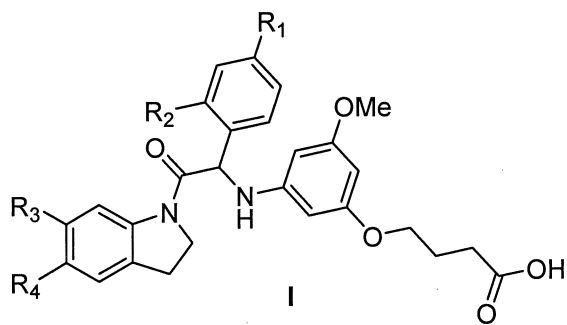


trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm:





Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I)



dạng đồng phân lập thể, muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó, trong đó

R₁ là flo, R₂ là hydro, R₃ là triflometyl, và R₄ là hydro; hoặc

R₁ là flo, R₂ là hydro, R₃ is triflometoxy, và R₄ là hydro; hoặc

R₁ là clo, R₂ là hydro, R₃ là triflometyl, và R₄ là hydro; hoặc

R₁ là clo, R₂ là hydro, R₃ là triflometoxy, và R₄ là hydro; hoặc

R₁ là clo, R₂ là hydro, R₃ là triflometyl, và R₄ là metoxy; hoặc

R₁ là clo, R₂ là metoxy, R₃ là triflometyl, và R₄ là hydro; hoặc

R₁ là clo, R₂ là metoxy, R₃ là triflometyl, và R₄ là metoxy; hoặc

R₁ là clo, R₂ là metoxy, R₃ là triflometoxy, và R₄ là hydro; hoặc

R₁ là clo, R₂ là flo, R₃ là triflometyl, và R₄ là hydro; hoặc

R₁ là clo, R₂ là flo, R₃ là triflometoxy, và R₄ là hydro; hoặc

R₁ là clo, R₂ là flo, R₃ là triflometyl, và R₄ là metoxy; hoặc

R₁ là clo, R₂ là hydro, R₃ là triflometoxy, và R₄ là metoxy.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa hợp chất nêu trên hoặc dạng đồng phân lập thể, muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó cùng với một hoặc nhiều tá được, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Muối được dụng của hợp chất nêu trên bao gồm muối cộng axit và muối bazơ của nó. Các muối cộng axit thích hợp được tạo ra từ các axit tạo muối không độc. Các muối bazơ thích hợp được tạo ra từ các bazơ tạo muối không độc.

Hợp chất chất theo sáng chế cũng có thể tồn tại dưới dạng không solvat và solvat. Thuật ngữ “solvat” được sử dụng trong bản mô tả này để mô tả phức chất phân tử chứa hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều phân tử dung môi được dụng, ví dụ, etanol.

Thuật ngữ “dạng đa hình” chỉ khả năng của hợp chất theo sáng chế tồn tại ở nhiều hơn một dạng hoặc cấu trúc tinh thể.

Hợp chất theo sáng chế có thể được dùng dưới dạng kết tinh hoặc vô định hình. Chúng có thể được thu, ví dụ, dưới dạng bánh rắn, bột hoặc màng bằng các phương pháp như kết tủa, kết tinh, làm khô ở nhiệt độ thấp, sấy phun, hoặc làm khô bay hơi. Chúng có thể được dùng riêng hoặc kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất khác theo sáng chế hoặc kết hợp với một hoặc nhiều được chất khác. Nói chung, chúng sẽ được dùng dưới dạng chế phẩm kết hợp với một hoặc nhiều tá được dụng được dụng. Thuật ngữ “tá được” được sử dụng trong bản mô tả này để mô tả thành phần bất kỳ không phải (các) hợp chất theo sáng chế. Việc chọn tá được phụ thuộc chủ yếu vào các yếu tố như cách dùng cụ thể, tác dụng của tá được đối với độ hòa tan và độ ổn định, và tính chất của dạng liều.

Hợp chất theo sáng chế hoặc phân nhóm bất kỳ của nó có thể được điều chế thành các dạng dược phẩm khác nhau cho mục đích sử dụng. Các dược phẩm thích hợp có thể được viên dẫn bao gồm tất cả các dược phẩm thường được sử dụng cho các dược chất dùng toàn thân. Để bào chế dược phẩm theo sáng chế, lượng hữu hiệu của hợp chất cụ thể, tùy ý dạng muối, làm hoạt chất được trộn nhuyển với chất mang dược dụng, chất mang này có thể ở nhiều dạng tùy theo dạng dược phẩm muốn dùng. Các dược phẩm này cần ở dạng liều đơn vị thích hợp, ví dụ, để dùng qua đường miệng hoặc trực tràng. Ví dụ, để bào chế dược phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng, chất dẫn thuốc thông thường bất kỳ có thể được sử dụng như, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và chất tương tự trong trường hợp của các dược phẩm lỏng dùng qua đường miệng như huyền phù, xi-rô, cồn ngọt, nhũ tương, và dung dịch; hoặc các chất mang rắn như tinh bột, đường, cao lanh, chất pha loãng, chất làm trơn, chất liên kết, chất gây rã và chất tương tự trong trường hợp của bột, viên tròn, viên nang và viên nén. Do dễ dùng, viên nén và viên nang là các dạng đơn vị liều dùng qua đường miệng thuận lợi nhất, trong trường hợp này các chất mang thuốc rắn hiển nhiên được sử dụng. Cũng được bao gồm là các dược phẩm dạng rắn có thể được chuyển hóa, ngay trước khi sử dụng, thành dạng lỏng.

Đặc biệt có lợi nếu bào chế các dược phẩm nêu trên ở dạng đơn vị dễ dễ dùng và đồng nhất liều. Dạng liều đơn vị như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý thích hợp làm các liều đơn vị, mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hoạt chất được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn kết hợp với chất mang thuốc yêu cầu. Các ví dụ về dạng liều đơn vị này là viên nén (bao gồm viên nén được khía hoặc được bao), viên nang, viên tròn, gói bột, viên nhện, thuốc đạn, dung dịch hoặc huyền phù tiêm và dạng tương tự, và các dạng chia nhỏ của chúng.

Người có hiểu biết trong điều trị bệnh nhiễm có thể xác định được lượng hữu hiệu từ các kết quả thử nghiệm được trình bày sau đây. Nói chung, dự tính rằng lượng hằng ngày hữu hiệu nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 50 mg/kg thể trọng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 mg/kg đến 10 mg/kg thể trọng. Có thể thích hợp nếu dùng các liều yêu cầu dưới dạng hai, ba, bốn hoặc hơn liều chia nhỏ với khoảng cách thích hợp trong ngày. Các liều chi nhỏ này có thể được bào chế dưới dạng liều đơn vị, ví dụ, chứa hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000 mg, và cụ thể là nằm trong khoảng từ 5 đến 200 mg/dạng liều đơn vị.

Liều lượng và tần suất dùng chính xác phụ thuộc vào hợp chất cụ thể theo sáng chế, tình trạng cụ thể cần điều trị, mức độ nghiêm trọng của tình trạng cần điều trị, độ tuổi, thể trọng và tình trạng thể chất chung của bệnh nhân cụ thể cũng như thuốc khác mà bệnh nhân dùng, như được người có hiểu biết trong lĩnh vực này biết rõ. Hơn nữa, rõ ràng rằng lượng hữu hiệu có thể tăng hoặc giảm tùy theo đáp ứng của đối tượng được điều trị và/hoặc tùy theo đánh giá của bác sỹ kê đơn hợp chất theo sáng chế. Do đó, giới hạn lượng hữu hiệu nêu trên chỉ là hướng dẫn và không được dự tính làm giới hạn phạm vi hoặc sử dụng của sáng chế ở mức độ bất kỳ.

Sáng chế cũng dự tính bao gồm các chất đồng vị bất kỳ của các nguyên tử có mặt trong hợp chất theo sáng chế. Ví dụ, các chất đồng vị của hydro bao gồm triti và đoteri và các chất đồng vị của cacbon bao gồm C-13 và C-14.

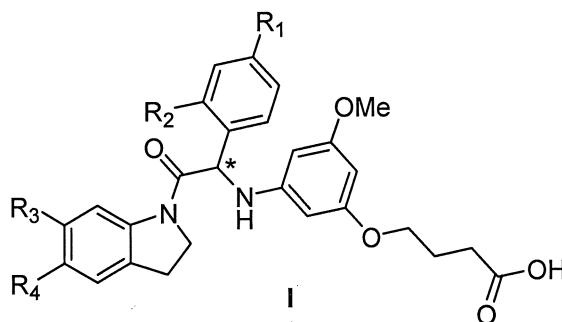
Hợp chất theo sáng chế cũng có thể tồn tại ở dạng đồng phân hóa lập thể, bằng cách xác định tất cả các hợp chất có thể có được tạo nên bởi cùng các nguyên tử được liên kết bởi cùng trình tự liên kết song có cấu trúc ba chiều khác nhau, chúng không thể thay thế cho nhau. Trừ khi có quy định khác, ký hiệu hóa học của các hợp chất bao gồm tất cả các dạng đồng phân hóa lập thể có thể có, mà các hợp chất nêu trên có thể có. Hỗn hợp này có thể chứa tất cả các chất đồng phân không đối quang và/hoặc chất đồng phân đối quang có cấu trúc phân tử cơ bản của hợp chất nêu trên. Tất cả các dạng đồng phân hóa lập thể của các hợp chất được sử dụng theo sáng chế ở dạng tinh khiết hoặc trộn với nhau được dự tính là nằm trong phạm vi của sáng chế bao gồm hỗn hợp triet quang bất kỳ hoặc các raxemat.

Các dạng đồng phân lập thể tinh khiết của các hợp chất và chất trung gian như nêu trong bản mô tả này được xác định là các chất đồng phân về bản chất không chứa các dạng đồng phân đối quang hoặc đồng phân không đối quang khác có cùng cấu trúc phân tử cơ bản của các hợp chất và chất trung gian đã nêu. Cụ thể, thuật ngữ 'tinh khiết về mặt đồng phân lập thể' chỉ hợp chất hoặc chất trung gian chứa lượng dư đồng phân lập thể ít nhất 80% (tức là tối thiểu 90% một chất đồng phân và tối đa 10% chất đồng phân có thể có còn lại) đến lượng dư đồng phân lập thể 100% (tức là 100% một chất đồng phân và không có chất đồng phân còn lại), cụ thể là hợp chất hoặc chất trung gian chứa lượng dư đồng phân lập thể nằm trong khoảng từ 90% đến 100%, cụ thể hơn là lượng dư đồng phân lập thể nằm trong khoảng từ 94% đến 100% và đặc biệt là lượng

đồng phân lập thể nằm trong khoảng từ 97% đến 100%. Các thuật ngữ ‘tinh khiết về mặt đồng phân đối quang’ và ‘tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang’ cần được hiểu theo cách tương tự, song lại là về lượng đồng phân đối quang, tiếp theo là lượng đồng phân không đối quang của hỗn hợp được đề cập.

Các dạng đồng phân lập thể tinh khiết của các hợp chất và chất trung gian được sử dụng theo sáng chế có thể được thu bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các chất đồng phân đối quang có thể được tách ra khỏi nhau bằng cách kết tinh chọn lọc các muối đồng phân không đối quang của chúng bằng các axit hoặc bazơ quang hoạt. Các ví dụ về axit này là axit tartaric, axit dibenzoyltartaric, axit ditoluoyltartaric và axit camphosulfonic. Theo cách khác, các chất đồng phân đối quang có thể được tách ra bằng kỹ thuật sắc ký bằng cách sử dụng pha tĩnh không đối xứng. Các dạng đồng phân hóa lập thể tinh khiết nêu trên cũng có thể được tạo ra từ các dạng đồng phân hóa lập thể tinh khiết tương ứng của nguyên liệu thích hợp, với điều kiện phản ứng xảy ra một cách đặc hiệu lập thể. Tốt hơn là, nếu cần có chất đồng phân lập thể riêng, hợp chất nêu trên sẽ được tổng hợp bằng các phương pháp điều chế đặc hiệu lập thể. Có lợi nếu các phương pháp này sử dụng các nguyên liệu tinh khiết về mặt đồng phân đối quang.

Hợp chất có công thức (I) theo sáng chế đều có ít nhất một nguyên tử cacbon không đối xứng như được chỉ ra trên hình vẽ ở dưới bằng nguyên tử cacbon có dấu *:



Do sự có mặt của nguyên tử cacbon không đối xứng nêu trên, “hợp chất có công thức (I)” có thể là chất đồng phân đối quang (R), chất đồng phân đối quang (S), dạng triệt quang, hoặc tổ hợp có thể có bất kỳ của hai chất đồng phân đối quang riêng rẽ theo tỷ lệ bất kỳ. Khi cấu hình (R) hoặc (S) tuyệt đối của một chất đồng phân đối quang là chưa biết, chất đồng phân đối quang này cũng có thể được nhận dạng bằng cách chỉ ra

nó là quay phải (+) hay quay trái (-) sau khi đo góc quay quang riêng của chất đồng phân đối quang cụ thể nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến nhóm thứ nhất của hợp chất có công thức (I) trong đó hợp chất có công thức (I) có sự quay cực riêng (+).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến nhóm thứ hai của hợp chất có công thức (I) trong đó hợp chất có công thức (I) có sự quay cực riêng (-).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương pháp LC/MS

Phương pháp đo sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) được thực hiện bằng cách sử dụng bơm LC, đầu dò mảng điốt (diode-array detector: DAD) hoặc đầu dò tia cực tím (UV) và cột như được chỉ rõ trong các phương pháp tương ứng. Nếu cần, các đầu dò bổ sung được bao gồm (xem bảng các phương pháp ở dưới).

Dòng chảy từ cột được đưa đến khối phổ kế (Mass Spectrometer: MS) được cấu hình bằng nguồn ion áp suất khí quyển. Người có hiểu biết trong lĩnh vực này biết cách đặt các thông số điều chỉnh (ví dụ, phạm vi quét, thời gian dừng, v.v.) để thu được các ion cho phép nhận dạng trọng lượng phân tử (molecular weight: MW) đơn đồng vị danh định của hợp chất. Việc thu thập dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm thích hợp.

Các hợp chất được mô tả bằng thời gian lưu giữ thực nghiệm của chúng (R_t) và các ion. Nếu không có quy định khác trong bảng dữ liệu, ion phân tử được thông báo 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 trực tiếp ion hóa, loại sản phẩm cộng được chỉ rõ (tức là $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$, v.v.). Đối với các phân tử có nhiều kiểu đồng vị phóng xạ (Br, Cl), giá trị được thông báo là giá trị thu được đối với khối lượng đồng vị nhỏ nhất. Tất cả các kết quả được thu với các bất định thực nghiệm có liên quan chung đến phương pháp được sử dụng.

Sau đây, “SQD” có nghĩa là đầu dò tứ cực đơn (Single Quadrupole Detector), “MSD” có nghĩa là đầu dò chọn lọc khối lượng (Mass Selective Detector), “RT” có nghĩa là nhiệt độ trong phòng (room temperature), “BEH” là thể lai cầu etylsiloxan/silic

dioxit (bridged ethylsiloxane/silica hybrid), “DAD” có nghĩa là đầu dò mảng điốt (Diode Array Detector), “HSS” có nghĩa là silic dioxit độ bền cao (High Strength silica).

Mã phương pháp LC/MS (Lưu tốc được tính bằng mL/phút; nhiệt độ cột (T) được tính bằng °C; thời gian chạy được tính bằng phút).

Mã phương pháp	Thiết bị	Cột	Pha động	Gradient	Lưu tốc ----- T	Thời gian chạy (phút)
LC-A	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Quattro Micro™	Waters: BEH C18 (1,7µm, 2,1x100mm)	A: 95% CH ₃ COONH ₄ 7mM / 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	84,2% A trong 0,49 phút, đến 10,5% A trong 2,18 phút, giữ trong 1,94 phút, trở về 84,2% A trong 0,73 phút, giữ trong 0,73 phút.	0,343 mL/phút ----- 40°C	6,2
LC-B	Waters: Acquity® H-Class - DAD và SQD2TM	Waters BEH® C18 (1,7µm, 2,1x100mm)	A: CH ₃ COONH ₄ 7mM 95%/ CH ₃ CN 5%, B: CH ₃ CN	84,2% A/15,8% B đến 10,5% A trong 2,18 phút, giữ trong 1,96 phút, trở về 84,2% A/15,8% B trong 0,73 phút, giữ trong 0,49 phút.	0,343 mL/phút ----- 40°C	6,1

Mã phương pháp	Thiết bị	Cột	Pha động	Gradien	Lưu tốc ----- T	Thời gian chạy (phút)
LC-C	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Acquity® TQ detector	Waters: HSS C18 (1,8µm, 2,1x50mm)	A: 0,1% HCOOH B: CH ₃ CN	50% A đến 10% A trong 3,5 phút, giữ trong 1,5 phút.	0,5 mL/phút ----- 40°C	5
LC-D	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- SQD	Waters: BEH C18 (1,7µm, 2,1x50mm)	A: 10mM CH ₃ COONH ₄ trong 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	Từ 95% A đến 5% A trong 1,3 phút, giữ trong 0,7 phút.	0,8 mL/phút ----- 55°C	2

Phương pháp SFC/MS

Phương pháp đo SFC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký lỏng siêu tới hạn (Supercritical fluid chromatography: SFC) phân tích có bố trí bơm đôi để phân phối cacbon dioxit (CO₂) và chất cải biến, bộ tự lấy mẫu, lò cột, đầu dò mảng diot có lắp ô đo áp suất cao lên đến 400 bar. Nếu được cấu hình với khối phổ kế (MS), dòng chảy từ cột được đưa tới (MS). Người có hiểu biết trong lĩnh vực này biết cách đặt các thông số điều chỉnh (ví dụ, phạm vi quét, thời gian dừng, v.v.) để thu được các ion cho phép nhận dạng trọng lượng phân tử (molecular weight: MW) đơn đồng vị danh định của hợp chất. Việc thu thập dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm thích hợp.

Các phương pháp SFC phân tích/MS (Lưu tốc được tính bằng mL/phút; nhiệt độ cột (T) được tính bằng °C; thời gian chạy được tính bằng phút, áp lực ngược (Backpressure: BPR) được tính bằng bar.

Mã phương pháp	Cột	Pha động	Gradient	Lưu tốc ----- T	Thời gian chạy ----- BPR
SFC-A	Cột Daicel Chiralcel® OD-3 (3 µm, 100 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0,3% iPrNH ₂)	40% B giữ 3 phút	3,5 ----- 35	3 ----- 105
SFC-B	Cột Daicel Chiralcel® OD- H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: MeOH	40% B giữ 7 phút	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-C	Cột Daicel Chiralcel® OD- H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH	40% B giữ 7 phút	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-D	Cột Daicel Chiralpak® AD- H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0,3% iPrNH ₂)	50% B giữ 7 phút	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-E	Cột Daicel Chiralcel® OD- H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH	30% B giữ 7 phút	3 ----- 35	7 ----- 100

Mã phương pháp	Cột	Pha động	Gradien	Lưu tốc	Thời gian chạy
				----- T	----- BPR
SFC-F	Cột Daicel Chiralcel® OD-H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH	30% B giữ 7 phút	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-G	Cột Daicel Chiralcel® OD-H (3 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0,3% iPrNH ₂)	30% B giữ 7 phút	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-H	Cột Daicel Chiralpak® IC (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0,3% iPrNH ₂)	30% B giữ 7 phút	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-I	Cột Daicel Chiralpak® AD-3 (3 µm, 100 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0,3% iPrNH ₂)	50% B giữ 3 phút	3,5 ----- 35	3 ----- 103
SFC-J	Cột Daicel Chiralpak® AS3 (3,0 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0,2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O)	10%-50% B trong 6 phút, giữ 3,5 phút	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110

Điểm nóng chảy

Các giá trị có thể là giá trị đỉnh hoặc giới hạn nóng chảy, và được thu với các bất định thực nghiệm có liên quan chung đến phương pháp phân tích này.

DSC823e (được chỉ ra dưới dạng DSC)

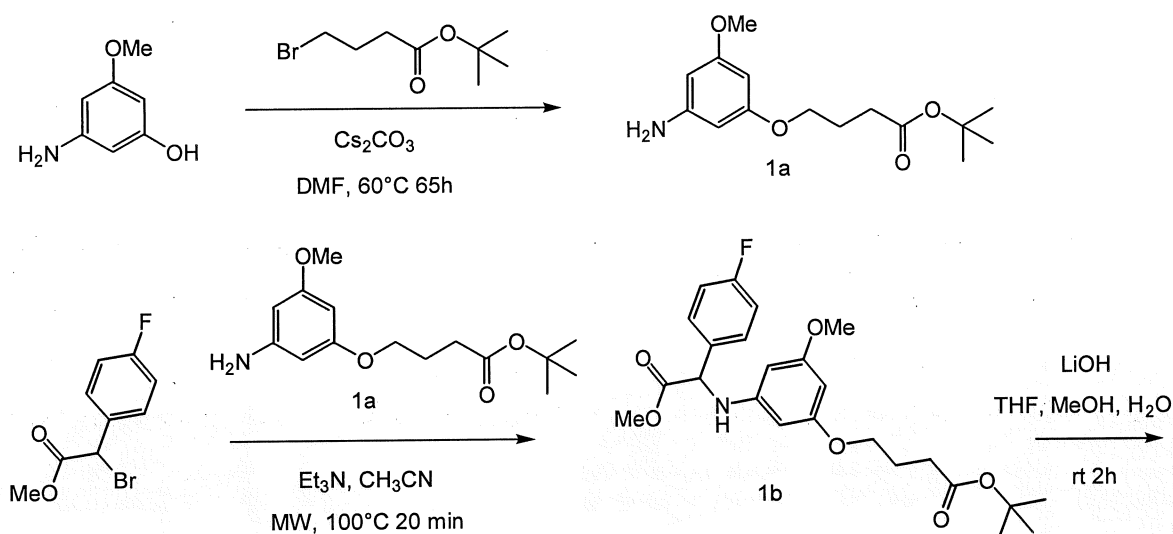
Đối với một số hợp chất, điểm nóng chảy được xác định bằng DSC823e (Mettler-Toledo). Các điểm nóng chảy được đo theo gradien nhiệt độ 10°C/phút. Nhiệt độ tối đa là 300°C.

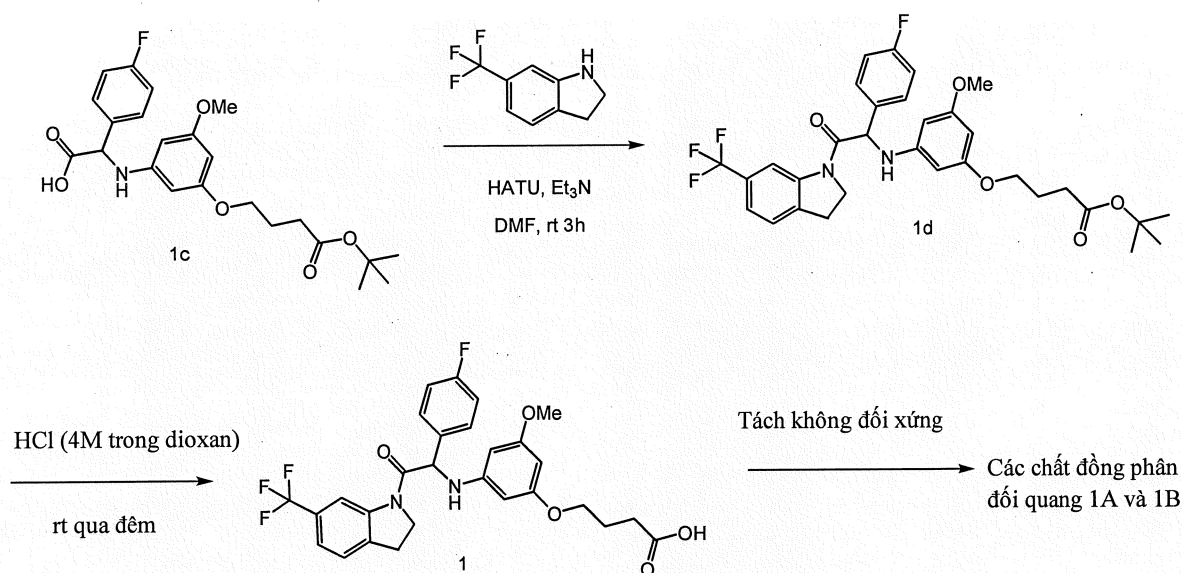
Góc quay quang:

Góc quay quang được đo bằng phân cực kế Perkin-Elmer 341 có đèn hơi natri và được thông báo như sau: $[\alpha]^\circ (\lambda, c \text{ g/100ml, dung môi, } T^\circ\text{C})$.

$[\alpha]_\lambda^T = (100\alpha) / (l \times c)$: trong đó l là chiều dài đường đi tính bằng dm và c là nồng độ tính bằng g/100 ml đối với mẫu ở nhiệt độ T (°C) và bước sóng λ (tính bằng nm). Nếu bước sóng của ánh sáng được sử dụng là 589 nm (vạch natri D), thì ký tự D có thể được sử dụng thay thế. Ký hiệu quay (+ hoặc -) luôn được sử dụng. Khi sử dụng phương trình này, nồng độ và dung môi luôn được để trong ngoặc sau góc quay. Góc quay được thông báo bằng độ và không có đơn vị nồng độ được cho (nó được giả định là g/100 ml).

Ví dụ 1: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (Hợp chất 1) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang 1A và 1B





Tổng hợp chất trung gian 1a:

Dung dịch được khuấy cơ học chứa *tert*-butyl 4-bromobutanoat [CAS 110661-91-1] (42,3 g, 0,19 mol) trong DMF (600 mL) được bổ sung từng phần hỗn hợp chất rắn gồm 3-amino-5-metoxyphenol [CAS 162155-27-3] (26,4 g, 0,19 mol) và Cs₂CO₃ (123,6 g, 0,379 mol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 60°C trong 65 giờ, và để nguội tới nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được rót vào H₂O (2,5 L). Sản phẩm được chiết bằng Et₂O (2 lần). Các lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước muối, làm khô trên MgSO₄ và lọc ra. Dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm, và tiếp theo được làm bay hơi đồng thời với toluen. Cặn được tinh chế qua HPLC pha thường (Pha tĩnh: silicagel 60A 25-40 μm (Merck), Pha động: gradien từ 20% EtOAc, 80% heptan đến 60% EtOAc, 40% heptan) thu được *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)butanoat **1a** (27 g).

Tổng hợp chất trung gian 1b:

Hỗn hợp gồm methyl 2-bromo-2-(4-flophenyl)axetat [CAS 71783-54-5] (0,400 g, 1,62 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)butanoat **1a** (0,547 g, 1,94 mmol) và triethylamin (0,337 mL, 2,43 mmol) trong CH₃CN (4 mL) được gia nhiệt trong lò vi sóng ở 100°C trong 20 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng EtOAc và được rửa bằng HCl 1N. Pha hữu cơ được rửa bằng H₂O và nước muối, làm khô trên MgSO₄, lọc và cô dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel bằng cách sử dụng gradien EtOAc (2% đến 20%) trong heptan thu được

tert-butyl 4-(3-((1-(4-flophenyl)-2-metoxo-2-oxoethyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoat **1b** (0,511 g).

Tổng hợp chất trung gian **1c**:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-flophenyl)-2-metoxo-2-oxoethyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoat **1b** (0,510 g, 1,14 mmol) trong hỗn hợp dung môi gồm THF (3 mL), MeOH (3 mL) và H₂O (3 mL) được bổ sung lithi hydroxit (0,239 g, 5,70 mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô một phần dưới áp suất giảm để loại bỏ các dung môi hữu cơ. Cặn được axit hóa bằng HCl 1N và được chiết bằng CH₂Cl₂. Pha hữu cơ được làm khô trên MgSO₄, lọc và cô dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel bằng cách sử dụng gradien MeOH (0% đến 10%) trong CH₂Cl₂ (chứa 2% axit axetic) thu được axit 2-((3-(4-(*tert*-butoxy)-4-oxobutoxy)-5-metoxyphehyl)amino)-2-(4-flophenyl)axetic **1c** (0,326 g).

Tổng hợp chất trung gian **1d**:

Dung dịch chứa axit 2-((3-(4-(*tert*-butoxy)-4-oxobutoxy)-5-metoxyphehyl)amino)-2-(4-flophenyl)axetic **1c** (0,326 g, 0,75 mmol) trong DMF (6 mL) được bổ sung HATU (0,286 g, 0,75 mmol), trietylamin (0,418 mL, 3,01 mmol) và 6-(triflometyl)indolin [CAS 181513-29-1] (0,141 g, 0,75 mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng EtOAc và được rửa bằng HCl 1N. Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa và nước muối, làm khô trên MgSO₄, lọc và cô dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel bằng cách sử dụng gradien EtOAc (5% đến 50%) trong heptan thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoat **1d** (0,134 g).

Tổng hợp Hợp chất 1 và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **1A** và **1B**:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoat **1d** (0,134 g, 0,22 mmol) trong CH₂Cl₂ (3 mL) được bổ sung dung dịch hydro clorua 4M trong dioxan (3 mL, 12 mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng

được cô dưới áp suất giảm. Cặn được nghiền bằng hỗn hợp gồm Et₂O/heptan. Các chất rắn được lọc ra và được làm khô trong chân không thu được axit 4-(3-((1-(4-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy) butanoic (Hợp chất 1, 103 mg) dưới dạng hỗn hợp triệt quang.

Các chất đồng phân đối quang này của Hợp chất 1 (1,3 g) được tách ra qua SFC điều chế (Pha tĩnh: Chiralcel[®] Diacel OD 20 x 250 mm, Pha động: CO₂, Etanol). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất được tinh chế tiếp bằng sắc ký nhanh (Pha tĩnh: Grace Reveleris[®] silica 40 g, Pha động: gradien heptan/EtOAc/EtOH/HOAc 100/0/0/0 đến 0/75/24,5/0,5). Các phân đoạn mong muốn được thu gom, làm bay hơi dưới áp suất giảm, và được làm bay hơi đồng thời với EtOAc, và tiếp theo với MeOH/H₂O. Cặn được khuấy trong H₂O (15 mL) + MeOH (1,5 mL) trong 45 phút, lọc ra, rửa (4x) bằng MeOH/H₂O (4/1), và được làm khô trong chân không ở 45°C tạo ra Chất đồng phân đối quang 1A (475 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai được tinh chế tiếp bằng sắc ký nhanh (Pha tĩnh: Grace Reveleris[®] silica 40 g, Pha động: gradien heptan/EtOAc/EtOH/HOAc 100/0/0/0 đến 0/75/24,5/0,5). Các phân đoạn mong muốn được thu gom, làm bay hơi dưới áp suất giảm, và được làm bay hơi đồng thời với EtOAc, và tiếp theo với MeOH/H₂O. Cặn được khuấy trong H₂O (15 mL) + MeOH (1,5 mL) trong 75 phút, lọc ra, rửa (4x) bằng MeOH/H₂O (4/1), và được làm khô trong chân không ở 45°C tạo ra Chất đồng phân đối quang 1B (461 mg).

Hợp chất 1:

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,80 - 1,94 (m, 2 H) 2,22 - 2,48 (m, 2 H) 3,09 - 3,27 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, *J*=6,2 Hz, 2 H) 3,91 - 4,06 (m, 1 H) 4,48 - 4,61 (m, 1 H) 5,57 (d, *J*=8,7 Hz, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,94 (s, 1 H) 5,96 (s, 1 H) 6,39 (d, *J*=8,3 Hz, 1 H) 7,21 (t, *J*=8,7 Hz, 2 H) 7,35 - 7,49 (m, 2 H) 7,58 (dd, *J*=8,1, 5,8 Hz, 2 H) 8,38 (s, 1 H) 12,1 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 1,94 phút, MH⁺ 547

Chất đồng phân đối quang 1A:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,8 Hz, 2 H) 2,33 (t, *J*=7,4 Hz, 2 H) 3,14 - 3,29 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, *J*=6,5 Hz, 2 H) 4,00 (td, *J*=10,5, 7,3 Hz, 1

¹H) 4,54 (td, $J=10,4, 6,3$ Hz, 1 H) 5,56 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H) 5,76 (t, $J=2,0$ Hz, 1 H) 5,95 (dt, $J=9,1, 1,8$ Hz, 2 H) 6,36 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 7,20 (t, $J=8,9$ Hz, 2 H) 7,34 - 7,41 (m, 1 H) 7,42 - 7,49 (m, 1 H) 7,52 - 7,62 (m, 2 H) 8,38 (br s, 1 H) 12,10 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-D): R_t 0,99 phút, MH^+ 547

$[\alpha]_D^{20}$: $-49,0^\circ$ (c 0,41, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-J): R_t 2,92 phút, MH^+ 547 độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang 1B:

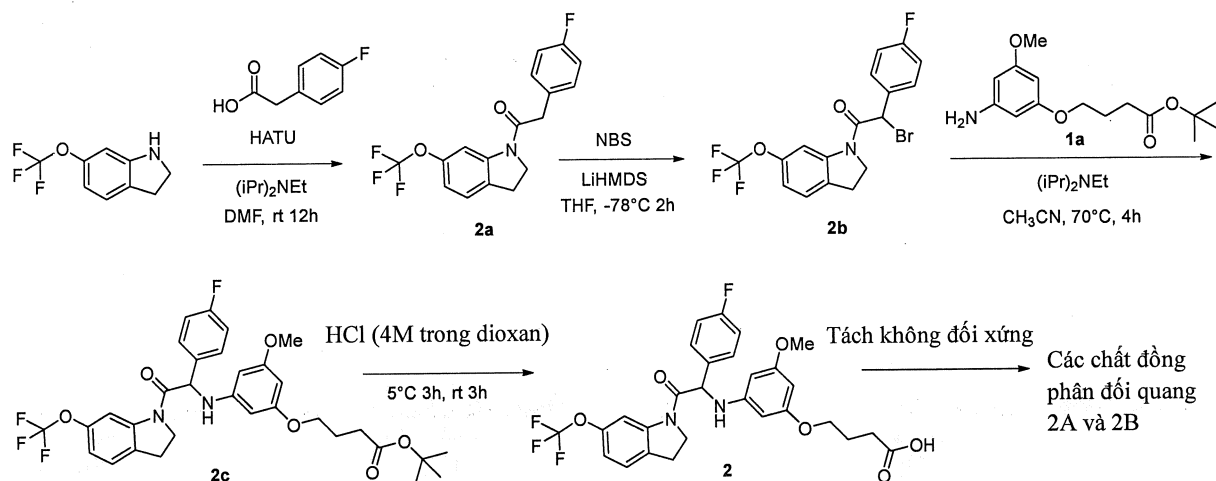
¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,33 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,12 - 3,29 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, $J=6,5$ Hz, 2 H) 4,00 (td, $J=10,4, 7,2$ Hz, 1 H) 4,54 (td, $J=10,4, 6,3$ Hz, 1 H) 5,56 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 5,76 (t, $J=2,1$ Hz, 1 H) 5,95 (dt, $J=9,1, 2,0$ Hz, 2 H) 6,36 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 7,20 (t, $J=8,2$ Hz, 2 H) 7,35 - 7,41 (m, 1 H) 7,42 - 7,48 (m, 1 H) 7,53 - 7,62 (m, 2 H) 8,38 (br s, 1 H) 12,11 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-D): R_t 1,00 phút, MH^+ 547

$[\alpha]_D^{20}$: $+49,5^\circ$ (c 0,525, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-J): R_t 2,81 phút, MH^+ 547, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 2: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)ethyl)amino)-5-metoxiphenoxy)butanoic (Hợp chất **2**) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **2A** và **2B**.



Tổng hợp chất trung gian 2a:

Hỗn hợp gồm axit 6-(triflometoxy)indolin [CAS 959235-95-1] (2 g, 9,84 mmol), 2-(4-flophenyl)axetic [CAS 405-50-5] (1,67 g, 10,8 mmol), HATU (5,6 g, 14,8 mmol) và diisopropyletylamin (4,9 mL, 29,5 mmol) trong DMF (40 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Nước được bổ sung và chất kết tủa được lọc ra. Cặn được hấp thụ EtOAc. Dung dịch hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước K₂CO₃ 10%, nước muối, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (15-40 µm, 80 g, gradien heptan/EtOAc 90/10 đến 60/40). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và dung môi được cô dưới áp suất giảm thu được 2-(4-flophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **2a** (2,5 g).

Tổng hợp chất trung gian 2b:

Ở -78°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1,5 M trong THF (9,82 mL, 14,7 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-flophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **2a** (2,5 g, 7,37 mmol) trong THF (40 mL). Hỗn hợp được khuấy trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (1,44 g, 8,1 mmol) trong THF (30 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C, phản ứng được dập tắt bằng dung dịch nước bão hòa NH₄Cl. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được, sau khi kết tủa từ CH₃CN/diisopropyl ete, 2-bromo-2-(4-flophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **2b** (3 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian 2c:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-flophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **2b** (1,1 g, 2,63 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)butanoat **1a** (0,74 g, 2,63 mmol) và diisopropyletylamin (0,54 mL, 3,15 mmol) trong CH₃CN (40 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm. Cặn được pha loãng bằng EtOAc, được rửa bằng HCl 1N và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Hợp chất này được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 80 g, heptan/EtOAc 80/20). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô. Cặn được kết tinh từ diisopropyl ete/ete

dầu hỏa, thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **2c** (1,25 g).

Tổng hợp Hợp chất 2 và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang 2A và 2B:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)-indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **2c** (1,5 g, 2,42 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (15 mL) và được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Chất kết tủa được lọc ra và được làm khô thu được axit 4-(3-((1-(4-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic dưới dạng muối HCl (Hợp chất **2**, 1,4 g, 0,76 đương lượng HCl, 0,1 đương lượng H₂O). Hợp chất **2** (muối HCl) được trung hòa trước khi tách không đối xứng bằng cách xử lý dung dịch chứa Hợp chất **2** (muối HCl) trong EtOAc hoặc CH₂Cl₂ bằng NaOH 1N và làm bay hơi lớp hữu cơ dưới áp suất giảm. Các chất đồng phân đối quang này của Hợp chất **2** (1,3 g) được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Chiralcel[®] OD-H 5 µm 250 x 30 mm, Pha động: 50% CO₂, 50% MeOH) và được tinh chế tiếp qua sắc ký đảo pha (Pha tĩnh: YMC-actus Triart-C18 10 µm 150 x 30 mm, Pha động: gradien từ 60% HCOONH₄ 0,6 g/L pH=3,5, 40% CH₃CN đến 0% HCOONH₄ 0,6 g/L pH=3,5, 100% CH₃CN). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất (205 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **2A** (168 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai (259 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **2B** (180 mg).

Hợp chất 2:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,9 Hz, 2 H) 2,34 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,05 - 3,28 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, *J*=6,5 Hz, 2 H) 4,01 (td, *J*=10,3, 7,4 Hz, 1 H) 4,53 (td, *J*=10,2, 6,6 Hz, 1 H) 5,56 (s, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,96 (br d, *J*=10,4 Hz, 2 H) 7,01 (br d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 7,21 (t, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,33 (d, *J*=8,2 Hz, 1 H) 7,57 (dd, *J*=8,5, 5,7 Hz, 2 H) 8,04 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 2,80 phút, MH⁺ 563

Điểm nóng chảy: 136°C

Chất đồng phân đối quang 2A:

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,86 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,33 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,05 - 3,26 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,84 (t, $J=6,3$ Hz, 2 H) 3,96 - 4,08 (m, 1 H) 4,46 - 4,60 (m, 1 H) 5,55 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 5,75 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=11,0$ Hz, 2 H) 6,41 (br d, $J=8,5$ Hz, 1 H) 7,01 (br d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,21 (t, $J=8,8$ Hz, 2 H) 7,33 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,57 (dd, $J=8,2, 5,7$ Hz, 2 H) 8,04 (s, 1 H) 12,19 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,87 phút, MH^+ 563

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $-46,3^\circ$ (c 0,27, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-B): R_t 1,75 phút, MH^+ 563, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang 2B:

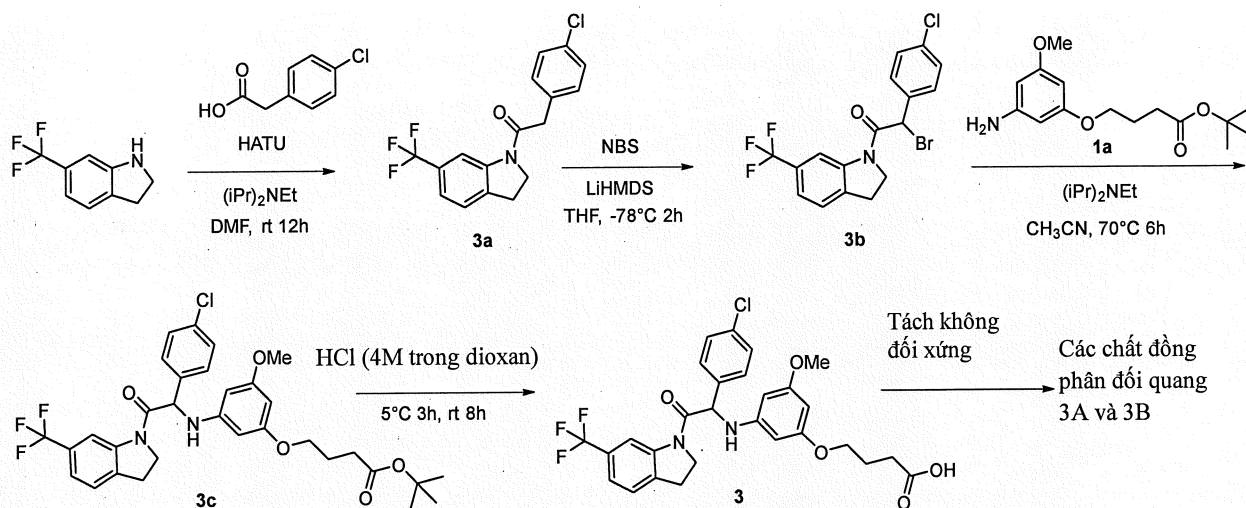
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,86 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,32 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,05 - 3,26 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,84 (t, $J=6,5$ Hz, 2 H) 4,01 (td, $J=10,3, 7,4$ Hz, 1 H) 4,53 (td, $J=10,2, 6,0$ Hz, 1 H) 5,55 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 5,75 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=12,0$ Hz, 2 H) 6,41 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 7,01 (br d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,20 (t, $J=8,7$ Hz, 2 H) 7,33 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,57 (dd, $J=8,5, 5,7$ Hz, 2 H) 8,04 (s, 1 H) 11,49 - 12,49 (m, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,87 phút, MH^+ 563

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $+47,0^\circ$ (c 0,27, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-B): R_t 3,83 phút, MH^+ 563, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 3: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (Hợp chất 3) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang 3A và 3B.



Tổng hợp chất trung gian 3a:

Hỗn hợp gồm axit 6-(triflometyl)indolin [CAS 181513-29-1] (3 g, 16,0 mmol), 2-(4-clophenyl) axetic [CAS 1878-66-6] (3,53 g, 20,8 mmol), HATU (9,1 g, 24,0 mmol) và diisopropyletylamin (7,95 mL, 48,1 mmol) trong DMF (75 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Nước được bổ sung và chất kết tủa được lọc ra. Cặn được hấp thụ EtOAc. Dung dịch hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước K₂CO₃ 10%, nước muối, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (15-40 μm, 80 g, gradien heptan/EtOAc 90/10 đến 60/40). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và dung môi được cô dưới áp suất giảm thu được 2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **3a** (4,5 g).

Tổng hợp chất trung gian 3b:

Ở -78°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1,5 M trong THF (17,7 mL, 26,5 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **3a** (4,5 g, 13,3 mmol) trong THF (65 mL). Hỗn hợp được khuấy trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (2,6 g, 14,6 mmol) trong THF (35 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C, phản ứng được dập tắt bằng dung dịch bão hòa NH₄Cl. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được hấp thụ diisopropyl ete. Chất kết tủa được lọc ra và loại bỏ (suxinimit còn lại). Phần lọc được cô dưới áp suất giảm thu được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **3b** (5 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian 3c:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **3b** (5 g, 11,9 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)butanoat **1a** (3,3 g, 11,9 mmol) và diisopropyletylamin (2,47 mL, 14,3 mmol) trong CH₃CN (120 mL) được khuấy ở 70°C trong 6 giờ. Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm, pha loãng bằng EtOAc, và được rửa bằng HCl 1N và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Hợp chất này được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 80 g, gradien heptan/EtOAc 90/10 đến 60/40). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)-butanoat **3c** (1,6 g).

Tổng hợp Hợp chất 3 và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang 3A và 3B:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **3c** (1,6 g, 2,58 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (22 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 8 giờ. Dung dịch được cô dưới áp suất giảm. Cặn được hấp thụ trong CH₃CN/diisopropyl ete. Chất kết tủa được lọc ra và được làm khô thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic dưới dạng muối HCl (1,15 g, 0,95 đương lượng HCl, 0,07 đương lượng H₂O). Phần nhỏ Hợp chất **3** (muối HCl) được trung hòa bằng cách xử lý dung dịch chứa Hợp chất **3** (muối HCl) trong EtOAc hoặc CH₂Cl₂ bằng NaOH 1N và làm bay hơi lớp hữu cơ dưới áp suất giảm thu được Hợp chất **3**. Lượng còn lại của Hợp chất **3** (muối HCl) được sử dụng để tách không đối xứng: các chất đồng phân đối quang này được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Chiralcel® OD-H 5 µm 250 x 30 mm, Pha động: 50% CO₂, 50% iPrOH). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất (470 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **3A** (404 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai (480 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **3B** (433 mg).

Hợp chất 3:

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,33 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,18 - 3,27 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, $J=6,3$ Hz, 2 H) 3,97 - 4,09 (m, 1 H) 4,46 - 4,59 (m, 1 H) 5,57 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=9,1$ Hz, 2 H) 6,40 (br d, $J=8,6$ Hz, 1 H) 7,34 - 7,49 (m, 4 H) 7,55 (d, $J=8,6$ Hz, 2 H) 8,38 (s, 1 H) 11,90 - 12,25 (m, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,88 phút, MH^+ 563

Điểm nóng chảy: 192°C

Chất đồng phân đối quang 3A:

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (br t, $J=6,6$ Hz, 2 H) 2,34 (br t, $J=7,1$ Hz, 2 H) 3,15 - 3,31 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (br t, $J=6,1$ Hz, 2 H) 3,97 - 4,09 (m, 1 H) 4,48 - 4,60 (m, 1 H) 5,59 (br d, $J=8,5$ Hz, 1 H) 5,77 (br s, 1 H) 5,95 (br d, $J=11,3$ Hz, 2 H) 6,44 (br d, $J=8,5$ Hz, 1 H) 7,36 - 7,50 (m, 4 H) 7,56 (br d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 8,38 (s, 1 H) 12,17 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,93 phút, MH^+ 563

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -42,4° (c 0,25, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-C): R_t 2,12 phút, MH^+ 563, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang 3B:

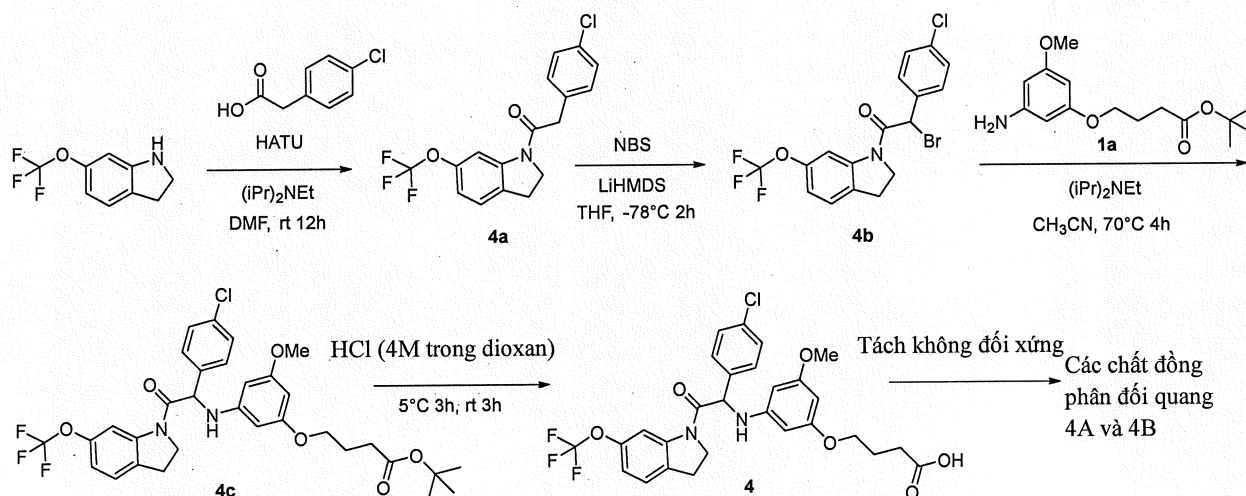
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,7$ Hz, 2 H) 2,34 (br t, $J=7,1$ Hz, 2 H) 3,15 - 3,31 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (br t, $J=6,3$ Hz, 2 H) 3,97 - 4,10 (m, 1 H) 4,49 - 4,61 (m, 1 H) 5,59 (br d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 5,77 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=11,3$ Hz, 2 H) 6,44 (br d, $J=8,5$ Hz, 1 H) 7,36 - 7,49 (m, 4 H) 7,56 (br d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 8,38 (s, 1 H) 12,17 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,93 phút, MH^+ 563

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +50,7° (c 0,27, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-C): R_t 4,87 phút, MH^+ 563, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 4: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)-indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (Hợp chất **4**) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **4A** và **4B**.



Tổng hợp chất trung gian **4a**:

Hỗn hợp gồm axit 6-(triflometoxy)indolin [CAS 959235-95-1] (2 g, 9,84 mmol), 2-(4-clophenyl) axetic [CAS 1878-66-6] (1,85 g, 10,8 mmol), HATU (5,6 g, 14,8 mmol) và diisopropyletylamin (4,9 mL, 29,5 mmol) trong DMF (40 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Nước được bổ sung và chất kết tủa được lọc ra. Cặn được hấp thụ EtOAc. Dung dịch hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước K₂CO₃ 10%, nước muối, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (15-40 μm, 80 g, gradien heptan/EtOAc 90/10 đến 60/40). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và dung môi được cô dưới áp suất giảm thu được 2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **4a** (3 g).

Tổng hợp chất trung gian **4b**:

Ở -78°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1,5 M trong THF (11,2 mL, 16,9 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **4a** (3 g, 8,43 mmol) trong THF (50 mL). Hỗn hợp được khuấy trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (1,65 g, 9,3 mmol) trong THF (30 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C, phản ứng được dập tắt bằng dung dịch bão hòa NH₄Cl. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lốp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay

hơi dưới áp suất giảm thu được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **4b** (3,6 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian **4c**:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **4b** (3,6 g, 8,3 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)butanoat **1a** (2,3 g, 8,3 mmol) và diisopropyletylamin (1,7 mL, 9,94 mmol) trong CH₃CN (80 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm, pha loãng bằng EtOAc, và được rửa bằng HCl 1N và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Hợp chất này được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 120 g, heptan/EtOAc 80/20). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được, sau khi kết tinh từ diisopropyl ete, *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **4c** (2,6 g).

Tổng hợp Hợp chất **4** và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **4A** và **4B**:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **4c** (2,4 g, 3,8 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (24 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Chất kết tủa được lọc ra và được làm khô thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic dưới dạng muối HCl (Hợp chất **4**, 2 g, 0,8 đương lượng HCl, 0,07 đương lượng H₂O). Hợp chất **4** (2 g, muối HCl) được trung hòa trước khi tách không đối xứng bằng cách xử lý dung dịch chứa Hợp chất **4** (muối HCl) trong etylaxetat bằng NaOH 1N và làm bay hơi lớp hữu cơ dưới áp suất giảm. Các chất đồng phân đối quang này được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Chiralcel® OD-H 5 µm 250 x 30 mm, Pha động: 50% CO₂, 50% iPrOH (+ 0,3% iPrNH₂)) và được tinh chế tiếp qua SFC đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Cyano® 6 µm 150x21,2mm, Pha động: 80% CO₂, 20% MeOH (+ 0,3% iPrNH₂)). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Hai chất đồng phân đối quang này được hấp thụ EtOAc và được rửa bằng HCl 1N. Các lớp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất được hóa rắn từ

ete/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **4A** (616 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai được hóa rắn từ ete/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **4B** (715 mg).

Cũng có thể tách các chất đồng phân đối quang bắt đầu từ muối HCl của raxemat bằng cách sử dụng các điều kiện tương tự như đối với tách không đối xứng.

Hợp chất 4:

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,34 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,07 - 3,28 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, $J=6,5$ Hz, 2 H) 4,04 (td, $J=10,5, 7,1$ Hz, 1 H) 4,52 (td, $J=10,3, 6,5$ Hz, 1 H) 5,57 (s, 1 H) 5,76 (t, $J=2,2$ Hz, 1 H) 5,90 - 6,00 (m, 2 H) 7,01 (dd, $J=8,2, 1,6$ Hz, 1 H) 7,33 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,41 - 7,48 (m, 2 H) 7,55 (d, $J=8,5$ Hz, 2 H) 8,03 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-B): Rt 2,70 phút, MH^+ 579

Điểm nóng chảy: 150°C

Chất đồng phân đối quang **4A**:

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,7$ Hz, 2 H) 2,34 (br t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,08 - 3,27 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (br t, $J=6,3$ Hz, 2 H) 3,99 - 4,11 (m, 1 H) 4,47 - 4,57 (m, 1 H) 5,57 (br s, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=10,1$ Hz, 2 H) 6,45 (br s, 1 H) 7,01 (br d, $J=7,6$ Hz, 1 H) 7,34 (br d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,44 (br d, $J=8,5$ Hz, 2 H) 7,55 (br d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 8,04 (br s, 1 H) 12,12 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 2,95 phút, MH^+ 579

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -48,5° (c 0,27, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-A): Rt 1,13 phút, MH^+ 579, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang **4B**:

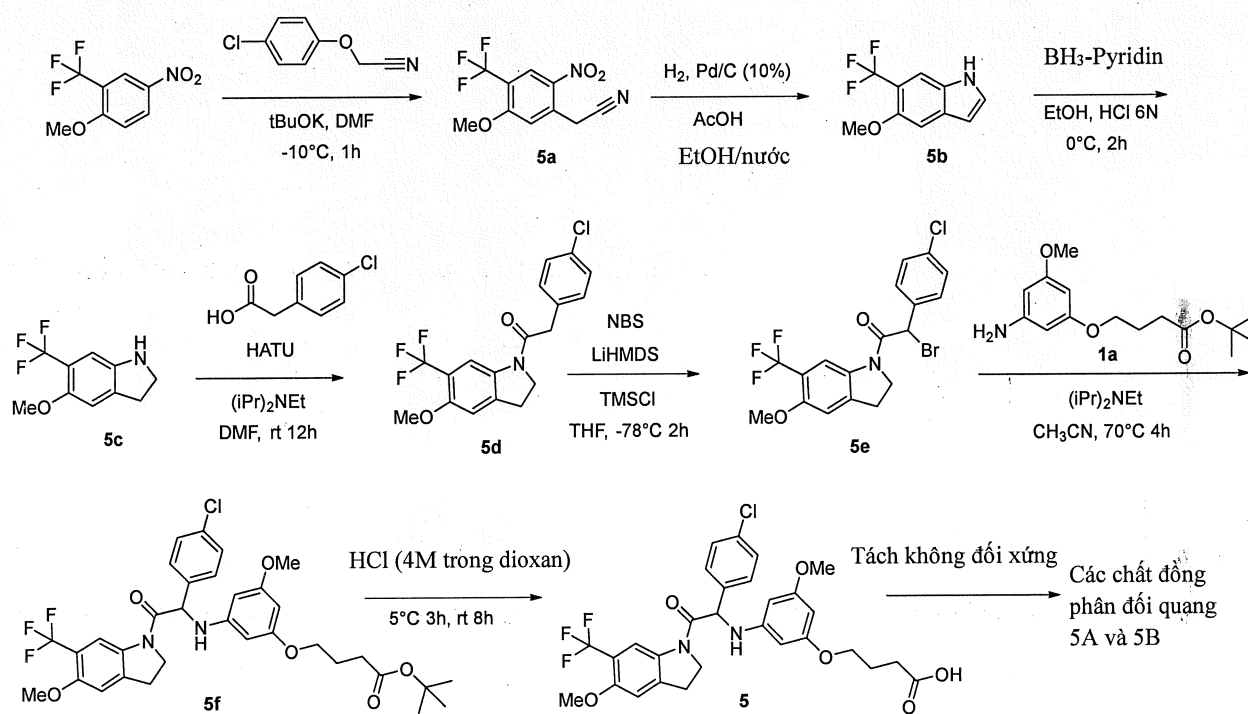
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (br t, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,34 (br t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,09 - 3,27 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (br t, $J=6,1$ Hz, 2 H) 3,99 - 4,10 (m, 1 H) 4,46 - 4,59 (m, 1 H) 5,57 (s, 1 H) 5,76 (br s, 1 H) 5,95 (br d, $J=10,1$ Hz, 2 H) 6,45 (br s, 1 H) 7,01 (br d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,34 (br d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,44 (br d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 7,55 (br d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 8,04 (br s, 1 H) 12,12 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,94 phút, MH^+ 579

$[\alpha]_D^{20}$: +42,9° (c 0,28, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-A): R_t 2,13 phút, MH^+ 579, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 5: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxi-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxi-phenoxy)butanoic (Hợp chất **5**) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **5A** và **5B**.



Tổng hợp chất trung gian **5a**:

Hỗn hợp gồm 1-metoxi-4-nitro-2-(triflometyl)benzene [CAS 654-76-2] (24,5 g, 110,8 mmol) và 4-clophenoxyaxetonitril [CAS 3598-13-8] (20,4 g, 121,9 mmol) trong DMF (100 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt trong 30 phút vào dung dịch được khuấy chứa $tBuOK$ (27,35 g, 243,7 mmol) trong DMF (100 mL) ở $-10^\circ C$. Sau khi bổ sung, dung dịch màu tím này được duy trì ở $-10^\circ C$ trong 1 giờ. 500 mL nước đá và 500 mL HCl 6N được bổ sung và chất kết tủa được lọc ra, được rửa bằng nước và làm khô dưới áp suất giảm thu được 40,4 g 2-(5-metoxi-2-nitro-4-(triflometyl)phenyl)axetonitril **5a** (được dùng ngay cho bước tiếp theo).

Tổng hợp chất trung gian **5b**:

Dung dịch chứa 2-(5-metoxi-2-nitro-4-(triflometyl)phenyl)axetonitril **5a** (26 g, 99,9 mmol) trong etanol/nước (9/1) (500 mL) và AcOH (5,2 mL) được hydro hóa trong 1 giờ ở áp suất 3,5 Bar với Pd/C 10% (15,3 g) làm chất xúc tác. Hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đệm celite® và bánh lọc được rửa bằng hỗn hợp dung môi gồm CH₂Cl₂ và CH₃OH. Phần lọc được cô dưới áp suất giảm. Cặn được lọc qua bộ lọc thủy tinh có nạp silic dioxit 60-200 µm bằng cách sử dụng heptan/EtOAc 80/20 làm dung môi giải hấp. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được thu gom và dung môi được cô dưới áp suất giảm thu được 5-metoxi-6-(triflometyl)-1*H*-indol **5b** (15,6 g).

Tổng hợp chất trung gian **5c**:

Ở 0°C, BH₃-Pyridin (23,5 mL, 232,4 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào dung dịch chứa 5-metoxi-6-(triflometyl)-1*H*-indol **5b** (10 g, 46,5 mmol) trong EtOH (60 mL). HCl 6N (140 mL) được bổ sung từ từ trong khi duy trì nhiệt độ thấp hơn 10°C. Hỗn hợp này được khuấy ở 0°C trong 2 giờ. Nước (200 mL) được bổ sung và hỗn hợp được kiềm hóa đến độ pH 8-9 bằng dung dịch nước NaOH đặc (nhiệt độ phản ứng được duy trì thấp hơn 20°C). Chất kết tủa được lọc ra, được rửa bằng nước (hai lần) và làm bay hơi đồng thời dưới áp suất giảm với toluen thu được 5-metoxi-6-(triflometyl)indolin **5c** (9 g).

Tổng hợp chất trung gian **5d**:

Hỗn hợp gồm axit 5-metoxi-6-(triflometyl)indolin **5c** (2 g, 9,21 mmol), 2-(4-clophenyl)axetic [CAS 1878-66-6] (1,73 g, 10,1 mmol), HATU (5,25 g, 13,8 mmol) và diisopropyletylamin (4,6 mL, 27,6 mmol) trong DMF (40 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Nước được bổ sung và chất kết tủa được lọc ra. Cặn được hấp thụ EtOAc. Dung dịch hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước K₂CO₃ 10%, nước muối, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (15-40 µm, 80 g, gradien heptan/EtOAc 90/10 đến 60/40). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và dung môi được cô dưới áp suất giảm thu được 2-(4-clophenyl)-1-(5-metoxi-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **5d** (3 g).

Tổng hợp chất trung gian **5e**:

Ở -78°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1 M trong THF (17,3 mL, 17,3 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-clophenyl)-1-(5-metoxi-6-

(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **5d** (3,2 g, 8,65 mmol) trong THF (45 mL). TMSCl (1,32 mL, 10,4 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Hỗn hợp này được khuấy trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (1,85 g, 10,4 mmol) trong THF (30 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C, phản ứng được dập tắt bằng dung dịch bão hòa NH₄Cl. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(5-metoxi-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **5e** (3,1 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian **5f**:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(5-metoxi-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **5e** (3,5 g, 7,8 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxi-phenoxy)butanoat **1a** (2,2 g, 7,8 mmol) và diisopropyletylamin (1,6 mL, 9,4 mmol) trong CH₃CN (80 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm, pha loãng bằng EtOAc và được rửa bằng HCl 1N và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 80 g, heptan/EtOAc 80/20). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được, sau khi kết tinh từ diisopropyl ete, *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxi-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxi-phenoxy)butanoat **5f** (2,1 g).

Tổng hợp Hợp chất **5** và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **5A** và **5B**:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxi-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxi-phenoxy)butanoat **5f** (3,1 g, 4,77 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (42,2 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ phòng trong 8 giờ. Chất kết tủa được lọc ra và được làm khô thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxi-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxi-phenoxy)butanoic dưới dạng muối HCl (Hợp chất **5**, 2 g). Các chất đồng phân đối quang này được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Chiralpak® IA 5 µm 250 x 20 mm, Pha động: 50% CO₂, 50% iPrOH (+ 0,3% iPrNH₂ + 10% CH₂Cl₂)). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Hai chất đồng phân đối quang này được hấp thụ EtOAc và được rửa bằng HCl 1N. Các lớp hữu cơ được

tách ra, làm khô trên MgSO_4 , lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất (847 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **5A** (772 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai (840 mg) được hóa rắn từ ete/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **5B** (724 mg).

Hợp chất 5:

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,34 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,14 - 3,35 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,80 - 3,89 (m, 5 H) 3,94 - 4,04 (m, 1 H) 4,51 (td, $J=10,2, 6,3$ Hz, 1 H) 5,55 (s, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=11,7$ Hz, 2 H) 7,23 (s, 1 H) 7,43 (d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 7,55 (d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 8,34 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,86 phút, MH^+ 593

Điểm nóng chảy: 130°C

Chất đồng phân đối quang 5A:

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,34 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,12 - 3,31 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,81 - 3,89 (m, 5 H) 3,94 - 4,05 (m, 1 H) 4,45 - 4,56 (m, 1 H) 5,55 (br s, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=11,0$ Hz, 2 H) 6,40 (br s, 1 H) 7,23 (s, 1 H) 7,44 (d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 7,56 (d, $J=8,5$ Hz, 2 H) 8,34 (s, 1 H) 12,14 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,85 phút, MH^+ 593

$[\alpha]_D^{20}$: $-43,2^\circ$ (c 0,25, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-D): R_t 2,16 phút, MH^+ 593, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang 5B:

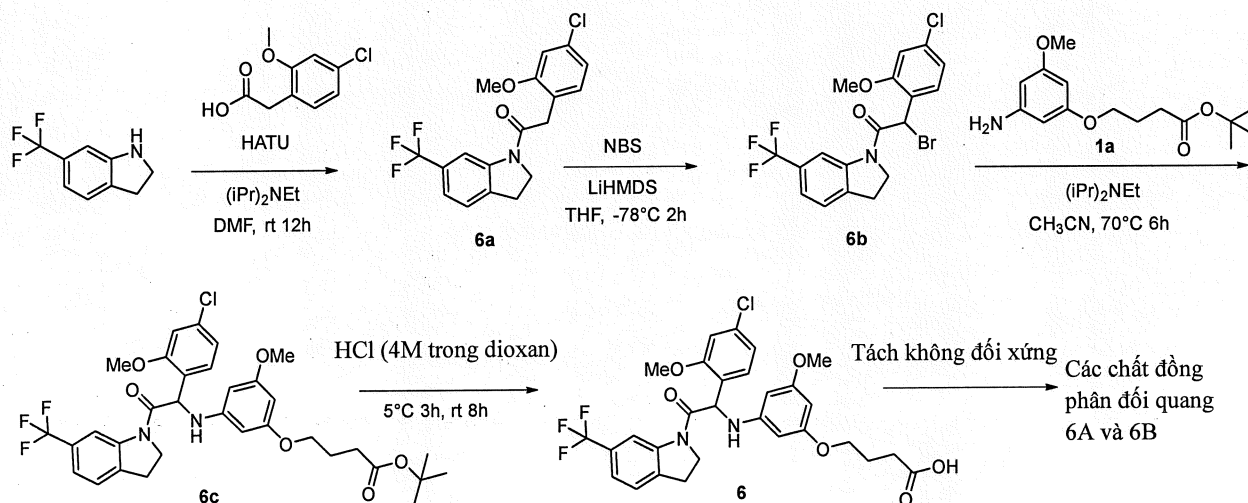
^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,34 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,13 - 3,33 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,79 - 3,88 (m, 5 H) 3,94 - 4,03 (m, 1 H) 4,51 (td, $J=10,3, 6,1$ Hz, 1 H) 5,54 (br s, 1 H) 5,75 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=11,3$ Hz, 2 H) 6,40 (br s, 1 H) 7,23 (s, 1 H) 7,43 (d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 7,55 (d, $J=8,5$ Hz, 2 H) 8,34 (s, 1 H) 12,14 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,85 phút, MH^+ 593

$[\alpha]_D^{20}$: +41,4° (c 0,28, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-D): R_t 3,75 phút, MH^+ 593, độ tinh khiết không đối xứng 99,37%.

Ví dụ 6: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxyphenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (Hợp chất **6**) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **6A** và **6B**.



Tổng hợp chất trung gian **6a**:

Hỗn hợp gồm axit 6-(triflometyl)indolin [CAS 181513-29-1] (2 g, 10,7 mmol), 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)axetic [CAS 170737-95-8] (2,36 g, 11,8 mmol), HATU (6,1 g, 16 mmol) và diisopropyletylamin (5,3 mL, 32 mmol) trong DMF (50 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Nước được bổ sung và chất kết tủa được lọc ra. Cặn được hấp thụ EtOAc. Dung dịch hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước K_2CO_3 10%, nước muối, làm khô trên $MgSO_4$, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (15-40 μm , 80 g, gradien heptan/EtOAc 90/10 đến 60/40). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và dung môi được cô dưới áp suất giảm thu được 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **6a** (3,9 g).

Tổng hợp chất trung gian **6b**:

Ở -78°C, dưới dòng N_2 , LiHMDS 1M trong THF (13,5 mL, 13,5 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **6a** (2,5 g, 6,76 mmol) trong THF (40 mL). Hỗn hợp được khuấy

trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuccinimide (1,32 g, 7,44 mmol) trong THF (20 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C , phản ứng được dập tắt bằng dung dịch bão hòa NH_4Cl . Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO_4 , lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được 2-bromo-2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **6b** (3 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian **6c**:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **6b** (3 g, 6,69 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxypheoxy)butanoat **1a** (1,88 g, 6,69 mmol) và diisopyletylamin (1,4 mL, 8 mmol) trong CH_3CN (100 mL) được khuấy ở 70°C trong 6 giờ. Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm, pha loãng bằng EtOAc và được rửa bằng HCl 1N, và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO_4 , lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Hợp chất này được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 μm , 80 g, heptan/EtOAc 80/20). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxypheyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat **6c** (1,6 g).

Tổng hợp Hợp chất **6** và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **6A** và **6B**:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxypheyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat **6c** (1,53 g, 2,36 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (20 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 8 giờ. Dung dịch được cô dưới áp suất giảm. Cặn được hấp thụ trong CH_3CN /diisopropyl ete. Chất kết tủa được lọc ra và được làm khô thu được axit 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxypheyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoic (Hợp chất **6**) dưới dạng muối HCl (1,35 g, 0,67 đương lượng HCl, 0,28 đương lượng H_2O). Các chất đồng phân đối quang này được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Chiralcel® OD-H 5 μm 250 x 3 0mm, Pha động: 65% CO_2 , 35% EtOH). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất được tinh chế tiếp qua sắc ký đảo pha (Pha tĩnh: YMC-actus Triart-C18 10 μm 150 x 30 mm, Pha động: gradien

từ 55% axit formic 0,1%, 45% CH₃CN đến 0% axit formic 0,1%, 100% CH₃CN. Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn (417 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **6A** (370 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai được tinh chế tiếp qua sắc ký đảo pha (Pha tĩnh: YMC-actus Triart-C18 10 μ m 150x30mm, Pha động: gradien từ 55% axit formic 0,1%, 45% CH₃CN đến 0% axit formic 0,1%, 100% CH₃CN. Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn (400 mg) tiếp theo được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **6B** (363 mg).

Hợp chất 6:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (br t, *J*=6,6 Hz, 2 H) 2,33 (br t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,18 - 3,32 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,80 - 3,87 (m, 2 H) 3,90 (s, 3 H) 3,96 - 4,07 (m, 1 H) 4,31 - 4,45 (m, 1 H) 5,61 (s, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,87 (br d, *J*=7,6 Hz, 2 H) 7,02 (br d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 7,14 (s, 1 H) 7,32 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 7,35 - 7,41 (m, 1 H) 7,43 - 7,50 (m, 1 H) 8,37 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 2,90 phút, MH⁺ 593

Điểm nóng chảy: 130°C

Chất đồng phân đối quang 6A:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,9 Hz, 2 H) 2,33 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,24 (br dd, *J*=18,6, 11,7 Hz, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,80 - 3,87 (m, 2 H) 3,90 (s, 3 H) 3,97 - 4,06 (m, 1 H) 4,33 - 4,43 (m, 1 H) 5,61 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,87 (br d, *J*=10,4 Hz, 2 H) 6,43 (d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 7,03 (dd, *J*=8,2, 1,9 Hz, 1 H) 7,15 (d, *J*=1,6 Hz, 1 H) 7,32 (d, *J*=8,2 Hz, 1 H) 7,39 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 7,46 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 8,37 (s, 1 H) 12,16 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 2,99 phút, MH⁺ 593

[α]_D²⁰: -28,6° (c 0,29, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): Rt 2,17 phút, MH⁺ 593, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Điểm nóng chảy: 178°C

Chất đồng phân đối quang 6B:

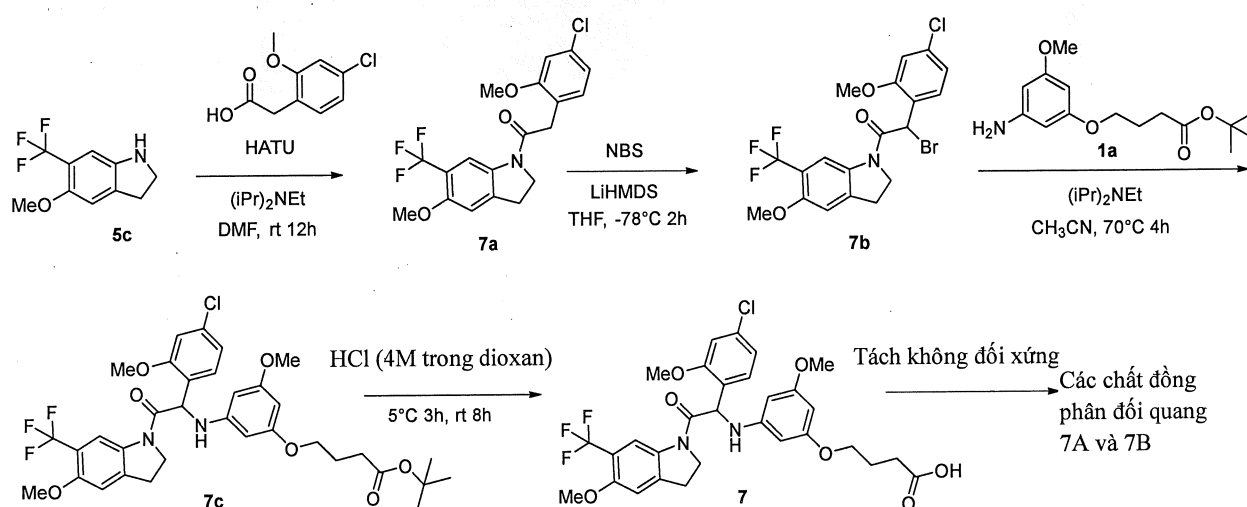
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,33 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,24 (br dd, $J=18,8, 11,5$ Hz, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,83 (q, $J=6,2$ Hz, 2 H) 3,90 (s, 3 H) 3,96 - 4,08 (m, 1 H) 4,32 - 4,43 (m, 1 H) 5,61 (d, $J=8,5$ Hz, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,87 (br d, $J=10,1$ Hz, 2 H) 6,43 (br d, $J=8,5$ Hz, 1 H) 7,03 (dd, $J=8,2, 1,6$ Hz, 1 H) 7,15 (d, $J=1,6$ Hz, 1 H) 7,32 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,39 (d, $J=7,6$ Hz, 1 H) 7,46 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 8,37 (s, 1 H) 12,16 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 3,00 phút, MH^+ 593

$[\alpha]_D^{20}$: +32,1° (c 0,28, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 4,04 phút, MH^+ 593, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 7: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-2-(5-metoxi-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxyphe-noxy)butanoic (Hợp chất 7) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang 7A và 7B.

**Tổng hợp chất trung gian 7a:**

Hỗn hợp gồm 5-metoxi-6-(triflometyl)indolin 5c (1,5 g, 6,9 mmol), 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)axit axetic [CAS 170737-95-8] (1,4 g, 6,9 mmol), HATU (3,94 g, 10,4 mmol) và diisopropyletylamin (3,4 mL, 20,7 mmol) trong DMF (40 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Bểng/nước được bổ sung và chất kết tủa được lọc ra. Cặn được hấp thụ CH₂Cl₂. Dung dịch hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước K₂CO₃ 10%, nước muối, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm.

Cặn được kết tinh từ diisopropyl ete thu được 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-metox- y-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **7a** (2,48 g).

Tổng hợp chất trung gian **7b**:

Ở -78°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1M trong THF (16,5 mL, 16,5 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-metox- y-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **7a** (3,3 g, 8,25 mmol) trong THF (45 mL). TMSCl (1,26 mL, 9,91 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Hỗn hợp này được khuấy trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (1,76 g, 9,91 mmol) trong THF (30 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C, phản ứng được dập tắt bằng dung dịch bão hòa NH₄Cl. Hỗn hợp thu được được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được 2-bromo-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-metox- y-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **7b** (3,5 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian **7c**:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-metox- y-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **7b** (3,5 g, 7,31 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphe- noxy)butanoat **1a** (2 g, 7,31 mmol) và diisopropyletylamin (1,5 mL, 8,8 mmol) trong CH₃CN (80 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm, pha loãng bằng EtOAc và được rửa bằng HCl 1N, và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Hợp chất này được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 80 g, heptan/EtOAc 80/20). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-2-(5-metox- y-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxyphe- noxy)butanoat **7c** (2,2 g).

Tổng hợp Hợp chất **7** và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **7A** và **7B**:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-2-(5-metox- y-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxyphe- noxy)butanoat **7c** (2,1 g, 3,1 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (27,4 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt

độ trong phòng trong 8 giờ. Dung dịch được cô dưới áp suất giảm. Cặn được hấp thụ trong CH₃CN/diisopropyl ete. Chất kết tủa được lọc ra và được làm khô thu được axit 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxyphenyl)-2-(5-metoxy-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoethyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (Hợp chất 7) dưới dạng muối HCl (1,5 g, 0,74 đương lượng HCl, 0,29 đương lượng H₂O). Các chất đồng phân đối quang này được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Chiralcel® OD-H 5 µm 250 x 30 mm, Pha động: 55% CO₂, 45% iPrOH). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất (671 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **7A** (606 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai (647 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **6B** (580 mg).

Hợp chất 7:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,7 Hz, 2 H) 2,34 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,17 - 3,30 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,79 - 3,87 (m, 5 H) 3,90 (s, 3 H) 3,93 - 4,02 (m, 1 H) 4,29 - 4,40 (m, 1 H) 5,59 (s, 1 H) 5,75 (s, 1 H) 5,87 (br d, *J*=10,7 Hz, 2 H) 7,02 (dd, *J*=8,2, 1,6 Hz, 1 H) 7,14 (d, *J*=1,3 Hz, 1 H) 7,24 (s, 1 H) 7,32 (d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 8,32 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 2,89 phút, MH⁺ 623

Điểm nóng chảy: 160°C

Chất đồng phân đối quang 7A:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (br t, *J*=6,8 Hz, 2 H) 2,34 (br t, *J*=7,1 Hz, 2 H) 3,18 - 3,28 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,79 - 3,87 (m, 5 H) 3,91 (s, 3 H) 3,94 - 4,05 (m, 1 H) 4,31 - 4,42 (m, 1 H) 5,59 (br d, *J*=8,2 Hz, 1 H) 5,76 (br s, 1 H) 5,87 (br d, *J*=10,4 Hz, 2 H) 6,40 (br d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 7,02 (br d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 7,14 (s, 1 H) 7,24 (s, 1 H) 7,33 (br d, *J*=8,2 Hz, 1 H) 8,33 (s, 1 H) 12,18 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 2,87 phút, MH⁺ 623

[α]_D²⁰: -23,9° (c 0,28, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-C): Rt 1,76 phút, MH⁺ 623, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang 7B:

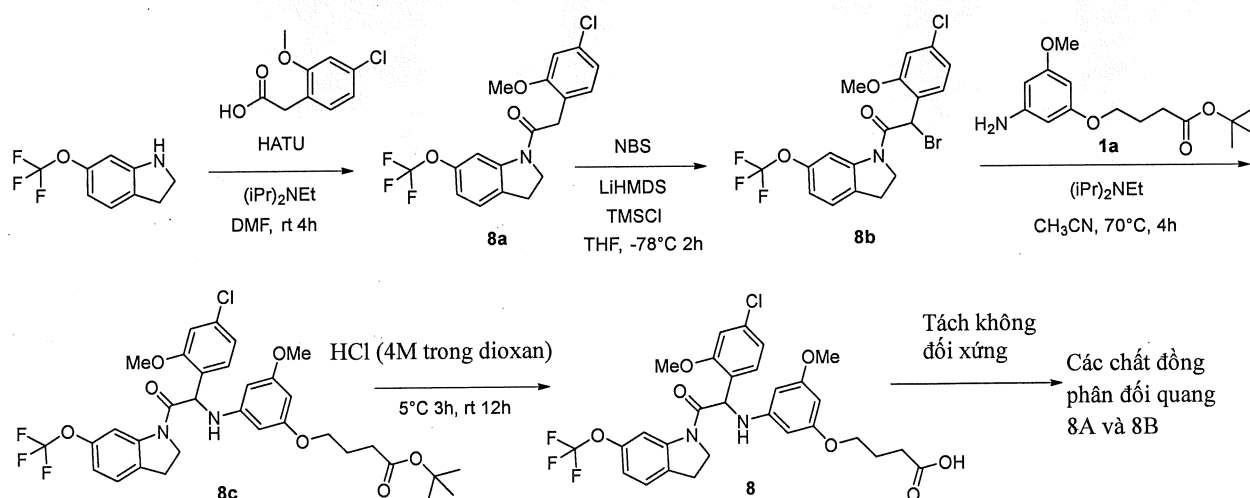
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,5$ Hz, 2 H) 2,34 (br t, $J=7,1$ Hz, 2 H) 3,18 - 3,28 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,80 - 3,87 (m, 5 H) 3,91 (s, 3 H) 3,94 - 4,02 (m, 1 H) 4,28 - 4,41 (m, 1 H) 5,59 (br d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 5,75 (br s, 1 H) 5,87 (br d, $J=10,4$ Hz, 2 H) 6,40 (br d, $J=8,5$ Hz, 1 H) 7,02 (br d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,14 (s, 1 H) 7,24 (s, 1 H) 7,33 (br d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 8,33 (s, 1 H) 12,17 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,87 phút, MH^+ 623

$[\alpha]_D^{20}$: +28,5° (c 0,26, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-C): R_t 3,52 phút, MH^+ 623, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 8: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxypheyl)-2-oxo-2-(6-(triflo-metoxi)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoic (Hợp chất **8**) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **8A** và **8B**.

**Tổng hợp chất trung gian 8a:**

Hỗn hợp gồm axit 6-(triflometoxy)indolin [CAS 959235-95-1] (2,5 g, 12,3 mmol), 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetic [CAS 170737-95-8] (2,47 g, 12,3 mmol), HATU (7 g, 18,5 mmol) và diisopropyletylamin (6,1 mL, 36,9 mmol) trong DMF (40-mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Nước và EtOAc được bổ sung. Lớp hữu cơ được tách ra, được rửa bằng nước, làm khô trên MgSO_4 , lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (15-40 μm , 80 g, heptan/EtOAc 85/15). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và dung môi

được cô dưới áp suất giảm thu được, sau khi kết tinh từ CH₃CN/heptan, 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **8a** (4,3 g).

Tổng hợp chất trung gian **8b**:

Ở -78°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1M trong THF (19,7 mL, 19,7 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **8a** (3,8 g, 9,8 mmol) trong THF (50 mL). TMSCl (1,5 mL, 11,8 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Hỗn hợp này được khuấy trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa N-bromosuxinimit (1,9 g, 10,8 mmol) trong THF (35 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C, phản ứng được dập tắt bằng dung dịch bão hòa NH₄Cl. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lốp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được 2-bromo-2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **8b** (4,5 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian **8c**:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **8b** (4,5 g, 9,68 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxypheoxy)butanoat **1a** (2,7 g, 9,68 mmol) và diisopropyletylamin (2 mL, 11,6 mmol) trong CH₃CN (100 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp này được cô dưới áp suất giảm, pha loãng bằng EtOAc và được rửa bằng HCl 1N và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 120 g, heptan/EtOAc 80/20). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được, sau khi kết tinh từ CH₃CN, *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxypheyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat **8c** (2,3 g).

Tổng hợp Hợp chất **8** và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **8A** và **8B**:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxypheyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat **8c** (2,3 g, 3,46 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (30 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Chất kết tủa được lọc ra, được rửa bằng diisopropyl ete và được

làm khô thu được axit 4-(3-((1-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-2-oxo-2-(6-(triflo-metox-yl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphe-noxy)butanoic (Hợp chất 8) dưới dạng muối HCl (1,79 g, 0,86 đương lượng HCl, 0,22 đương lượng H₂O). Các chất đồng phân đối quang này được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Chiralcel® OD-H 5 µm 250 x 30 mm, Pha động: 65% CO₂, 35% iPrOH). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất (726 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang 8A (612 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai (712 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang 8B (643 mg).

Hợp chất 8:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,9 Hz, 2 H) 2,34 (br t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,08 - 3,26 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,83 (q, *J*=6,5 Hz, 2 H) 3,90 (s, 3 H) 3,98 - 4,09 (m, 1 H) 4,31 - 4,42 (m, 1 H) 5,60 (s, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,87 (br d, *J*=9,5 Hz, 2 H) 6,98 - 7,05 (m, 2 H) 7,14 (d, *J*=1,9 Hz, 1 H) 7,31 (d, *J*=8,2 Hz, 1 H) 7,34 (d, *J*=8,2 Hz, 1 H) 8,02 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 3,04 phút, MH⁺ 609

Điểm nóng chảy: 139°C

Chất đồng phân đối quang 8A:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,9 Hz, 2 H) 2,33 (t, *J*=7,4 Hz, 2 H) 3,09 - 3,25 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,78 - 3,87 (m, 2 H) 3,90 (s, 3 H) 3,98 - 4,07 (m, 1 H) 4,32 - 4,42 (m, 1 H) 5,59 (d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,86 (s, 1 H) 5,88 (s, 1 H) 6,45 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 6,97 - 7,06 (m, 2 H) 7,14 (d, *J*=1,3 Hz, 1 H) 7,31 (d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 7,34 (d, *J*=8,2 Hz, 1 H) 8,02 (s, 1 H) 12,14 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 3,03 phút, MH⁺ 609

[α]_D²⁰: -39,3° (c 0,28, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-F): Rt 2,32 phút, MH⁺ 609, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang 8B:

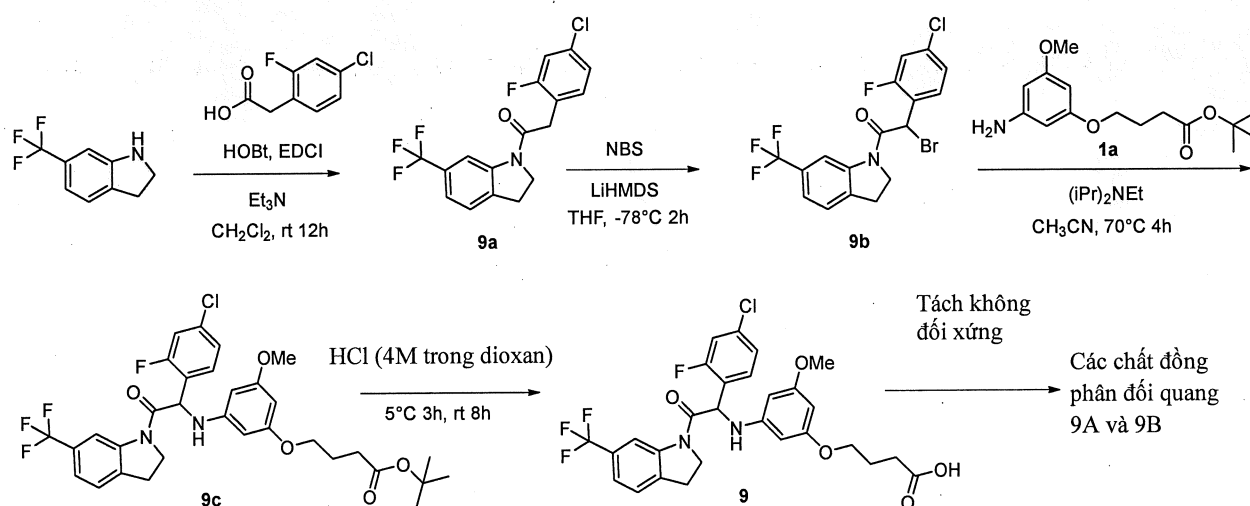
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,34 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,09 - 3,25 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,79 - 3,88 (m, 2 H) 3,90 (s, 3 H) 4,02 (td, $J=10,2, 6,9$ Hz, 1 H) 4,33 - 4,41 (m, 1 H) 5,60 (s, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,86 (s, 1 H) 5,88 (s, 1 H) 6,45 (br s, 1 H) 6,99 - 7,05 (m, 2 H) 7,14 (d, $J=1,6$ Hz, 1 H) 7,31 (d, $J=8,5$ Hz, 1 H) 7,34 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 8,02 (s, 1 H) 12,12 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 3,03 phút, MH^+ 609

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +34,5° (c 0,29, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-F): R_t 3,51 phút, MH^+ 609, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 9: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (Hợp chất 9) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang 9A và 9B.



Tổng hợp chất trung gian 9a:

Hỗn hợp gồm axit 2-(4-clo-2-flophenyl)axetic [CAS 194240-75-0] (2,52 g, 13,4 mmol), 6-(triflometyl)indolin [CAS 181513-29-1] (2,5 g, 13,4 mmol), hydroxybenzotriazol (2,7 g, 20,04 mmol), 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit (3,84 g, 20,04 mmol) và trimetylamin (3,71 mL, 26,7 mmol) trong CH_2Cl_2 (30 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Nước được bổ sung và các lớp được tách ra. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, làm khô trên MgSO_4 , lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được, sau khi kết tinh từ CH_3CN /diisopropyl

ete, 2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **9a** (3,9 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian **9b**:

Ở -78°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1M trong THF (13,98 mL, 13,98 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **9a** (2,5 g, 6,99 mmol) trong THF (20 mL). Hỗn hợp này được khuấy trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (1,37 g, 7,69 mmol) trong THF (15 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C, phản ứng được dập tắt bằng dung dịch bão hòa NH₄Cl. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được 2-bromo-2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **9b** (2,8 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian **9c**:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **9b** (2,8 g, 6,41 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)butanoat **1a** (1,8 g, 6,41 mmol) và diisopropyletylamin (1,33 mL, 7,7 mmol) trong CH₃CN (90 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm, pha loãng bằng EtOAc, và được rửa bằng HCl 1N, và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 80 g, heptan/EtOAc 80/20). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được, sau khi kết tinh từ CH₃CN/diisopropyl ete, *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **9c** (1,75 g).

Tổng hợp Hợp chất **9** và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **9A** và **9B**:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **9c** (1,75 g, 2,75 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (24,3 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 8 giờ. Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm. Cặn được kết tinh từ

CH₃CN/diisopropyl ete thu được axit 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoic (Hợp chất 9) dưới dạng muối HCl (1,4 g, 0,8 đương lượng HCl, 0,78 đương lượng H₂O). Các chất đồng phân đối quang này được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Chiralpak® AD-H 5 µm 250 x 30 mm, Pha động: 70% CO₂, 30% iPrOH). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất (618 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang 9A (505 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai (548 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang 9B (495 mg).

Hợp chất 9:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,9 Hz, 2 H) 2,34 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,18 - 3,34 (m, 2 H) 3,63 (s, 3 H) 3,80 - 3,90 (m, 2 H) 4,02 - 4,14 (m, 1 H) 4,40 - 4,49 (m, 1 H) 5,72 (s, 1 H) 5,80 (s, 1 H) 5,94 (br d, *J*=10,1 Hz, 2 H) 7,33 (dd, *J*=8,5, 1,6 Hz, 1 H) 7,39 - 7,43 (m, 1 H) 7,43 - 7,50 (m, 3 H) 8,36 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 2,99 phút, MH⁺ 581

Điểm nóng chảy: 110°C

Chất đồng phân đối quang 9A:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,7 Hz, 2 H) 2,33 (br t, *J*=7,1 Hz, 2 H) 3,22 - 3,28 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,80 - 3,90 (m, 2 H) 4,03 - 4,13 (m, 1 H) 4,39 - 4,48 (m, 1 H) 5,72 (br d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 5,80 (s, 1 H) 5,93 (br d, *J*=10,7 Hz, 2 H) 6,60 (br d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 7,33 (br d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 7,39 - 7,43 (m, 1 H) 7,43 - 7,51 (m, 3 H) 8,36 (s, 1 H) 12,19 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 2,98 phút, MH⁺ 581

[α]_D²⁰: -30,0° (c 0,29, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-G): Rt 1,97 phút, MH⁺ 581, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang 9B:

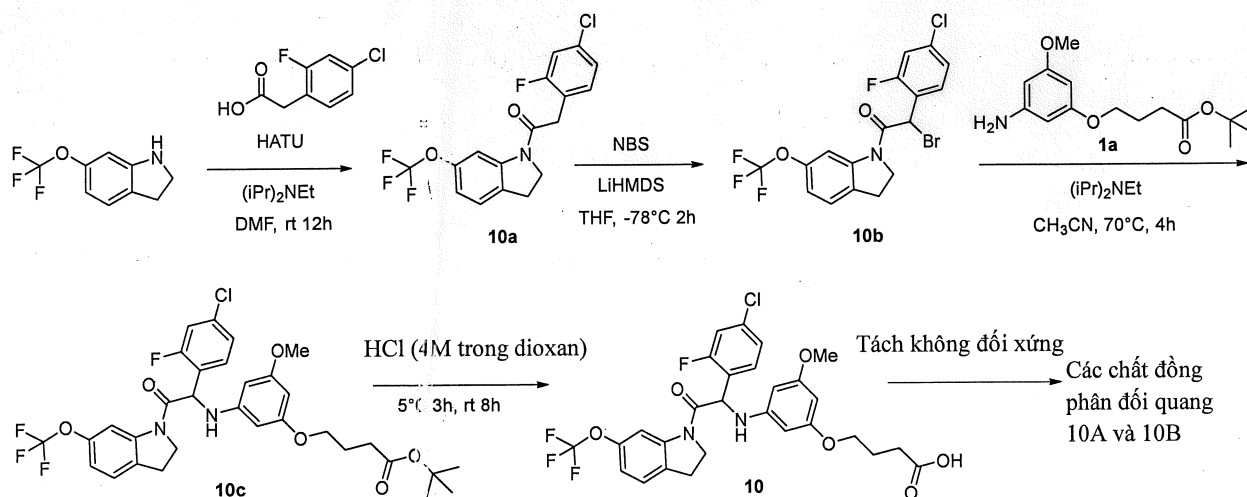
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,33 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,21 - 3,28 (m, 2 H) 3,63 (s, 3 H) 3,80 - 3,91 (m, 2 H) 4,02 - 4,12 (m, 1 H) 4,40 - 4,49 (m, 1 H) 5,72 (d, $J=9,1$ Hz, 1 H) 5,80 (s, 1 H) 5,94 (br d, $J=11,0$ Hz, 2 H) 6,60 (br d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 7,33 (dd, $J=8,2, 1,6$ Hz, 1 H) 7,38 - 7,43 (m, 1 H) 7,43 - 7,50 (m, 3 H) 8,36 (s, 1 H) 11,04 - 12,93 (m, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,98 phút, MH^+ 581

$[\alpha]_D^{20}$: +27,9° (c 0,28, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-G): R_t 3,19 phút, MH^+ 581, độ tinh khiết không đối xứng 99,35%.

Ví dụ 10: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (Hợp chất **10**) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **10A** và **10B**.



Tổng hợp chất trung gian 10a:

HATU (7,02 g, 18,46 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp gồm 6-(triflometoxy)indolin [CAS 959235-95-1] (2,5 g, 12,3 mmol), axit 2-(4-clo-2-flophenyl)axetic [CAS 194240-75-0] (2,32 g, 12,3 mmol) và diisopropyletylamin (6,1 mL, 36,9 mmol) trong DMF (100 mL). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp này được pha loãng bằng nước, chất kết tủa được lọc ra, và được rửa bằng nước. Cặn được hấp thụ EtOAc và dung dịch hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước K_2CO_3 10%, nước muối, làm khô trên MgSO_4 , lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Sản phẩm cặn được kết tinh từ diisopropyl ete thu được 2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **10a** (4 g).

Tổng hợp chất trung gian 10b:

Ở -78°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1M trong THF (21,4 mL, 21,4 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **10a** (4 g, 10,7 mmol) trong THF (60 mL). Hỗn hợp này được khuấy trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (2,1 g, 11,8 mmol) trong THF (40 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C, phản ứng được dập tắt bằng dung dịch bão hòa NH₄Cl. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lốp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được 2-bromo-2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **10b** (4,8 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian 10c:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **10b** (3 g, 6,63 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)butanoat **1a** (1,86 g, 6,63 mmol) và diisopropyletylamin (1,37 mL, 7,95 mmol) trong CH₃CN (60 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm, pha loãng bằng EtOAc, và được rửa bằng HCl 1N và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 120 g, heptan/EtOAc 80/20). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **10c** (835 mg).

Tổng hợp Hợp chất 10 và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang 10A và 10B:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **10c** (835 mg, 1,28 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (11,3 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 8 giờ. Dung dịch được cô dưới áp suất giảm. Cặn được hóa rắn từ diisopropyl ete thu được axit 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (Hợp chất **10**) (620 mg). Các chất đồng phân đối quang này được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế

(Pha tĩnh: Chiralpak® IC 5 μm 250 x 30 mm, Pha động: 70% CO_2 , 30% iPrOH (+ 0,3% iPrNH_2). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất (249 mg) được hấp thụ EtOAc và được rửa bằng HCl 1N. Lớp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO_4 , lọc và cô dưới áp suất giảm. Cặn được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **10A** (183 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai (274 mg) được hấp thụ EtOAc và được rửa bằng HCl 1N. Lớp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO_4 , lọc và cô dưới áp suất giảm. Cặn được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **10B** (186 mg).

Hợp chất 10:

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,33 (br t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,09 - 3,24 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,81 - 3,89 (m, 2 H) 4,05 - 4,13 (m, 1 H) 4,38 - 4,47 (m, 1 H) 5,70 (br d, $J=9,1$ Hz, 1 H) 5,79 (s, 1 H) 5,93 (br d, $J=9,8$ Hz, 2 H) 6,62 (br d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 7,03 (br d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,31 - 7,37 (m, 2 H) 7,41 - 7,50 (m, 2 H) 8,02 (s, 1 H) 12,15 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 3,07 phút, MH^+ 597

Chất đồng phân đối quang 10A:

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,34 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,12 - 3,22 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,79 - 3,90 (m, 2 H) 4,04 - 4,13 (m, 1 H) 4,38 - 4,48 (m, 1 H) 5,70 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 5,79 (s, 1 H) 5,93 (br d, $J=9,8$ Hz, 2 H) 6,62 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 7,03 (br d, $J=9,5$ Hz, 1 H) 7,30 - 7,38 (m, 2 H) 7,41 - 7,51 (m, 2 H) 8,02 (s, 1 H) 12,10 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 3,04 phút, MH^+ 597

$[\alpha]_D^{20}$: +23,1° (c 0,26, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-H): R_t 3,22 phút, MH^+ 597, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang 10B:

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,87 (br t, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,34 (br t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,12 - 3,25 (m, 2 H) 3,63 (s, 3 H) 3,80 - 3,90 (m, 2 H) 4,05 - 4,14 (m, 1 H) 4,38 -

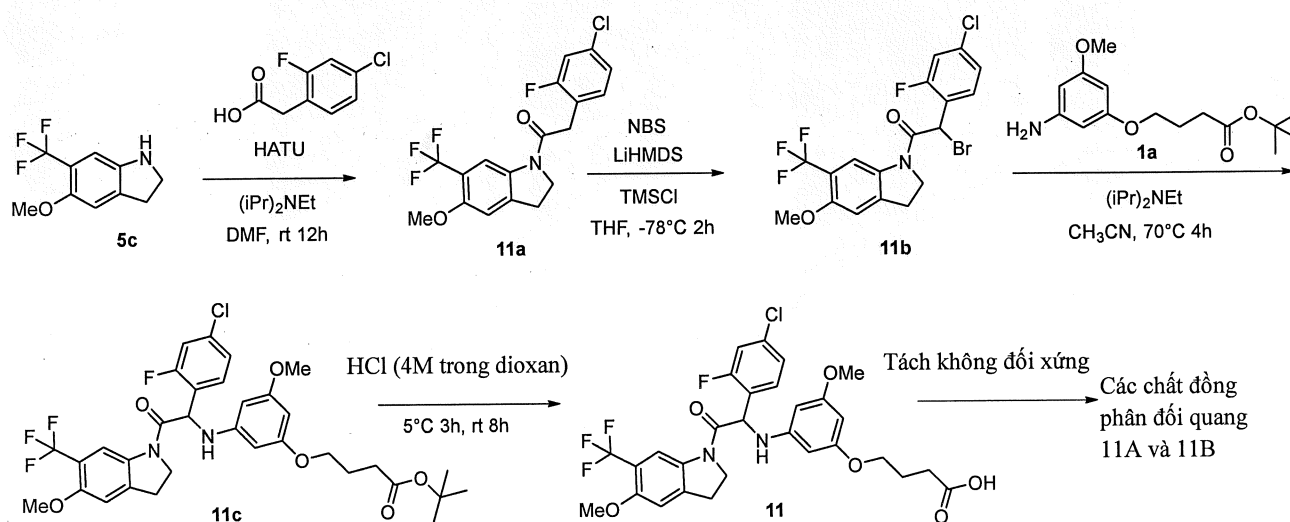
4,49 (m, 1 H) 5,71 (br d, $J=9,1$ Hz, 1 H) 5,80 (br s, 1 H) 5,94 (br d, $J=9,5$ Hz, 2 H) 6,62 (br d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 7,03 (br d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,30- 7,38 (m, 2 H) 7,41 - 7,52 (m, 2 H) 8,02 (br s, 1 H) 12,12 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 3,04 phút, MH^+ 597

$[\alpha]_D^{20}$: $-23,0^\circ$ (c 0,3, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-H): R_t 4,05 phút, MH^+ 597, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 11: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-(5-metoxi-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxi-phenoxy)butanoic (Hợp chất 11) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang 11A và 11B.



Tổng hợp chất trung gian 11a:

HATU (5,25 g, 13,81 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp gồm 5-metoxi-6-(triflo-metyl)indolin **5c** (2 g, 9,21 mmol), axit 2-(4-clo-2-flophenyl)axetic [CAS 194240-75-0] (1,74 g, 9,21 mmol) và diisopropyletylamin (4,57 mL, 27,6 mmol) trong DMF (50 mL). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp được pha loãng bằng băng/nước. Chất kết tủa được lọc ra và được rửa bằng nước. Cặn được hấp thụ CH_2Cl_2 và dung dịch hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước K_2CO_3 10%, nước muối, làm khô trên $MgSO_4$, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được kết tinh từ diisopropyl ete thu được 2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(5-metoxi-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **11a** (3,4 g).

Tổng hợp chất trung gian 11b:

Ở -78°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1M trong THF (17,5 mL, 17,5 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(5-metoxy-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **11a** (3,4 g, 8,77 mmol) trong THF (45 mL). TMSCl (1,34 mL, 10,5 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Hỗn hợp này được khuấy trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (1,87 g, 10,52 mmol) trong THF (30 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C, phản ứng được dập tắt bằng dung dịch bão hòa NH₄Cl. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lốp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được 2-bromo-2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(5-metoxy-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **11b** (4 g). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian **11c**:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-clo-2-flophenyl)-1-(5-metoxy-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon **11b** (4 g, 8,57 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)butanoat **1a** (2,4 g, 8,57 mmol) và diisopropyletylamin (1,77 mL, 10,3 mmol) trong CH₃CN (100 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm, pha loãng bằng EtOAc và được rửa bằng HCl 1N và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Hợp chất này được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 80 g, heptan/EtOAc 80/20). Hợp chất này được tinh chế tiếp qua SFC đối xứng (pha tĩnh: 2-ethylpyridin 5 µm 150 x 30 mm, pha động: 85% CO₂, 15% MeOH). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-(5-metoxy-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **11c** (2,6 g).

Tổng hợp Hợp chất **11** và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **11A** và **11B**:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-(5-metoxy-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat **11c** (2,2 g, 3,3 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (29,2 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ phòng trong 8 giờ. Dung dịch được cô dưới áp suất giảm. Cặn được kết tinh từ CH₃CN/diisopropyl ete thu được axit 4-(3-((1-(4-clo-2-flophenyl)-2-(5-metoxy-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (Hợp chất **11**)

dưới dạng muối HCl (800 mg, 0,85 đương lượng HCl, 0,36 đương lượng H₂O). Phân đoạn này được kết hợp với mẻ khác (tổng lượng: 1,8 g) để tách không đối xứng. Các chất đồng phân đối quang này được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Chiralcel® OD-H 5 µm 250 x 30 mm, Pha động: 55% CO₂, 45% iPrOH). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất (788 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **11A** (693 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai (771 mg) được hóa rắn từ ete dầu hỏa/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **11B** (695 mg).

Hợp chất 11:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,8 Hz, 2 H) 2,34 (br t, *J*=7,4 Hz, 2 H) 3,18 - 3,31 (m, 2 H) 3,63 (s, 3 H) 3,85 (s, 5 H) 3,98 - 4,09 (m, 1 H) 4,37 - 4,48 (m, 1 H) 5,69 (s, 1 H) 5,79 (s, 1 H) 5,93 (br d, *J*=11,0 Hz, 2 H) 7,26 (s, 1 H) 7,32 (br d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 7,44 - 7,52 (m, 2 H) 8,32 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,90 phút, MH⁺ 611

Điểm nóng chảy: 121°C

Chất đồng phân đối quang 11A:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,88 (quin, *J*=6,8 Hz, 2 H) 2,34 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,18 - 3,29 (m, 2 H) 3,63 (s, 3 H) 3,86 (s, 5 H) 3,99 - 4,07 (m, 1 H) 4,38 - 4,47 (m, 1 H) 5,69 (br s, 1 H) 5,79 (s, 1 H) 5,93 (br d, *J*=10,7 Hz, 2 H) 6,55 (br s, 1 H) 7,25 (s, 1 H) 7,32 (dd, *J*=8,5, 1,3 Hz, 1 H) 7,43 - 7,51 (m, 2 H) 8,33 (s, 1 H) 12,13 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,90 phút, MH⁺ 611

[α]_D²⁰: -23,9° (c 0,26, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-C): R_t 1,70 phút, MH⁺ 611, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang 11B:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,88 (quin, *J*=6,8 Hz, 2 H) 2,34 (br t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,18 - 3,31 (m, 2 H) 3,63 (s, 3 H) 3,85 (s, 5 H) 3,99 - 4,07 (m, 1 H) 4,37 - 4,47 (m,

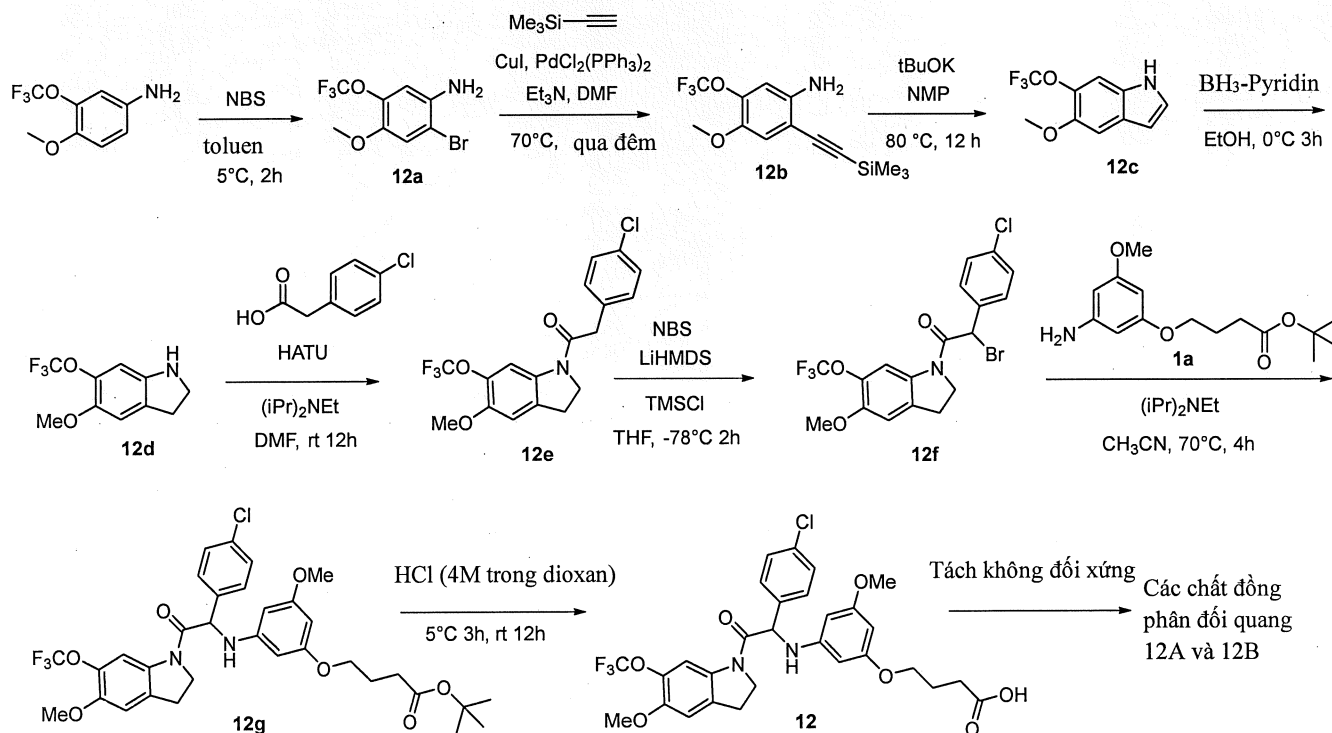
1 H) 5,69 (br s, 1 H) 5,79 (s, 1 H) 5,93 (br d, $J=11,0$ Hz, 2 H) 6,56 (br s, 1 H) 7,25 (s, 1 H) 7,32 (br d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,43 - 7,50 (m, 2 H) 8,33 (s, 1 H) 12,13 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,89 phút, MH^+ 611

$[\alpha]_D^{20}$: +24,0° (c 0,25, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-C): R_t 2,96 phút, MH^+ 611, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 12: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxi-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoethyl)amino)-5-metoxi-phenoxy)butanoic (Hợp chất **12**) và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang **12A** và **12B**.



Tổng hợp chất trung gian 12a:

Dung dịch chứa 4-metoxi-3-(triflometoxy)anilin [CAS 647855-21-8] (3,1 g, 15,0 mmol) trong toluen (50 mL) được xử lý bằng *N*-bromosuxinimit (2,8 g, 15,7 mmol) ở 5°C và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5 đến 10°C trong 2 giờ. Hỗn hợp này được dập tắt bằng nước và được chiết bằng EtOAc. Các phần chiết đã thu gom được làm khô trên $MgSO_4$, lọc và cho bay hơi dưới áp suất giảm. Việc tinh chế được thực hiện bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 μm , 24 g, gradien heptan/EtOAc 95/5 đến 90/10). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được 2-bromo-4-metoxi-5-(triflometoxy)anilin **12a** (2,5 g).

Tổng hợp chất trung gian 12b:

Dung dịch chứa 2-bromo-4-metoxi-5-(triflometoxy)anilin **12a** (2,72 g, 9,51 mmol) trong DMF (30 mL) được loại khí bằng N₂ trong 15 phút. Diclobis-(triphenylphosphin)paladi (667 mg, 0,95 mmol), đồng (I) iodia (362 mg, 1,90 mmol), trietylamin (3,96 mL, 28,5 mmol) và trimetylsilylaxetylen (3,95 mL, 28,53 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng này được gia nhiệt ở 70°C trong 12 giờ dưới dòng N₂. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng H₂O và được chiết bằng EtOAc. Các pha hữu cơ được thu gom, làm khô trên MgSO₄, lọc và cô dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 80 g, heptan/EtOAc 85/15). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu được 4-metoxi-5-(triflometoxy)-2-((trimetylsilyl)etynyl)anilin **12b** (1,4 g).

Tổng hợp chất trung gian 12c:

Dung dịch chứa 4-metoxi-5-(triflometoxy)-2-((trimetylsilyl)etynyl)anilin **12b** (1,2 g, 3,96 mmol) trong NMP (11 mL) dưới dòng N₂ được bổ sung *t*BuOK (1,33 g, 11,9 mmol) từng phần. Hỗn hợp phản ứng này được gia nhiệt ở 80°C trong 4 giờ; sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được rót vào băng/nước và được axit hóa bằng HCl 3N cho đến khi đạt độ pH 4-5. Hỗn hợp phản ứng được chiết bằng EtOAc. Các pha hữu cơ được thu gom, được rửa bằng H₂O, làm khô trên MgSO₄, lọc và cô dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 40 g, heptan/EtOAc 85/15). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và làm bay hơi đến khô thu được 5-metoxi-6-(triflometoxy)-1*H*-indol **12c** (490 mg).

Tổng hợp chất trung gian 12d:

Ở 0°C, BH₃-Pyridin (10,5 mL, 103,8 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào dung dịch chứa 5-metoxi-6-(triflometoxy)-1*H*-indol **12c** (8 g, 34,6 mmol) trong EtOH (45 mL). HCl 6N (6 mL) được bổ sung từ từ trong khi duy trì nhiệt độ thấp hơn 10°C. Hỗn hợp này được khuấy ở 0°C trong 3 giờ. Nước (210 mL) được bổ sung và hỗn hợp này được kiềm hóa cho đến khi đạt độ pH 8-9 bằng dung dịch nước NaOH đặc (trong quá trình bổ sung, nhiệt độ phản ứng được duy trì thấp hơn 20°C). Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, làm khô trên MgSO₄, lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Toluene được bổ sung và dung dịch được cô dưới áp suất giảm thu được 7,5 g 5-metoxi-6-(triflometoxy)indolin **12d**.

Tổng hợp chất trung gian 12e:

Hỗn hợp gồm axit 5-metoxi-6-(triflometoxi)indolin **12d** (1 g, 4,29 mmol), 2-(4-clophenyl)axetic [CAS 1878-66-6] (805 mg, 4,72 mmol), HATU (2,44 g, 6,43 mmol) và diisopropyletylamin (2,13 mL, 12,87 mmol) trong DMF (20 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Băng/nước được bổ sung và chất kết tủa được lọc ra. Cặn được hấp thụ CH_2Cl_2 . Dung dịch hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO_4 , lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được 2-(4-clophenyl)-1-(5-metoxi-6-(triflometoxi)indolin-1-yl)etanon **12e** (1,68 g).

Tổng hợp chất trung gian 12f:

Ở -78°C , dưới dòng N_2 , LiHMDS 1M trong THF (8,3 mL, 8,3 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào hỗn hợp gồm 2-(4-clophenyl)-1-(5-metoxi-6-(triflometoxi)indolin-1-yl)etanon **12e** (1,6 g, 4,15 mmol) trong THF (25 mL). TMSCl (0,63 mL, 4,98 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Hỗn hợp này được khuấy trong 15 phút ở -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (0,89 g, 4,98 mmol) trong THF (15 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở -78°C , phản ứng được dập tắt bằng dung dịch bão hòa NH_4Cl . Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lốp hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO_4 , lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm thu được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(5-metoxi-6-(triflometoxi)indolin-1-yl)etanon **12f** (2,3 g, độ tinh khiết (đo bằng LC): 50%). Hợp chất này được dùng ngay cho bước tiếp theo.

Tổng hợp chất trung gian 12g:

Hỗn hợp gồm 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(5-metoxi-6-(triflometoxi)indolin-1-yl)etanon **12f** (2,3 g, 2,48 mmol, độ tinh khiết (đo bằng LC): 50%), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxi-phenoxy)butanoat **1a** (0,696 g, 2,48 mmol) và diisopropyletylamin (0,512 mL, 2,97 mmol) trong CH_3CN (25 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp thu được được cô dưới áp suất giảm, pha loãng bằng EtOAc, và được rửa bằng HCl 1N, và nước. Pha hữu cơ được tách ra, làm khô trên MgSO_4 , lọc và dung môi được bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 μm , 80 g, heptan/EtOAc 80/20). Các phân đoạn chứa sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm và cặn lại được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 μm , 40 g, CH_2Cl_2). Các phân đoạn tinh khiết được thu gom và cho bay hơi đến khô thu

được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxo-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoethyl)amino)-5-metoxophenoxy)butanoat **12g**

(920 mg).

Tổng hợp Hợp chất 12 và tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối quang 12A và 12B:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxo-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoethyl)amino)-5-metoxophenoxy)butanoat **12g** (920 mg, 1,38 mmol) trong HCl 4M trong dioxan (15 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Chất kết tủa được lọc ra, được rửa bằng diisopropyl ete và được làm khô thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxo-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoethyl)amino)-5-metoxophenoxy)butanoic (Hợp chất **12**, 802 mg, 0,2 đương lượng H₂O). Các chất đồng phân đối quang này được tách ra qua SFC không đối xứng điều chế (Pha tĩnh: Chiralpak® AD-H 5 µm 250 x 20 mm, Pha động: 50% CO₂, 50% iPrOH). Các phân đoạn sản phẩm được thu gom và được bay hơi dưới áp suất giảm. Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ nhất (260 mg) được hóa rắn từ heptan/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **12A** (165 mg). Chất đồng phân đối quang được giải hấp thứ hai (241 mg) được hóa rắn từ heptan/diisopropyl ete thu được Chất đồng phân đối quang **12B** (184 mg).

Hợp chất 12:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,86 (quin, *J*=6,9 Hz, 2 H) 2,33 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,08 - 3,28 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,81 (s, 3 H) 3,84 (br t, *J*=6,5 Hz, 2 H) 3,97 - 4,06 (m, 1 H) 4,48 (td, *J*=10,4, 6,3 Hz, 1 H) 5,53 (s, 1 H) 5,75 (s, 1 H) 5,94 (br d, *J*=10,1 Hz, 2 H) 7,20 (s, 1 H) 7,43 (d, *J*=8,5 Hz, 2 H) 7,54 (d, *J*=8,5 Hz, 2 H) 8,06 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 2,89 phút, MH⁺ 609

Chất đồng phân đối quang 12A:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,86 (quin, *J*=6,8 Hz, 2 H) 2,33 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,09 - 3,26 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,81 (s, 3 H) 3,84 (br t, *J*=6,5 Hz, 2 H) 4,02 (td, *J*=10,3, 7,1 Hz, 1 H) 4,48 (td, *J*=10,4, 6,3 Hz, 1 H) 5,53 (d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 5,75 (s, 1 H) 5,93 (s, 1 H) 5,95 (s, 1 H) 6,43 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 7,20 (s, 1 H) 7,43 (d, *J*=8,2 Hz, 2 H) 7,55 (d, *J*=8,5 Hz, 2 H) 8,06 (s, 1 H) 12,12 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,92 phút, MH^+ 609

$[\alpha]_D^{20}$: $-44,2^\circ$ (c 0,197, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-I): R_t 0,99 phút, MH^+ 609, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối quang 12B:

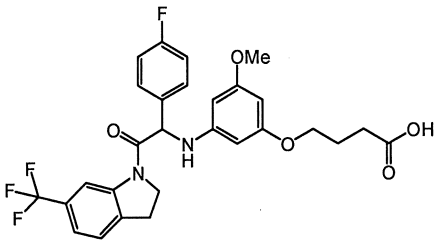
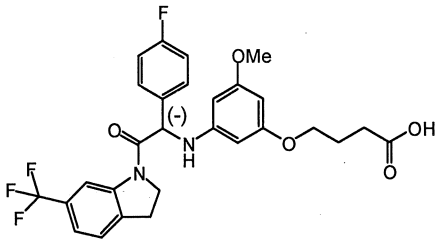
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,86 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,33 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,09 - 3,27 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,81 (s, 3 H) 3,84 (br t, $J=6,5$ Hz, 2 H) 3,98 - 4,06 (m, 1 H) 4,48 (td, $J=10,5, 6,1$ Hz, 1 H) 5,53 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 5,75 (s, 1 H) 5,93 (s, 1 H) 5,95 (s, 1 H) 6,43 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 7,20 (s, 1 H) 7,43 (d, $J=8,5$ Hz, 2 H) 7,54 (d, $J=8,5$ Hz, 2 H) 8,06 (s, 1 H) 12,16 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,91 phút, MH^+ 609

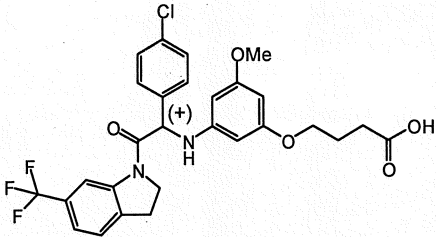
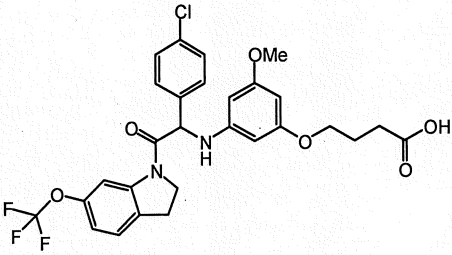
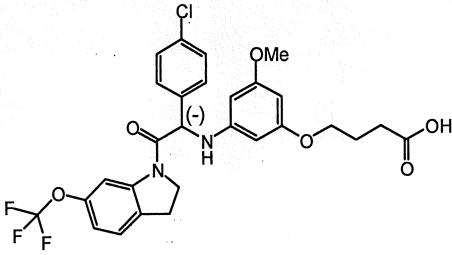
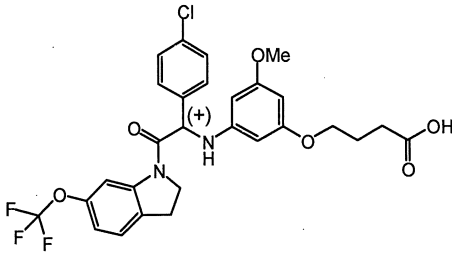
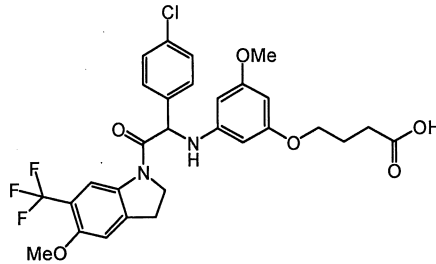
$[\alpha]_D^{20}$: $+40,7^\circ$ (c 0,189, DMF)

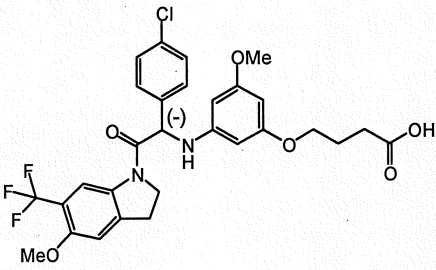
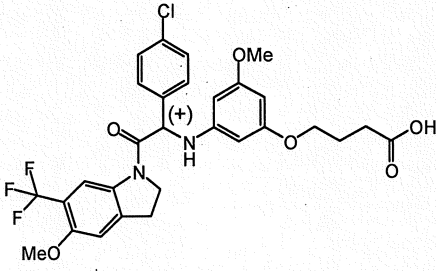
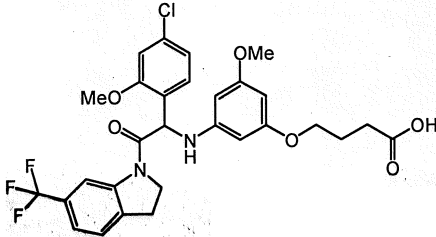
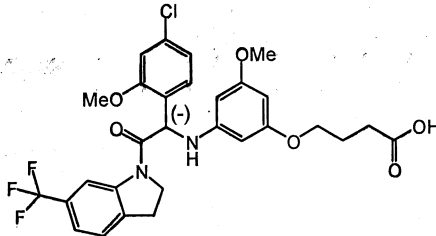
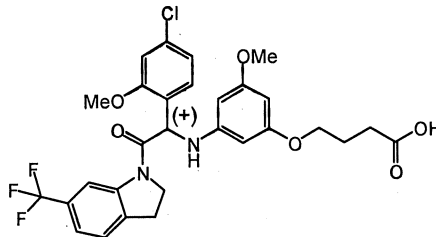
SFC không đối xứng (phương pháp SFC-I): R_t 1,45 phút, MH^+ 609, độ tinh khiết không đối xứng 98,53%.

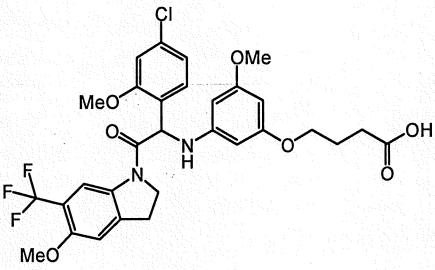
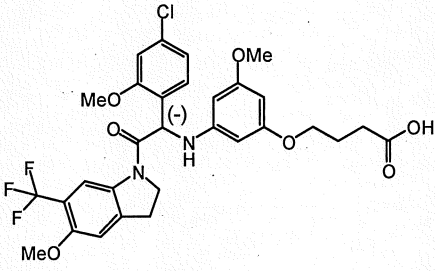
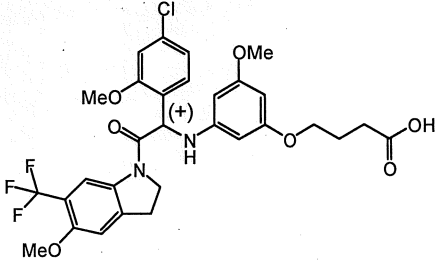
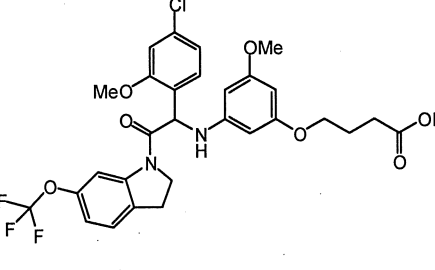
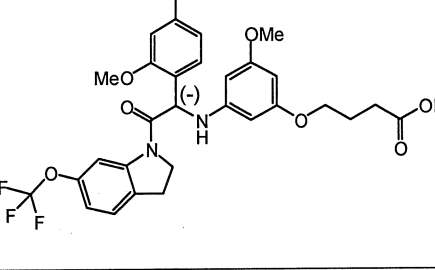
Bảng : Các hợp chất được điều chế như được mô tả ở trên

Hợp chất	Cấu trúc	Góc quay quang
1		Triệt quang
1A		$[\alpha]_D^{20} = -49,0^\circ$

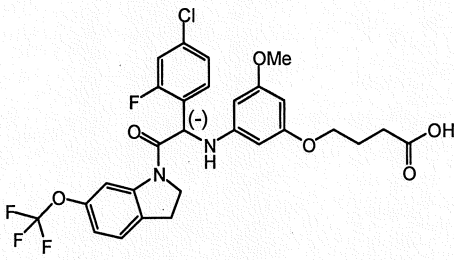
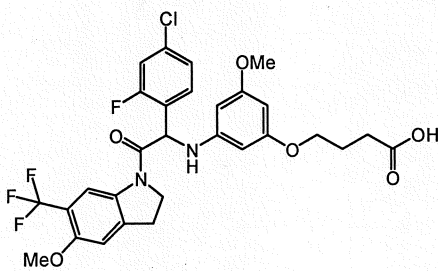
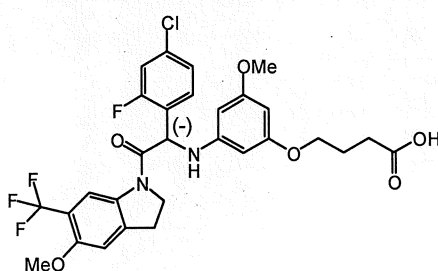
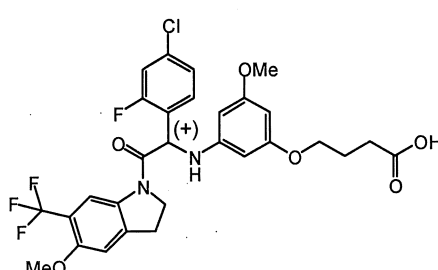
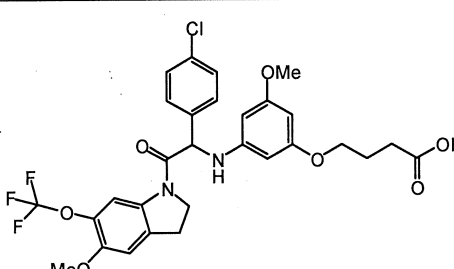
Hợp chất	Cấu trúc	Góc quay quang
1B		$[\alpha]_D^{20} = +49,5^\circ$
2		Triệt quang
2A		$[\alpha]_D^{20} = -46,3^\circ$
2B		$[\alpha]_D^{20} = +47,0^\circ$
3		Triệt quang
3A		$[\alpha]_D^{20} = -42,4^\circ$

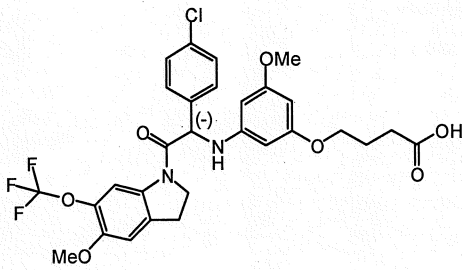
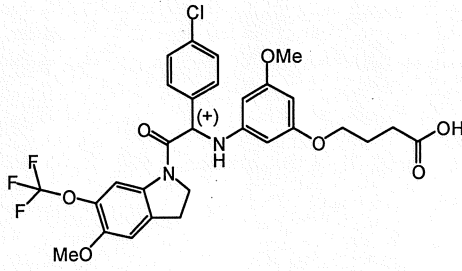
Hợp chất	Cấu trúc	Góc quay quang
3B		$[\alpha]_D^{20} = +50,7^\circ$
4		Triệt quang
4A		$[\alpha]_D^{20} = -48,5^\circ$
4B		$[\alpha]_D^{20} = +42,9^\circ$
5		Triệt quang

Hợp chất	Cấu trúc	Góc quay quang
5A		$[\alpha]_D^{20} = -43,2^\circ$
5B		$[\alpha]_D^{20} = +41,4^\circ$
6		Triệt quang
6A		$[\alpha]_D^{20} = -28,6^\circ$
6B		$[\alpha]_D^{20} = +32,1^\circ$

Hợp chất	Cấu trúc	Góc quay quang
7		Triệt quang
7A		$[\alpha]_D^{20} = -23,9^\circ$
7B		$[\alpha]_D^{20} = +28,5^\circ$
8		Triệt quang
8A		$[\alpha]_D^{20} = -39,3^\circ$

Hợp chất	Cấu trúc	Góc quay quang
8B		$[\alpha]_D^{20} = +34,5^\circ$
9		Triệt quang
9A		$[\alpha]_D^{20} = -30,0^\circ$
9B		$[\alpha]_D^{20} = +27,9^\circ$
10		Triệt quang
10A		$[\alpha]_D^{20} = +23,1^\circ$

Hợp chất	Cấu trúc	Góc quay quang
10B		$[\alpha]_D^{20} = -23,0^\circ$
11		Triệt quang
11A		$[\alpha]_D^{20} = -23,9^\circ$
11B		$[\alpha]_D^{20} = +24,0^\circ$
12		Triệt quang

Hợp chất	Cấu trúc	Góc quay quang
12A		$[\alpha]_D^{20} = -44,2^\circ$
12B		$[\alpha]_D^{20} = +40,7^\circ$

Hoạt tính kháng virus của hợp chất theo sáng chế

Thử nghiệm kháng virus DENV-2

Hoạt tính kháng virus của tất cả các hợp chất theo sáng chế được thử nghiệm kháng chủng DENV-2 16681, chủng này được đánh dấu protein huỳnh quang xanh tăng cường (enhanced green fluorescent protein: eGFP). Môi trường nuôi cấy gồm môi trường cần thiết tối thiểu có bổ sung 2% huyết thanh thai bò được bất hoạt bởi nhiệt, 0,04% gentamycin (50 mg/mL) và 2mM L-glutamin. Các tế bào Vero, thu nhận từ ECACC, được tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy và 25 μ L được bổ sung vào đĩa 384 lỗ (2500 tế bào/lỗ), đĩa này chứa sẵn hợp chất kháng virus. Thông thường, đĩa này chứa dung dịch pha loãng theo bậc 5 lần gồm 9 bước pha loãng hợp chất thử nghiệm ở 200 lần nồng độ cuối trong DMSO 100% (200nL). Ngoài ra, mỗi nồng độ hợp chất được thử nghiệm bốn lần (giới hạn nồng độ cuối: 25 μ M – 0,000064 μ M hoặc 2,5 μ M – 0,0000064 μ M đối với các hợp chất có hoạt tính cao nhất). Cuối cùng, mỗi đĩa chứa các lỗ được chỉ định là đối chứng virus (chứa tế bào và virus mà không chứa hợp chất), đối chứng tế bào (chứa tế bào mà không chứa virus và hợp chất) và đối chứng môi trường (chứa môi trường mà không chứa tế bào, virus và hợp chất). Đối với các lỗ được chỉ định là đối chứng môi trường, 25 μ L môi trường nuôi cấy được bổ sung thay vì tế bào Vero. Sau khi tế bào được bổ sung vào đĩa, đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ

trong phòng để tế bào phân bố đều bên trong lỗ. Tiếp theo, đĩa được ủ trong thiết bị ủ được giữ ẩm đầy đủ (37°C, 5% CO₂) cho đến ngày tiếp theo. Tiếp theo, chủng DENV-2 16681, được đánh dấu eGFP, được bổ sung ở độ bội nhiễm (multiplicity of infection: MOI) 0,5. Do đó, 15 µL huyền phù virus được bổ sung vào tất cả các lỗ chứa hợp chất thử nghiệm và các lỗ được chỉ định là đối chứng virus. Đồng thời, 15 µL môi trường nuôi cấy được bổ sung vào đối chứng môi trường và đối chứng tế bào. Tiếp theo, đĩa được ủ trong 3 ngày trong thiết bị ủ được giữ ẩm đầy đủ (37°C, 5% CO₂). Vào ngày đọc kết quả, mức huỳnh quang eGFP được đo bằng kính hiển vi huỳnh quang tự động ở 488 nm (laze xanh). Bằng cách sử dụng hệ thống LIMS nội bộ, đường cong liều ức chế-đáp ứng đối với mỗi hợp chất được tính và nồng độ cho hiệu quả cực đại 50% (EC₅₀) được xác định. Do đó, phần trăm ức chế (I) đối với mỗi nồng độ thử nghiệm được tính bằng cách sử dụng công thức sau: $I = 100 * (S_T - S_{CC}) / (S_{VC} - S_{CC})$; S_T, S_{CC} và S_{VC} là lượng tín hiệu eGFP lần lượt trong các lỗ chứa hợp chất thử nghiệm, đối chứng tế bào và đối chứng virus. EC₅₀ là nồng độ của một hợp chất mà tại đó sự sao chép của virus bị ức chế 50%, như đo được bằng mức giảm 50% cường độ huỳnh quang eGFP so với đối chứng virus. EC₅₀ được tính bằng phép nội suy tuyến tính (Bảng 1).

Đồng thời, độc tính hợp chất được đánh giá trên cùng đĩa. Sau khi đọc tín hiệu eGFP, 40 µL ATPlite, một loại thuốc nhuộm tế bào sống, được bổ sung vào tất cả các lỗ của đĩa 384 lỗ. ATP có mặt trong tất cả các tế bào có hoạt động chuyển hóa và nồng độ chất này giảm rất nhanh khi tế bào trải qua quá trình hoại tử hoặc chết theo chương trình. Hệ thống thử nghiệm ATPlite dựa trên sự phát sáng do phản ứng của ATP với luciferaza và D-luciferin được bổ sung vào. Đĩa được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, đĩa được đo trên ViewLux. Nồng độ gây độc tế bào cực đại 50% (CC₅₀) cũng được xác định, được định nghĩa là nồng độ cần để làm giảm tín hiệu phát quang 50% so với tín hiệu phát quang của các lỗ đối chứng tế bào. Cuối cùng, chỉ số chọn lọc (SI) được xác định đối với hợp chất, được tính như sau: $SI = CC_{50} / EC_{50}$.

Bảng 1: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất theo sáng chế trong thử nghiệm kháng virus DENV-2

Hợp chất	EC ₅₀ (μ M)	N	CC ₅₀ (μ M)	N	SI	N
1	0,0021	4	>25	4	>12022	4
1A	0,18	3	>25	3	>76	3
1B	0,00084	3	20	3	26500	3
2	0,00055	3	12	4	22200	3
2A	0,056	3	14	3	248	3
2B	0,00024	3	20	3	214720	3
3	0,00048	3	13	5	20300	3
3A	0,0039	6	11	7	3200	6
3B	0,00014	8	13	8	111100	8
4	0,00015	4	10	4	>46100	4
4A	0,031	7	10	8	345	7
4B	0,00012	23	13	23	92400	23
5	0,00062	3	13	3	26000	3
5A	0,019	3	12	3	625	3
5B	0,00018	3	13	3	87500	3
6	0,00031	6	12	7	32100	6

Hợp chất	EC ₅₀ (μM)	N	CC ₅₀ (μM)	N	SI	N
6A	0,023	3	12	3	527	3
6B	0,00013	5	13	5	>209126	5
7	0,00047	3	12	3	24500	3
7A	0,024	3	12	3	508	3
7B	0,00017	3	13	3	101083	3
8	0,00013	3	12	3	112292	3
8A	0,28	4	12	4	43	4
8B	0,000066	6	14	7	>62700	6
9	0,00096	3	11	3	12700	3
9A	0,031	3	12	3	392	3
9B	0,00040	3	13	3	28400	3
10	0,00024	3	10	3	44300	3
10A	0,00019	3	13	3	79200	3
10B	0,0055	3	8,8	3	1620	3
11	0,00066	3	11	3	20600	3
11A	0,015	3	12	3	837	3
11B	0,00015	3	12	3	124345	3
12	0,00073	4	12	4	17700	4
12A	0,38	3	12	3	32	3

Hợp chất	EC ₅₀ (μ M)	N	CC ₅₀ (μ M)	N	SI	N
12B	0,00035	3	12	3	34900	3

N= số thí nghiệm độc lập trong đó hợp chất được thử nghiệm.

Thử nghiệm PCR định lượng phiên mã ngược (RT-qPCR)

Hoạt tính kháng virus của hợp chất theo sáng chế được thử nghiệm kháng chủng DENV-1 TC974#666 (NCPV), chủng DENV-2 16681, chủng DENV-3 H87 (NCPV) và chủng DENV-4 H241 (NCPV) trong thử nghiệm RT-qPCR. Do đó, tế bào Vero được gây nhiễm bằng DENV-1, hoặc DENV-2, hoặc DENV-3 hoặc DENV-4 với sự có mặt hoặc không có mặt của hợp chất thử nghiệm. Vào ngày 3 sau gây nhiễm, tế bào được làm tan và dịch tan tế bào được sử dụng để điều chế cADN của cả đích virus (3'UTR của DENV; Bảng 2) và gen tham chiếu của tế bào (β -actin, Bảng 2). Tiếp theo, PCR kép thời gian thực được thực hiện trên thiết bị Lightcycler480. Giá trị C_p tỷ lệ nghịch với lượng biểu hiện ARN của các đích này. Việc ức chế sự sao chép của DENV bởi hợp chất thử nghiệm dẫn đến sự dịch chuyển của C_p đối với gen 3'UTR. Mặt khác, nếu hợp chất thử nghiệm là độc đối với tế bào, tác dụng tương tự đến sự biểu hiện β -actin sẽ được quan sát thấy. Phương pháp $\Delta\Delta C_p$ so sánh được sử dụng để tính EC₅₀, dựa trên mức biểu hiện gen tương đối của gen đích (3'UTR) được chuẩn hóa theo gen giữ nhà của tế bào (β -actin). Ngoài ra, các giá trị CC₅₀ được xác định trên cơ sở các giá trị C_p cần cho gen giữ nhà β -actin.

Bảng 2: Mồi và đoạn dò dùng cho RT-PCR định lượng, thời gian thực

Mồi/đoạn dò	Đích	Trình tự ^{a, b}
F3utr258	DENV 3'- UTR	5'-CGGTTAGAGGAGACCCCTC-3'
R3utr425	DENV 3'- UTR	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTC-3'

P3utr343	DENV 3'-UTR	FAM-5'-AAGGACTAG-ZEN-AGGTTAGAGGAGACCCCCC-3'-IABkFQ
Factin743	β -actin	5'-GGCCAGGTCATCACCATT-3'
Ractin876	β -actin	5'-ATGTCCACGTCACACTTCATG-3'
Pactin773	β -actin	HEX-5'-TTCCGCTGC-ZEN-CCTGAGGCTCTC-3'-IABkFQ

^a Thuốc nhuộm chỉ thị (FAM, HEX) và yếu tố dập tắt (ZEN và IABkFQ) được biểu thị bằng chữ in đậm và in nghiêng.

^b Trình tự nucleotit của môi và đoạn dò được chọn từ vùng bảo toàn trong vùng 3'UTR của hệ gen virus dengue, trên cơ sở sắp hàng 300 trình tự nucleotit của bốn typ huyết thanh dengue lưu giữ trong Ngân hàng gen (Gong et al., 2013, Methods Mol Biol, Chapter 16).

Môi trường nuôi cấy gồm môi trường cần thiết tối thiểu có bổ sung 2% huyết thanh thai bò được bất hoạt bởi nhiệt, 0,04% gentamycin (50 mg/mL) và 2 mM L-glutamin. Các tế bào Vero, thu nhận từ ECACC, được tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy và 75 μ L/lỗ được bổ sung vào đĩa 96 lỗ (10000 tế bào/lỗ), đĩa này chứa sẵn hợp chất kháng virus. Thông thường, đĩa này chứa dung dịch pha loãng theo bậc 5 lần gồm 9 bước pha loãng hợp chất thử nghiệm ở 200 lần nồng độ cuối trong DMSO 100% (500 nL; giới hạn nồng độ cuối: 25 μ M – 0,000064 μ M hoặc 2,5 μ M – 0,0000064 μ M đối với các hợp chất có hoạt tính cao nhất). Ngoài ra, mỗi đĩa chứa các lỗ được chỉ định là đối chứng virus (chứa tế bào và virus mà không chứa hợp chất) và đối chứng tế bào (chứa tế bào mà không chứa virus và hợp chất). Sau khi tế bào được bổ sung vào đĩa, đĩa được ủ trong thiết bị ủ được giữ ẩm đầy đủ (37°C, 5% CO₂) cho đến ngày tiếp theo. Các virus Dengue có typ huyết thanh 1, 2, 3 và 4 được pha loãng để thu được Cp ~22-24 trong thử nghiệm này. Do đó, 25 μ L huyền phù virus được bổ sung vào tất cả các lỗ chứa hợp chất thử nghiệm và các lỗ được chỉ định là đối chứng virus. Đồng thời, 25 μ L môi trường nuôi cấy được bổ sung vào lỗ đối chứng tế bào. Tiếp theo, đĩa được ủ trong 3 ngày trong thiết bị ủ được giữ ẩm đầy đủ (37°C, 5% CO₂). Sau 3 ngày, dịch nổi được loại khỏi lỗ và tế bào được rửa hai lần bằng PBS lạnh trên băng (~100 μ L). Viên tế bào

trong đĩa 96 lỗ được bảo quản ở -80°C trong ít nhất 1 ngày. Tiếp theo, ARN được chiết bằng kit làm tan Cells-to-CT™, theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Life Technologies). Dịch tan tế bào có thể được bảo quản ở -80°C hoặc dùng ngay cho bước phiên mã ngược.

Để chuẩn bị bước phiên mã ngược, hỗn hợp A (bảng 3A) được điều chế và 7,57 μL /lỗ được phân phối vào đĩa 96 lỗ. Sau khi bổ sung 5 μL dịch tan tế bào, bước biến tính năm phút ở 75°C được thực hiện (bảng 3B). Sau đó, 7,43 μL hỗn hợp B được bổ sung (bảng 3C) và bước phiên mã ngược được bắt đầu (bảng 3D) tạo ra cADN.

Cuối cùng, hỗn hợp RT-qPCR được điều chế, hỗn hợp C (bảng 4A), và 22,02 μL /lỗ được phân phối vào đĩa qPCR 96 lỗ LightCycler với 3 μL cADN được bổ sung và qPCR được thực hiện theo các điều kiện nêu trong bảng 4B trên LightCycler 480.

Bằng cách sử dụng phần mềm LightCycler và hệ thống LIMS nội bộ, đường cong liều-đáp ứng đối với mỗi hợp chất được tính và nồng độ cho hiệu quả cực đại 50% (EC_{50}) và nồng độ gây độc tế bào 50% (CC_{50}) được xác định (các bảng 5-8).

Bảng 3: Tổng hợp cADN bằng cách sử dụng hỗn hợp A, biến tính, hỗn hợp B và phiên mã ngược

Hỗn hợp A

A	Đĩa	8			
	Mẫu	828			Thể tích phản ứng (μL)
	Thành phần hỗn hợp	Nồng độ			Thể tích dùng cho (μL)
		Đơn vị	Gốc	Cuối	1 mẫu
	Milli-Q H_2O				7,27
					x mẫu
					6019,56

R3utr425	μM	20	0,27	0,15	124,20
Ractin876	μM	20	0,27	0,15	124,20
Tổng thể tích/lỗ (μl)				7,57	
Dịch tan tế bào				5,00	

Bước biến**B tính:**

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
Biến tính	75°C	5'
Giữ	4°C	giữ

C Hỗn hợp B

Mẫu	864				
Thành phần hỗn hợp	Nồng độ			Thể tích dùng cho (μl)	
	Đơn vị	Gốc	Cuối	1 mẫu	x mẫu
Dung dịch đệm Expand HIFI 2	X	10,00	1,00	2,00	1728,0
MgCl ₂	mM	25,00	3,50	2,80	2419,2
dNTPs	mM	10,00	1,00	2,00	1728,0
Chất ức chế ARNaza	U/ μl	40,00	1,00	0,50	432,0

Expand RT	U/ μ l	50,00	0,33	0,13	112,3
Tổng thể tích Mi (μl)				7,43	

Quy trình tổng hợp

D cADN

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
Phiên mã ngược	42°C	30'
Biến tính	99°C	5'
Giữ	4°C	giữ

Bảng 4: Hỗn hợp và quy trình qPCR.

A Hỗn hợp C

Mẫu	833			Thể tích phản ứng (μ l)	25
Thành phần hỗn hợp	Nồng độ			Thể tích dùng cho (μ l)	
	Đơn vị	Gốc	Cuối	1 mẫu	x mẫu
H ₂ O PCR grade Roche				7,74	6447,42

Hỗn hợp Roche 2xMM	X	2	1	12,50	10412,50
F3utr258	μM	20	0,3	0,38	316,54
R3utr425	μM	20	0,3	0,38	316,54
P3utr343	μM	20	0,1	0,13	108,29
Factin743	μM	20	0,3	0,38	316,54
Ractin876	μM	20	0,3	0,38	316,54
Pactin773	μM	20	0,1	0,13	108,29
Tổng thể tích / ống (μl)				22,02	
cADN				3,00	

Quy trình

B qPCR3

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	Tỷ lệ dốc nhiệt	
Ủ sơ bộ/biến tính	95°C	10 phút	4,4	
Biến tính	95°C	10 giây	4,4	40 chu kỳ
Ủ	58°C	1 phút	2,2	
Kéo dài	72°C	1 giây	4,4	

Làm lạnh	40°C	10 giây	1,5
----------	------	---------	-----

Bảng 5: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất kháng typ huyết thanh 1 trong thử nghiệm RT-qPCR

	Quy trình A					
	RT-qPCR typ huyết thanh 1 TC974#666					
Hợp chất	EC ₅₀ (μM)	N	CC ₅₀ (μM)	N	SI	N
1B	0,00028	4	14	4	34200	4
2B	0,00030	4	>2,5	4	>19400	4
3B	0,00018	3	>2,5	3	>30300	3
4B	0,000048	7	>2,5	7	>85800	7
5B	0,00074	4	>2,5	4	>6700	4
6B	0,00047	3	>2,5	3	>8420	3
7B	0,00061	3	>2,5	3	>6020	3
8B	0,00015	4	>2,5	4	>30700	4
9B	0,00022	4	>2,5	4	>24000	4
10A	0,00016	4	>2,5	4	>33300	4
11B	0,00067	4	>2,5	4	>6970	4
12B	0,00068	3	>2,5	3	>6820	3

N= số thí nghiệm độc lập trong đó hợp chất được thử nghiệm.

Bảng 6: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất kháng typ huyết thanh 2 trong thử nghiệm RT-qPCR

	Quy trình A					
	RT-qPCR typ huyết thanh 2 16681					
Hợp chất	EC ₅₀ (μM)	N	CC ₅₀ (μM)	N	SI	N
1B	0,00048	4	18	3	38000	3
2B	0,00028	3	14	3	76100	3
3B	0,00012	3	10	3	81700	3
4B	0,000060	7	>2,5	5	>65500	5
5B	0,00017	3	>2,5	3	>16000	3
6B	0,00015	3	>2,5	3	>23800	3
7B	0,00028	4	>2,5	4	>34500	4
8B	0,000062	3	>2,5	3	>43700	3
9B	0,00030	3	>2,5	3	>18200	3
10A	0,00020	3	>2,5	3	>24400	3
11B	0,00017	3	>2,5	3	>18300	3
12B	0,00022	3	>2,5	3	>12900	3

N= số thí nghiệm độc lập trong đó hợp chất được thử nghiệm.

Bảng 7: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất kháng typ huyết thanh 3 trong thử nghiệm RT-qPCR

	Quy trình A					
	RT-qPCR typ huyết thanh 3 H87					
Hợp chất	EC ₅₀ (μM)	N	CC ₅₀ (μM)	N	SI	N
1B	0,0034	3	>2,5	3	>909	3
2B	0,0046	3	>2,5	3	>1200	3
3B	0,0011	3	>2,5	3	>5170	3
4B	0,00066	7	>2,5	6	>5610	6
5B	0,0046	3	>2,5	3	>1050	3
6B	0,0017	3	>2,5	3	>2170	3
7B	0,0058	3	>2,5	3	>1080	3
8B	0,0010	3	>2,5	3	>2740	3
9B	0,0041	3	>2,5	3	>1360	3
10A	0,0021	3	>2,5	3	>1290	3
11B	0,0054	3	>2,5	3	>604	3
12B	0,0041	3	>2,5	3	>1240	3

N= số thí nghiệm độc lập trong đó hợp chất được thử nghiệm.

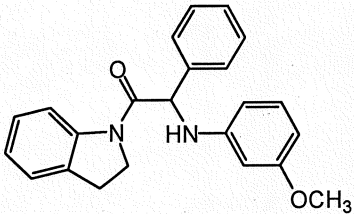
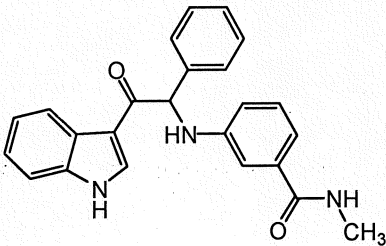
Bảng 8: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất kháng typ huyết thanh 4 trong thử nghiệm RT-qPCR

Hợp chất	Quy trình A					
	RT-qPCR typ huyết thanh 4 H241					
	EC ₅₀ (μM)	N	CC ₅₀ (μM)	N	SI	N
1B	0,051	4	8,3	3	173	3
2B	0,030	4	9,5	4	587	4
3B	0,014	3	1,2	3	85	3
4B	0,011	10	9,1	9	682	9
5B	0,024	3	9,6	3	530	3
6B	0,016	3	>2,5	3	>232	3
7B	0,025	3	9,4	3	531	3
8B	0,012	3	5,8	3	334	3
9B	0,031	3	15	3	570	3
10A	0,010	3	15	2	2640	2
11B	0,022	3	11	3	697	3
12B	0,028	3	10	3	348	3

N= số thí nghiệm độc lập trong đó hợp chất được thử nghiệm.

Các ví dụ về tình trạng kỹ thuật

Các hợp chất (56) và (170) bộc lộ trong WO-2013/045516 được thử nghiệm trong thử nghiệm kháng virus DENV-2 giống như hợp chất theo sáng chế và hoạt tính của chúng được nêu ở dưới.

	hợp chất (56) của WO-2013/045516
	hợp chất (170) của WO-2013/045516

Bảng 9 : EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với các hợp chất (56) và (170) bộc lộ trong thử nghiệm kháng virus DENV-2

Hợp chất	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	SI
(56) của WO-2013/045516	0,45	> 139	> 312
(170) của WO-2013/045516	0,44	26	58

Các chữ viết tắt được sử dụng trong phần thực nghiệm

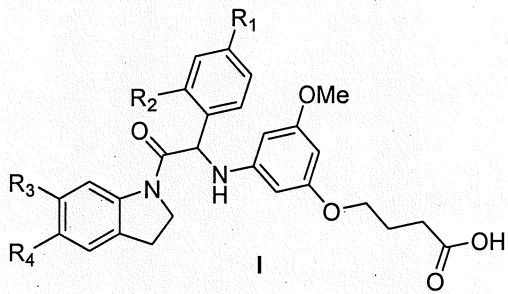
(M+H) ⁺	ion phân tử được proton hóa	iPrNH ₂	isopropylamin
aq.	nước	lPrOH	2-propanol

Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl	K ₂ CO ₃	kali cacbonat
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butyl dicacbonat	K ₃ PO ₄	kali orthophosphat
br	rộng	LiAlH ₄	lithi nhôm hydrua
CH ₃ CN	axetonitril	m/z	tỷ lệ khối lượng/điện tích
CHCl ₃	clorofom	Me	metyl
CH ₂ Cl ₂	diclometan	MeOH	metanol
CO ₂	cacbon dioxit	MgSO ₄	magie sulfat
d	bộ đôi	min	phút
DCM	diclometan	N ₂	nito
DIEA	diisopropyletylamin	Na ₂ CO ₃	natri cacbonat
DIPE	diisopropyl ete	Na ₂ SO ₄	natri sulfat
DMA	dimetylxetamit	NaBH ₄	natri bohhydrua
DMAP	4-dimetylamino pyridin	NaHCO ₃	natri bicacbonat
DME	1,2-dimetoxyetan	NaNO ₂	natri nitrit
DMF	dimetylformamit	NaOH	natri hydroxit
DMSO	dimetyl sulfoxit	q	bộ bốn
eq.	đương lượng	rt hoặc RT	nhiệt độ trong phòng
Et ₂ O	dietyl ete	s	bộ đơn
Et ₃ N	trietylamin	t	bộ ba

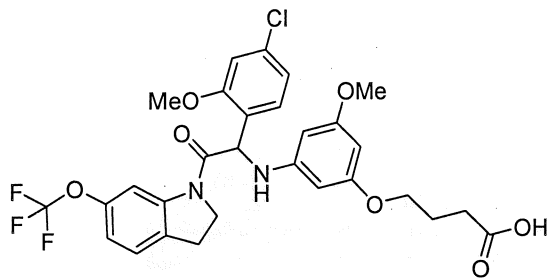
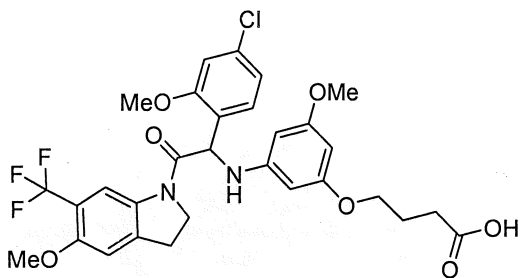
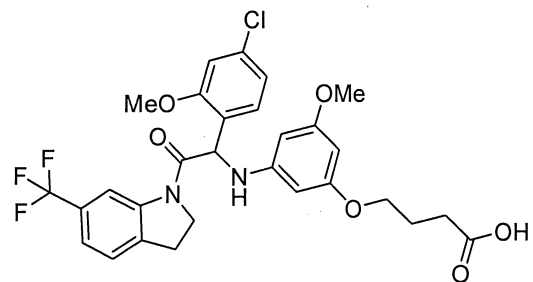
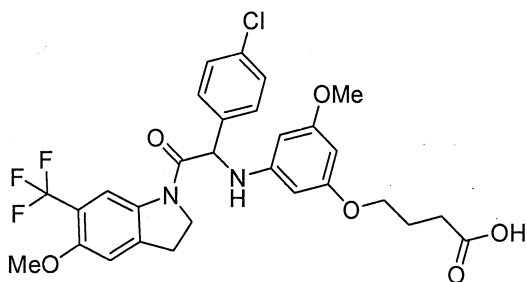
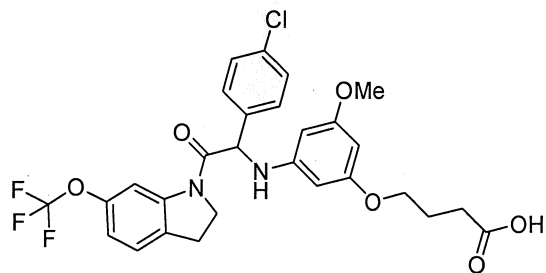
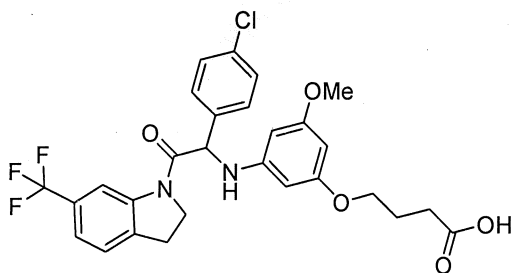
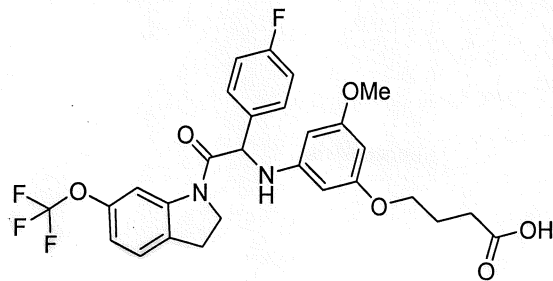
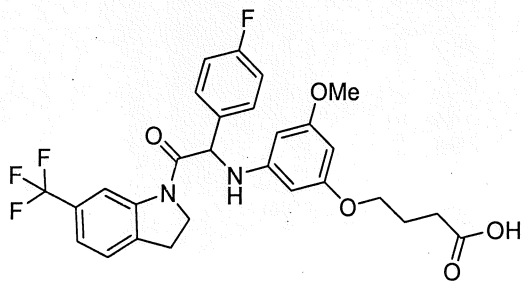
EtOAc	etyl axetat	tBuOH	<i>tert</i> -butanol
EtOH	etanol	TEA	trietylamin
H ₂ O	nước	TFA	trifloaxit axetic
H ₂ SO ₄	axit sulfuric	THF	tetrahydrofuran
HCl	axit clohydric	TMSCl	trimetylsilyl clorua
HPLC	sắc ký lỏng hiệu năng cao	h	giờ

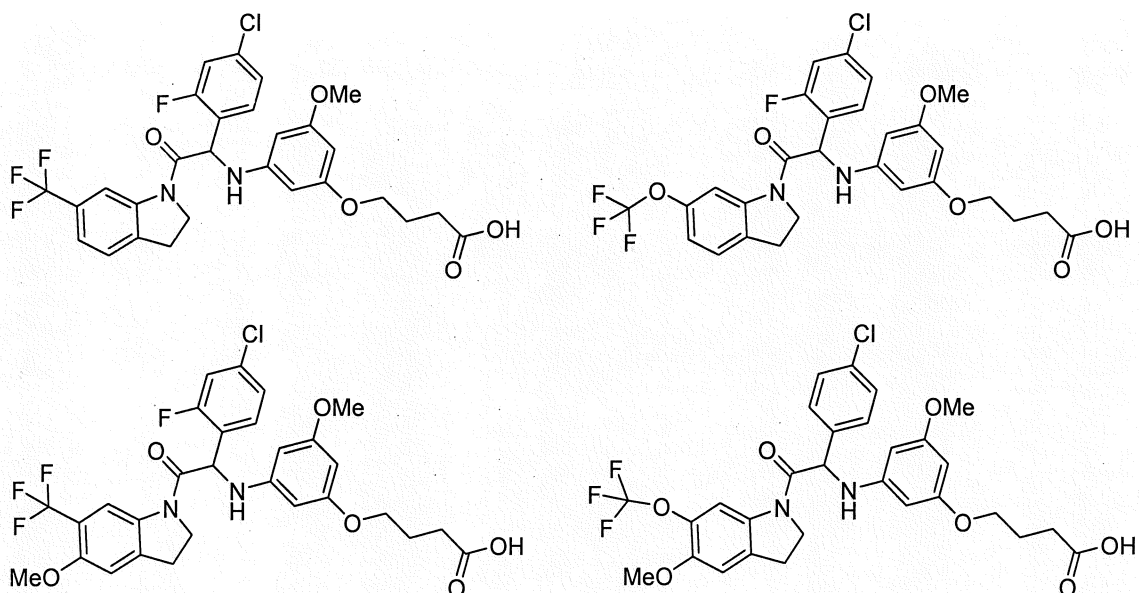
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I)

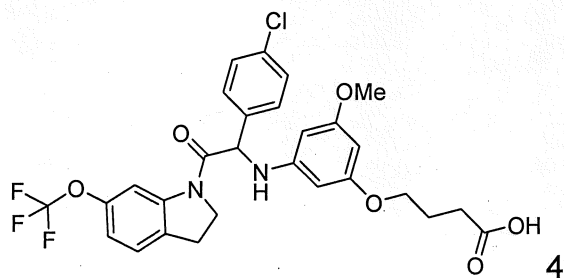


dạng đồng phân lập thể, muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm:





2. Hợp chất theo điểm 1 có công thức 4:



hoặc dạng đồng phân lập thể, muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó.

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2 hoặc dạng đồng phân lập thể, muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó, trong đó hợp chất này là: chất đồng phân đối quang 4A, trong đó

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,7$ Hz, 2 H) 2,34 (br t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,08 - 3,27 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (br t, $J=6,3$ Hz, 2 H) 3,99 - 4,11 (m, 1 H) 4,47 - 4,57 (m, 1 H) 5,57 (br s, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=10,1$ Hz, 2 H) 6,45 (br s, 1 H) 7,01 (br d, $J=7,6$ Hz, 1 H) 7,34 (br d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,44 (br d, $J=8,5$ Hz, 2 H) 7,55 (br d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 8,04 (br s, 1 H) 12,12 (br s, 1 H);

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,95 phút, MH^+ 579;

$[\alpha]_D^{20}$: $-48,5^\circ$ (c 0,27, DMF);

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-A): R_t 1,13 phút, MH^+ 579, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

4. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2 hoặc dạng đồng phân lập thể, muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó, trong đó hợp chất này là: chất đồng phân đối quang 4B, trong đó

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ ppm 1,87 (br t, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,34 (br t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,09 - 3,27 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (br t, $J=6,1$ Hz, 2 H) 3,99 - 4,10 (m, 1 H) 4,46 - 4,59 (m, 1 H) 5,57 (s, 1 H) 5,76 (br s, 1 H) 5,95 (br d, $J=10,1$ Hz, 2 H) 6,45 (br s, 1 H) 7,01 (br d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,34 (br d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,44 (br d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 7,55 (br d, $J=8,2$ Hz, 2 H) 8,04 (br s, 1 H) 12,12 (br s, 1 H);

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,94 phút, MH^+ 579;

$[\alpha]_D^{20}$: +42,9° (c 0,28, DMF);

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-A): R_t 2,13 phút, MH^+ 579, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 hoặc muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó, trong đó hợp chất này là ở dạng tinh thể.

6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 hoặc muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó, trong đó hợp chất này là ở dạng vô định hình.

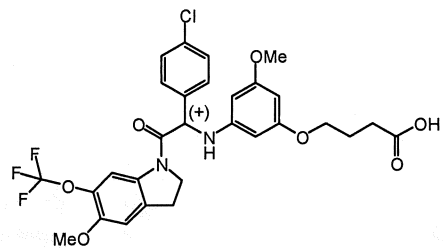
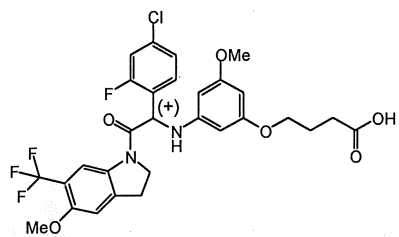
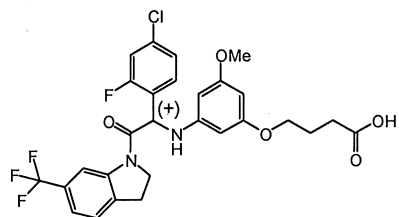
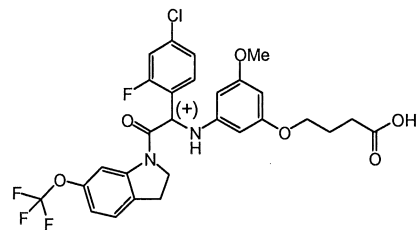
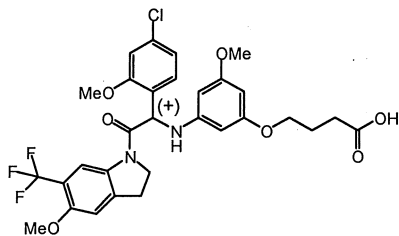
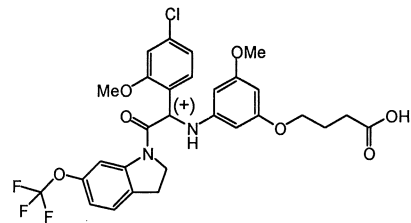
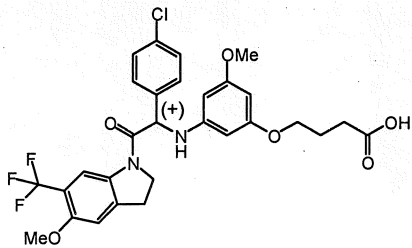
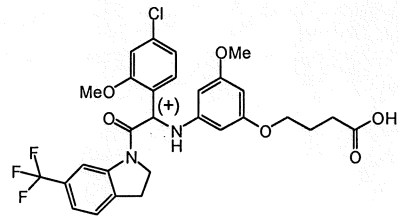
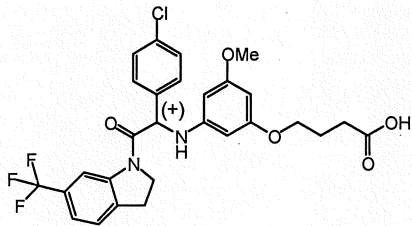
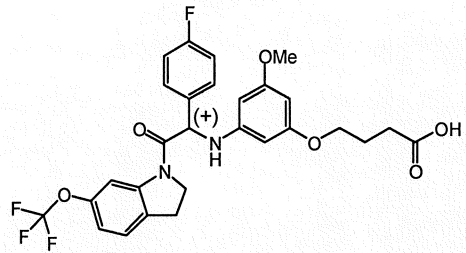
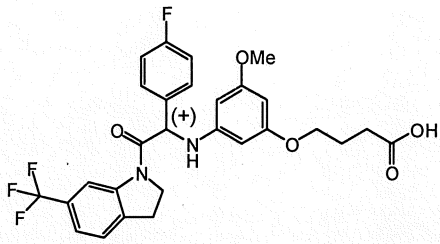
7. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 hoặc muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó, trong đó hợp chất này là ở dạng không solvat.

8. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc dạng đồng phân lập thể của nó, muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

9. Dược phẩm theo điểm 8, trong đó dược phẩm này còn chứa chất điều trị bổ sung.

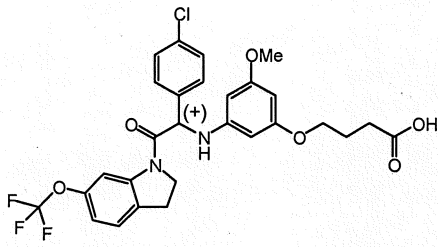
10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó chất điều trị bổ sung được chọn từ chất kháng virus hoặc vacxin dengue, hoặc cả hai thành phần này.

11. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 5-7, trong đó hợp chất này là



hoặc muối được dùng, solvat hoặc dạng đa hình của nó.

12. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-2 và 5-7, trong đó hợp chất này là



hoặc muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó.

13. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 11 hoặc 12, muối được dụng, solvat hoặc dạng đa hình của nó cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó dược phẩm này còn chứa chất điều trị bổ sung.

15. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó chất điều trị bổ sung được chọn từ chất kháng virus hoặc vaccin dengue, hoặc cả hai thành phần này.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Janssen Pharmaceuticals, Inc
Katholieke Universiteit Leuven

<120> HỢP CHẤT INDOLIN ĐƯỢC THỂ DÙNG LÀM CHẤT ỨC CHẾ SỰ SAO CHÉP CỦA
VIRUT DENGUE VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

<130> TIP 359 PCT

<150> EP16163488.6

<151> 2016-04-01

<160> 6

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Virut Dengue

<220>

<221> nguồn

<222> 1..19

<223> /sinh vật="Virut Dengue"

/kiểu phân tử="ADN chưa được quy định"

<400> 1

cggttagagg agaccctc

19

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Virut Dengue

<220>

<221> nguồn

<222> 1..21

<223> /sinh vật="Virut Dengue"

/kiểu phân tử="ADN chưa được quy định"

<400> 2

gagacagcag gatctctggt c

21

<210> 3
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Virut Dengue

<220>
 <221> nguồn
 <222> 1..28
 <223> /sinh vật="Virut Dengue"
 /kiểu phân tử="ADN chưa được quy định"
 <400> 3
 aaggactaga ggtagagga gaccccc

28

<210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Virut Dengue

<220>
 <221> nguồn
 <222> 1..18
 <223> /sinh vật="Virut Dengue"
 /kiểu phân tử="ADN chưa được quy định"
 <400> 4
 ggccaggtca tcaccatt

18

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virut Dengue

<220>
 <221> nguồn
 <222> 1..21
 <223> /sinh vật="Virut Dengue"
 /kiểu phân tử="ADN chưa được quy định"
 <400> 5
 atgtccacgt cacacttcac g

21

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Virut Dengue

<220>

<221> nguồn

<222> 1..21

<223> /sinh vật="Virut Dengue"

/kiểu phân tử="ADN chưa được quy định"

<400> 6

ttccgctgcc ctgaggctct c

21