



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

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

(11)



1-0031855

(51)⁷ C07D 405/06; A61K 31/4045; A61P
35/00

(13) B

(21) 1-2019-00109

(22) 31/05/2017

(86) PCT/US2017/035097 31/05/2017

(87) WO2017/213919 14/12/2017

(30) 62/348,457 10/06/2016 US

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/03/2019 372A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) BASTIAN, Jolie Anne (US); CHEN, Jiehao (US); COHEN, Jeffrey Daniel (US);
HENRY, James Robert (US); MCMILLEN, William Thomas (US); REAMAN,
Bradley Earl (US); RUBIO, Almudena (US); SALL, Daniel Jon (US); ZHAO,
Gaiying (CN).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT 2,3-DIHYDRO-1H-INDOL VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT
NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất 2,3-dihydro-1H-indol nhất định và dược phẩm chứa hợp chất này. Hợp chất này là hữu dụng để điều trị các bệnh ung thư, cụ thể hơn là để điều trị bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm u hắc sắc tố, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, caxinom vôi trứng, caxinom màng bụng nguyên phát, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, u thần kinh đệm, u lympho phi Hodgkin, và u lympho Hodgkin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất 2,3-dihydro-1H-indol mà ức chế sự chuyển hóa tryptophan thành kynurenin, một số hợp chất nhất định trong số các hợp chất này đã được xác nhận là gắn kết với indolamin 2,3-dioxygenaza (IDO1). Sáng chế còn đề cập đến các dược phẩm chứa các hợp chất này. Các hợp chất này là hữu dụng để điều trị các rối loạn sinh lý, cụ thể hơn là để điều trị bệnh ung thư như u hắc sắc tố; bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom tế bào thận, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, caxinom vôi trứng, caxinom màng bụng nguyên phát, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, u thần kinh đệm, u lympho phi Hodgkin, và u lympho Hodgkin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tryptophan là axit amin thiết yếu cần thiết cho quy trình sinh tổng hợp protein, sự phát triển tế bào, sự sản sinh các chất chuyển hóa có hoạt tính hoạt động thần kinh như serotonin (5-hydroxytryptamin), melatonin, và co-enzym nicotinamid adenin dinucleotit (NAD). Tryptophan được chuyển hóa bằng indolamin 2,3-dioxygenaza (IDO1), là enzym phụ thuộc heme mà xúc tác bước hạn chế tốc độ và đầu tiên trong quy trình chuyển hóa tryptophan thành N-formyl-kynurenin, chất này sau đó được deformyl hóa để tạo ra kynurenin. Trong quá trình nhiễm, sự biểu hiện của IDO1 được cảm ứng bởi interferon gamma để làm suy giảm một cách cục bộ tryptophan, là chất ức chế sự phát triển của các tác nhân gây bệnh nội bào phụ thuộc tryptophan như *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, và các virus. Ngoài ra, IDO1 còn đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn ngừa sự tổn hại do oxy hóa ở các tế bào, ngăn ngừa một số bệnh lý thần kinh, điều hòa hệ miễn dịch, và ngăn ngừa bệnh ung thư. Mặc dù hoạt tính IDO1 là yếu tố mấu chốt của đáp ứng miễn dịch đối với các tác nhân gây bệnh, nhưng hoạt tính kéo dài lại dẫn đến sự suy giảm tryptophan ngoại bào đồng thời làm sản sinh kynurenin, cả hai điều này đều làm ức chế miễn dịch. Sự biểu hiện IDO1 ở bệnh ung thư đã được ghi nhận rõ ràng và xảy ra trong cả trường hợp hoạt hóa nội tại sự biểu hiện gen IDO1 và/hoặc trong trường hợp hoạt hóa trực IFN- γ -đến-

IDO1, là kết quả của sự hoạt hóa tế bào miễn dịch. Ngoài ra, các tế bào miễn dịch bẩm sinh như các tế bào tua, các bạch cầu đơn nhân và các đại thực bào, mà được tuyển mộ đến các vị trí viêm và vi môi trường khối u, là ức chế miễn dịch khi chúng biểu hiện IDO1. Việc làm suy giảm tryptophan phụ thuộc IDO1 cùng với việc sản sinh kynurenin đã được cho là có liên quan đến việc ức chế sự hoạt hóa và sự tăng sinh tế bào T và ức chế chức năng tế bào NK. Hơn nữa, việc làm suy giảm tryptophan và việc sản xuất kynurenin còn là yếu tố mấu chốt đối với sự tạo thành các tế bào T điều hòa (regulatory T cells - Treg) và các tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy (myeloid-derived suppressor cells - MDSCs), các tế bào này có tác dụng làm giảm sự hoạt hóa tế bào miễn dịch. Các cơ chế ức chế miễn dịch phụ thuộc IDO1 này là các yếu tố cho phép khối u tránh được hệ miễn dịch.

Các chất ức chế sản sinh kynurenin tiềm năng thông qua sự ức chế IDO1 đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, WO2010005958, WO2012142237 và WO2014150646 và Journal of Medicinal Chemistry (2016), 59(1), 419-430. Các hợp chất 2,3-dihydro-1H-indol nhất định đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, các số đăng ký CAS 1359420-19-1, 1358912-57-8, 1358648-68-6, 1357815-05-4, 1359035-89-4, và 1359002-77-9.

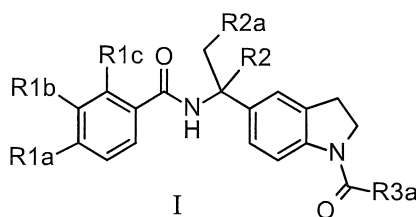
Có nhu cầu về các chất điều trị ung thư mới. Cụ thể là, cần có phương pháp điều trị bệnh ung thư mới đối với bệnh u hắc sắc tố; bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom tế bào thận, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, caxinom vôi trứng, caxinom màng bụng nguyên phát, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, u thần kinh đệm, u lympho phi Hodgkin, và u lympho Hodgkin. Cũng cần cung cấp các chất ức chế sản sinh kynurenin khác hữu dụng trong điều trị bệnh ung thư. Tốt hơn nếu các hợp chất như vậy có các đặc tính để có thể định liều tối ưu cần thiết để ức chế tối đa sự phát triển của các tế bào khối u trong khi có độ dung nạp chấp nhận được đối với bệnh nhân. Tốt hơn nếu các hợp chất như vậy cũng có tính sinh khả dụng khi dùng qua đường miệng. Tốt hơn nếu các hợp chất như vậy còn có khả năng vượt qua hàng rào máu não và do đó tiếp xúc được với não. Tốt hơn nếu các hợp chất như vậy còn có khả

năng khắc phục được một cách tiềm năng tính kháng lại các chất ức chế kynurenin hiện có bằng cách có cơ chế tác dụng khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các hợp chất 2,3-dihydro-1H-indol nhất định mà là các chất ức chế sự sản sinh kynurenin. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng các chất ức chế sự sản sinh kynurenin có thể có tính hữu dụng trên lâm sàng dưới dạng tác nhân đơn lẻ hoặc dưới dạng kết hợp với các tác nhân chống ung thư khác để điều trị các loại bệnh ung thư khác nhau và cụ thể là u hắc sắc tố; bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom tế bào thận, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, caxinom vôi trứng, caxinom màng bụng nguyên phát, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, u thần kinh đệm, u lympho phi Hodgkin, và u lympho Hodgkin.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức:



trong đó:

R1a là hydro, metyl, etenyl, xyano, flo, clo, flometyl, hoặc diflometyl;

R1b là hydro, flo, hoặc clo;

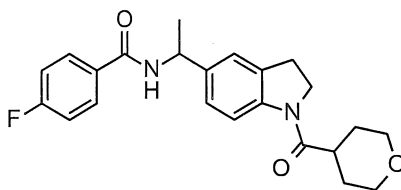
R1c là hydro, hydroxy, flo, benzyloxy, hoặc hydroxyetylamino;

R2 là hydro hoặc metyl;

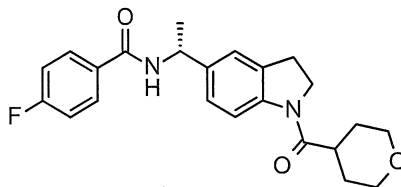
R2a là hydro hoặc metyl; và

R3a là tetrahydropyranyl.

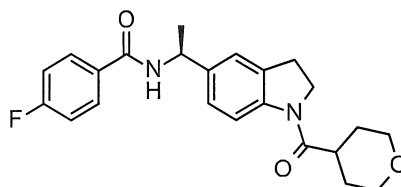
Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức:



Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức:

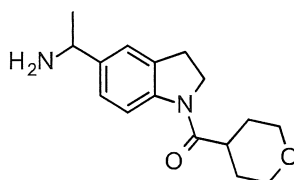


Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức:



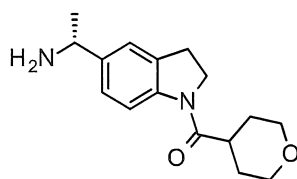
Sáng chế còn đề xuất hợp chất mà là 4-flo-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]ethyl)benzamidit. Tốt hơn là hợp chất này là 4-flo-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]ethyl)benzamidit dưới dạng tinh thể. Tốt hơn là, hợp chất này là 4-flo-N-((1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]ethyl)benzamidit dạng tinh thể được đặc trưng bằng nhiễu xạ đồ bột tia X (nguồn bức xạ Cu, λ -1,54060 Å) chứa ít nhất một đỉnh ở 17,38° kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm bao gồm 12,51°, 15,65°, 16,37°, 17,56°, 21,48° và 25,23° ($2\theta \pm 0,2^\circ$).

Sáng chế còn đề xuất chất trung gian hoặc muối của nó có công thức:



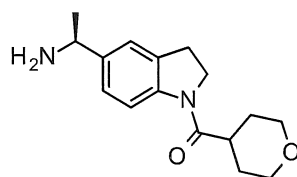
hữu dụng trong phương pháp tạo ra các hợp chất nhất định theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất chất trung gian hoặc muối của nó có công thức:



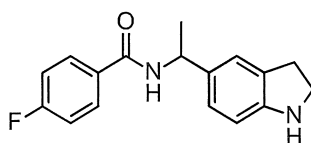
hữu dụng trong phương pháp tạo ra các hợp chất nhất định theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất chất trung gian hoặc muối của nó có công thức:



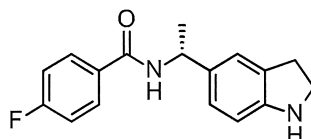
hữu dụng trong phương pháp tạo ra các hợp chất nhất định theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất chất trung gian có công thức:



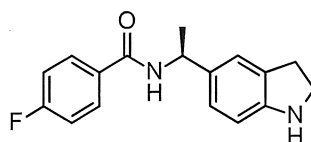
hữu dụng trong phương pháp tạo ra các hợp chất nhất định theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất chất trung gian có công thức:



hữu dụng trong phương pháp tạo ra các hợp chất nhất định theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất chất trung gian có công thức:



hữu dụng trong phương pháp tạo ra các hợp chất nhất định theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế cùng với tá dược, chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng. Tốt hơn là hợp chất này là 4-flo-N- $\{(1R)-1-[1-(\text{tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl})-2,3\text{-dihydro-1H-indol-5-yl]ethyl}\}$ benzamid.

Phần mô tả sáng chế bộc lộ phương pháp điều trị bệnh nhân bị bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm u hắc sắc tố; bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom tế bào thận, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, caxinom vôi trứng, caxinom màng bụng nguyên phát, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, u thần kinh đệm, u lympho phi Hodgkin, và u lympho Hodgkin, bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế. Tốt hơn là, bệnh ung thư này là u hắc sắc tố. Tốt hơn là, bệnh ung thư là ung thư đại trực tràng. Tốt hơn là, bệnh ung thư là caxinom tế bào thận. Tốt hơn là, bệnh ung thư là ung thư vú. Tốt hơn là, bệnh ung thư là ung thư phổi, cụ thể là ung thư phổi tế bào không nhỏ. Tốt hơn là, bệnh ung thư là ung thư buồng trứng. Tốt hơn là, bệnh ung thư là u thần kinh đệm. Tốt hơn là hợp chất này là 4-flo-N- $\{(1R)-1-[1-(\text{tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl})-2,3\text{-dihydro-1H-indol-5-yl]ethyl}\}$ benzamid.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng trong liệu pháp điều trị. Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm u hắc sắc tố; bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom tế bào thận, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, caxinom vôi trứng, caxinom màng bụng nguyên phát, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, u thần kinh đệm, u lympho phi Hodgkin, và u lympho Hodgkin. Tốt hơn là, bệnh ung thư này là u hắc sắc tố. Tốt hơn là, bệnh ung thư là ung thư đại trực tràng. Tốt hơn là, bệnh ung thư là caxinom tế bào thận, tốt hơn là, bệnh ung thư là ung thư vú. Tốt hơn là, bệnh ung thư là ung thư phổi, cụ thể là ung thư phổi tế bào không nhỏ. Tốt hơn là, bệnh ung thư là ung thư buồng trứng. Tốt hơn là, bệnh ung thư là u thần kinh đệm. Tốt hơn là hợp chất này là 4-flo-N- $\{(1R)-1-[1-(\text{tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl})-2,3\text{-dihydro-1H-}$

indol-5-yl]etyl}benzamid. Tốt hơn là hợp chất này là 4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid.

Sáng chế này còn đề xuất chế phẩm kết hợp chứa hợp chất theo sáng chế và LY3300054 để dùng đồng thời, riêng rẽ, hoặc lần lượt trong điều trị bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư phổi tế bào không nhỏ và ung thư ruột kết. Tốt hơn là, bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ. Tốt hơn là, bệnh ung thư là bệnh ung thư ruột kết. Tốt hơn là hợp chất này là 4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid. Tốt hơn là, hợp chất này là 4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid và bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ. Tốt hơn là hợp chất này là 4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid và bệnh ung thư là bệnh ung thư ruột kết.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các đoạn dưới đây mô tả các nhóm được ưu tiên của công thức I:

a) R1a là hydro, metyl, xyano, flo, hoặc clo;

b) R1b là hydro, flo, hoặc clo;

c) R1c là hydro hoặc hydroxy;

d) R2 là hydro hoặc metyl;

e) R2a là hydro hoặc metyl;

f) R3a là tetrahydropyranyl; và

g) R1a là flo, R1b là hydro, R1c là hydro, R2 là hydro, R2a là hydro, và R3 là tetrahydropyranyl.

Các hợp chất nhất định theo sáng chế là ở dạng tinh thể. Đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì cường độ tương đối của các đỉnh nhiễu xạ có thể thay đổi do sự định hướng được ưu tiên xuất phát từ các yếu tố như hình thái tinh thể hoặc dạng tinh thể. Khi xuất hiện tác động của sự định hướng được ưu tiên, thì cường độ đỉnh bị thay đổi, nhưng các vị trí đỉnh đặc trưng của dạng đa hình là không thay đổi. Xem, ví dụ, The U. S. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35 Chapter <941> Characterization of crystalline and partially

crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official May 1, 2015. Ngoài ra, cũng đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì các vị trí đỉnh ở góc có thể thay đổi một chút. Ví dụ, các vị trí đỉnh có thể bị dịch chuyển do sự thay đổi nhiệt độ hoặc độ ẩm mà tại đó mẫu được phân tích, sự dịch chuyển mẫu hoặc sự có mặt hay không có mặt của chất nội chuẩn. Trong trường hợp này, sự thay đổi vị trí đỉnh $\pm 0,2$ về góc 2θ sẽ tính đến các thay đổi tiềm ẩn này mà không gây cản trở cho sự nhận diện chắc chắn dạng tinh thể chỉ định. Việc khẳng định dạng tinh thể có thể được thực hiện dựa vào tổ hợp duy nhất bất kỳ gồm các đỉnh khác biệt (theo đơn vị $^{\circ}2\theta$), điển hình là các đỉnh nổi bật hơn. Các nhiễu xạ đồ dạng tinh thể, mà được thu thập ở nhiệt độ và độ ẩm tương đối của môi trường, được điều chỉnh theo các đỉnh tiêu chuẩn NIST 675 tại góc 2θ là 8,85 và 26,77 độ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “điều trị”, “việc điều trị” hoặc “phép điều trị” được dùng để chỉ việc hạn chế, làm chậm, làm ngừng, hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn đã mắc.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “bệnh nhân” chỉ động vật máu nóng như động vật có vú, cụ thể là người, mà bị mắc bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng các hợp chất và các chất trung gian nhất định theo sáng chế có thể tồn tại ở các dạng tautome. Trong bản mô tả này, nếu một trong số các tautome cụ thể của các hợp chất theo sáng chế được viện dẫn thì cần hiểu rằng nó bao gồm cả hai dạng tautome và tất cả các hỗn hợp của chúng.

Một số hợp chất trung gian hoặc hợp chất theo sáng chế được bộc lộ đây có thể có một hoặc nhiều tâm bất đối hoặc tâm lập thể. Tất cả các chất đồng phân lập thể, chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân không đối quang riêng rẽ, cũng như các hỗn hợp của các chất đồng phân đối ảnh và các chất đồng phân không đối quang của tất cả các hợp chất hoặc các chất trung gian nêu trên theo sáng chế đều được dự tính là gồm cả các raxemat. Tốt hơn là, các hợp chất hoặc các chất trung gian theo sáng chế được bộc lộ ở đây chứa ít nhất một tâm không đối xứng tồn tại ở dạng các chất đồng phân đối ảnh hoặc các chất đồng phân không đối quang riêng lẻ. Chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang có thể được điều chế bắt đầu bằng

các chất phản ứng bất đối xứng hoặc bằng các kỹ thuật tổng hợp lập thể chọn lọc hoặc lập thể đặc thù (như được minh họa trong phần điều chế và các ví dụ). Theo cách khác, chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang đơn có thể được tách từ các hỗn hợp bằng kỹ thuật sắc ký bất đối chuẩn (như được minh họa trong phần điều chế và các ví dụ) hoặc kỹ thuật kết tinh. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng trong một số tình huống, thứ tự rửa giải của các chất đồng phân đối ảnh hoặc các chất đồng phân không đối quang có thể khác nhau do các cột sắc ký và pha động khác nhau.

Biểu thị “chất đồng phân 1” trong tên gọi của hợp chất thể hiện rằng chất trung gian hoặc hợp chất tương ứng theo sáng chế là đồng phân đối ảnh thứ nhất trong số hai đồng phân đối ảnh rửa giải khi hỗn hợp của cặp các đồng phân đối ảnh được phân tách bằng sắc ký bất đối. Biểu thị “chất đồng phân 2” trong tên gọi của hợp chất thể hiện rằng chất trung gian hoặc hợp chất tương ứng theo sáng chế là đồng phân đối ảnh thứ hai trong số hai đồng phân đối ảnh rửa giải khi hỗn hợp của cặp các đồng phân đối ảnh được phân tách bằng sắc ký bất đối.

Biểu thị “chất đồng phân A” trong tên gọi của hợp chất thể hiện rằng chất trung gian hoặc hợp chất tương ứng theo sáng chế là đồng phân đơn lẻ của cấu hình tuyệt đối chưa biết từ quy trình tổng hợp bất đối.

Như được sử dụng ở đây, “LY3300054” là kháng thể mà gắn kết với PD-L1 của người (SEQ ID NO: 1), chứa chuỗi nhẹ (light chain - LC) và chuỗi nặng (heavy chain - HC), trong đó chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (light chain variable region - LCVR) và chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (heavy chain variable region - HCVR), trong đó LCVR chứa các vùng quyết định bổ cứu của chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó trình tự axit amin của LCDR1 là SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 5), trình tự axit amin của LCDR2 là YGNSNRPS (SEQ ID NO: 6), và trình tự axit amin của LCDR3 là QSYDSSLGSV (SEQ ID NO: 7), và trong đó HCVR chứa các vùng xác định bổ cứu của chuỗi nặng HCDR1, HCDR2, và HCDR3, trong đó trình tự axit amin của HCDR1 là KASGGTFSSYAIS (SEQ ID NO: 2), trình tự axit amin của HCDR2 là GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 3), và trình tự axit amin của HCDR3 là ARSPDYSPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 4).

Theo một số phương án của LY3300054, LY3300054 gắn kết với PD-L1 của người, và chứa chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) và chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR), trong đó trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO: 9, và trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án của LY3300054, LY3300054 gắn kết với PD-L1 của người, chứa chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó trình tự axit amin của LC là SEQ ID NO: 10 và HC có trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 11. Theo một phương án của LY3300054, LY3300054, chứa hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, trong đó mỗi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 11, và mỗi chuỗi nặng có trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 10.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng biến đổi của chuỗi nhẹ” hoặc “LCVR” dùng để chỉ một phần của chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể mà chứa các trình tự axit amin của các CDR và FR.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng biến đổi của chuỗi nặng” hoặc “HCVR” dùng để chỉ một phần của chuỗi nặng của phân tử kháng thể mà chứa các trình tự axit amin của các CDR và FR.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “vùng quyết định bổ cứu” và “CDR”, dùng để chỉ các vị trí kết hợp kháng nguyên không liên kề nhau được phát hiện ở trong vùng biến đổi của các polypeptit LC và HC của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Các vùng cụ thể này đã được mô tả bởi các tác giả khác bao gồm Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); MacCallum, et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); và North, et al., J. Mol. Biol., 406, 228-256 (2011), trong đó các định nghĩa bao gồm cả sự chồng lấn hoặc các tập hợp con của các gốc axit amin khi được so sánh với nhau.

Các vùng CDR nằm xen kẽ với các vùng mà được bảo tồn hơn, được gọi là các vùng khung (framework region - “FR”). Mỗi một LCVR và HCVR chứa ba

CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng cacboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Ba CDR của chuỗi nhẹ được gọi là “LCDR1, LCDR2, và LCDR3” và ba CDR của chuỗi nặng được gọi là “HCDR1, HCDR2, và HCDR3”. Các CDR chứa hầu hết các gốc mà tạo ra các tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Việc đánh số và định vị các gốc axit amin của CDR bên trong các vùng LCVR và HCVR là phù hợp theo các quy ước đã biết (ví dụ, Kabat (1991), Chothia (1987), và/hoặc North (2011)). Theo các phương án khác của sáng chế, các FR của LY3300054 có thể giống với các trình tự dòng mầm của người hoặc có thể được biến đổi theo cách tự nhiên hoặc nhân tạo.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ K_D ” có nghĩa là hằng số phân ly cân bằng của tương tác kháng thể-kháng nguyên hoặc mảnh kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

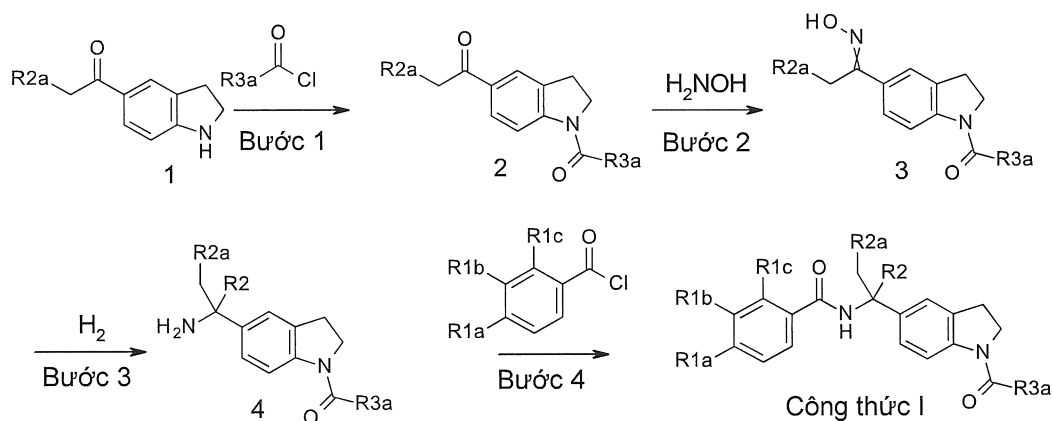
Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “gắn kết” có nghĩa là ái lực của kháng thể đối với PD-L1 của người được dự tính là để chỉ, trừ khi có quy định khác, K_D nhỏ hơn khoảng 1×10^{-6} M, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 1×10^{-9} M như được xác định bằng các phương pháp chung đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm bằng cách sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR) ở 37°C chủ yếu như được mô tả ở đây.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ sau có ý nghĩa được chỉ ra dưới đây: “ACN” được dùng để chỉ axetonitril; “APCI” được dùng để chỉ sự ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển (atmospheric pressure chemical ionization); “BTI” được dùng để chỉ [bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzen; “CDI” được dùng để chỉ carbonyldiimidazol; “DCM” được dùng để chỉ diclometan; “DMSO” được dùng để chỉ dimethyl sulfoxit; “DMF” được dùng để chỉ N,N-dimethylformamit; “DPBS” được dùng để chỉ dung dịch nước muối đệm phosphat Dulbecco; “ES” được dùng để chỉ sự ion hóa phun điện tử (electrospray ionization); “EtOAc” được dùng để chỉ etyl axetat; “EtOH” được dùng để chỉ etanol; “FBS” được dùng để chỉ huyết thanh thai bò; “HPLC” được dùng để chỉ sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography); “iPrOH” được dùng để chỉ isopropanol; “LC/MS-MS” được dùng để chỉ sắc ký lỏng kết hợp phổ khối; “L-kynurenin-d4” được dùng để chỉ axit (2S)-2-amino-4-(2-amino-3,4,5,6-tetrađoteri-phenyl)-4-oxo-butanoic; “MES” được dùng để

chỉ axit 2-(N-morpholino)etansulfonic; “MS” được dùng để chỉ phổ khối; “MeOH” được dùng để chỉ metanol; “PBS” được dùng để chỉ dung dịch nước muối đậm phosphat; “TFA” được dùng để chỉ axit trifloaxetic; “TEA” được dùng để chỉ triethylamin; “THF” được dùng để chỉ tetrahydrofuran; “SFC” được dùng để chỉ sắc ký lỏng siêu tới hạn (supercritical fluid chromatography); và “UVW” được dùng để chỉ bước sóng tử ngoại.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế theo các sơ đồ các quy trình điều chế và các ví dụ dưới đây bằng các phương pháp đã được biết và hiểu rõ trong lĩnh vực này. Các điều kiện phản ứng thích hợp cho các bước của các quy trình điều chế và các ví dụ này là đã được biết rõ trong lĩnh vực và các thay thế thích hợp của dung môi và các chất đồng phản ứng là nằm trong phạm vi hiểu biết của chuyên gia trong lĩnh vực này. Tương tự, chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng các chất tổng hợp trung gian có thể được phân tách và/hoặc tinh chế bằng các kỹ thuật khác nhau đã được biết rõ nếu cần hoặc nếu muốn, và rằng thông thường, có thể sử dụng các chất trung gian khác nhau một cách trực tiếp trong các bước tổng hợp tiếp theo với việc tinh chế thêm một chút hoặc không tinh chế. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng trong một số trường hợp, thứ tự của các gốc được đưa vào là không quan trọng. Thứ tự cụ thể của các bước cần thiết để điều chế hợp chất theo sáng chế là phụ thuộc vào hợp chất cụ thể được tổng hợp, hợp chất ban đầu, và sự chịu trách nhiệm tương đối của các gốc được thế, là như được hiểu rõ bởi nhà hóa học có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Tất cả các nhóm thế, trừ khi có quy định khác, như đã được xác định, và tất cả các chất phản ứng là đã được biết rõ và được hiểu trong lĩnh vực này.

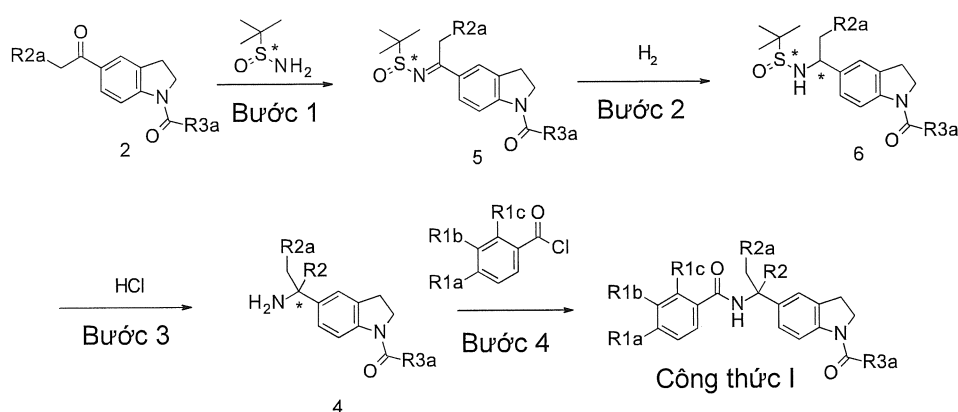
Các hợp chất theo sáng chế có thể được tổng hợp như được minh họa trong các sơ đồ sau đây, trong đó R1a, R1b, R1c, R2, R2a và R3a là như được xác định trên đây.



Sơ đồ 1: Tổng hợp các hợp chất có công thức I

Sơ đồ 1 minh họa quy trình tổng hợp chung các hợp chất có công thức I, R2 là H. Trong Bước 1, 2,3-dihydro-1H-indol (Hợp chất 1) được phản ứng với axit carboxylic được hoạt hóa thích hợp như clorua axit với sự có mặt của bazơ thích hợp như TEA và trong dung môi thích hợp như DCM hoặc dicloetan (DCE) ở nhiệt độ thích hợp như từ 0°C đến nhiệt độ hồi lưu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng có nhiều axit carboxylic được hoạt hóa và nhiều phương pháp để hoạt hóa axit carboxylic tại chỗ để hoàn thành phản ứng trong Bước 1. Keton thu được (Hợp chất 2) trong Bước 1 sau đó được xử lý với hydroxylamin trong dung môi proton phân cực như EtOH ở nhiệt độ thích hợp như từ nhiệt độ trong phòng đến nhiệt độ hồi lưu để thu được oxim dưới dạng hỗn hợp của các chất đồng phân E và Z (Hợp chất 3). Bước 3 thể hiện sự khử oxim (Hợp chất 3) thành amin (Hợp chất 4). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng có nhiều phương pháp sẵn có để thực hiện sự biến đổi này. Ví dụ, oxim (Hợp chất 3) được tiếp xúc với chất xúc tác thích hợp như niken RANEY® trong dung môi thích hợp như MeOH hoặc EtOH trong thiết bị phản ứng thích hợp như máy lắc PARR®. Sau đó hỗn hợp được đưa vào áp suất hydro như 100-500 kPa ở nhiệt độ thích hợp như từ nhiệt độ trong phòng đến 50°C trong thời gian thích hợp như từ 1 đến 24 giờ. Sơ đồ 1, Bước 4 mô tả sự kết hợp amit của amin (Hợp chất 4) với axit carboxylic được hoạt hóa thích hợp như clorua axit với sự có mặt của bazơ thích hợp như TEA và trong dung môi thích hợp như DCM hoặc DCE ở nhiệt độ thích hợp như từ 0°C đến nhiệt độ hồi lưu để tạo ra hợp chất có công thức I. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng có nhiều axit carboxylic được hoạt hóa và nhiều phương pháp để hoạt hóa axit carboxylic tại chỗ để hoàn thành phản ứng trong Bước 4. Người có hiểu biết trung

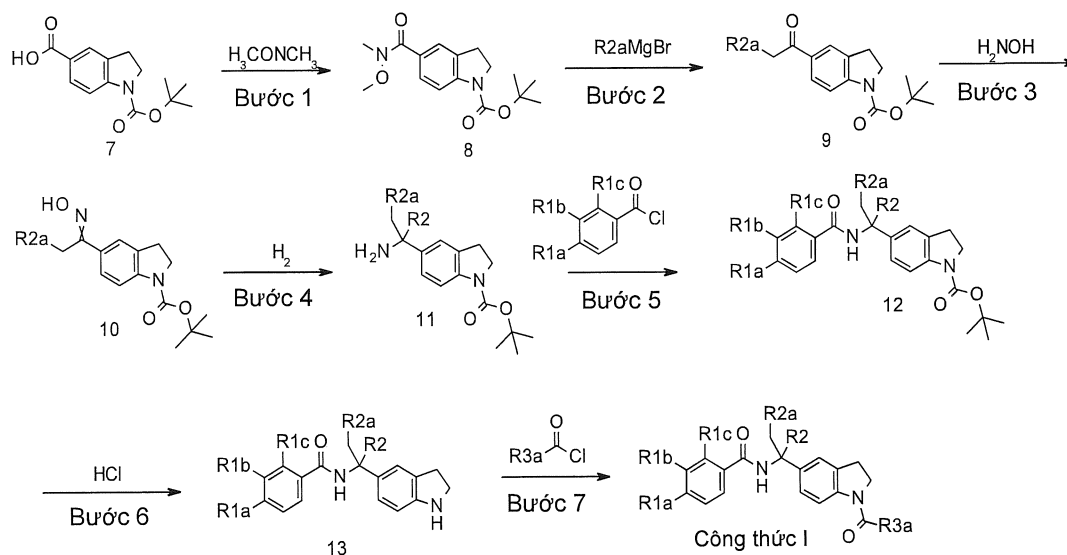
bình trong lĩnh vực này cũng sẽ hiểu rõ rằng Sơ đồ 1, Bước 3 và Bước 4 dẫn đến các sản phẩm với các tâm bất đối. Các chất đồng phân riêng rẽ có thể được tách riêng hoặc được phân giải bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này ở thời điểm thuận tiện bất kỳ trong quy trình tổng hợp các hợp chất theo sáng chế bằng các phương pháp như kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký bất đối xứng (xem, ví dụ, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, và E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994).



Sơ đồ 2: Tổng hợp các hợp chất có công thức I

Sơ đồ 2 minh họa quy trình tổng hợp chung khác đối với các hợp chất có công thức I, R2 là H. Trong Bước 1, keton (Hợp chất 2) được phản ứng với sulfinamit bất đối thích hợp với sự có mặt của axit Lewis thích hợp như titan(IV) etoxit trong dung môi thích hợp như THF ở nhiệt độ thích hợp như từ nhiệt độ trong phòng đến nhiệt độ hồi lưu trong thời gian thích hợp như từ 1 đến 24 giờ để tạo ra etylidensulfinamit bất đối xứng (Hợp chất 5). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng các chất phản ứng là có sẵn để tạo ra chất đồng phân đối ảnh của sulfinamit (Hợp chất 5). Sự khử bất đối xứng được mô tả trong Bước 2 để tạo ra etylsulfinamit (Hợp chất 6) từ etylidensulfinamit (Hợp chất 5) và các dấu hoa thị được sử dụng để thể hiện các tâm bất đối cho rõ ràng. Ví dụ, chất xúc tác thích hợp được tạo ra trước bằng cách trộn chất phản ứng rutheni thích hợp như dime diclo(p-cymen)rutheni(II) với aminoetanol thích hợp như 2-amino-2-metyl-1-propanol trong dung môi thích hợp như iPrOH với sự có mặt của chất loại nước như rây phân tử 4Å ở nhiệt độ thích

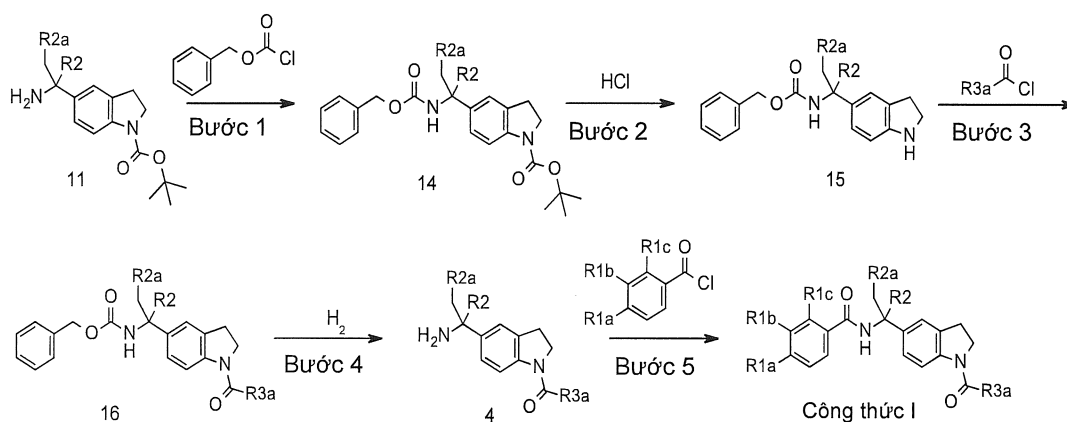
hợp như từ nhiệt độ trong phòng đến nhiệt độ hồi lưu trong thời gian thích hợp như năm phút đến khoảng một giờ. Hỗn hợp phản ứng xúc tác được tạo thành trước này được làm nguội đến nhiệt độ thích hợp như từ nhiệt độ trong phòng đến 50°C và được xử lý bằng etylidensulfonit (Hợp chất 5) và bazơ thích hợp như kali tert-butoxit. Phản ứng được duy trì ở nhiệt độ thích hợp như từ nhiệt độ trong phòng đến 50°C trong thời gian thích hợp như từ một đến 24 giờ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng có nhiều phương pháp xúc tác và hợp thức mà sẽ ảnh hưởng đến sự biến đổi như nhau và các phương pháp này có thể dẫn đến sự làm giàu chất đồng phân không đối quang tùy thuộc vào bản chất của các cơ chất và các chất phản ứng được sử dụng, và bao gồm sự tạo thành chất đồng phân không đối quang đơn. Sự thủy phân axit đối với etylsulfonit (Hợp chất 6) có thể được thực hiện bằng cách xử lý với axit thích hợp như axit clohydric (HCl) trong dung môi thích hợp như dioxan, iPrOH, EtOAc hoặc MeOH ở nhiệt độ thích hợp như từ 0°C đến nhiệt độ trong phòng trong thời gian thích hợp như từ một đến tám giờ để tạo ra amin (Hợp chất 4). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng nhiều phương pháp để phân tách là đã biết và các phương pháp này có thể dẫn đến sự phân tách hoặc muối hoặc bazơ tự do của amin (Hợp chất 4). Bước 4 mô tả sự kết hợp amit của amin (Hợp chất 4) với axit carboxylic được hoạt hóa thích hợp tương tự như Sơ đồ 1, Bước 4 nêu trên để thu được hợp chất có công thức I.



Sơ đồ 3: Tổng hợp các hợp chất có công thức I

Sơ đồ 3 mô tả quy trình tổng hợp chung khác đối với hợp chất có công thức I, R2 là H. Bước 1 mô tả sự kết hợp amit của axit carboxylic (Hợp chất 7) với N,O-dimethylhydroxylamin hydroclorua để tạo ra amit Weinreb (Hợp chất 8). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng có nhiều phương pháp để thực hiện sự biến đổi này. Ví dụ, axit carboxylic (Hợp chất 7) có thể được xử lý với chất phản ứng kết hợp thích hợp như 1-[bis(dimethylamino)metylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridini-3-oxit hexaflophosphat (HATU) với sự có mặt của bazơ thích hợp như N,N-diisopropyletylamin trong dung môi thích hợp như DMF trong thời gian thích hợp như từ năm đến mười phút. Sau đó hỗn hợp được xử lý với N,O-dimethylhydroxylamin hydroclorua và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ thích hợp như từ nhiệt độ trong phòng đến 100°C trong thời gian thích hợp như từ ba đến 18 giờ. Sau đó amit Weinreb thu được (Hợp chất 8) được xử lý với chất phản ứng Grignard, alkyl lithi hoặc alkyl kẽm thích hợp, trong Bước 2, để tạo ra keton (Hợp chất 9). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng có rất nhiều phương pháp sẵn có để thực hiện sự biến đổi này. Ví dụ, amit Weinreb (Hợp chất 8) trong dung môi thích hợp như THF ở nhiệt độ thích hợp như từ 0°C đến -78°C được xử lý bằng chất phản ứng alkyl kim loại thích hợp như etylmagie bromua. Phản ứng được tiếp tục sau khi bổ sung trong thời gian thích hợp như từ một đến 18 giờ để tạo ra keton (Hợp chất 9). Để rõ ràng, các bước 3, 4 và 5 của Sơ đồ 3 được thể hiện. Các phương pháp này là tương tự với các phương pháp lần lượt được thể hiện trong Sơ đồ 1, các bước 2, 3 và 4. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng hợp chất 11 chứa tâm bất đối và sự tinh chế bất đối xứng có thể được thực hiện đối với hợp chất 11 hoặc hỗn hợp triệt quang có thể được xử lý sau đó và việc tách có thể được thực hiện sau bước bất kỳ trong số các bước tiếp theo. Bước 6 mô tả sự khử bảo vệ đối với nhóm bảo vệ tert-butoxycarbonyl của carbamat (Hợp chất 12) để tạo thành amin (Hợp chất 13). Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng sự biến đổi này có thể được thực hiện trong điều kiện axit, bazơ hoặc nhiệt. Ví dụ, carbamat (Hợp chất 12) được tiếp xúc với axit thích hợp như HCl trong dung môi thích hợp như dioxan hoặc DCM hoặc hỗn hợp của chúng ở nhiệt độ thích hợp như từ 0°C đến nhiệt độ hồi lưu trong thời gian thích hợp như từ một đến 18 giờ để tạo ra amin (Hợp chất 13). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng có các phương pháp để tách amin dưới dạng muối hoặc bazơ tự do. Bước 7 mô tả sự kết hợp

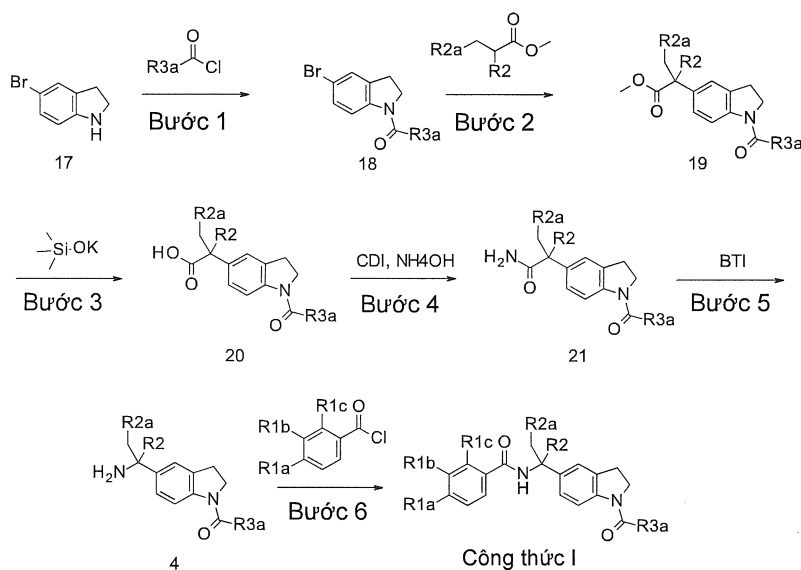
amit của amin (Hợp chất 13) và axit carboxylic được hoạt hóa để tạo ra hợp chất có công thức I. Các điều kiện là tương tự như các điều kiện được thể hiện trong Sơ đồ 1, Bước 1.



Sơ đồ 4: Tổng hợp các hợp chất có công thức I

Sơ đồ 4 mô tả quy trình tổng hợp chung khác đối với hợp chất có công thức I. Bước 1 mô tả sự bảo vệ amin (Hợp chất 11) bằng nhóm bảo vệ benzyl carbamat để tạo ra carbamat (Hợp chất 14). Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng có nhiều nhóm bảo vệ amin có sẵn mà có thể là các nhóm bảo vệ trực giao (orthogonal) đối với nhóm tert-butoxycarbonyl trên Hợp chất 14. Trong quy trình ví dụ, amin (Hợp chất 11) trong dung môi thích hợp như DCM và với sự có mặt của bazơ thích hợp như N,N-diisopropyletylamin được tiếp xúc với benzyloxycarbonyl chloride ở nhiệt độ thích hợp như từ 0°C đến nhiệt độ phòng trong thời gian thích hợp như từ một đến 18 giờ. Nhóm bảo vệ tert-butoxycarbonyl của Hợp chất 14 được khử bảo vệ một cách chọn lọc để tạo ra amin (Hợp chất 15) sử dụng các phương pháp tương tự với các phương pháp được mô tả cho Sơ đồ 3, Bước 6. Sau đó amin thu được (Hợp chất 15) được đem thực hiện phản ứng kết hợp amit với axit carboxylic được hoạt hóa bằng các phương pháp tương tự với các phương pháp trong Sơ đồ 1, Bước 1 để tạo ra amit (Hợp chất 16). Bước 4 mô tả sự khử bảo vệ đối với nhóm bảo vệ benzyloxy carbamat của Hợp chất 16 để tạo ra amin (Hợp chất 4). Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng có sẵn nhiều phương pháp để thực hiện sự biến đổi này. Ví dụ, Hợp chất 16 được đem thực hiện phản ứng hydro hóa có xúc tác với chất xúc tác thích hợp như paladi hydroxit trong dung môi thích hợp như EtOH trong áp suất hydro thích hợp như từ 100 đến 500 kPa trong thời gian thích hợp như từ một đến tám giờ để tạo ra

amin (Hợp chất 4). Cuối cùng, sự biến đổi amin (Hợp chất 4) thành hợp chất có công thức I là như được mô tả trong Sơ đồ 1, Bước 4.



Sơ đồ 5: Tổng hợp các hợp chất có công thức I

Sơ đồ 5 mô tả quy trình tổng hợp chung khác đối với hợp chất có công thức I. Bước 1 mô tả sự kết hợp amit của amin (Hợp chất 17) và axit carboxylic được hoạt hóa để tạo ra amit (Hợp chất 18). Các điều kiện là tương tự với các điều kiện được thể hiện trong Sơ đồ 1, Bước 1. Bước 2 mô tả sự tạo thành alpha aryl este (Hợp chất 19) thông qua phản ứng kết hợp chéo có xúc tác của bromua (Hợp chất 18) với este enolat. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ biết rõ khoảng điều kiện rộng mà có thể thực hiện sự biến đổi này. Ví dụ, dung dịch dialkyl amin thích hợp như dicyclohexylamin trong dung môi thích hợp như toluen được xử lý với bazơ lithi thích hợp như n-butyllithi ở nhiệt độ thích hợp như từ 0°C đến -78°C trong thời gian thích hợp như từ 10 phút đến một giờ. Dung dịch này được xử lý bằng dung dịch của este thích hợp như methyl 2-methylpropanoat trong dung môi thích hợp như toluen và hỗn hợp thu được được khuấy trong thời gian thích hợp như từ 10 phút đến một giờ ở nhiệt độ thích hợp như từ 0°C đến -40°C. Sau đó hỗn hợp thu được được xử lý với chất xúc tác paladi thích hợp như di-μ-bromobis(tri-t-butylphosphin)dipaladi(I) và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ thích hợp như từ 0°C đến nhiệt độ trong phòng trong thời gian thích hợp như từ một đến 18 giờ để thu được alpha aryl este (Hợp chất 19). Este (Hợp chất 19) có thể được thủy phân thành axit (Hợp chất 20) bằng các phương pháp

đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, este (Hợp chất 19) được tiếp xúc với bazơ thích hợp như kali trimethylsilanolat trong dung môi thích hợp như THF ở nhiệt độ thích hợp như từ nhiệt độ trong phòng đến nhiệt độ hồi lưu trong thời gian thích hợp như từ một đến bảy ngày. Bước 4 mô tả sự kết hợp amit của axit carboxylic (Hợp chất 20) với amoniac để tạo ra carboxamit (Hợp chất 21). Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ là có nhiều phương pháp để hoạt hóa axit carboxylic cũng như đưa vào nguồn amoniac. Ví dụ, axit carboxylic (Hợp chất 20) được tiếp xúc với 1,1'-carbonyldiimidazol trong dung môi thích hợp như DCM hoặc DMF hoặc hỗn hợp của chúng ở nhiệt độ thích hợp như từ 0°C đến nhiệt độ hồi lưu trong thời gian thích hợp như từ 30 phút đến tám giờ. Amoni hydroxit được bổ sung vào hỗn hợp và phản ứng được tiếp tục trong một thời gian nữa như từ một đến 18 giờ. Bước 21 mô tả phản ứng chuyển vị Hoffman của carboxamit (Hợp chất 21) với amin (Hợp chất 4). Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ là có nhiều chất phản ứng và điều kiện phản ứng có thể thực hiện sự biến đổi này. Ví dụ, dung dịch carboxamit (Hợp chất 21) trong dung môi thích hợp như hỗn hợp của ACN và nước được xử lý với [bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzen ở nhiệt độ thích hợp như từ nhiệt độ trong phòng đến nhiệt độ hồi lưu trong thời gian thích hợp như từ một đến 18 giờ. Cuối cùng, sự biến đổi amin (Hợp chất 4) thành hợp chất có công thức I được mô tả trong Sơ đồ 1, Bước 4.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Điều chế 1

Tổng hợp 1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etanon

Bổ sung TEA (51,9 mL, 372,2 mmol) và tetrahydropyran-4-carbonyl clorua (22,1 g, 148,9 mmol) vào hỗn hợp chứa 1-indolin-5-yletanon (20,0 g, 124,1 mmol) trong DCM (496 mL). Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM (500 mL) và rửa bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa. Tách lớp hữu cơ và chiết lớp nước hai lần bằng DCM (500 mL). Rửa các lớp hữu cơ gom lại bằng dung dịch natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô dịch lọc để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này một cách định lượng dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ES/MS (m/z): 274,0 (M+H).

Quy trình tách khác:

Xử lý sản phẩm với heptan và cô. Lặp lại quy trình xử lý và cô lần thứ hai. Xử lý với heptan và làm lạnh đến 0 đến 5°C. Thu gom sản phẩm bằng cách lọc và rửa bằng heptan và làm khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này.

Điều chế 2

Tổng hợp [5-(N-hydroxyetanimidoyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon

Bổ sung hydroxylamin (50% khối lượng trong nước, 22,8 mL, 372 mmol) vào hỗn hợp chứa 1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etanon (Điều chế 1) (33,9 g, 124,0 mmol) trong EtOH (1240 mL). Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày. Cô hỗn hợp phản ứng để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng hỗn hợp chứa các chất đồng phân E/Z một cách định lượng. ES/MS (m/z): 289,0 (M+H).

Điều chế 3

Tổng hợp hợp chất triệt quang [5-(1-aminoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon

Bổ sung niken RANEY® (huyền phù đặc trong EtOH, 60 g) vào bình lắc PARR® dung tích 2250 mL làm sạch bằng nitơ. Bổ sung dung dịch amoniac 2M trong MeOH (700 mL) và sau đó dung dịch [5-(N-hydroxyetanimidoyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon (Điều chế 2) (35,8 g, 124,0 mmol) trong dung dịch amoniac 2M trong MeOH (700 mL). Làm nguội hỗn hợp có tiềm năng tỏa nhiệt đến nhiệt độ trong phòng nếu cần, bịt kín, làm sạch bằng nitơ và sau đó là hydro. Khuấy trong hydro (60 psi, hoặc 414 kPa) trong bốn giờ ở nhiệt độ trong phòng. Lọc bỏ chất rắn và cô dịch lọc. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel với 7 đến 26% (dung dịch amoniac 7M trong MeOH) trong EtOAc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (26,5 g, 78%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt. ES/MS (m/z): 275,0 (M+H).

Điều chế 4A và 4B

Tách [5-(1-aminoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon, Chất đồng phân 1 và [5-(1-aminoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon, Chất đồng phân 2

Tinh chế hợp chất triệt quang [5-(1-aminoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon (Điều chế 3) bằng SFC bất đối xứng để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (Chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 275,0 (M+H). Điều kiện tinh chế: CHIRALPAK® AD-H, cột 50 x 150 cm; pha động: 40% EtOH (chứa 0,5% N,N-dimetyletylamin) trong CO₂; Nhiệt độ cột: 40°C; lưu lượng: 300 g/phút; UVW: 260 nm. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 1 bằng SFC phân tích bất đối xứng (>99% ee, R_t: 1,35 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 40% EtOH (chứa 0,5% N,N-dimetyletylamin) trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 260 nm) hoặc bằng HPLC phân tích bất đối xứng (97,4% ee, R_t: 6,48 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 mm x 150 mm; pha động: 100% EtOH (chứa 0,2% isopropylamin); lưu lượng: 1 mL/phút; UVW: 225 nm).

Việc tinh chế nêu trên còn tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (Chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 275,1 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 2 bằng SFC phân tích bất đối xứng (97,2% ee, R_t: 1,85 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 40% EtOH (chứa 0,5% N,N-dimetyletylamin) trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 260 nm) hoặc bằng HPLC phân tích bất đối xứng (97,6% ee, R_t: 5,31 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 mm x 150 mm; pha động: 100% EtOH (chứa 0,2% isopropylamin); lưu lượng: 1 mL/phút; UVW: 225 nm).

Điều chế 5

Tổng hợp (R)-2-metyl-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyliden}propan-2-sulfinamit

Bổ sung titan(IV) etoxit (5,0 g, 21,9 mmol) vào hỗn hợp chứa 1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etanon (Điều chế 1) (3,0 g, 11,0 mmol) và (R)-2-metylpropan-2-sulfinamit (1,6 g, 13,2 mmol) trong THF (43,9 mL).

Hồi lưu hỗn hợp thu được trong 24 giờ. Làm nguội hỗn hợp phản ứng này đến nhiệt độ phòng. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc (100 mL) và dung dịch natri clorua bão hòa (40 mL) và khuấy mạnh trong 15 phút. Tách lớp hữu cơ và chiết lớp nước hai lần bằng EtOAc (100 mL). Rửa các lớp hữu cơ gom lại bằng dung dịch natri clorua bão hòa, làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô dịch lọc. Tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với 10-100% ACN trong DCM để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (3,7 g, 87%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ES/MS (m/z): 377,0 (M+H).

Quy trình tách khác:

Thay vì làm nguội phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, làm nguội hỗn hợp phản ứng đến 10°C và sau đó lọc. Rửa chất rắn bằng toluen và làm khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này.

Điều chế 6

Tổng hợp (R)-2-metyl-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}propan-2-sulfinamit, Chất đồng phân A

Gia nhiệt hỗn hợp chứa diclo(p-cymen)rutheni(II) dime (0,021 g, 0,033 mmol), 2-amino-2-metyl-1-propanol (0,006 g, 0,066 mmol) và rây phân tử (4Å, 0,5 g) trong iPrOH (2 mL) để hồi lưu và sau đó làm nguội xuống 50°C. Bổ sung dung dịch (R)-2-metyl-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyliden}propan-2-sulfinamit (Điều chế 5) (0,5 g, 1,33 mmol) trong iPrOH (8,8 mL) và dung dịch kali tert-butoxit (0,019 g, 0,17 mmol) trong iPrOH (1,6 mL). Gia nhiệt hỗn hợp thu được ở 55°C trong hai giờ. Sau đó gia nhiệt hỗn hợp bổ sung chứa diclo(p-cymen)rutheni(II) dime (0,021 g, 0,033 mmol), 2-amino-2-metyl-1-propanol (0,06 g, 0,66 mmol) và rây phân tử (4Å, 0,5 g) trong iPrOH (2 mL) để hồi lưu, làm nguội xuống 50°C và bổ sung vào hỗn hợp phản ứng trên đây. Bổ sung dung dịch kali tert-butoxit (0,019 g, 0,17 mmol) trong iPrOH (1,6 mL) vào hỗn hợp phản ứng nêu trên. Gia nhiệt hỗn hợp ở 55°C trong 20 phút. Làm nguội phản ứng hợp đến nhiệt độ phòng và khuấy qua đêm. Pha loãng phản ứng bằng DCM (20 mL) và lọc qua đệm điatomit. Rửa đệm này bằng 5% MeOH trong DCM và cô dịch lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này một cách định lượng. ES/MS (m/z): 379,0 (M+H).

Quy trình tách khác:

Thay vì làm nguội phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, làm nguội hỗn hợp phản ứng đến 28 đến 32°C và sau đó lọc qua điatomit. Rửa chất rắn lọc bằng diclometan và cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này.

Điều chế 7A và 7B

Tổng hợp [5-(1-aminoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon, Chất đồng phân 1

Bổ sung axit clohydric (4M trong 1,4-dioxan, 1,66 mL, 6,64 mmol) vào hỗn hợp chứa (R)-2-metyl-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}propan-2-sulfinamit, chất đồng phân A (Điều chế 6) (503 mg, 1,33 mmol) trong MeOH (6,6 mL). Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Cô và tinh chế phần còn lại bằng sắc ký pha đảo (Cột pha đảo Redisep Rf Gold High Performance C18, 0-100% ACN trong dung dịch amoni bicacbonat 10mM). Cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (265 mg, 73%). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh bằng HPLC phân tích bất đối xứng (98,8% ee, R_t : 6,40 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 mm x 150 mm; pha động: 100% EtOH (chứa 0,2% isopropylamin); lưu lượng: 1 mL/phút; UVW: 225 nm). Đã xác nhận là Điều chế 4A, Chất đồng phân 1. ES/MS (m/z): 275,0 (M+H).

Tổng hợp [5-(1-aminoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon hydroclorua, Chất đồng phân 1

Bổ sung từng giọt axit clohydric (5,5M trong iPrOH, 400 mL, 2,20 mol) vào huyền phù đặc ở 5°C chứa (R)-2-metyl-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}propan-2-sulfinamit, chất đồng phân A (162,3 g, 364 mmol) trong EtOAc (1,2 L) cùng với việc khuấy cơ học ở phần trên. Loại bỏ bồn làm nguội sau khi bổ sung 100 mL dung dịch axit. Tiếp tục bổ sung và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng trong ba giờ. Làm lạnh đến 3°C và lọc. Rửa bánh lọc bằng 1 đến 1,5 L EtOAc, cho đến khi các nước rửa là trong. Làm khô các chất rắn thu gom được trong tủ chân không ở 60°C để thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt (96,4 g, 82,5%). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh bằng HPLC phân tích bất đối xứng (98% ee, R_t : 6,45 phút;

Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 mm x 150 mm; pha động: 100% EtOH (chứa 0,2% isopropylamin); lưu lượng: 1 mL/phút; UVW: 225 nm). Đã xác nhận là Điều chế 4A, Chất đồng phân 1. ES/MS (m/z): 275,0 (M+H). Đã xác nhận là Điều chế 4A, Chất đồng phân 1. ES/MS (m/z): 275,1 (M+H).

Điều chế các hợp chất dưới đây về cơ bản tương tự như Điều chế 1.

Điều chế số	Tên hóa học	Dữ liệu vật lý
8	[5-Bromo-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon	ES/MS (m/z, ⁷⁹ Br/ ⁸¹ Br): 310,0/312,0 (M+H)
9	Benzyl {1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propyl}carbamate, Chất đồng phân A	ES/MS (m/z): 423,2 (M+H)

Điều chế 10

Tổng hợp tert-butyl 5-axetyl-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat

Xử lý dung dịch ở 100°C chứa 1-indolin-5-yletanon (1,00g, 6,02 mmol) trong toluen (12 mL) với từng giọt dung dịch di-tert-butyl dicarbonat (1,97 g, 9,03 mmol) trong toluen (12 mL) trong 20 phút. Tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp trong 30 phút. Cô hỗn hợp phản ứng. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel với 15-35% (EtOAc:DCM 1:1) trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (1,52 g, 97%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 262,0 (M+H).

Điều chế 11

Tổng hợp tert-butyl 5-[metoxy(metyl)carbamoyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat

Xử lý dung dịch chứa axit 1-(tert-butoxycarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-carboxylic (14,0 g, 53,2 mmol) trong DMF (200 mL) và N,N-diisopropyletylamin (28,0 mL, 161 mmol) với 1-[bis(dimetylaminometyl)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-3-oxit hexaflorophosphat (23,3 g, 61,1 mmol). Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ phòng trong năm phút. Bổ sung N,O-dimetylhydroxylamin

hydroclorua (7,26 g, 74,4 mmol). Khuấy hỗn hợp thu được qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc và rửa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Tách lớp hữu cơ và chiết lớp nước hai lần bằng EtOAc. Rửa các lớp hữu cơ gom lại hai lần bằng nước, bổ sung dung dịch natri clorua bão hòa để hỗ trợ sự tách pha. Làm khô lớp hữu cơ qua natri sulfat khan, lọc và cô dịch lọc. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel với 10-32% axeton trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu trong, không màu, đặc với lượng định lượng. ES/MS (m/z): 307,0 (M+H).

Điều chế 12

Tổng hợp tert-butyl 5-propanoyl-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat

Làm lạnh dung dịch tert-butyl 5-[metoxy(metyl)carbamoyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat (Điều chế 11) (14,3 g, 46,7 mmol) trong THF (311 mL, khan) đến 0°C. Bổ sung từng giọt etylmagie bromua (3M trong diethylene, 39,0 mL, 117 mmol) trong 25 phút. Sau khi khuấy ở 0°C trong 1,5 giờ, cẩn thận làm nguội hỗn hợp phản ứng bằng dung dịch amoni clorua bão hòa. Chiết ba lần bằng EtOAc. Làm khô các lớp hữu cơ gom lại trên natri sulfat khan, lọc và cô dịch lọc. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel với 15-30% (EtOAc:DCM 1:1) trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (11,7 g, 91%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 276,0 (M+1).

Điều chế các hợp chất dưới đây về cơ bản tương tự như Điều chế 2, ngoại trừ Điều chế 14, trong đó việc gia nhiệt ở 70°C làm tăng tốc độ phản ứng.

Điều chế số	Tên hóa học	Dữ liệu vật lý
13	tert-Butyl 5-(N-hydroxyetanimidoyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat	ES/MS (m/z): 277,0 (M+H)
14	tert-Butyl 5-(N-hydroxypropanimidoyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat	ES/MS (m/z): 291,0 (M+H)

Điều chế các hợp chất dưới đây về cơ bản tương tự như Điều chế 3.

Điều chế số	Tên hóa học	Dữ liệu vật lý
15	Hợp chất triệt quang tert-butyl 5-[1-aminoethyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat	ES/MS (m/z): 246,0 (M-NH ₂) ⁺
16	Hợp chất triệt quang tert-butyl 5-[1-aminopropyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat	ES/MS (m/z): 260,1 (M-NH ₂) ⁺

Điều chế 17A và 17B

Tách tert-butyl 5-[1-aminopropyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat, Chất đồng phân 1 và tert-butyl 5-[1-aminopropyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat, Chất đồng phân 2 (đối với việc tách bất đối xứng)

Tinh chế hợp chất triệt quang tert-butyl 5-[1-aminopropyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat (Điều chế 16) bằng cách sắc ký bất đối xứng để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (Chất đồng phân 1). MS (m/z): 260,0 (M-NH₂)⁺. Điều kiện tinh chế: Cột CHIRALPAK® AD, 8 x 33,5 cm; pha động: 100% MeOH (chứa 0,2% N,N-dimetyletylamin); lưu lượng: 400 mL/phút; UVW: 240 nm. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 1 bằng HPLC phân tích bất đối xứng (> 99% ee, R_t: 9,2 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 100% MeOH (chứa 0,2% N,N-dimetyletylamin); lưu lượng: 0,6 mL/phút; UVW: 280 nm).

Việc tinh chế nêu trên còn tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (Chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 260,0 (M-NH₂)⁺. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 2 bằng HPLC phân tích bất đối xứng (99% ee, R_t: 14,7 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 100% MeOH (chứa 0,2% N,N-dimetyletylamin); lưu lượng: 0,6 mL/phút; UVW: 280 nm).

Điều chế 18

Tổng hợp hợp chất triệt quang tert-butyl 5-{1-[(4-flobenzoyl)amino]etyl}-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat

Xử lý dung dịch hợp chất triệt quang tert-butyl 5-[1-aminoethyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat (Điều chế 15) (3,00 g, 11,4 mmol) trong DCM (57 mL) với

N,N-diisopropyletylamin (4,0 mL, 57,2 mmol). Bổ sung 4-flobenzoyl clorua (1,52 mL, 12,6 mmol) và khuấy qua đêm. Làm nguội hỗn hợp phản ứng bằng nước và bổ sung dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Tách các lớp và chiết hai lần bằng DCM. Làm khô các lớp hữu cơ gom lại trên natri sulfat khan, lọc và cô dịch lọc. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel với 50-75% (10% axeton trong DCM) trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (4,29 g, 98%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ES/MS (m/z): 407,0 (M+Na)⁺, 383,0 (M-H)⁻.

Điều chế hợp chất dưới đây về cơ bản tương tự như Điều chế 18.

Điều chế số	Tên hóa học	Dữ liệu vật lý
19	Hợp chất triệt quang tert-butyl 5-{1-[(4-flobenzoyl)amino]propyl}-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat	ES/MS (m/z): 421,0 (M+Na) ⁺ , 397,2 (M-H) ⁻

Điều chế 20

Tổng hợp tert-butyl 5-[1-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}propyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat, Chất đồng phân A

Xử lý dung dịch tert-butyl 5-[1-aminopropyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat, Chất đồng phân 2 (Điều chế 17B) (3,25 g, 11,8 mmol) trong DCM (47,0 mL) ở nhiệt độ trong phòng với N,N-diisopropyletylamin (4,53 mL, 25,9 mmol). Bổ sung benzyl cloformat (2,12 mL, 14,1 mmol) và khuấy qua đêm. Xử lý hỗn hợp phản ứng bằng N,N-diisopropyletylamin bổ sung (2,06 mL, 11,8 mmol) và benzyl cloformat (0,707 mL, 4,70 mmol). Khuấy trong 30 phút. Làm nguội hỗn hợp phản ứng bằng nước và bổ sung dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Tách các lớp và chiết lớp nước hai lần bằng DCM. Làm khô các lớp hữu cơ gom lại trên natri sulfat khan, lọc và cô dịch lọc. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel rửa giải với gradien 5-35% axeton trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (4,47 g, 93%) dưới dạng bột màu trắng. ES/MS (m/z): 433,2 (M+Na)⁺, 409,0 (M-H)⁻.

Điều chế 21

Tổng hợp hợp chất triệt quang N-[1-(2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)etyl]-4-flobenzamid

Bổ sung axit clohydric 4M trong 1,4-dioxan (27,9 mL, 112 mmol) vào hỗn hợp chứa hợp chất triệt quang tert-butyl 5-{1-[(4-flobenzoyl)amino]etyl}-2,3-dihydro-1H-indol-1-carboxylat (Điều chế 18) (4,29 g, 11,2 mmol) trong DCM (112 mL). Gia nhiệt hỗn hợp thu được ở 40°C trong sáu giờ. Trung hòa bằng dung dịch NaOH 2N. Bổ sung CHCl₃:IPA tỷ lệ 4:1 để hòa tan chất rắn dạng gôm và tách các lớp. Rửa lớp hữu cơ bằng nước muối, làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô dịch lọc. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel rửa giải với gradien 30-60% (25% axeton trong DCM) trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (2,48 g, 78%) dưới dạng bột màu trắng nhạt. ES/MS (m/z): 285,0 (M+H).

Điều chế các hợp chất dưới đây về cơ bản tương tự như Điều chế 21.

Điều chế số	Tên hóa học	Dữ liệu vật lý
22	Hợp chất triệt quang N-[1-(2,3-Dihydro-1H-indol-5-yl)propyl]-4-flobenzamid	ES/MS (m/z): 299,0 (M+H)
23	Benzyl [1-(2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)propyl]carbamate, Chất đồng phân A	ES/MS (m/z): 311,2 (M+H)

Điều chế 24A và 24B

Tách N-[1-(2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)etyl]-4-flobenzamid, Chất đồng phân 1 và N-[1-(2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)etyl]-4-flobenzamid, Chất đồng phân 2 (đối với việc tách bất đối xứng)

Tinh chế hợp chất triệt quang N-[1-(2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)etyl]-4-flobenzamid (Điều chế 21) bằng SFC bất đối xứng để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (Chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 285,0 (M+H). Điều kiện tinh chế: Cột CHIRALPAK® AS-H, 5 x 15 cm; pha động: 15% iPrOH trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; lưu lượng: 300 g/phút; UVW: 250 nm. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 1 bằng SFC phân tích bất đối xứng (>99% ee, R_t: 1,47 phút; Cột: CHIRALPAK® AS-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 25% iPrOH trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 300 nm).

Việc tinh chế nêu trên còn tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (Chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 285,0 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 2 bằng SFC phân tích bất đối xứng (98,5% ee, R_t : 2,08 phút; Cột: CHIRALPAK® AS-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 25% iPrOH trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW 300 nm).

Điều chế 25

Tổng hợp {5-[1-aminopropyl]-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl}(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon, Chất đồng phân A

Bổ sung dung dịch benzyl {1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propyl}carbamate, Chất đồng phân A (Điều chế 9) (2,12 g, 5,02 mmol) trong EtOH (35 mL) vào huyền phù được làm sạch bằng nitor chứa 20% paladi hydroxit trên carbon (2,12 g) trong EtOH (35 mL) trong bình lắc PARR®. Bịt kín, làm sạch bằng nitor và sau đó thổi khí hydro. Lắc trong khí hydro ở 414 kPa (60 psi) trong 3,6 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Lọc hỗn hợp phản ứng qua diatomit và cô dịch lọc để thu hợp chất nêu ở đề mục này (1,36 g, 94%) dưới dạng chất rắn màu trắng hơi xám. ES/MS (m/z): 289,2 (M+H), 272,0 (M-NH₂)⁺.

Điều chế 26

Tổng hợp methyl 2-methyl-2-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propanoat

Bổ sung n-butyllithi (3,6 mL, 8,9 mmol, 2,2 M trong hexan) vào dung dịch được khuấy ở 0°C chứa dixyclohexylamin (1,9 mL, 9,6 mmol) trong toluen (25 mL) trong khí nitor và khuấy trong 20 phút. Bổ sung từng giọt dung dịch methyl isobutyrate (0,83 g, 8,2 mmol) trong toluen (5 mL) vào hỗn hợp đã được điều chế trước đó và khuấy trong 30 phút ở 0°C. Bổ sung [5-bromo-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon (Điều chế 8) (2,3 g, 7,4 mmol) và loại khí hỗn hợp phản ứng bằng khí nitor. Bổ sung di-μ-bromobis(tri-t-butylphosphin)dipaladi(I) (50 mg, 0,06 mmol) và để hỗn hợp thu được ấm đến nhiệt độ trong phòng trong khí nitor. Sau hai giờ, bổ sung phần thứ hai của di-μ-bromobis(tri-t-butylphosphin)dipaladi(I) (50 mg, 0,06 mmol) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khí nitor qua đêm. Pha loãng với EtOAc và dung dịch HCl 1N và khuấy trong 10 phút.

Lọc và rửa các chất rắn bằng EtOAc. Tách các lớp lọc và rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa và nước muối. Làm khô lớp hữu cơ qua natri sulfat khan, lọc và cô dịch lọc. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel với 20-60% EtOAc trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (2,3 g, hiệu suất 94%, độ tinh khiết 89%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 332,2 (M+H).

Điều chế 27

Tổng hợp axit 2-metyl-2-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propanoic

Hòa tan metyl 2-metyl-2-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propanoat (Điều chế 26) (2,2 g, 6,6 mmol) trong THF (66 mL) và bổ sung kali trimetylsilanolat (1,1 g, 8,6 mmol). Khuấy ở nhiệt độ phòng trong bốn ngày. Lọc chất rắn và rửa bằng THF. Hòa tan các chất rắn trong nước và axit hóa bằng dung dịch HCl 5N. Làm lạnh trong tủ lạnh trong 30 phút. Lọc để thu gom hợp chất nêu ở đề mục này (1,20 g, 57%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 318,0 (M+H).

Điều chế 28

Tổng hợp 2-metyl-2-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propanamit

Bổ sung 1,1'-carbonyldiimidazol (126 mg, 0,763 mmol) vào dung dịch được khuấy chứa axit 2-metyl-2-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propanoic (Điều chế 27) (202 mg, 0,636 mmol) trong DCM (6,4 mL) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong khí nitơ trong 45 phút. Bổ sung amoni hydroxit (1 mL, 9,55 mmol, 25% khối lượng/thể tích trong nước) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong khí nitơ trong 90 phút. Bổ sung DMF (3 mL) vào để hỗ trợ độ hòa tan và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ phòng trong hai giờ. Cô và tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel với 0-10% EtOH trong DCM để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (180 mg, 89%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 317,0 (M+H).

Điều chế 29

Tổng hợp [5-(1-amino-1-metyletyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydropyran-4-yl)metanon

Bổ sung [bis(trifloaxetoxy)iido]benzen (115 mg, 0,26 mmol) vào hỗn hợp được khuấy chứa 2-metyl-2-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propanamit (Điều chế 28) (81 mg, 0,26 mmol) trong ACN (0,25 mL) và nước (0,25 mL) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khí nitơ qua đêm. Cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (140 mg, 94%, độ tinh khiết 50%) dưới dạng chất rắn màu hồng nhạt. ES/MS (m/z): 289,2 (M+H), 272,0 (M-NH₂)⁺.

Điều chế 30

Tổng hợp metyl 4-flo-2-[(2-hydroxyetyl)amino]benzoat

Gia nhiệt hỗn hợp chứa metyl-2-amino-4-flobenzoat (2,81 g, 15,9 mmol) và 2-iodoetanol (0,879 mL, 11,2 mmol) đến 90°C trong sáu giờ sau đó làm nguội đến nhiệt độ trong phòng. Hòa tan hỗn hợp nguyên chất trong EtOAc, rửa ba lần bằng dung dịch NaOH 1N, sau đó bằng nước muối. Làm khô lớp hữu cơ trên magie sulfat khan, lọc và cô dịch lọc để thu được 2,94 g dầu màu nâu nhạt. Bổ sung 2-iodoetanol (1,26 mL, 15,9 mmol) và gia nhiệt hỗn hợp ở 100°C qua đêm. Bổ sung thêm 2-iodoetanol (0,314 mL, 3,99 mmol) và tiếp tục gia nhiệt ở 100°C trong hai giờ. Làm mát xuống nhiệt độ phòng. Hòa tan hỗn hợp nguyên chất trong EtOAc, rửa ba lần bằng dung dịch NaOH 1N, sau đó bằng nước muối. Làm khô lớp hữu cơ trên magie sulfat khan, lọc và cô dịch lọc để thu được 2,50 g chất rắn màu nâu. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel với 20-40% EtOAc trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (1,12 g, 33%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 214,0 (M+H).

Điều chế 31

Tổng hợp axit 4-flo-2-[(2-hydroxyetyl)amino]benzoic

Bổ sung natri hydroxit (0,49 mL, 2,4 mmol, 5M trong nước) vào dung dịch được khuấy chứa metyl 4-flo-2-[(2-hydroxyetyl)amino]benzoat (Điều chế 30) (104 mg, 0,488 mmol) trong 1,4-dioxan (2,4 mL). Bịt nắp, khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút sau đó gia nhiệt đến 70°C trong hai giờ. Cô và axit hóa đến độ pH xấp xỉ bằng 1 đến 2 bằng dung dịch HCl 1N, chiết hai lần bằng DCM. Làm khô các lớp hữu cơ gom lại trên magie sulfat khan, lọc và cô dịch lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (89 mg, 92%) dưới dạng chất rắn màu nâu vàng. ES/MS (m/z): 200,0 (M+H).

Điều chế tham chiếu 1

Tổng hợp 1-(2,4-diflophenyl)-3-(2,3-dihydro-1H-indol-5-ylmethyl)ure

Khuấy hỗn hợp chứa tert-butyl 5-(aminomethyl)indolin-1-carboxylat (4,1 g, 17 mmol) và 2,4-diflo-1-isoxyanatobenzen (3 mL, 24 mmol) trong DCM (100 mL) trong một giờ. Làm nguội phản ứng bằng MeOH và nước và cô. Hòa tan phần còn lại trong DCM (30 mL) và bổ sung TFA (15 mL) và để yên ở nhiệt độ trong phòng trong hai giờ. Cô và bổ sung dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Chiết hỗn hợp bằng MeOH/DCM (1/5, thể tích/thể tích). Làm khô lớp hữu cơ trên magie sulfat khan, lọc và cô dịch lọc. Tái kết tinh từ EtOH để tạo ra hai mẻ thu hoạch. Kết hợp các mẻ thu hoạch này để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (3,5 g, 68%). ES/MS (m/z): 304,0 (M+H).

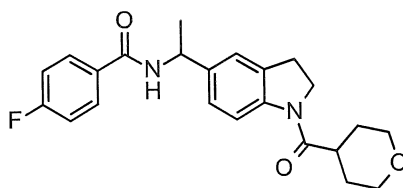
Điều chế tham chiếu 2

Tổng hợp 1-(2,4-diflophenyl)-3-{[1-(3,4,5-tribromobenzoyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]methyl}ure

Loại khí (bằng N₂) đối với dung dịch 1-(2,4-diflophenyl)-3-(2,3-dihydro-1H-indol-5-ylmethyl)ure (Điều chế tham chiếu 1) (70 mg, 0,23 mmol), axit 3,4,5-tribromobenzoic (170 mg, 0,24 mmol) và 1-[bis(dimethylamino)metylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxit hexaflophosphat (134 mg, 0,35 mmol) trong DMF (2 mL). Bổ sung TEA (0,08 mL, 0,6 mmol) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Trực tiếp tinh chế hỗn hợp phản ứng bằng cách tinh chế pha đảo (Cột: Cột sắc ký pha đảo Redisep Rf Gold High Performance C18; dung môi rửa giải: A: 10 mM amoni bicacbonat trong nước với 5% MeOH (pH=10), B: ACN; gradien: 40% B trong 5 phút sau đó 40-95% B trong 15 phút; lưu lượng 60 mL/phút, UVW 219/254 nM) và tách sản phẩm bằng cách làm khô lạnh để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (149 mg, 54%). ES/MS (m/z, ⁷⁹Br/⁸¹Br): 644,0/646,0 (M+H).

Ví dụ 1

Hợp chất triệt quang 4-flo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid

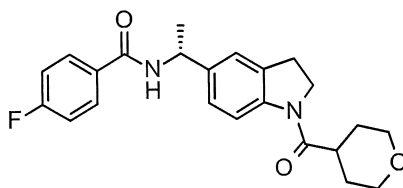


Kết hợp hợp chất triệt quang [5-(1-aminoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon (Điều chế 3) (420 mg, 1,53 mmol) và axit 4-flobenzoic (257 mg, 1,84 mmol) trong DCM (15 mL). Bổ sung vào dung dịch đang khuấy N,N-diisopropyletylamin (534 μ L, 3,06 mmol) và 1-[bis(dimethylamino)metylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridini-3-oxit hexaflorophosphat (890 mg, 2,30 mmol). Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Bay hơi dung môi và tinh chế bằng cách sắc ký cột pha đảo (Cột pha đảo Redisep Rf Gold High Performance C18, 25-100% ACN trong dung dịch amoni bicarbonat 10 mM) để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (372 mg, 61%). ES/MS (m/z): 397,2 (M+H). ^1H NMR (d_6 -DMSO) δ 8,73 (d, J=8 Hz, 1H), 7,98 (d, J=8 Hz, 1H), 7,93-7,89 (m, 2H), 7,28-7,23 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,12 (d, J=8 Hz, 1H), 5,07 (quin, J=8 Hz, 1H), 4,14 (t, J=8 Hz, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,36 (m, 2H), 3,09 (t, J=8 Hz, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,57-1,66 (m, 4H), 1,41 (d, J=7 Hz, 3H).

Ví dụ 1A

4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid

Phương pháp tổng hợp 1:



Tinh chế hợp chất triệt quang 4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid (Ví dụ 1) bằng SFC bất đối xứng để tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất là hợp chất nêu ở đề mục này. ES/MS (m/z): 397,0 (M+H). Điều kiện tinh chế: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150

mm; pha động: 40% MeOH trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; lưu lượng: 70 g/phút; UVW: 225 nm. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 1 bằng SFC phân tích bất đối xứng (>99% ee, R_t: 1,72 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 40% MeOH trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 225 nm). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 8,73 (d, J=8 Hz, 1H), 7,98 (d, J=8 Hz, 1H), 7,93-7,89 (m, 2H), 7,28-7,23 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,12 (d, J=8 Hz, 1H), 5,07 (quin, J=8 Hz, 1H), 4,14 (t, J=8 Hz, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,36 (m, 2H), 3,09 (t, J=8 Hz, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,57-1,66 (m, 4H), 1,41 (d, J=7 Hz, 3H).

Phương pháp tổng hợp 2:

Bổ sung TEA (9,8 mL, 70,3 mmol) và sau đó 4-flobenzoyl clorua (5,85 g, 36,9 mmol) vào dung dịch chứa [5-(1-aminoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon, Chất đồng phân 1 (Điều chế 4A) (9,65 g, 35,2 mmol) trong DCM (176 mL) ở 0°C. Để hỗn hợp thu được ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc (300 mL), lọc qua đệm silicagel và rửa bằng EtOAc. Cô dịch lọc và tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel với gradien từ 25-30% ACN trong DCM để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (9,4 g, 67,1%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt. MS (m/z): 397,2 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh bằng SFC phân tích bất đối xứng (>99% ee, R_t: 1,74 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 40% MeOH trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 225 nm). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 8,73 (d, J=8 Hz, 1H), 7,98 (d, J=8 Hz, 1H), 7,93-7,89 (m, 2H), 7,28-7,23 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,12 (d, J=8 Hz, 1H), 5,07 (quin, J=8 Hz, 1H), 4,14 (t, J=8 Hz, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,36 (m, 2H), 3,09 (t, J=8 Hz, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,57-1,66 (m, 4H), 1,41 (d, J=7 Hz, 3H).

Phương pháp tổng hợp 3:

Bổ sung TEA (65 mL, 468 mmol) vào hỗn hợp chứa [5-(1-aminoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl](tetrahydro-2H-pyran-4-yl)metanon hydroclorua, chất đồng phân 1 (Điều chế 7B) (70 g, 225 mmol) trong DCM (700 mL) ở 0-5°C. Bổ sung từng giọt 4-flobenzoyl clorua (37,85 g, 239 mmol) vào đó. Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong hai giờ. Bổ sung từng giọt nước ở tốc độ sao cho giữ nhiệt độ dưới 30°C và khuấy hỗn hợp ở 20 đến 30°C trong một giờ. Tách các lớp và rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch H₂SO₄ 18%. Tách các lớp và rửa lớp hữu cơ bằng

dung dịch NaHCO_3 7%. Tách các lớp và rửa lớp hữu cơ bằng nước. Tách các lớp và cho dung dịch hữu cơ qua máy lọc cacbon. Xử lý dung dịch bằng SI-Thiol (7 g) và gia nhiệt đến 40°C . Khuấy hỗn hợp thu được trong 12 giờ. Làm nguội hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng và lọc hỗn hợp qua diatomit. Cô lớp hữu cơ đến thể tích 200 mL (~3 phần thể tích). Bổ sung axeton (140 mL, 2 phần thể tích) và cô hỗn hợp thu được đến 200 mL (~3 phần thể tích). Xử lý thêm bằng axeton (280 mL, 4 phần thể tích) và nước (280 mL, 4 phần thể tích). Gia nhiệt ở 65°C trong hai giờ cho đến khi hỗn hợp phản ứng là dung dịch trong. Từ từ làm nguội xuống 30°C trong ba giờ. Khuấy ở 30°C trong một giờ. Bổ sung từng giọt nước (140 mL, 2 phần thể tích) và tiếp tục khuấy ở 30°C trong một giờ. Từ từ làm lạnh xuống 3 đến 8°C trong thời gian khoảng hai giờ. Khuấy ở nhiệt độ này trong sáu giờ. Lọc và rửa các chất rắn bằng nước (140 mL, 2 phần thể tích). Làm khô các chất rắn ở 55°C trong bốn đến sáu giờ. Thu được sản phẩm mong muốn dưới dạng chất rắn màu trắng (55 g, 61,6%).

Quy trình thu thập nhiễu xạ bột tia X đối với hợp chất theo Ví dụ 1A

Thu được các nhiễu xạ đồ XRD của các chất rắn dạng tinh thể bằng cách sử dụng máy nhiễu xạ bột tia X Bruker D4 Endeavor, có lắp nguồn CuK α ($\lambda = 0,154060$ nm (1,54060 Å)) và cảm biến Vantec, vận hành ở 35 kV và 50 mA. Mẫu được quét trong khoảng góc nhiễu xạ 2θ từ 4° và 40° , với bước góc nhiễu xạ 2θ là $0,0087^\circ$ và tốc độ quét là 0,5 giây/bước, và độ phân kỳ là 0,6 mm, bộ chống tán xạ cố định 5,28mm, và khe cảm biến 9,5 mm. Bột khô được đưa vào bộ chứa mẫu bằng thạch anh và tạo bề mặt trơn bằng cách sử dụng con trượt thủy tinh. Thu nhiễu xạ đồ dạng tinh thể ở nhiệt độ môi trường xung quanh và độ ẩm tương đối.

Quy trình thu thập nhiễu xạ bột tia X đối với hợp chất theo Ví dụ 1A, phương pháp 3

Mẫu đã được chuẩn bị của hợp chất theo Ví dụ 1A (phương pháp tổng hợp 3) được xác định đặc trưng bằng nhiễu xạ đồ XRD sử dụng nguồn phát xạ CuK α , thấy có các đỉnh nhiễu xạ (các trị số 2θ) như được nêu trong Bảng 1 dưới đây. Cụ thể là, nhiễu xạ đồ này có đỉnh ở $17,38^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm bao gồm $12,51^\circ$, $15,65^\circ$, $16,37^\circ$, $17,56^\circ$, $21,48^\circ$ và $25,23^\circ$ với dung sai đối với góc nhiễu xạ là $0,2^\circ$ ($2\theta \pm 0,2^\circ$).

Bảng 1. Các đỉnh nhiễu xạ bột tia X của hợp chất theo Ví dụ 1A phương pháp 3

Đỉnh	Góc (2-Theta °)	Cường độ (%)
1	9,99	13
2	12,51	73
3	15,65	90
4	16,37	57
5	17,38	100
6	17,56	62
7	18,79	25
8	19,81	38
9	21,48	56
10	23,38	43
11	24,41	21
12	24,70	17
13	25,23	64
14	25,46	28
15	27,69	15

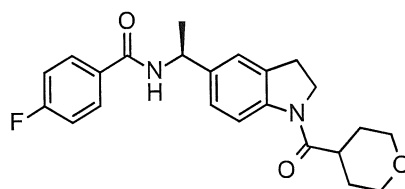
Xác định cấu hình tuyệt đối của hợp chất theo Ví dụ 1A

Điều chế tinh thể đơn của 4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid bằng cách tạo huyền phù 10 mg hợp chất 4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid trong hỗn hợp EtOH/heptan tỷ lệ 1:1 (1,75 mL) và tạo huyền phù đặc trên máy lắc quỹ đạo trong ba ngày. Sử dụng mẫu giống như phiến lá không màu của hợp chất 4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid, kích thước khoảng 0,020 mm x 0,080 mm x 0,300 mm, để phân tích tinh thể học tia X. Đo dữ liệu cường độ tia X sử dụng nguồn bức xạ I_μ CuK α (λ = 1,54178 Å) và nhiễu xạ kế đo góc 3 chu trình trên cơ sở Bruker

D8 Venture có lắp cảm biến vùng Photon 100 SL. Thu thập tổng cộng 8840 khung. Tích hợp các khung này với gói phần mềm Bruker SAINT sử dụng thuật toán khung hẹp. Sự tích hợp dữ liệu sử dụng ô đơn vị đơn tà thu được tổng cộng 7242 phản xạ đến góc θ tối đa là $68,28^\circ$ (độ phân giải $0,83 \text{ \AA}$), trong đó 3059 là độc lập (độ dư trung bình $2,367$, độ hoàn thiện = $95,9\%$, $R_{\text{int}} = 5,83\%$, $R_{\text{sig}} = 6,58\%$) và 2893 ($94,57\%$) là lớn hơn $2\sigma(F^2)$. Các hằng số ô cuối cùng là $a = 5,5831(13) \text{ \AA}$, $b = 5,1082(9) \text{ \AA}$, $c = 35,013(6) \text{ \AA}$, $\beta = 90,578(17)^\circ$, thể tích = $998,5(3) \text{ \AA}^3$, được dựa trên sự tinh chỉnh trọng tâm XYZ của 6280 phản xạ trên $20 \sigma(I)$ với $10,09^\circ < 2\theta < 136,8^\circ$. Hiệu chỉnh dữ liệu đối với các hiệu ứng hấp thụ bằng cách sử dụng phương pháp đa quét (SADABS). Tỷ lệ giữa mức truyền biểu kiến tối thiểu và tối đa là $0,784$. Các hệ số truyền tối thiểu và tối đa được tính (dựa trên kích cỡ tinh thể) là $0,8020$ và $0,9850$. Việc giải cấu trúc và tinh chỉnh sử dụng gói phần mềm Bruker SHELXTL, sử dụng nhóm không gian $P 2_1$, với $Z = 2$ đối với đơn vị công thức, $C_{23}H_{25}FN_2O_3$. Phương pháp tinh chỉnh bình phương tối thiểu ma trận đầy đủ không đẳng hướng cuối cùng trên F^2 với 264 tham biến hội tụ ở $R_1 = 9,17\%$, đối với dữ liệu được quan sát và $wR_2 = 23,48\%$ đối với tất cả các dữ liệu. Mức phù hợp là $1,141$. Đỉnh lớn nhất trong quy trình tổng hợp mật độ electron chênh lệch cuối cùng là $0,506 \text{ e-/}\text{\AA}^3$ và lỗ lớn nhất là $-0,358 \text{ e-/}\text{\AA}^3$ với độ lệch RMS $0,088 \text{ e-/}\text{\AA}^3$. Dựa trên cơ sở mô hình cuối cùng, mật độ tính được là $1,319 \text{ g/cm}^3$ và $F(000)$, 420 e- . Thông số cấu trúc tuyệt đối tinh chỉnh đến $0,12(16)$, xác nhận hóa học lập thể của tâm bất đối. Cấu trúc tuyệt đối được xác nhận là cấu hình R- tại tâm lập thể.

Ví dụ 1B

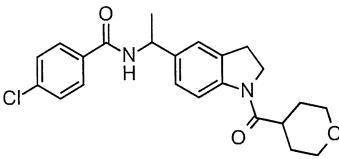
4-flo-N- $\{1(1S)$ -1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl $\}$ benzamid, Chất đồng phân 2



Tinh chế hợp chất triệt quang 4-flo-N- $\{1$ -[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl $\}$ benzamid (Ví dụ 1) bằng sắc ký bất đối xứng để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai là hợp chất nêu ở đề mục

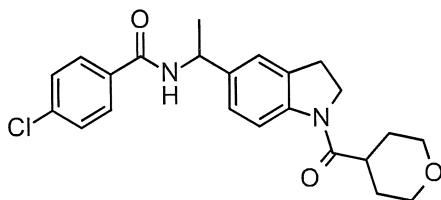
này. ES/MS (m/z): 397,0 (M+H). Điều kiện tinh chế: Cột: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; pha động: 40% MeOH trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; lưu lượng: 70 g/phút; UVW: 225 nm. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 2 bằng SFC phân tích bất đối xứng (98,3% ee, R_t: 2,37 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 40% MeOH trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 225 nm). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 8,73 (d, J=8 Hz, 1H), 7,98 (d, J=8 Hz, 1H), 7,93-7,89 (m, 2H), 7,28-7,23 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,12 (d, J=8 Hz, 1H), 5,07 (quin, J=8 Hz, 1H), 4,14 (t, J=8 Hz, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,36 (m, 2H), 3,09 (t, J=8 Hz, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,57-1,66 (m, 4H), 1,41 (d, J=7 Hz, 3H).

Điều chế hợp chất theo Ví dụ 2 về cơ bản tương tự như Ví dụ 1, sử dụng nguyên liệu ban đầu từ Điều chế 3.

Ví dụ số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý
2	Hợp chất triệt quang 4-clo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamidit		ES/MS (m/z): 413,0 (M+H)

Ví dụ 2A và 2B

4-clo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamidit, Chất đồng phân 1 và 4-clo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamidit, Chất đồng phân 2

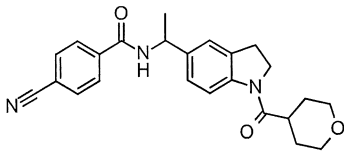
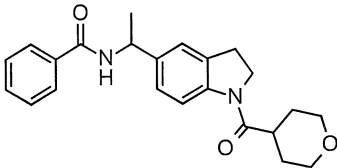
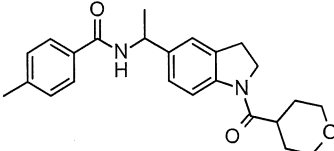


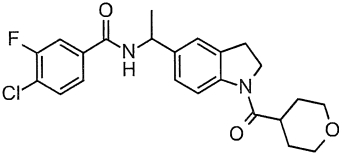
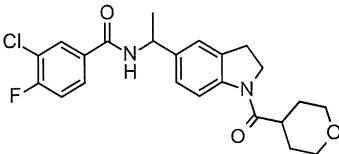
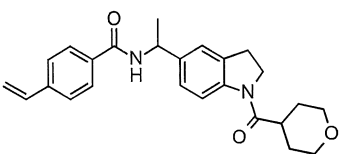
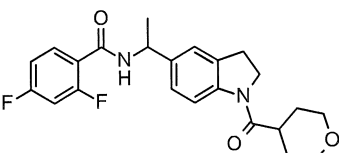
Tinh chế hợp chất triệt quang 4-clo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamidit (Ví dụ 2) bằng SFC bất đối

xứng để tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (Chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 413,0 (M+H). Điều kiện tinh chế: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; pha động: 40% iPrOH trong CO₂; lưu lượng: 70 g/phút; UVW: 260 nm. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 1 bằng SFC phân tích bất đối xứng (>99% ee, R_t=1,97 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 40% iPrOH trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 225 nm).

Việc tinh chế nêu trên còn tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (Chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 413,0 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 2 bằng SFC phân tích bất đối xứng (>99% ee, R_t: 3,04 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 40% iPrOH trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 225 nm).

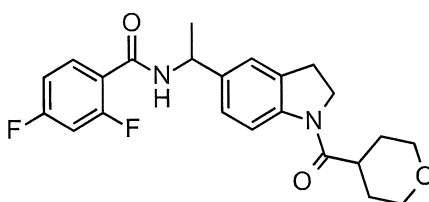
Điều chế hợp chất theo Ví dụ 3 thông qua Ví dụ 9 về cơ bản tương tự như Ví dụ 1, sử dụng nguyên liệu ban đầu từ Điều chế 3.

Ví dụ số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý
3	Hợp chất triệt quang 4-xyano-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid		ES/MS (m/z): 404,4 (M+H)
4	Hợp chất triệt quang N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid		ES/MS (m/z): 379,4 (M+H)
5	Hợp chất triệt quang 4-metyl-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid		ES/MS (m/z): 393,4 (M+H)

6	Hợp chất triệt quang 4-clo-3-flo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid		ES/MS (m/z): 431,4 (M+H)
7	Hợp chất triệt quang 3-clo-4-flo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid		ES/MS (m/z): 431,4 (M+H)
8	Hợp chất triệt quang 4-ethenyl-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid		ES/MS (m/z): 405,4 (M+H)
9	Hợp chất triệt quang 2,4-diflo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid		ES/MS (m/z): 415,0 (M+H)

Ví dụ 9A và 9B

2,4-Diflo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid, Chất đồng phân 1 và 2,4-Diflo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid, Chất đồng phân 2



Tinh chế hợp chất triệt quang 2,4-diflo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid (Ví dụ 9) bằng SFC bất đối xứng để tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (Chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 415,0 (M+H). Điều kiện tinh chế: CHIRALPAK® AD-H, 21 x 150 mm; pha động: 40% MeOH trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; lưu lượng: 70 g/phút; UVW: 225 nm. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 1 bằng phân tích

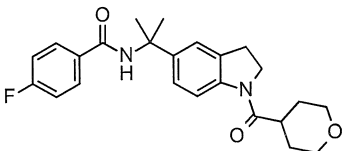
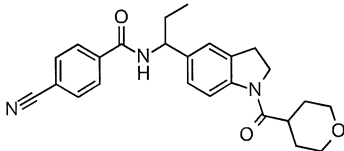
bất đối xứng (98,6% ee, R_t : 1,72 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 40% MeOH trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 225 nm).

Việc tinh chế nêu trên còn tạo ra chất đồng phân rửa giải thứ hai (Chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 415,2 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 2 bằng SFC phân tích bất đối xứng (98,5% ee, R_t : 2,60 phút; Cột: CHIRALPAK® AD-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 40% MeOH trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 225 nm).

Điều chế hợp chất theo Ví dụ 10 thông qua Ví dụ 13 về cơ bản tương tự như Ví dụ 1, sử dụng nguyên liệu ban đầu từ Điều chế 7.

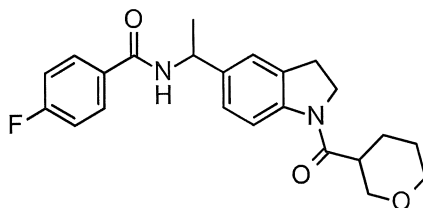
Ví dụ số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý
10	4-(Diflometyl)-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid, Chất đồng phân A		ES/MS (m/z): 429,0 (M+H)
11	4-(flometyl)-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid, Chất đồng phân A		ES/MS (m/z): 411,2 (M+H)
12	2-(Benzyloxy)-4-(flo)-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid, chất đồng phân A		ES/MS (m/z): 503,2 (M+H)
13	4-flo-2-[(2-hydroxyetyl)amino]-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid, Chất đồng phân A		ES/MS (m/z): 456,2 (M+H)

Điều chế các hợp chất theo ví dụ 14 và 15 về cơ bản là tương tự như ví dụ 1A, phương pháp tổng hợp 2.

Ví dụ số	Tên hóa học	Cấu trúc	Dữ liệu vật lý
14	4-flo-N-{2-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propan-2-yl}benzamidit		ES/MS (m/z): 411,2 (M+H)
15	4-xyano-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propyl}benzamidit, Chất đồng phân A		ES/MS (m/z): 418,2 (M+H)

Ví dụ 16

4-Flo-N-[1-{1-[tetrahydro-2H-pyran-3-ylcarbonyl]-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl}etyl]benzamidit đồng phân không đối quang (hỗn hợp của 2 chất đồng phân không đối quang)

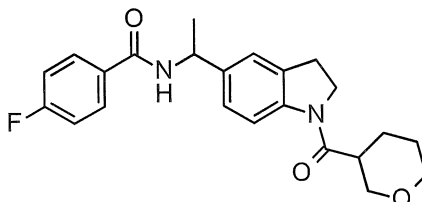


Xử lý hỗn hợp chứa N-[1-(2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)etyl]-4-flobenzamidit, Chất đồng phân 1 (Điều chế 24A) (150 mg, 0,528 mmol), axit tetrahydropyran-3-carboxylic triệt quang (100 mg, 0,739 mmol) và N,N-diisopropyletylamin (0,277 mL, 1,58 mmol) trong DCM (5,28 mL) với 1-[bis(dimetylamino)metylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxit hexaflophosphat (304 mg, 0,791 mmol). Khuấy ở

nhệt độ trong phòng trong 45 phút. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM. Bổ sung nước và dung dịch natri bicarbonat bão hòa. Tách các lớp và chiết lớp nước hai lần bằng DCM. Cho lớp hữu cơ gom lại được cho qua lớp lọc thủy tinh xốp kỵ nước (bộ tách pha ISOLUTE®) và cô dịch lọc. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel rửa giải với gradien 20-55% axeton trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (184 mg, 88%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 397,2 (M+H).

Ví dụ 16A và 16B

4-Flo-N-[1-{1-[tetrahydro-2H-pyran-3-ylcarbonyl]-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl}ethyl]benzamidit, Chất đồng phân 1 và 4-flo-N-[1-{1-[tetrahydro-2H-pyran-3-ylcarbonyl]-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl}ethyl]benzamidit, Chất đồng phân 2



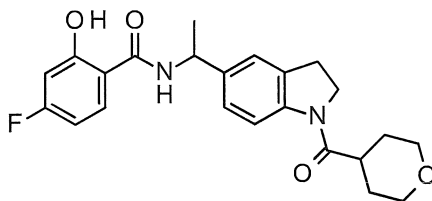
Tinh chế 4-flo-N-[1-{1-[tetrahydro-2H-pyran-3-ylcarbonyl]-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl}ethyl]benzamidit đồng phân không đối quang (Ví dụ 16) bằng cách sắc ký bất đối xứng để thu được chất đồng phân không đối quang rửa giải thứ nhất (Chất đồng phân 1). MS (m/z): 397,2 (M+H). Điều kiện tinh chế: CHIRALCEL® OJ-H, 30 x 250 mm; pha động: 100% MeOH; lưu lượng: 30 mL/phút; UVW: 225 nm. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 1 bằng HPLC phân tích bất đối xứng (> 99% de, R_t: 3,42 phút; Cột: CHIRALCEL® OJ-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 100% MeOH (chứa 0,2% isopropylamin); lưu lượng: 1 mL/phút; UVW: 225 nm).

Việc tinh chế nêu trên còn tạo ra chất đồng phân rửa giải thứ hai (Chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 397,2 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 2 bằng HPLC phân tích bất đối xứng (97,8% de, R_t: 4,66 phút; Cột: CHIRALCEL® OJ-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 100% MeOH (chứa 0,2% isopropylamin); lưu lượng: 1 mL/phút; UVW: 225 nm).

Ví dụ 17

4-flo-2-hydroxy-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-

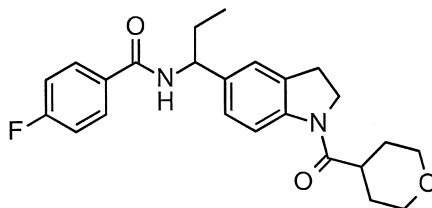
indol-5-yl]etyl}benzamid, Chất đồng phân A



Bổ sung 10% Pd/C (10 mg) vào dung dịch đã được thổi nitơ, chứa 2-(benzyloxy)-4-flo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid, Chất đồng phân A (Ví dụ 12) (96,0 mg, 0,19 mmol) trong etanol (2 mL) và hydro hóa với 1 atm (101 kPa) hydro ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Lọc qua điatomit và cô dịch lọc để thu được hợp chất mong muốn (66 mg, 84%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 413,0 (M+H).

Ví dụ 18

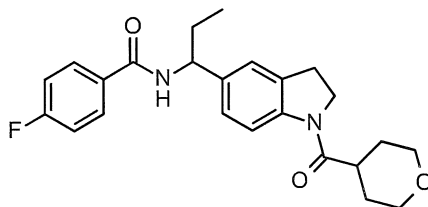
4-Flo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propyl}benzamid triệt quang



Xử lý hỗn hợp chứa hợp chất triệt quang N-[1-(2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)propyl]-4-flobenzamid (Điều chế 22) (200 mg, 0,650 mmol) trong DCM (6,5 mL) bằng N,N-diisopropyletylamin (0,228 mL, 1,30 mmol). Bổ sung tetrahydropyran-4-carbonyl clorua (110 mg, 0,715 mmol) và khuấy trong 30 phút. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM. Bổ sung nước và dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Tách các lớp và chiết lớp nước hai lần bằng DCM. Cho lớp hữu cơ gom lại được cho qua lớp lọc thủy tinh xốp kỵ nước (bộ tách pha ISOLUTE®) và cô dịch lọc. Tinh chế bằng cách sắc ký cột silicagel rửa giải bằng gradien 20-60% axeton trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng bột màu quả đào nhạt (244 mg, 91%). ES/MS (m/z): 411,2 (M+H).

Ví dụ 18A và 18B

4-Flo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propyl}benzamid, Chất đồng phân 1 và 4-flo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propyl}benzamid, Chất đồng phân 2

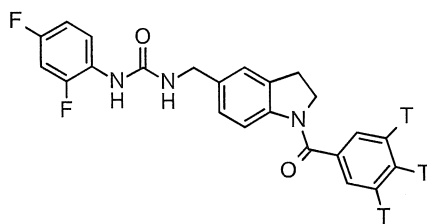


Tinh chế hợp chất triệt quang 4-flo-N-{1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]propyl}benzamid (Ví dụ 18) bằng cách sắc ký SFC bất đối xứng để thu được chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (Chất đồng phân 1). ES/MS (m/z): 411,2 (M+H). Điều kiện tinh chế: Cột CHIRALPAK® AS-H, 21 x 150 mm; pha động: 25% MeOH trong CO₂; nhiệt độ cột: 40°C; lưu lượng: 80 g/phút; UVW: 260 nm. Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 1 bằng SFC phân tích bất đối xứng (>99% ee, R_t: 0,92 phút; Cột: CHIRALPAK® AS-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 25% MeOH trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 225 nm).

Việc tinh chế nêu trên còn tạo ra chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (Chất đồng phân 2). ES/MS (m/z): 411,2 (M+H). Xác nhận sự làm giàu đồng phân đối ảnh của Chất đồng phân 2 bằng SFC phân tích bất đối xứng (>99% ee, R_t: 1,53 phút; Cột: CHIRALPAK® AS-H, 4,6 x 150 mm; pha động: 25% MeOH trong CO₂; lưu lượng: 5 mL/phút; UVW: 225 nm).

Ví dụ tham chiếu 1

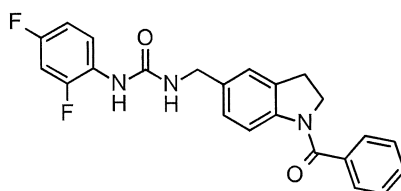
1-(2,4-Diflophenyl)-3-{[1-(3,4,5-tritritiobenzoyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]methyl}ure



Trong bình chuẩn độ, khuấy 1-(2,4-diflophenyl)-3-{[1-(3,4,5-tribromobenzoyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]metyl}ure (3 mg, 0,005 mmol), paladi (10% trên cacbon, 3 mg) và N,N-diisopropyletylamin (10 μ L, 0,06 mmol) trong DMF (1 mL) trong 3Ci triti trong ba giờ. Lọc hỗn hợp phản ứng và bay hơi đồng thời dịch lọc với EtOH để loại bỏ triti không bền. Hòa tan phần còn lại trong EtOH và tinh chế bằng cách sắc ký cột pha đảo (Cột: GEMINI® C18 250 x 10 mm; pha động: A: nước/TFA (1000:1), B: ACN/TFA (1000:1); gradien: 20-70% B trong 60 phút; lưu lượng 3 mL/phút) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này, hợp chất này được hòa tan trong EtOH. MS: 414,19 (M+H) và 74 Ci/mmol.

Ví dụ tham chiếu 2

1-(2,4-Diflophenyl)-3-{[1-(phenylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]metyl}ure



Hòa tan 1-(2,4-diflophenyl)-3-(2,3-dihydro-1H-indol-5-ylmetyl)ure (300 mg, 0,99 mmol) trong DCM (20 mL) và bổ sung benzoyl clorua (0,13 mL, 1,1 mmol) và TEA (0,27 mL, 1,9 mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong hai giờ. Cô và tinh chế phần còn lại bằng cách tinh chế pha đảo (Cột: Cột pha đảo Redisep Rf Gold High Performance C18; pha động: A: 0,1% axit formic trong nước, B: ACN; gradien: 0-80% B trong 30 phút; lưu lượng: 60 mL/phút, UVW: 219/254 nm) và tách sản phẩm bằng cách làm khô lạnh để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (403 mg, 79%). ES/MS (m/z): 408,2 (M+H).

Hệ miễn dịch là điểm kiểm tra cốt yếu, kháng lại sự phát triển khối u. Do đó, bệnh ung thư có thể tiến hóa nhiều cơ chế để lẩn tránh, ngăn chặn, hoặc cách khác là làm hỏng hệ miễn dịch. Mặc dù tryptophan là tuyệt đối cần thiết đối với sự phát triển tế bào ung thư, nhưng sự phân hủy của nó lại được chọn cho nhiều bệnh ung thư qua sự biểu hiện của indolamin 2,3 dioxygenaza (IDO1) hoặc bằng bản thân tế bào ung thư (có hữu), hoặc bằng các tế bào trong vi môi trường hoặc các hạch bạch huyết dẫn lưu khối u (tumor draining lymph nodes - TDLNs) (không có hữu). Sự hoạt hóa chọn lọc của IDO1 trong vi môi trường khối u trong khi chống lại sự phát triển nhanh chóng tế bào tạo cho khối u chiến lược hiệu quả để tránh sự giám sát miễn dịch, điểm kiểm tra cốt yếu trong quá trình phát triển ung thư và khiến cho khối u sự kháng lại liệu pháp điều trị. Hoạt tính ức chế miễn dịch của IDO1 là kết quả trực tiếp của việc làm suy kiệt cục bộ tryptophan và việc sản sinh đồng thời kynurenin, cả hai quy trình này đều ức chế miễn dịch.

Vai trò ức chế miễn dịch của hoạt tính IDO1 tác động đến nhiều loại tế bào bao gồm sự ức chế tế bào [các tế bào T (Frumento, et al. (2002) *J Exp Med* 196(4): 459-468; Terness, et al. (2002) *J Exp Med* 196(4): 447-457) và các tế bào NK (Della Chiesa, et al. (2006) *Blood* 108(13): 4118-4125)], sự phát triển tế bào [các tế bào T điều hòa (Sharma, et al. (2007) *J Clin Invest* 117(9): 2570-2582; Chen, et al. (2008) *J Immunol* 181(8): 5396-5404; Baban, et al. (2009) *J Immunol* 183(4): 2475-2483)] và các tế bào trình diện kháng nguyên ức chế [các tế bào tua ức chế và các đại thực bào (Munn, et al. (2004) *J Clin Invest* 114(2): 280-290; Munn, et al. (2005) *Immunity* 22(5): 633-642; Sharma, et al. (2007) *J Clin Invest* 117(9): 2570-2582)], và tuyển mộ và mở rộng [các tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy (Yu, et al. (2014) *J Immunol* 193(5): 2574-2586; Holmgaard, et al. (2015) *Cell Rep* 13(2): 412-424)]. Hoạt tính IDO1 ức chế các tác động này thông qua việc làm suy kiệt tryptophan và việc gia tăng đồng thời kynurenin trong khối u, vi môi trường khối u và TDLNs.

Cả việc làm suy kiệt cục bộ tryptophan và việc sản sinh kynurenin bằng sự biểu hiện IDO1 trong vi môi trường khối u hoặc trong TDLNs đều hỗ trợ sự phát triển và sự hoạt hóa của Tregs (Sharma, et al. (2007) *J Clin Invest* 117(9): 2570-2582), MDSCs (Holmgaard, et al. (2015) *Cell Rep* 13(2): 412-424), và các tế bào tua điều hòa (Sharma, et al. (2007) *J Clin Invest* 117(9): 2570-2582) tất cả các điều này đều

đóng vai trò ức chế miễn dịch mà hỗ trợ sự phát triển khối u. Việc làm suy kiệt tryptophan hỗ trợ sự phát triển Treg thông qua sự hoạt hóa của kinaza đáp ứng stress GCN2, sự hoạt hóa này được kích thích để đáp ứng lại sự tích tụ của các tRNA không mang điện tích. Các tế bào T thiếu GCN2 không nhạy với sự ức chế qua trung gian IDO1 đối với sự tăng sinh hoặc sự cảm ứng của kiểu hình dị ứng (Munn, et al. (2005) *Immunity* 22(5): 633-642). Ngoài việc làm suy kiệt tryptophan, hoạt tính IDO1 còn dẫn đến nồng độ cao của chất chuyển hóa xuôi chiều kynurenin, là phân tử ức chế miễn dịch quan trọng. Tương tự với sự làm suy kiệt tryptophan, sự hoạt hóa thụ thể hydrocarbon aryl (aryl hydrocarbon receptor - AHR) bằng kynurenin cũng là yếu tố thiết yếu đối với sự sản sinh các tế bào T điều hòa (Mezrich, et al. (2010) *J Immunol* 185(6): 3190-3198), và sự tăng sản sinh kynurenin và sự biểu hiện AHR có tương quan với sự tiên lượng kém ở bệnh ung thư não người (Opitz, et al. (2011) *Nature* 478(7368): 197-203). Kynurenin làm phong bế sự tăng sinh tế bào T và tế bào NK (Boyland, et al. (1956) *Biochem J* 64(3): 578-582) và là chất chủ vận của thụ thể AHR (Mezrich, et al. (2010) *J Immunol* 185(6): 3190-3198; Opitz, et al. (2011) *Nature* 478(7368): 197-203), yếu tố phiên mã mà điều hòa sự sản sinh các cytokin qua trung gian miễn dịch bẩm sinh như IL-1 β , IL-6 và IL-21, và được biểu hiện quá mức trong một số bệnh ung thư trong đó nó được cho là tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiến triển khối u và sự kháng lại liệu pháp điều trị (Julliard, et al. (2014) *Front Immunol* 5: 458). Trên thực tế, sự biểu hiện cổ hữu của IDO1 ở bệnh ung thư được điều hòa, một phần, bằng sự hoạt hóa qua trung gian kynurenin của vòng truyền tín hiệu AHR-IL-6-STAT3 mà thúc ép sự biểu hiện của IDO1 và ức chế sự tăng sinh tế bào T. Sự biểu hiện của trục truyền tín hiệu IDO1 này có liên quan đến sự giảm tỷ lệ sống sót không tái phát ở các bệnh nhân bị ung thư phổi (Litzenburger, et al. (2014) *Oncotarget* 5(4): 1038-1051). Sự sản sinh IL-6 qua trung gian IDO1 cũng đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ sự phát triển của các MDSC tiền sinh khối u và sự phá vỡ IDO1 đã làm giảm sự sản sinh IL-6, làm suy yếu hoạt tính ức chế MDSC, làm chậm sự phát triển khối u và làm gia tăng khả năng sống sót ở mô hình bệnh ung thư phổi do KRAS gây ra (Smith, et al. (2012) *Cancer Discov* 2(8): 722-735). Mối liên kết giữa sự làm suy kiệt tryptophan phụ thuộc IDO1 và sự hoạt hóa AHR phụ thuộc kynurenin cung cấp mấu chốt giải thích tại sao sự dị hóa tryptophan lại kết hợp mật

thiết với sự trốn tránh miễn dịch, điểm kiểm tra quan trọng kiểm chế sự tiến triển ung thư.

Việc điều hòa sự biểu hiện IDO1 trong vi môi trường khối u là phức tạp. IDO1 là gen được điều hòa bởi IFN- γ đầu tiên được khám phá (Yoshida, et al. (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78(1): 129-132). Trên thực tế, có mối tương quan mạnh mẽ giữa sự biểu hiện IFN- γ và IDO1 trên khắp tất cả các khoa nghiên cứu mô học ung thư (<http://cancergenome.nih.gov/>). Ngoài ra, sự biểu hiện IDO1 được điều hòa tăng bằng các interferon typ I, các phối tử TLR, TNF, IL-1, CTLA-4, CD200, GITR, CD40 và TGF- β , tất cả các chất này đều đóng vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch, và sự phát triển, sự tiến triển và sự đáp ứng của bệnh ung thư đối với liệu pháp điều trị. Hoạt tính IDO1 cao như được đo bởi sự biểu hiện IDO1, sự làm suy kiệt tryptophan và/hoặc sự gia tăng kynurenin đã có liên quan đến sự tiên lượng kém, sự giảm tỷ lệ sống sót và sự tăng tiềm năng di căn của rất nhiều loại khối u. Do đó, sự tăng mức kynurenin trong huyết thanh với sự giảm đồng thời tryptophan đã được chứng minh trong bệnh ung thư vú, ung thư đại trực tràng, ung thư đầu và cổ, ung thư phổi và ung thư tuyến tiền liệt (Liu, et al. (2010) Blood 115(17): 3520-3530). Ngoài ra, IDO1 được hoạt hóa thường xuyên ở các bệnh nhân ung thư (Schrocksnadel, et al. (2006) Clin Chim Acta 364(1-2): 82-90), bị bệnh nặng (Huang, et al. (2002) Br J Cancer 86(11): 1691-1696), kết quả kém và/hoặc kháng lại liệu pháp hóa trị chuẩn ở một số bệnh ung thư bao gồm bệnh u hắc sắc tố (Weinlich, et al. (2007) Dermatology 214(1): 8-14), bệnh bạch cầu tủy bào cấp (Chamuleau, et al. (2008) Haematologica 93(12): 1894-1898; Corm, et al. (2009) Leuk Res 33(3): 490-494), bệnh ung thư vú và cổ tử cung (Inaba, et al. (2010) Gynecol Oncol 117(3): 423-428; Yu, et al. (2011) Clin Dev Immunol 2011: 469135; Yu, et al. (2013) J Immunol 190(7): 3783-3797; Chen, et al. (2014) Breast Cancer Res 16(4): 410; Clin Cancer Res. 2007 Dec 1;13(23):6993-7002; Trott, et al. (2016). Oncotarget, 7(41), 66540-66557, bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom tế bào thận, u hắc sắc tố da, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, ung thư nội mạc tử cung, ung thư dạ dày, u thần kinh đệm, caxinom tế bào gan, u lympho Hodgkin, caxinom tế bào vảy thanh quản, ung thư phổi, đa u tủy, u lympho phi Hodgkin, caxinom tế bào vảy miệng và thực quản, sacom xương, ung thư buồng trứng, caxinom ống tụy, bệnh bạch cầu tế bào T và caxinom tuyến giáp. IFN- γ là xytokin tác động chủ yếu được tiết ra từ các tế bào NK và T được hoạt hóa. Các chu trình điều hòa âm mà gắn với

sự kìm chế hoạt tính tế bào T trên toàn thân (CTLA-4) hoặc cục bộ (PD-L1/L2) hiện được phê chuẩn để sử dụng làm tác nhân chống ung thư trong đó chúng tăng cường sự ức chế phát triển khối u qua trung gian tế bào T. Sự bất hoạt di truyền của các điểm kiểm tra như CTLA-4, PD-1 hoặc PD-L1 dẫn đến sự tăng cường rõ rệt sự sản sinh IFN- γ (Latchman, et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101(29): 10691-10696; Pandiyan, et al. (2007) *J Immunol* 178(4): 2132-2140), mà có thể gắn với trục ức chế miễn dịch IFN- γ -với-IDO1. Sự ức chế biểu hiện IDO1 có hữu với 1-Metyl Tryptophan ở mô hình u hắc sắc tố ở chuột làm cải thiện một cách đáng kể hiệu lực của Ipilimumab, kháng thể phong bế CTLA-4 (Holmgaard, et al. (2013) *J Exp Med* 210(7): 1389-1402). Hiệu lực được tăng cường này của Ipilimumab được kết hợp với sự tăng các tế bào tác động CD8 và sự giảm Tregs. Các quan sát này được mở rộng đối với các kháng thể khác hướng đích PD1, PD-L1 và GITR trong đó sự sức chế IDO1 đã làm tăng cường hoạt tính chống ung thư của chúng. Về mặt cơ chế, IDO1 được thể hiện là làm cản trở hiệu lực của các chất ức chế điểm kiểm tra này thông qua sự cảm ứng của các Treg với sự tuyển mộ tiếp theo của các MDSC tạo ra môi trường ức chế miễn dịch ở khối u (Holmgaard, et al. (2015) *Cell Rep* 13(2): 412-424). Các cách tiếp cận trị liệu miễn dịch để điều trị bệnh ung thư như bản thân IFN- γ , các chất hoạt hóa miễn dịch bẩm sinh như CpG-ODNs, chất kháng 4-1BB (CD137), chất kháng OX40, chất kháng PD-1/PD-L1/PD-L2, chất kháng CTLA 4 tất cả đều có tiềm năng hoạt hóa sự biểu hiện IDO1 cản trở hiệu lực trong thời gian dài của chúng trên lâm sàng. Do đó, có thể có tiềm năng trị liệu đáng kể khi kết hợp các chất ức chế IDO1 với các tác nhân này. Cụ thể là, sự kết hợp của các chất ức chế IDO1 với các kháng thể kháng PD1 (pidilizumab, nivolumab, pembrolizumab), các kháng thể kháng PD-L1 (durvalumab, atezolizumab, avelumab), các kháng thể kháng CTLA-4 (ipilimumab), các kháng thể kháng OX40 (MEDI6469, KHK4083) và các kháng thể kháng 4-1BB (CD137) (PF-05082566) có tiềm năng trị liệu đáng kể trên phổ rộng các loại khối u.

Cùng nhau, các dữ liệu này đã gợi ý rằng các chất ức chế sự làm suy kiệt tryptophan và sự sản sinh đồng thời kynurenin như các chất ức chế IDO1 có thể là hữu dụng để làm tác nhân đơn hoặc dưới dạng kết hợp trong điều trị nhiều loại bệnh ung thư trên cả bệnh nhân ung thư chưa được điều trị cũng như bệnh nhân ung thư kháng điều trị. Tính hữu dụng này đã được chứng minh bằng các chất ức chế IDO1

đã biết như epacadostat (INCB024360) và NLG919. Epacadostat được biết là gắn kết với IDO1 và phong bế sự dị hóa của tryptophan và sự sản sinh kynurenin tiếp theo cả *in vitro* và *in vivo*. Ngoài ra, epacadostat đã chứng minh hiệu lực tác nhân đơn trên các mô hình chuột tiền lâm sàng, CT26 và PAN02, tác dụng mà phụ thuộc vào sự có mặt của các tế bào T. (Yue, et al. (2009) J Med Chem 52(23): 7364-7367; Koblisch, et al. (2010) Mol Cancer Ther 9(2): 489-498; Liu, et al. (2010) Blood 115(17): 3520-3530 ; Jochems, et al. (2016) Oncotarget, Advance Publications). Hiệu lực tiền lâm sàng của epacadostat đã chuyển thành kết quả thử nghiệm lâm sàng trên người (NCT01195311).

Kết quả của các thử nghiệm dưới đây chứng tỏ rằng các hợp chất làm ví dụ trong bản mô tả là hữu dụng làm chất ức chế sản sinh kynurenin như các chất ức chế IDO1 và có thể hữu dụng trong điều trị bệnh ung thư. Hơn nữa, kết quả của các thử nghiệm dưới đây chứng minh rằng các hợp chất làm ví dụ nhất định đã gắn kết với IDO1 và rằng tất cả các hợp chất làm ví dụ đều ức chế sự chuyển hóa tryptophan thành kynurenin ở các tế bào ung thư cả *in vitro* và *in vivo*.

Thử nghiệm gắn kết đối với IDO1

Mục đích của thử nghiệm này là để chứng minh rằng các hợp chất làm ví dụ nhất định đã gắn kết với IDO1 *in vitro*. Cụ thể là, thử nghiệm này đánh giá khả năng của các hợp chất thử nghiệm trong việc cạnh tranh với phân tử theo dõi được triti hóa 1-(2,4-diflophenyl)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoyl)indolin-5-yl]metyl]ure và cho phép tính ái lực gắn kết, IC₅₀.

Gắn kết cạnh tranh của 1-(2,4-Diflophenyl)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoyl)indolin-5-yl]metyl]ure với IDO1

Nạp 300 nM His₆-IDO1 (Proteros, SwissProtID P14902, Cat# PR-0278, mẻ 19/59, 98 mg/mL trong 25 mM MES pH bằng 6,5, 150 mM KCl, độ tinh khiết >95%) được pha loãng trong DPBS vào mỗi lỗ của đĩa được phủ niken (Sigma, Cat# S5563) và ủ qua đêm ở 4°C. Loại bỏ các protein không gắn kết bằng cách rửa đĩa bốn lần bằng 300 µL DPBS trong máy rửa vi đĩa BIOTEK®. Bổ sung 100 µL dung dịch đệm phong bế (0,05% TWEEN® 20/DPBS) vào mỗi lỗ và ủ trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng để giảm sự gắn kết không đặc hiệu. Trong khi phong bế đĩa, chuẩn bị 50 nM 1-(2,4-diflophenyl)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoyl)indolin-5-yl]metyl]ure (Biocair,

Cat# TRQ41455) bằng cách pha loãng trong DPBS, và thực hiện pha loãng theo dãy nồng độ đối với dung dịch gốc không được đánh dấu 2,5 lần trong DMSO để tạo ra đường cong pha loãng 11 điểm. Bổ sung 5 μ L các hợp chất không được đánh dấu đã pha loãng theo dãy vào 95 μ L 1-(2,4-diflophenyl)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoyl)indolin-5-yl]metyl]ure 50 nM, bổ sung hỗn hợp này vào các lỗ của đĩa, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bốn giờ với sự lắc nhẹ. Để xác định sự dịch chuyển tối đa của phân tử theo dõi được triti hóa (1-(2,4-diflophenyl)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoyl)indolin-5-yl]metyl]ure), bổ sung lượng dư của 1-(2,4-diflophenyl)-3-[[1-(phenylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]metyl]ure không được đánh dấu (ChemDiv, Cat# G714-0242) 100 μ M vào 1-(2,4-diflophenyl)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoyl)indolin-5-yl]metyl]ure 50 nM và bổ sung vào các lỗ đối chứng gắn kết không đặc hiệu trong đĩa. Sau bốn giờ ủ, hút các lỗ bằng cách sử dụng MultiMek96 và rửa đĩa nhanh chóng một lần bằng 300 μ L DPBS lạnh bằng sử dụng máy rửa vi đĩa BIOTEK®. Bổ sung 100 μ L imidazol 100 mM trong PBS ở độ pH bằng 7,5 vào mỗi lỗ và ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng để dịch chuyển phức hợp IDO1-phối tử ra khỏi đĩa phủ niken. Chuyển phức hợp IDO1-phối tử đã được dịch chuyển vào đĩa đáy trong màu trắng 96 lỗ (Costar, Cat# 3632) chứa 200 μ L Microscint-20 (Perkin Elmer, Cat# 6013621), mỗi lỗ bằng cách sử dụng MultiMek96. Định lượng mức gắn kết tổng cộng và mức gắn kết không đặc hiệu (non-specific binding - NSB) của phối tử 1-(2,4-diflophenyl)-3-[[1-(3,4,5-tritritiobenzoyl)indolin-5-yl]metyl]ure bằng cách sử dụng máy đếm Trilux Microbeta. Sử dụng trị số gắn kết tổng cộng và trị số NSB để tính IC_{50} đối với hợp chất không được đánh dấu sử dụng phép phân tích hồi quy không tuyến tính trên phần mềm GraphPad Prism. Kết quả của thử nghiệm này chứng minh rằng các hợp chất làm ví dụ nhất định đã gắn kết với IDO1. Ví dụ, các hợp chất theo ví dụ 1A và 1B chứng minh trị số IC_{50} nhỏ hơn 1,5 μ M. Cụ thể là, IC_{50} của hợp chất theo ví dụ 1A là $0,033 \mu\text{M} \pm 0,0028$ (n=2).

Thử nghiệm sản sinh kynurenin (SKOV3)

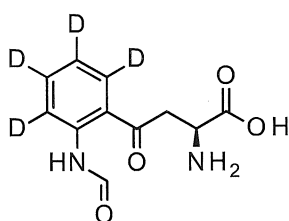
Mục đích của thử nghiệm này là để đánh giá sự ức chế sản sinh kynurenin, N-formyl-kynurenin và sự làm suy kiệt tryptophan trên các tế bào ung thư biểu hiện IDO1 và đánh giá liệu các hợp chất có độc tính hiển nhiên đối với các tế bào này hay không. Các hợp chất làm ví dụ được thử nghiệm về khả năng ức chế hoạt tính IDO1

trên SKOV3 (ATCC, Cat# HTB-77), dòng tế bào ung thư buồng trứng mà vốn biểu hiện IDO1. Do sự biểu hiện IDO1, các tế bào SKOV3 phân hủy tryptophan với sự sản sinh đồng thời kynurenin và các hợp chất được thử nghiệm về khả năng của chúng trong việc ức chế sự sản sinh kynurenin, N-formyl-kynurenin và sự làm suy kiệt tryptophan. Tùy ý, độc tính hiển nhiên của các hợp chất có thể được đánh giá bằng cách theo dõi sự sống sót tế bào.

Tổng hợp các nội chuẩn

Tổng hợp N-Formyl L-Kynurenin-d4

Axit (2S)-2-amino-4-oxo-4-(2,3,4,5-tetradeuterio-6-formamido-phenyl)butanoic



Bổ sung hỗn hợp đã được tạo ra từ trước chứa anhydrit axetic (0,026 mL, 0,264 mmol) trong axit formic (0,052 mL, 1,32 mmol) vào hỗn hợp chứa L-kynurenin-d4 (56 mg, 0,264 mmol) trong axit formic (0,132 mL). Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng trong khí nitơ trong hai giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng ACN và cô trong dòng khí nitơ. Tinh chế phần còn lại bằng HPLC pha đảo (cột: PHENOMENEX® LUNA® 5 μ m C18 (2) 100Å AXIA, 30 x 75 mm; dung môi rửa giải: A: 0,1% axit formic/nước, B: 0,1% axit formic/ACN; gradien: 0% B trong 2 phút sau đó gradien đến 22% B trong 5 phút; lưu lượng: 85 mL/phút ở UVW 231/214 nm) để thu được 29 mg hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng như mùi bông sau khi làm khô lạnh. ES/MS (m/z): 241,0 (M+H).

Xử lý tế bào và khả năng sống sót của tế bào

Cấy các tế bào SKOV3, dòng tế bào ung thư buồng trứng biểu hiện IDO1, ở mật độ 20.000 tế bào trên mỗi lỗ trong 100 μ L môi trường McCoy's 5A (Gibco, Cat# 16600-082) được bổ sung các axit amin không thiết yếu (Gibco, Cat# 11140-050), 1 mM natri pyruvat (Gibco, Cat# 11360-070), và 10% huyết thanh thai bò, môi trường

đầy đủ, vào đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ (BD Biosciences). Sau đó, ủ các tế bào trong 16 giờ trong máy ủ 37°C với 5% CO₂. Chuẩn bị các dịch pha loãng theo dãy chứa hợp chất từ dung dịch gốc chứa các hợp chất thử nghiệm nồng độ 10mM trong DMSO. Pha loãng theo dãy nồng độ dung dịch gốc này 3 lần trong DMSO, và cho 5 µL hợp chất vào đĩa định liều trung gian chứa 95 µL môi trường đầy đủ để tạo ra đường cong pha loãng mười điểm với nồng độ hợp chất cuối cùng nằm trong khoảng từ 1 µM đến 0,5 pM hoặc 10 µM đến 0,5 nM. Gạn môi trường ra khỏi đĩa chứa các tế bào và thấm lên khăn giấy. Rửa đĩa hai lần bằng 90 µL môi trường đầy đủ trên mỗi lỗ và thay thế dịch rửa cuối cùng bằng 90 µL môi trường đầy đủ. Sau khi rửa, bổ sung 10 µL hợp chất được pha loãng theo dãy nồng độ từ đĩa định liều trung gian vào mỗi lỗ của đĩa và ủ trong 18 giờ trong máy ủ 37°C với 5% CO₂. Nồng độ DMSO cuối cùng trong thử nghiệm này là 0,5%. Khi kết thúc quá trình ủ 18 giờ, chuyển 50 µL môi trường từ mỗi lỗ vào đĩa đáy hình chữ V, 96 lỗ (Thermo Scientific), bịt kín đĩa, và bảo quản ở -80°C để sau này thực hiện phép đo trên cơ sở phổ khối để đo lượng kynurenin, N-formyl-kynurenin và tryptophan. Tùy ý, cho (các) đĩa ban đầu trở lại máy ủ trong 24 giờ nữa và đo khả năng sống sót của tế bào bằng cách bổ sung thể tích tương đương của CELLTITER-GLO® (Promega) và đo mức phát quang trong máy đọc đĩa PERKIN ELMER® EnVision.

Đo phổ khối (MS) đối với Tryptophan, N-Formyl-kynurenin, và Kynurenin

Rã đông các mẫu thu được từ thử nghiệm trên cơ sở tế bào SKOV3 trên đá và làm sạch mảnh tế bào bằng cách ly tâm đĩa ở tốc độ 3220xg trong một phút ở 4°C. Bổ sung 12,5 µL chất nội chuẩn chứa 2,5 µg/mL L-tryptophan-2',4',5',6',7'-d5 (CDN Isotopes, Cat# D-1522), L-kynurenin sulfat-vòng-d4,3,3-d2 (Cambridge Isotope Laboratories, Cat# DLM-7842-0,01) và N-formyl L-kynurenin-d4 được điều chế nội bộ. Bịt kín nhiệt tất cả các đĩa bằng màng bịt dễ lột (Easy Peel) (ThermoScientific) và trộn bằng cách xoay trong 1-2 phút và sau đó ly tâm trong một phút ở tốc độ 3220xg ở 4°C. Tạo ra các dung dịch hiệu chuẩn tiêu chuẩn để định lượng kynurenin và N-formylkynurenin bằng cách hòa tan mỗi chất trong nước để có nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL. Lấy phần phân ước 20,8 µL kynurenin và 23,6 µL N-formylkynurenin từ dung dịch gốc nồng độ 1 mg/mL tương ứng của chúng và pha

loãng đến 1 mL bằng cách dùng môi trường McCoy's 5A để thu được nồng độ cuối cùng cho mỗi dịch chuẩn là 100 μM . Pha loãng theo dãy dung dịch hiệu chuẩn 2 lần trong môi trường đầy đủ để thu được đường cong chuẩn 5 điểm với các nồng độ cuối cùng là từ 5 μM đến 0,313 μM (kynurenin) và 2 μM đến 0,125 μM (N-formylkynurenin). Tiêm 1 μL mẫu môi trường (chưa biết) hoặc dung dịch hiệu chuẩn tiêu chuẩn vào hệ LC/MS-MS chứa hệ HPLC SHIMADZU® Prominence 30A và khối phổ kế ba tứ cực AB SCIEX® 5500. Tách các chất phân tích trên cột XBridge™ C18, 2,1 x 50 mm, 3,5 μm (Waters, Cat#186003021) được duy trì ở 35°C, với lưu lượng pha động là 0,7 mL/phút. Pha động A là axit formic 0,1% trong nước, và pha động B là MeOH. Biên dạng gradien là: 0 phút, 0,5% B; 0,8 phút, 98% B; 1,10 phút, 98% B; 1,11 phút, 0,5% B; 1,7 phút, và sau đó kết thúc. Vận hành khối phổ kế theo phương thức theo dõi dương cực đa phản ứng APCI. Sử dụng dữ liệu từ các mẫu đường cong chuẩn và tạo ra đường cong hiệu chuẩn khớp tuyến tính đối với mỗi chất phân tích bằng cách sử dụng phần mềm MultiQuan™. Sử dụng đường cong chuẩn được tạo ra để tính các nồng độ chất phân tích của các dung dịch chưa biết.

Tính các trị số IC_{50} của hợp chất bằng cách sử dụng giá trị đo khối phổ của kynurenin từ môi trường chứa 500 μM chất điều trị chuẩn tham chiếu làm chuẩn ức chế một trăm phần trăm, và không chứa hợp chất nhưng chứa chất điều trị DMSO làm chuẩn ức chế không phần trăm. Các số đo của N-formyl-kynurenin và tryptophan được sử dụng để đánh giá tính hợp lệ của dữ liệu được tạo ra bằng cách thể hiện mối quan hệ trực tiếp giữa sự sản sinh kynurenin và N-formyl-kynurenin với sự giảm đồng thời mức tryptophan. Kết quả của thử nghiệm này chứng minh rằng tất cả các hợp chất làm ví dụ đều ức chế sự sản sinh kynurenin và N-formyl-kynurenin trong các tế bào ung thư biểu hiện IDO1 ở các trị số IC_{50} để ức chế cả kynurenin và N-formyl-kynurenin là nhỏ hơn 0,9 μM , và trong số các hợp chất được thử nghiệm (các hợp chất theo ví dụ 1-9), về khả năng sống sót tế bào, tất cả các hợp chất đều thể hiện ức chế như trên mà không là độc hại hiển nhiên đối với tế bào cho đến nồng độ ít nhất 1 μM . Ví dụ, IC_{50} của hợp chất theo ví dụ 1A để ức chế kynurenin và N-formyl-kynurenin lần lượt là $0,007 \mu\text{M} \pm 0,002$ ($n=6$) và $0,007 \mu\text{M} \pm 0,002$ ($n=6$). Hơn nữa, hợp chất theo ví dụ 1A không ức chế sự tăng sinh tế bào cho đến nồng độ 10 μM .

Thử nghiệm ức chế đích *in vivo*

Mục đích của thử nghiệm này là để đánh giá sự ức chế sự sản sinh kynurenin và sự làm suy kiệt tryptophan trên các tế bào ung thư *in vivo*. SKOV3X (từ Trung tâm nghiên cứu và công nghệ Đại học Indiana), dòng tế bào ung thư buồng trứng, vốn biểu hiện IDO1 và dễ dàng tạo thành khối u trong khoang bụng của chuột nhắt Athymic Nude-Foxn1^{nu} (Harlan). Kết quả của sự biểu hiện IDO1 là, các khối u SKOV3X làm suy kiệt một cách cục bộ tryptophan với sự sản sinh đồng thời mức kynurenin cao trong vi môi trường khối u. Mục đích của thử nghiệm này là để đo khả năng của các hợp chất thử nghiệm trong việc ức chế IDO1 được chứng minh bằng sự giảm rõ ràng mức kynurenin trong khối u.

Pha sống

Nuôi cấy SKOV3X trong môi trường McCoy's 5A (Gibco, Cat# 16600-082) được bổ sung bằng các axit amin không thiết yếu (Gibco, Cat# 11140-050), 1 mM natri pyruvat (Gibco, Cat#11360-070) và 10% FBS và ủ ở 37°C trong 5% CO₂. Trypsin hóa và tách các tế bào ra khỏi môi trường nuôi cấy và tạo huyền phù tế bào trong dung dịch muối cân bằng Hank (HBSS). Cấy 2 x 10⁶ SKOV3X tế bào vào khoang bụng của mỗi con chuột Athymic Nude-Foxn1^{nu} (Harlan). Khoảng ba tuần sau khi cấy, bắt mạch các con vật để đảm bảo sự tạo thành khối u và chia ngẫu nhiên các con chuột mang khối u thành nhóm đối chứng điều trị chất dẫn và nhóm điều trị hợp chất. Cho các con chuột dùng hợp chất được phối chế trong chất dẫn chứa 1% hydroxyethylxenluloza (HEC) và 0,025% TWEEN® 80 và 0,05% Antifoam hoặc chỉ dùng chất dẫn bằng cách dùng ống thông qua đường miệng. Tạo ra biên dạng ức chế theo thời gian bằng cách cho các con chuột mang khối u dùng liều đơn và thu các mẫu huyết tương, gan, và khối u ở thời điểm 2, 4, 8, 12, và 24 giờ sau khi dùng liều. Thu gom máu vào các ống thu gom máu chứa EDTA (Greiner bio-one, Cat# 450474) và ly tâm ở tốc độ 2365xg, tách huyết tương, và làm đông lạnh ở -80°C. Tách các mảnh gan và khối u, ghi khối lượng và làm đông lạnh nhanh và bảo quản ở -80°C.

Tạo ra đường cong chuẩn, xử lý mô và ức chế đích

Điều chế các đường cong hiệu chuẩn cho L-kynurenin và L-tryptophan bằng cách đầu tiên tạo ra các chất nền tro, đó là các phần đồng nhất huyết tương và mô đã được làm suy kiệt L-kynurenin và L-tryptophan bằng cách thẩm tách. Sau đó, tăng cường cho các chất nền tro bằng các lượng đã biết của L-kynurenin và L-tryptophan. Tạo ra huyết tương chuột nhất tro bằng cách bổ sung 10 mL huyết tương chuột nhất đã được xử lý bằng EDTA (BioreclamationIVT, Cat# MSEPLEDTA3) vào SPECTRA/POR® FLOAT-A-LYZER® G2 (Spectrum Labs, Cat# G235063) và đặt thiết bị thẩm tách này trong 1000 mL dung dịch nước muối đệm phosphat và thẩm tách qua đêm. Sau đó, chuyển thiết bị này vào 1000 mL dung dịch nước muối đệm phosphat mới và lặp lại việc thẩm tách. Chuyển huyết tương chuột nhất tro này vào đồ chứa sạch và bảo quản ở -20°C để sử dụng trong tương lai. Điều chế phần đồng nhất gan đối chứng bằng cách bổ sung 3 mL MeOH/nước (1:1, thể tích/thể tích) trên mỗi gam gan chuột đối chứng và làm đồng nhất bằng đầu dò siêu âm. Điều chế phần đồng nhất khối u đối chứng theo cách tương tự ngoại trừ việc sử dụng máy nghiền mô để làm đồng nhất mô khối u. Bổ sung 10 mL phần đồng nhất mô đối chứng, gan và khối u, vào các thiết bị SPECTRA/POR® FLOAT-A-LYZER® G2 riêng rẽ và thẩm tách mỗi mẫu qua đêm trong 1000 mL MeOH/nước (1:1, thể tích/thể tích), sau đó chuyển mỗi mẫu vào 1000 mL MeOH/nước (1:1, thể tích/thể tích) mới và lặp lại việc thẩm tách. Chuyển các phần đồng nhất mô tro này vào các đồ chứa riêng rẽ và bảo quản ở -20°C để sử dụng trong tương lai.

Các dung dịch gốc chuẩn điều chế của L-kynurenin-sulfat (Sigma Aldrich, Cat# K3750), được hòa tan trong ACN/nước (1:1, thể tích/thể tích) và L-tryptophan (Sigma Aldrich), được hòa tan trong N-metyl-2-pyrrolidon/nước (4:1, thể tích/thể tích), để tạo ra các nồng độ bazơ tự do cuối cùng là 1 mg/mL. Lấy phần phân ước 50 µL của các dung dịch gốc tương ứng và pha loãng với MeOH/nước (1:1, thể tích/thể tích) để tạo ra dung dịch xử lý kết hợp nồng độ 50 µg/mL. Điều chế sáu dung dịch xử lý hiệu chuẩn bổ sung trong MeOH/nước (1:1, thể tích/thể tích) bằng cách pha loãng theo dãy đối với dung dịch nồng độ 50.000 ng/mL để thu được đường cong hiệu chuẩn 7 điểm với các nồng độ cuối cùng là từ 25 ng/mL đến 50 µg/mL.

Trộn các mẫu gan lấy được từ các đối tượng thử nghiệm với MeOH/nước (1:1, thể tích/thể tích) theo tỷ lệ 1 gam mô với 3 mL dung môi và làm đồng nhất với đầu

dò siêu âm. Làm đồng nhất các mẫu khối u với tỷ phần tương tự của MeOH/nước (1:1, thể tích/thể tích) sử dụng máy nghiền mô. Làm rã đông các mẫu huyết tương từ các đối tượng thử nghiệm và trộn để làm đồng nhất.

Thực hiện chiết các dung dịch xử lý hiệu chuẩn, chuỗi pha loãng 7 điểm của L-kynurenin và L-tryptophan, bằng cách chuyển 25 μ L mỗi mẫu vào các lỗ riêng rẽ của đĩa 96 lỗ và bổ sung 25 μ L chất nền đối chứng tro thích hợp (phần đồng nhất huyết tương, gan hoặc khối u) vào các lỗ này tùy thuộc vào nguồn gốc mô của các mẫu thử nghiệm. Bổ sung 25 μ L MeOH/nước (1:1, thể tích/thể tích) vào các lỗ riêng rẽ sau đó là 25 μ L các mẫu thử nghiệm tương ứng. Tiếp theo, bổ sung 180 μ L ACN/MeOH (1:1, thể tích/thể tích) chứa 250 ng/mL L-tryptophan-2',4',5',6',7'-d5 (Sigma Aldrich, Cat# 615862) và L-kynurenin sulfat-vòng-d4,3,3-d2 (Cambridge Isotope Laboratories, Cat# DLM-7842-0,005) vào tất cả các lỗ và trộn để kết tủa các protein trong các mẫu. Ly tâm đĩa 96 lỗ để kết viên vật liệu protein kết tủa sau đó pha loãng một phần của mỗi dịch nổi ít nhất 10 lần bằng nước/TFA (100:2, thể tích/thể tích). Tiêm 10 μ L mỗi mẫu được chiết và chất chuẩn hiệu chuẩn vào hệ LC/MS-MS chứa bộ điều khiển SHIMADZU® SCL-10A với bơm HPLC SHIMADZU® LC-10ADvp, bộ lấy mẫu tự động CTC-PAL và khối phổ kế ba tứ cực AB SCIEX® 4000. Tách các chất phân tích trên cột Advantage™ Echelon™ C18, 2,1 x 20 mm, 4 μ m (Analytical Sales và Service, Cat# Sprite AE1822) được duy trì ở điều kiện môi trường với lưu lượng pha động là 1,5 mL/phút. Pha động A là nước /TFA/amoni bicacbonat 1M, (1000:4:1, thể tích/thể tích/thể tích) và pha động B là ACN/TFA/amoni bicacbonat 1M 1000:4:1, thể tích/thể tích/thể tích). Biên dạng gradien là: 0 phút, 0,3% B; 0,03 đến 0,2 phút, 7% B; 0,3 đến 0,4 phút, 36% B; 0,41 phút, 98% B, sau đó dừng lại ở 0,7 phút để quay trở lại điều kiện ban đầu. Vận hành khối phổ kế theo phương thức theo dõi dương cực đa phản ứng TURBOIONSPRAY®. Sử dụng dữ liệu từ các mẫu đường cong chuẩn hiệu chuẩn và tạo ra đường cong hiệu chuẩn khớp bình phương đối với mỗi chất phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Analyst™. Sử dụng đường cong chuẩn được tạo ra để tính các nồng độ chất phân tích của các mẫu thử nghiệm.

Sử dụng nồng độ kynurenin trong gan từ các con vật không mang khối u được điều trị bằng chất dẫn làm mức ức chế tối đa hoặc mức kynurenin thấp nhất. Sử dụng

nồng độ kynurenin trong khối u SKOV3X từ các con chuột mang khối u được điều trị bằng chất dẫn làm mức ức chế tối thiểu hoặc mức kynurenin cao nhất. Tính phần trăm ức chế đối với nhóm được điều trị bằng hợp chất so với mức ức chế IDO1 tối thiểu trong nhóm khối u được điều trị bằng chất dẫn. Kết quả của thử nghiệm này chứng minh rằng hợp chất theo ví dụ 1A ức chế sự sản sinh kynurenin và N-formyl-kynurenin trong các tế bào ung thư biểu hiện IDO1 *in vivo*. Cụ thể là, hợp chất theo ví dụ 1A được dùng với liều 75 mg/kg, 25 mg/kg và 5 mg/kg lần lượt dẫn đến mức ức chế 79%, 59% và 37% ở thời điểm 12 giờ sau khi dùng.

Tác dụng chống khối u của hợp chất theo ví dụ 1A trên mô hình Colon26 đồng nguồn ở chuột nhắt đối với bệnh ung thư ruột kết và tác dụng chống khối u của hợp chất theo ví dụ 1A trong kết hợp với LY3300054 trên mô hình L55 được tạo lập của chuột nhắt được làm giống như của người

Mô hình Colon 26 đồng nguồn của chuột nhắt:

Nuôi dưỡng dòng tế bào ung thư ruột kết Colon26 thu được từ các con chuột nhắt BALB/c trong môi trường RPMI 1640 được bổ sung 10 mM HEPES, 1 mM natri pyruvat, và 10% huyết thanh thai bò. Thu hoạch các tế bào cấy hợp dòng bằng trypsin và rửa hai lần bằng môi trường sinh trưởng đầy đủ không có huyết thanh. Khởi tạo các khối u dưới da bằng cách tiêm 1×10^6 tế bào đã được tạo huyền phù trong HBSS vào sườn sau của các con chuột BALB/c đầy đủ miễn dịch (Envigo, Indianapolis, IN). Sáu ngày sau khi cấy khối u, chia ngẫu nhiên các con vật dựa vào thể trọng và đặt vào nhóm điều trị tương ứng của chúng, sử dụng số con vật trên mỗi nhóm như được chỉ định.

Mô hình khối u L55 được làm giống như của người, thử thách hPBMC, và điều trị:

Nuôi dòng tế bào NSCLC của người, L55, trong môi trường RPMI 1640 được bổ sung 10% huyết thanh thai bò. Thu hoạch các tế bào cấy hợp dòng bằng trypsin và rửa hai lần bằng môi trường sinh trưởng không có huyết thanh. Bắt đầu phát triển các khối u dưới da bằng cách tiêm 5×10^6 tế bào trong hỗn hợp chứa HBSS và

MATRIGEL® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) với tỷ lệ 1:1 vào trong sườn sau của các con chuột nhắt NOD.Cg-*Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}*/SzJ thường được biết hơn là các con chuột bất hoạt chuỗi gama NOD scid (NOD scid gamma chain knockout mice - NSG) (The Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine), chúng thiếu các tế bào T, tế bào B, tế bào NK, và thiếu hụt sự truyền tín hiệu xytokin. Khi thể tích khối u trung bình đạt đến khoảng 200-300 mm³, chia ngẫu nhiên các con vật theo kích cỡ khối u và thể trọng và đặt vào các nhóm điều trị tương ứng của chúng như được chỉ định. Sau khi chia ngẫu nhiên, thử thách các con chuột có khối u bằng một mình PBS (không có các PBMC) hoặc bằng PBS chứa 1×10^7 PBMC của người vào tĩnh mạch đuôi của con vật.

Lấy dữ liệu, phối chế hợp chất và đối chứng chất dẫn (cả hai mô hình)

Thu thập kích cỡ khối u và thể trọng sử dụng phương tiện Study Director. Xác định thể tích khối u (V) bằng cách sử dụng công thức: $V = 0,536 \times L \times W^2$ trong đó L = đường kính đo được lớn hơn và W = đường kính vuông góc nhỏ hơn. Chuyển dữ liệu thể tích khối u sang thang logarit để cân bằng phương sai theo thời gian và nhóm điều trị. Phân tích dữ liệu thể tích trên thang logarit bằng phương pháp phân tích số đo lặp hai chiều đối với các phương sai theo thời gian và việc điều trị nhờ sử dụng phương thức MIXED trong phần mềm SAS (Version 9.2). Mô hình tương quan của các số đo lặp là Spatial Power. So sánh các nhóm được điều trị với nhóm đối chứng tại mỗi thời điểm. Sử dụng phương thức MIXED cũng riêng biệt đối với mỗi nhóm điều trị để tính toán các giá trị trung bình đã hiệu chỉnh và các sai số chuẩn tại mỗi thời điểm. Cả hai phân tích đều tính đến sự tự tương quan trong mỗi con vật và tính đến sự thất thoát dữ liệu mà xảy ra khi các con vật có khối u lớn sớm được loại ra khỏi nghiên cứu. Tính các biến đổi tương đối về thể tích khối u (%T/C) bằng cách sử dụng các số đo thể tích khối u được lấy ở thời điểm gần nhất với ngày cuối cùng dùng liệu hợp chất theo ví dụ 1A, sử dụng công thức $\%T/C = 100 \times \Delta T / \Delta C$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm được điều trị bằng hợp chất, ΔT = thể tích khối u trung bình của nhóm được điều trị bằng hợp chất trừ đi thể tích khối u trung bình vào ngày cơ sở, C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng (chất dẫn), và ΔC = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng trừ đi thể tích khối u trung bình vào

ngày cơ sở. Nếu $\Delta T < 0$, thì giá trị thoái triển khối u được tính thay vì %T/C trong đó $\% \text{thoái triển} = 100 \times \Delta T / T_{\text{ban đầu}}$ sao cho $T_{\text{ban đầu}} =$ thể tích khối u trung bình vào ngày cơ sở.

Đánh giá hiệu quả chống khối u của hợp chất theo ví dụ 1A và LY3300054 một mình, hoặc dưới dạng kết hợp bằng cách đo thể tích khối u bằng thước đo ba chiều hai lần mỗi tuần trong quá trình nghiên cứu. Xác định thể trọng hai lần mỗi tuần trong quá trình nghiên cứu, làm chỉ số chung về khả năng dung nạp.

Các chế phẩm phối chế của hợp chất theo ví dụ 1A và LY3300054: Phối chế hợp chất theo ví dụ 1A trên cơ sở hàng tuần trong 1% HEC/0,25% Tween 80/0,05% Antifoam và bảo quản ở 4°C. Hòa tan LY3300054 trong dung dịch nước muối đậm phosphat và bảo quản ở 4°C

(Các) nhóm đối chứng: Đối với các nghiên cứu hiệu lực một tác nhân, chỉ dùng chất dẫn cho hợp chất theo ví dụ 1A. Đối với các nghiên cứu kết hợp, cấp cả các chất dẫn được sử dụng cho hợp chất theo ví dụ 1A và LY3300054 theo phác đồ lần lượt giống như đối với mỗi một hợp chất. Đối với các nhóm đơn trị liệu trong các nghiên cứu hiệu lực kết hợp, điều trị các con vật bằng hợp chất mong muốn và chất dẫn thay cho hợp chất không được dùng theo phác đồ đối với hợp chất không được dùng.

Mô hình Colon26 đồng nguồn, điều trị và kết quả:

Liệu pháp đơn trị liệu với hợp chất theo ví dụ 1A

Điều trị các con chuột nhắt cái BALB/c (n=10) có khối u Colon26 bằng hợp chất theo ví dụ 1A hai lần mỗi ngày trong 21 ngày bằng cách dùng ống thông qua đường miệng với liều 10, 50, và 100 mg/kg. Bắt đầu dùng hợp chất theo ví dụ 1A sáu ngày sau khi cấy khối u, và theo dõi sự phát triển khối u và thể trọng hai lần mỗi tuần trong khoảng thời gian điều trị.

Kết quả: Việc xử lý bằng 10, 50, và 100 mg/kg hợp chất theo ví dụ 1A dẫn đến tác dụng đáp ứng liều đối với sự phát triển khối u với các liều chỉ 50 và 100 mg/kg thể hiện sự ức chế phát triển khối u có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) ở ngày 20. Các thay đổi về thể tích khối u (%T/C) quan sát được ở ngày 20 là 17,5%, 31,2%, và 62,6% lần lượt đối với các liều 10, 50, và 100 mg/kg. Không có các vấn đề về khả

năng dung nạp đáng kể tại mức liều bất kỳ được thử nghiệm của hợp chất theo ví dụ 1A về mặt thay đổi thể trọng trong quá trình điều trị so với các con chuột được điều trị bằng chất dẫn. Sự giảm thể trọng được đo dưới dạng phần trăm thay đổi so với thể trọng trung bình được ghi tại thời điểm cơ sở 6 ngày sau khi cấy khối u đối với mỗi nhóm. Ở ngày 20, các con chuột được điều trị bằng chất dẫn trung bình thể hiện mức giảm 5,5% thể trọng so với mức cơ sở, với các nhóm được dùng liều 10, 50, và 100 mg/kg thể hiện mức giảm lần lượt là 2,5%, 8%, và 2,5%. Mặc dù sự giảm thể trọng liên quan đến liều dùng có xu hướng phụ thuộc liều nhưng chúng không khác biệt về mặt thống kê so với các con chuột được điều trị bằng chất dẫn.

Mô hình khối u L55 được làm giống như của người, điều trị và kết quả:

Tác dụng của hPBMc đối với sự phát triển khối u L55

Dòng tế bào ung thư NCLC L55 ở người vốn kháng lại đáp ứng dị sinh kết hợp với sự tiêm hPBMc. Mục đích của các nghiên cứu này là để đánh giá khả năng của các hợp chất trong việc tạo điều kiện cho đáp ứng dị sinh cho phép các tế bào T của người hướng đích và hạn chế sự phát triển của các khối u L55 của người trên con chuột nhắt mà thiếu hệ miễn dịch thích nghi (các con chuột NSG). Để đánh giá sự đóng góp của các hPBMc vào việc ức chế sự phát triển khối u của các khối u L55, tiêm giả được PBS không chứa hPBMc, hoặc PBS chứa 1×10^7 hPBMc vào các con chuột NSG mang khối u L55 đã được tạo lập (n=10) với kích cỡ khối u đã đạt đến khoảng 250 mm³. Đo thể tích khối u và thể trọng hai lần mỗi tuần trong suốt toàn bộ quãng thời gian điều trị.

Kết quả: Không có sự ức chế có ý nghĩa thống kê đối với sự phát triển khối u L55 khi so với các con vật mà không nhận hPBMc trong toàn bộ quá trình nghiên cứu. Không thấy có các vấn đề đáng kể về khả năng dung nạp với việc tiêm PBMc của người trong toàn bộ quá trình nghiên cứu được chứng minh bởi việc không có sự giảm thể trọng đáng kể khi so với mốc cơ sở, trong đó mức giảm thể trọng tại ngày 41 là nhỏ hơn 0,1% so với mốc cơ sở.

Liệu pháp đơn trị liệu với hợp chất theo ví dụ 1A

Để đánh giá khả năng của hợp chất theo ví dụ 1A trong việc tăng cường sự ức chế phát triển khối u L55 qua trung gian hPBMC, tiêm giả được PBS không chứa hPBMC vào các con chuột NSG mang khối u L55 đã được tạo lập (n=10) với kích cỡ khối u đã đạt đến khoảng 250 mm³, và tiêm PBS chứa 1×10^7 hPBMC vào nhóm khác (n=10). Điều trị cả hai nhóm bằng 75 mg/kg hợp chất theo ví dụ 1A bằng cách dùng ống thông qua đường miệng hai lần mỗi ngày trong 21 ngày. Đo thể tích khối u và thể trọng hai lần mỗi tuần trong suốt toàn bộ quãng thời gian điều trị.

Kết quả: Khi không có hPBMC, việc điều trị khối u L55 bằng hợp chất theo ví dụ 1A không dẫn đến sự ức chế phát triển khối u đáng kể trong toàn bộ quá trình điều trị so với việc điều trị bằng một mình chất dẫn không có PBMC. Việc điều trị các con vật mang khối u L55 bằng hợp chất theo ví dụ 1A với sự có mặt của hPBMC dẫn đến sự ức chế phát triển khối u so với nhóm đối chứng chất dẫn không chứa hPBMC. Mức ức chế có ý nghĩa thống kê đối với sự phát triển khối u là rõ ràng nhất ở thời điểm muộn hơn với %T/C là 47,6% ở ngày 41 ($P < 0,001$). Không thấy có vấn đề đáng kể về khả năng dung nạp trong toàn bộ quá trình nghiên cứu với hPBMC, hợp chất theo ví dụ 1A, hoặc kết hợp cả hai như được chứng minh bằng việc không có sự giảm có ý nghĩa thống kê về mức giảm thể trọng khi so với các số đo cơ sở.

Liệu pháp đơn trị liệu với LY3300054

Để đánh giá khả năng của LY3300054 trong việc tăng cường sự ức chế phát triển khối u L55 qua trung gian hPBMC, tiêm PBS chứa hPBMC vào hai nhóm chuột NSG mang khối u L55 đã được tạo lập (n=10 con/nhóm) với kích cỡ khối u đã đạt đến khoảng 250 mm³. Điều trị một nhóm bằng 10 mg/kg kháng thể đối chứng vô hiệu IgG-tác động (IgG-effector null - IgG-EN) và nhóm còn lại bằng 10 mg/kg LY3300054 bằng cách tiêm trong phúc mạc một lần mỗi tuần trong 4 tuần. Đo thể tích khối u và thể trọng hai lần mỗi tuần trong suốt toàn bộ quãng thời gian điều trị.

Kết quả: Việc điều trị các con chuột mang khối u L55 mà đã được tiêm hPBMC bằng 10 mg/kg IgG-EN đã không làm thay đổi sự phát triển hoặc sự tiến triển khối u so với việc điều trị bằng một mình chất dẫn có hoặc không có hPBMC. Việc điều trị các con vật mang khối u L55 mà đã được tiêm hPBMC bằng 10 mg/kg LY3300064 dẫn đến sự ức chế phát triển khối u có ý nghĩa thống kê so với các đối chứng được

điều trị bằng chất dẫn chứa hoặc không chứa hPBM. Mức thay đổi về thể tích khối u (%T/C) thấy được ở cuối quá trình dùng liều so với việc dùng một mình chất dẫn không chứa PBM (ngày 37) là 75,7%. Không thấy có vấn đề đáng kể về khả năng dung nạp trong toàn bộ quá trình nghiên cứu với LY3300054 cùng hoặc không cùng với hPBM, như được chứng minh bằng việc không có sự giảm có ý nghĩa thống kê về mức giảm thể trọng khi so với các số đo cơ sở.

Kết hợp hợp chất theo ví dụ 1A và LY3300054

Tiêm hPBM vào các con chuột NSG (n=10) mang khối u L55 với kích cỡ khối u đã đạt đến khoảng 250 mm³ và điều trị bằng 75 mg/kg hợp chất theo ví dụ 1A hai lần mỗi ngày bằng cách dùng ống thông qua đường miệng trong 21 ngày và 10 mg/kg LY3300054 bằng cách tiêm trong phúc mạc một lần mỗi tuần trong 4 tuần. Đo thể tích khối u và thể trọng hai lần mỗi tuần trong suốt toàn bộ quãng thời gian điều trị.

Kết quả: Việc điều trị kết hợp 75 mg/kg hợp chất theo ví dụ 1A và 10 mg/kg LY3300054 dẫn đến sự cải thiện hiệu quả chống khối u so với cả hai nhóm đơn trị liệu. Thể tích khối u là thấp hơn đáng kể so với các nhóm điều trị bằng một mình chất dẫn mà không có PBM hoặc được tiêm hPBM ($P < 0,001$ ở tất cả các số đo). Thể tích khối u vào các ngày 30, 34, 37, và 41 lần lượt là 9,6 %T/C, 19,8 %T/C, 13,3 %T/C, và 27,3% T/C. Sự khác nhau về hiệu quả chống khối u giữa các nhóm đơn trị liệu so với nhóm kết hợp là có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,001$). Để đánh giá liệu có hay không sự kết hợp là có tính cộng hợp hay tính hiệp đồng, dữ liệu được phân tích về cơ bản như sau:

Phân tích thống kê (cả hai mô hình):

Phân tích thống kê đối với dữ liệu thể tích khối u bắt đầu bằng việc biến đổi dữ liệu sang thang logarit để cân bằng phương sai theo thời gian và nhóm điều trị. Dữ liệu thể tích trên thang logarit được phân tích bằng phương pháp phân tích số đo lặp hai chiều đối với các phương sai theo thời gian và việc điều trị nhờ sử dụng phương thức MIXED trong phần mềm SAS (Version 9.3). Mô hình tương quan của các số đo

lập là Spatial Power. Nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng tại mỗi thời điểm. Phương thức MIXED cũng được sử dụng riêng biệt đối với mỗi nhóm điều trị để tính toán các giá trị trung bình đã hiệu chỉnh và các sai số chuẩn tại mỗi thời điểm. Cả hai phân tích đều tính đến sự tự tương quan trong mỗi con vật và sự thất thoát dữ liệu mà xảy ra khi các con vật có khối u lớn sớm được loại ra khỏi nghiên cứu. Các giá trị trung bình đã được hiệu chỉnh và các sai số chuẩn (standard error - s.e.) được dựng biểu đồ cho mỗi nhóm điều trị theo thời gian.

Phương pháp phân tích kết hợp (phương pháp độc lập Bliss đối với các nghiên cứu IVEF):

Với kết quả của việc phân tích số đo lập, các đánh giá đối nghịch được sử dụng để kiểm tra tác dụng tương tác tại mỗi thời điểm, so sánh giá trị trung bình của nhóm dùng chất dẫn và nhóm dùng kết hợp với giá trị trung bình của hai nhóm dùng một chất đơn lẻ. Phương pháp này là tương đương với phương pháp độc lập Bliss để kiểm tra tính cộng hợp. Đáp ứng cộng hợp kỳ vọng (expected additive response - EAR) đối với dạng kết hợp được tính trên thang thể tích khối u là: Thể tích EAR = $V1 * V2/V0$, trong đó $V0$, $V1$, và $V2$ là các thể tích khối u trung bình được ước tính lần lượt đối với nhóm đối chứng chất dẫn, điều trị 1 một mình, và điều trị 2 một mình. Nếu kết quả kiểm tra tương tác là có ý nghĩa thì tác dụng kết hợp được tuyên bố về mặt thống kê là lớn hơn mức cộng hợp hay nhỏ hơn mức cộng hợp tùy thuộc vào thể tích trung bình kết hợp lần lượt được thấy là nhỏ hơn hay lớn hơn thể tích EAR. Nếu không, kết luận thống kê là có tính cộng hợp.

Sử dụng phương pháp phân tích này, sự ức chế phát triển khối u là không tốt hơn mức cộng hợp cho đến ngày 34 và 37 khi đó mức ức chế sự phát triển khối u là có tính hiệp đồng lần lượt với $P < 0,008$ và $p < 0,001$. Không thấy có vấn đề đáng kể về khả năng dung nạp trong toàn bộ quá trình nghiên cứu với sự kết hợp hợp chất theo ví dụ 1A và LY3300054, như được chứng minh bằng việc không có sự giảm có ý nghĩa thống kê về mức giảm thể trọng khi so với các số đo cơ sở.

Các hợp chất theo sáng chế tốt hơn là được bào chế ở dạng dược phẩm dùng theo nhiều đường khác nhau. Tốt nhất nếu các dược phẩm này để sử dụng qua đường miệng hoặc trong tĩnh mạch. Các dược phẩm như vậy và quy trình bào chế chúng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (D. Troy, et al., eds., 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

Như dược sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được dùng để chỉ lượng hoặc liều của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó mà, khi cho bệnh nhân dùng liều đơn hoặc đa liều, tạo ra hiệu quả mong muốn ở bệnh nhân được chẩn đoán hoặc điều trị.

Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng được xác định bởi bác sỹ chẩn đoán, được xem là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được từ những trường hợp tương tự. Khi xác định lượng hữu hiệu đối với bệnh nhân, một số yếu tố được cân nhắc bởi bác sỹ chẩn đoán, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: loài động vật; kích thước của động vật; độ tuổi và thể trạng chung, bệnh hoặc rối loạn cụ thể có liên quan, mức độ liên quan hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn; đáp ứng của bệnh nhân cụ thể; hợp chất cụ thể được sử dụng; cách dùng; các đặc tính sinh khả dụng của chế phẩm dược dùng; chế độ liều được chọn; việc sử dụng các biện pháp y học đồng thời khác; và các tình trạng có liên quan khác.

Các hợp chất theo sáng chế nhìn chung có hiệu quả trong một phạm vi liều lượng rộng. Ví dụ, liều dùng mỗi ngày thường nằm trong khoảng liều hàng ngày từ 0,05-1000 mg. Tốt hơn là các liều như vậy nằm trong khoảng liều hàng ngày từ 0,1-500 mg. Tốt hơn nữa là các liều như vậy nằm trong khoảng liều hàng ngày từ 1-200 mg. Trong một số trường hợp, mức liều dùng dưới giới hạn dưới của các khoảng liều trên đây có thể là nhiều hơn mức đủ, trong khi trong các trường hợp khác, liều lớn hơn vẫn có thể được sử dụng, và do đó các khoảng liều trên đây không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào. Cần hiểu rằng lượng hợp chất thực tế được dùng sẽ được xác định bởi bác sỹ, trong các trường hợp tương ứng, bao gồm tình trạng được điều trị, đường dùng được chọn, hợp chất hoặc các hợp chất thực tế

được dùng, độ tuổi, thể trọng, và đáp ứng của bệnh nhân cụ thể, và mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng của bệnh nhân.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

Trình tự axit amin và trình tự nucleotit

SEQ ID NO: 1 (PD-L1 người)

MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLA
ALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQIT
DVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHEL
TCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNE
IFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIF
RLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

SEQ ID NO: 2 (HCDR1 của LY3300054)

KASGGTFSSYAIS

SEQ ID NO: 3 (HCDR2 của LY3300054)

GIPIFGTANYAQKFQG

SEQ ID NO: 4 (HCDR3 của LY3300054)

ARSPDYSPYYYYGMDV

SEQ ID NO: 5 (LCDR1 của LY3300054)

SGSSSNIGSNTVN

SEQ ID NO: 6 (LCDR2 của LY3300054)

YGNSNRPS

SEQ ID NO: 7 (LCDR3 của LY3300054)

QSYDSSLGSV

SEQ ID NO: 8 (HCVR của LY3300054)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
GIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSPD
YSPYYYYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 9 (LCVR của LY3300054)

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNS
NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGI
KLTVLG

SEQ ID NO: 10 (HC của LY3300054)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
GIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSPD
YSPYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11 (LC của LY3300054)

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNS
NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGI
KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS
SPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE
KTVAPAEC

SEQ ID NO: 12 (ADN của HC của LY3300054)

CAGGTCCAGCTGGTCCAGTCAGGGGGCCGAGGTCAAAAAGCCAGGGTCA
TCTGTCAAAGTGTCTTGTAAGGCATCCGGGGGCACATTTTCCAGCTACG
CTATCTCCTGGGTGAGACAGGCACCAGGGCAGGGTCTGGAGTGGATGG
GCGGAATCATTCCCATCTTCGGGACCGCCAACCTACGCTCAGAAAGTTTCA
GGGAAGGGTCACTATTACCGCCGACAAAAGCACATCTACTGCTTATATG
GAGCTGTCTAGTCTGAGGTCTGAAGATAACCGCAGTGTACTATTGCGCCC
GGAGTCCCGACTATAGCCCTTACTATTACTATGGCATGGATGTCTGGGG
CCAGGGAACACAGTGACAGTCTCATCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCG
GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC
GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTC
CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGCACCGT
CAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCT

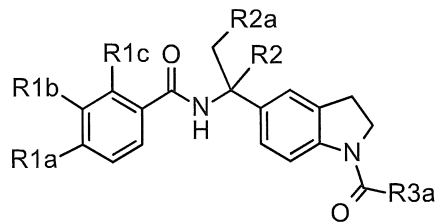
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
 CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGT
 CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
 GCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCCTCTATTCCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
 AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
 CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAA

SEQ ID NO: 13 (ADN của LC của LY3300054)

CAGTCCGTCCTGACACAGCCACCCTCAGCCTCTGGCACCCCTGGGCAGC
 GAGTGACAATCTCTTGTCTGGGAGTTCCTCAAATATTGGTAGTAACACC
 GTGAATTGGTACCAGCAGCTGCCCCGGCACAGCACCTAAGCTGCTGATCT
 ATGGAAACTCAAATAGGCCATCCGGAGTCCCCGACCGGTTCTCTGGTAG
 TAAATCAGGCACTTCCGCCAGCCTGGCTATTAGCGGGCTGCAGTCTGAG
 GACGAAGCCGATTACTATTGCCAGTCTTACGATTCCAGCCTGTCTGGAA
 GTGTGTTTGGCGGAGGGATCAAGCTGACCGTCCTGGGCCAGCCTAAGGC
 TGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCA
 ACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGT
 GACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGA
 GACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG
 CTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGC
 TGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCT
 GCAGAATGCTCT

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



trong đó:

R1a là hydro, metyl, etenyl, xyano, flo, clo, flometyl, hoặc diflometyl;

R1b là hydro, flo, hoặc clo;

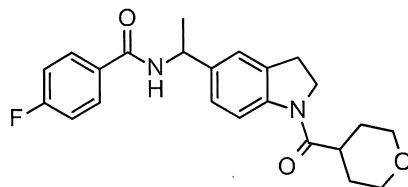
R1c là hydro, hydroxy, flo, benzyloxy, hoặc hydroxyetylamin;

R2 là hydro hoặc metyl;

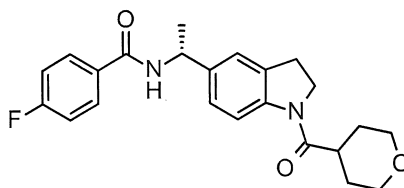
R2a là hydro hoặc metyl; và

R3a là tetrahydropyranyl.

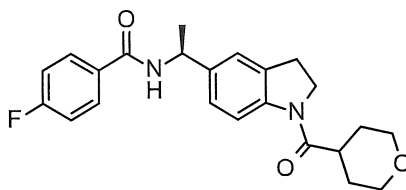
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là:



3. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2, trong đó hợp chất này là:



4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2, trong đó hợp chất này là:



5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hợp chất này là 4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid ở dạng tinh thể.
6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó hợp chất này là 4-flo-N-{(1R)-1-[1-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl]etyl}benzamid ở dạng tinh thể được đặc trưng bằng nhiễu xạ đồ bột tia X (nguồn bức xạ Cu, λ -1,54060 Å) chứa ít nhất một đỉnh ở $17,38^\circ$ kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm bao gồm $12,51^\circ$, $15,65^\circ$, $16,37^\circ$, $17,56^\circ$, $21,48^\circ$ và $25,23^\circ$ ($2\theta \pm 0,2^\circ$).
7. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 và một hoặc nhiều tá dược, chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company
 <120> HỢP CHẤT 2,3-DIHYDRO-1H-INDOL VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY
 <130> X21056
 <150> 62/348457
 <151> 2016-06-10
 <160> 13
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 1

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285

Glu Thr

290

<210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5 10

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
 1 5 10

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 1 5 10

<210> 8
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Ile Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 10
<211> 453
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
225 230 235 240

Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser
 325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 11
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Ile Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
210 215

<210> 12
<211> 1359
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12
caggtccagc tgggtccagtc agggggccgag gtcaaaaagc caggggtcatc tgtcaaagtg 60
tcttgtaagg catccggggg cacattttcc agctacgcta tctcctgggt gagacaggca 120
ccagggcagg gtctggagtg gatgggcgga atcattccca tcttcggggac cgccaactac 180
gctcagaagt ttcaggggaag ggtcactatt accgccgaca aaagcacatc tactgcttat 240
atggagctgt ctagtctgag gtctgaagat accgcagtgt actattgcgc ccggagtccc 300
gactatagcc cttactatta ctatggcatg gatgtctggg gccaggggaac cacagtgaca 360
gtctcatccg ctagcaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480
acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600

acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 660
 gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaagcc 720
 gagggggcac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 780
 cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840
 ttcaactggt atgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca agactggctg 960
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccctcctc catcgagaaa 1020
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1080
 cgggaggaga tgaccaagaa ccaagtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 1200
 cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctatt ccaagctcac cgtggacaag 1260
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggcaaa 1359

<210> 13
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13
 cagtccgtcc tgacacagcc accctcagcc tctggcacc ctgggcagcg agtgacaatc 60
 tcttgttctg ggagttcctc aaatattggt agtaacaccg tgaattggta ccagcagctg 120
 cccggcacag cacctaagct gctgatctat ggaaactcaa ataggccatc cggagtcccc 180
 gaccggttct ctggtagtaa atcaggcact tccgccagcc tggctattag cgggctgcag 240
 tctgaggacg aagccgatta ctattgccag tcttacgatt ccagcctgtc tggaagtgtg 300
 tttggcggag ggatcaagct gaccgtcctg ggccagccta aggctgcccc ctcggtcact 360
 ctgttccccg cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggt gtgtctcata 420

agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag	480
gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc	540
tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg	600
catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctgcag aatgctct	648