



(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)



1-0036246

(51)⁷ C07D 471/08; C07D 513/08; C07D
487/08; C07D 209/04

(13) B

(21) 1-2017-04836

(22) 04/05/2016

(86) PCT/EP2016/059975 04/05/2016

(87) WO 2016/180696 17/11/2016

(30) 15166900.9 08/05/2015 EP; 16163342.5 31/03/2016 EP

(45) 25/07/2023 424

(43) 26/03/2018 360A

(73) 1. JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (US)

1125 Trenton-Harbourton Road, Titusville, NJ New Jersey 08560, United States of America

2. KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (BE)

KU Leuven Research & Development, Waaistraat 6, bus 5105, 3000 Leuven, Belgium

(72) KESTELEYN, Bart, Rudolf, Romanie (BE); BONFANTI, Jean-François (FR); JONCKERS, Tim, Hugo, Maria (BE); RABOISSON, Pierre, Jean-Marie, Bernard (BE); BARDIOT, Dorothée, Alice, Marie-Eve (BE); MARCHAND, Arnaud, Didier, M (BE).

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

(54) HỢP CHẤT INDOL ĐƯỢC THỂ MỘT LẦN HOẶC HAI LẦN DÙNG LÀM CHẤT ỨC SỰ SAO CHÉP VIRUT GÂY SỐT DENGUE, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP TỔNG HỢP HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất indol được thể một lần hoặc hai lần để sử dụng làm thuốc, tốt hơn nữa là để sử dụng làm thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus gây sốt dengue. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm hoặc chế phẩm kết hợp của hợp chất này, dược phẩm hoặc chế phẩm này để sử dụng làm thuốc, tốt hơn nữa là để ngăn ngừa hoặc điều trị sự lây nhiễm virus gây sốt dengue. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tổng hợp các hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất indol được thể một lần hoặc hai lần để sử dụng làm thuốc, tốt hơn nữa là để sử dụng làm thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus gây sốt dengue. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến được phẩm hoặc chế phẩm kết hợp của các hợp chất này, được phẩm hoặc chế phẩm này để sử dụng làm thuốc, tốt hơn nữa là để ngăn ngừa hoặc điều trị sự lây nhiễm virus gây sốt dengue. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tổng hợp hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Flavivirus, được truyền qua muỗi hoặc bọ ve, gây ra các bệnh truyền nhiễm đe dọa đến tính mạng con người, như viêm não và sốt xuất huyết. Bốn týp huyết thanh khác biệt nhưng có liên quan gần gũi của flavivirus gây sốt dengue đã được biết, gọi là DENV-1, -2, -3, và -4. Dengue là bệnh địa phương ở hầu hết các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới, chủ yếu ở khu vực thành thị và nửa thành thị. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), cứ 2,5 tỷ người thì có 1 tỷ trẻ em có nguy cơ nhiễm DENV (WHO, 2002). Ước tính có khoảng từ 50 đến 100 triệu ca mắc sốt dengue [DF], 500.000 ca mắc bệnh sốt dengue nghiêm trọng (nghĩa là sốt xuất huyết dengue [DHF] và hội chứng sốc dengue [DSS]), và hơn 20.000 ca tử vong xảy ra trên thế giới mỗi năm. DHF trở thành nguyên nhân hàng đầu của các ca nhập viện và tử vong ở trẻ em ở vùng dịch địa phương. Nhìn chung, sốt dengue là nguyên nhân phổ biến nhất gây bệnh virus lây truyền qua động vật chân khớp. Do các đợt bùng phát lớn gần đây tại các quốc gia nằm ở châu Mỹ La Tinh, Đông Nam Á và Tây Thái Bình Dương (bao gồm Brazil, Puerto Rico, Venezuela, Campuchia, Indonesia, Việt Nam, Thái Lan), nên số ca mắc sốt dengue đã tăng lên đáng kể trong những năm qua. Không chỉ số ca mắc sốt dengue tăng lên vì bệnh đang lan sang các khu vực mới, mà các đợt bùng phát có xu hướng nghiêm trọng hơn.

Để ngăn ngừa và/hoặc kiểm soát bệnh có liên quan đến sự lây nhiễm virus gây sốt dengue, phương pháp duy nhất hiện có chỉ là các chiến lược diệt trừ muỗi để kiểm soát vật truyền bệnh. Mặc dù có tiến triển trong việc phát triển vaccin chống lại virus

gây sốt dengue, nhưng quá trình này vẫn gặp phải rất nhiều khó khăn. Các khó khăn này bao gồm sự tồn tại của hiện tượng gọi là hiện tượng tăng cường phụ thuộc kháng thể (ADE). Việc phục hồi sau khi bị lây nhiễm bởi một týp huyết thanh tạo ra sự miễn dịch suốt đời chống lại týp huyết thanh đó nhưng chỉ mang lại sự bảo vệ một phần và tạm thời chống lại sự lây nhiễm sau đó bởi một trong ba týp huyết thanh còn lại. Sự lây nhiễm sau đó với một týp huyết thanh khác, các kháng thể khác dạng tồn tại trước đó tạo ra phức hợp với týp huyết thanh của virus gây sốt dengue mới lây nhiễm nhưng không làm trung hòa tác nhân gây bệnh. Thay vào đó, virus được cho là chui vào tế bào một cách thuận lợi, dẫn đến sự sao chép virus không kiểm soát và độ chuẩn virus đạt đến đỉnh cao hơn. Trong cả sự lây nhiễm nguyên phát và thứ phát, độ chuẩn virus cao hơn có liên quan đến bệnh sốt dengue nghiêm trọng hơn. Vì các kháng thể có nguồn gốc từ mẹ có thể dễ dàng truyền cho trẻ sơ sinh bằng cách cho con bú, điều này có thể là một trong các lý do khiến trẻ em bị ảnh hưởng bởi bệnh sốt dengue nghiêm trọng hơn người lớn.

Tại các khu vực có hai hoặc nhiều týp huyết thanh tuần hoàn đồng thời, còn được gọi là vùng tăng dịch địa phương, nguy cơ mắc bệnh sốt dengue nghiêm trọng cao hơn đáng kể do sự lây nhiễm thứ phát, nghiêm trọng hơn có nguy cơ tăng. Hơn nữa, trong trường hợp tăng dịch địa phương, xác suất xuất hiện các chủng virus độc hơn tăng, do đó làm tăng khả năng mắc sốt xuất huyết dengue (DHF) hoặc hội chứng sốc dengue.

Muỗi mang dengue, bao gồm *Aedes aegypti* và *Aedes albopictus* (muỗi vằn), đang di chuyển về phía Bắc trên toàn cầu. Theo Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ, cả hai loài muỗi này hiện có mặt khắp nơi ở Nam Texas. Sự lan rộng của muỗi mang dengue ở phía Bắc không chỉ giới hạn ở Mỹ, mà còn được quan sát thấy ở châu Âu.

Gần đây (Tháng 12, 2015), vaccin dengue do Sanofi Pasteur sản xuất lần đầu tiên được chấp nhận ở Mexico. Vaccin này cũng được chấp nhận ở Brazil, Philippin và El Salvador. Quá trình xem xét đang được tiếp tục ở các nước khác, mà ở đó dengue là vấn đề ưu tiên của sức khỏe cộng đồng. Tuy nhiên, vaccin này cần được cải tiến thêm nữa do nó có hiệu lực hạn chế, đặc biệt là khả năng chống lại DENV-1 và -2, hiệu lực thấp ở các đối tượng chưa từng tiếp xúc với flavivirus và thời gian dùng thuốc kéo dài.

Mặc dù có những hạn chế nêu trên, vacxin này là yếu tố có tính chất quyết định làm thay đổi tình hình bệnh dịch vì vacxin này sẽ bảo vệ cho phần lớn dân số, nhưng mà chắc chắn không phải là trẻ sơ sinh, người mang virus gây bệnh sốt dengue lớn nhất. Ngoài ra, thời gian dùng thuốc và hiệu lực rất hạn chế ở các đối tượng chưa tiếp xúc với flavivirus làm cho nó không phù hợp và có thể không đáng giá/hiệu quả đối với những người di chuyển từ các khu vực không có bệnh dịch sang các khu vực có bệnh dịch gây sốt dengue. Những hạn chế nêu trên của vacxin virus gây sốt dengue là lý do giải thích tại sao cần có thuốc kháng virus gây sốt dengue trước khi phơi nhiễm.

Hơn nữa, hiện nay, thuốc kháng virus đặc hiệu để điều trị hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus gây sốt dengue là chưa có sẵn. Rõ ràng, vẫn có nhu cầu về y tế chưa được đáp ứng đối với các trị liệu dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị sự lây nhiễm virus ở động vật, cụ thể hơn là ở người và đặc biệt đối với sự lây nhiễm virus do Flavivirus gây ra, cụ thể hơn là virus gây sốt dengue. Vẫn cần có các hợp chất có hiệu lực kháng virus tốt, không có hoặc có mức độ tác dụng phụ thấp, phổ hoạt động rộng chống lại nhiều týp huyết thanh của virus gây sốt dengue, độc tính thấp và/hoặc có các đặc tính dược động học hoặc dược lực học tốt.

Sáng chế đề xuất hợp chất, dẫn xuất indol được thế một lần hoặc hai lần, thể hiện hoạt tính tiềm năng cao chống lại tất cả bốn (4) týp huyết thanh của virus gây sốt dengue. Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế cũng có profin dược động học tốt và các hợp chất cụ thể này thể hiện độ ổn định bất đối xứng được cải thiện một cách đáng ngạc nhiên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

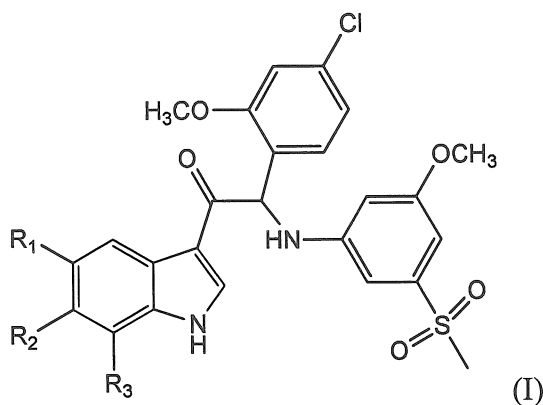
Sáng chế dựa trên phát hiện bất ngờ rằng ít nhất một trong số các vấn đề được đề cập trên đây có thể được giải quyết bằng các hợp chất hiện nay theo sáng chế này.

Sáng chế đề xuất các hợp chất được thấy là có hoạt tính kháng virus hiệu nghiệm chống lại cả bốn (4) týp huyết thanh đã được biết hiện nay. Sáng chế còn chứng tỏ rằng các hợp chất này ức chế một cách hiệu quả sự tăng sinh của virus gây sốt dengue (DENV). Do đó, các hợp chất này cấu thành lớp hợp chất hiệu nghiệm hữu dụng, có thể được sử dụng trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus ở động vật, động vật có vú và người, cụ thể hơn để điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus gây sốt dengue.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các hợp chất này để làm thuốc và để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus, cụ thể sự lây nhiễm virus thuộc họ virus gây sốt dengue ở động vật hoặc động vật có vú, cụ thể hơn là ở người. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tổng hợp tất cả các hợp chất như vậy và dược phẩm chứa chúng với lượng hữu hiệu.

Sáng chế còn đề cập đến lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều hợp chất như vậy, hoặc muối được dụng của nó tùy ý kết hợp với một hoặc nhiều thuốc khác, như chất kháng virus khác hoặc vaccin virus gây sốt dengue hoặc cả hai, để điều trị hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus gây sốt dengue ở bệnh nhân cần điều trị.

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



dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của nó chứa nhóm indol được thế một lần hoặc hai lần; hợp chất này được chọn từ nhóm trong đó:

R_1 là H, R_2 là F và R_3 là H hoặc CH_3 ,

R_1 là H, CH_3 hoặc F, R_2 là OCH_3 và R_3 là H,

R_1 là H, R_2 là OCH_3 và R_3 là CH_3 ,

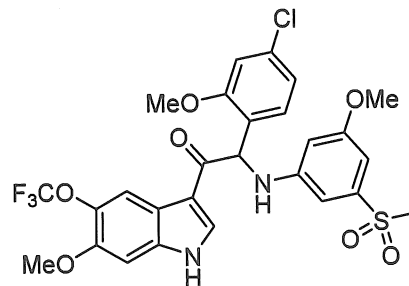
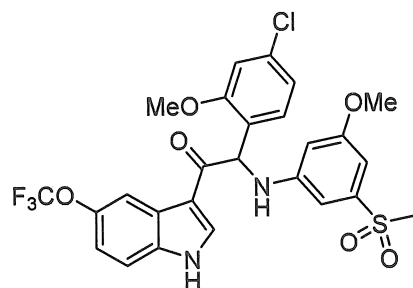
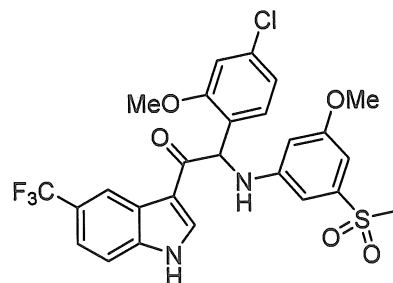
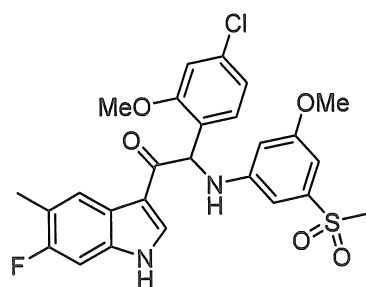
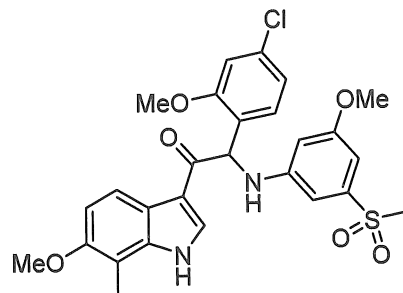
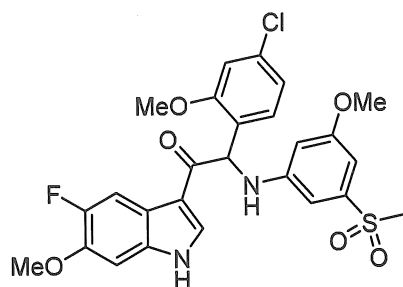
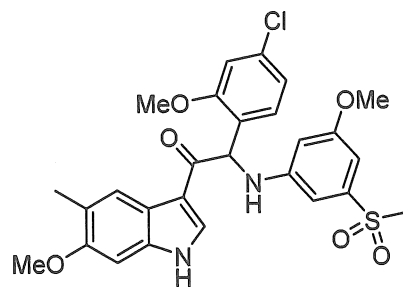
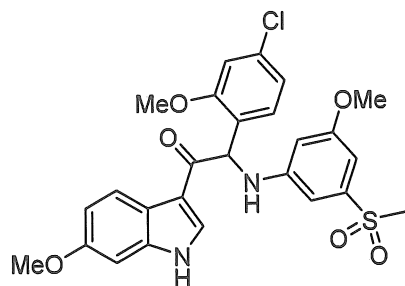
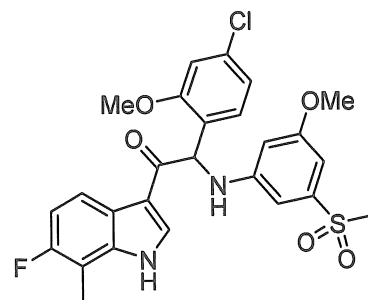
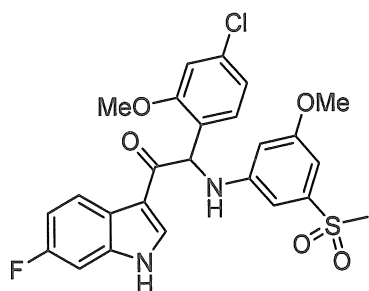
R_1 là CH_3 , R_2 là F và R_3 là H,

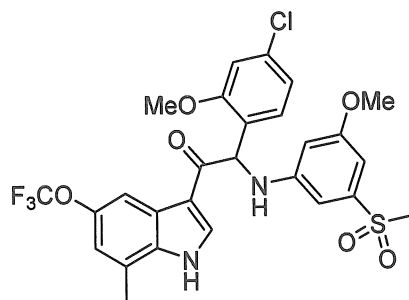
R_1 là CF_3 hoặc OCF_3 , R_2 là H và R_3 là H,

R_1 là OCF_3 , R_2 là OCH_3 và R_3 là H và

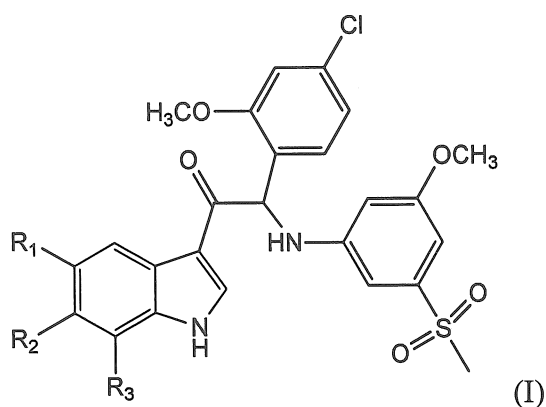
R_1 là OCF_3 , R_2 là H và R_3 là CH_3 .

Cụ thể, hợp chất theo sáng chế hoặc dạng đồng phân lập thể của nó, muối, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của nó được chọn từ nhóm:





Khía cạnh khác theo sáng chế là hợp chất có công thức cấu trúc (I) sau:



dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó chứa nhóm indol được thế một lần hoặc hai lần; hợp chất này được chọn từ nhóm trong đó:

R_1 là H, R_2 là F và R_3 là H hoặc CH_3 ,

R_1 là H, CH_3 hoặc F, R_2 là OCH_3 và R_3 là H và

R_1 là H, R_2 là OCH_3 và R_3 là CH_3 ,

R_1 là CH_3 , R_2 là F và R_3 là H,

R_1 là CF_3 hoặc OCF_3 , R_2 là H và R_3 là H,

R_1 là OCF_3 , R_2 là OCH_3 và R_3 là H và

R_1 là OCF_3 , R_2 là H và R_3 là CH_3

để ức chế quá trình sao chép của virus gây sốt dengue trong mẫu sinh học hoặc bệnh nhân.

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Muối được dùng của hợp chất có công thức (I) bao gồm muối bazơ và muối cộng axit của nó. Muối cộng axit thích hợp được tạo thành từ axit mà tạo thành muối không độc. Muối bazơ thích hợp được tạo thành từ bazơ mà tạo thành muối không độc.

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

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

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng sản phẩm kết tinh hoặc vô định hình. Chúng có thể thu được ví dụ dưới dạng đốm rắn, bột, hoặc màng bằng các phương pháp như kết tủa, kết tinh, sấy đông khô, sấy phun, hoặc làm khô bay hơi. Chúng có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất theo sáng chế khác hoặc kết hợp với một hoặc nhiều thuốc khác. Nhìn chung, chúng sẽ được sử dụng dưới dạng chế phẩm kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dùng. Thuật ngữ “tá dược” được sử dụng ở đây để mô tả thành phần bất kỳ khác với (các) hợp chất theo sáng chế. Việc lựa chọn tá dược phụ thuộc nhiều vào các yếu tố như cách thức sử dụng cụ thể, ảnh hưởng của tá dược đến độ hòa tan và độ ổn định, và bản chất của dạng liều lượng.

Hợp chất theo sáng chế hoặc nhóm phụ bất kỳ của nó có thể được tạo công thức thành các dạng được khác nhau cho các mục đích sử dụng. Để làm chế phẩm thích hợp, có thể kể đến tất cả các chế phẩm thường được sử dụng để dùng thuốc toàn thân. Để bào chế được phẩm theo sáng chế, lượng hữu hiệu của hợp chất cụ thể, tùy ý ở dạng muối cộng, làm hoạt chất được kết hợp trong hỗn hợp được trộn nhuyển với chất mang được dùng, chất mang này có thể có nhiều dạng khác nhau tùy thuộc vào dạng chế phẩm mong muốn để sử dụng. Các dược phẩm này tốt hơn nếu ở dạng liều lượng đơn vị thích hợp, ví dụ, để sử dụng qua đường miệng hoặc qua trực tràng. Ví dụ, khi bào chế chế phẩm ở dạng liều lượng dùng qua đường miệng, môi trường được thông thường bất kỳ có thể được sử dụng như, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và các môi trường tương tự trong trường hợp của chế phẩm lỏng dùng qua đường miệng như huyền phù, xi rô, cốm ngọt, nhũ tương, và dung dịch; hoặc chất mang rắn như tinh bột,

đường, cao lạnh, chất pha loãng, chất làm trơn, chất kết dính, chất làm phân rã và các chất tương tự trong trường hợp của bột, viên tròn, viên nang, và viên nén. Vì dễ sử dụng nên viên nén và viên nang là dạng đơn vị liều lượng dùng qua đường miệng thuận lợi nhất, trong trường hợp này chất mang được rã tất yếu được sử dụng. Cũng được bao gồm là chế phẩm dạng rắn mà có thể được biến đổi, ngay trước khi sử dụng, thành dạng lỏng.

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

Chuyên gia trong việc điều trị các bệnh lây nhiễm sẽ có thể xác định được lượng hữu hiệu từ các kết quả thử nghiệm được đưa ra sau đây trong bản mô tả này. Nhìn chung, dự tính rằng lượng hữu hiệu hằng ngày sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 50 mg/kg thể trọng, tốt hơn nữa là từ 0,1 mg/kg đến 10 mg/kg thể trọng. Có thể thích hợp nếu sử dụng liều yêu cầu dưới dạng hai, ba, bốn liều phụ hoặc nhiều hơn ở các khoảng thời gian thích hợp trong ngày. Các liều phụ này có thể được bào chế dưới dạng liều lượng đơn vị, ví dụ, chứa từ 1 đến 1000 mg, và cụ thể từ 5 đến 200 mg hoạt chất cho mỗi dạng liều lượng đơn vị.

Liều lượng và tần suất sử dụng chính xác tùy thuộc vào hợp chất có công thức (I) cụ thể được sử dụng, tình trạng bệnh lý cụ thể được điều trị, mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh lý cần được điều trị, độ tuổi, cân nặng và tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân cụ thể cũng như thuốc khác mà cá thể có thể đang dùng, như đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ngoài ra, rõ ràng là lượng hữu hiệu có thể được làm giảm hoặc tăng tùy thuộc vào đáp ứng của đối tượng được điều trị và/hoặc tùy thuộc vào đánh giá của bác sĩ chỉ định hợp chất theo sáng chế. Do đó, lượng hữu hiệu nằm trong khoảng nêu trên chỉ có tính chất hướng dẫn và không được dự định làm giới hạn phạm vi hoặc việc sử dụng sáng chế ở mức độ bất kỳ.

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

Hợp chất theo sáng chế cũng có thể tồn tại ở dạng đồng phân hóa học lập thể của chúng, xác định tất cả các hợp chất có thể có được tạo nên từ cùng các nguyên tử được liên kết bởi cùng trình tự liên kết nhưng có cấu trúc không gian ba chiều khác nhau, mà không thể thay thế lẫn nhau. Trừ khi được đề cập hoặc nêu khác đi, ký hiệu hóa học của các hợp chất bao gồm hỗn hợp của tất cả các dạng đồng phân hóa học lập thể, mà hợp chất này có thể có.

Hỗn hợp nêu trên có thể chứa tất cả các chất đồng phân không đối quang và/hoặc chất đồng phân đối ảnh có cấu trúc phân tử cơ bản của hợp chất này. Tất cả các dạng đồng phân hóa học lập thể của các hợp chất được sử dụng theo sáng chế ở dạng tinh khiết hoặc trong hỗn hợp với nhau đều được dự định được bao gồm trong phạm vi của sáng chế kể cả hỗn hợp raxemic hoặc các raxemat bất kỳ.

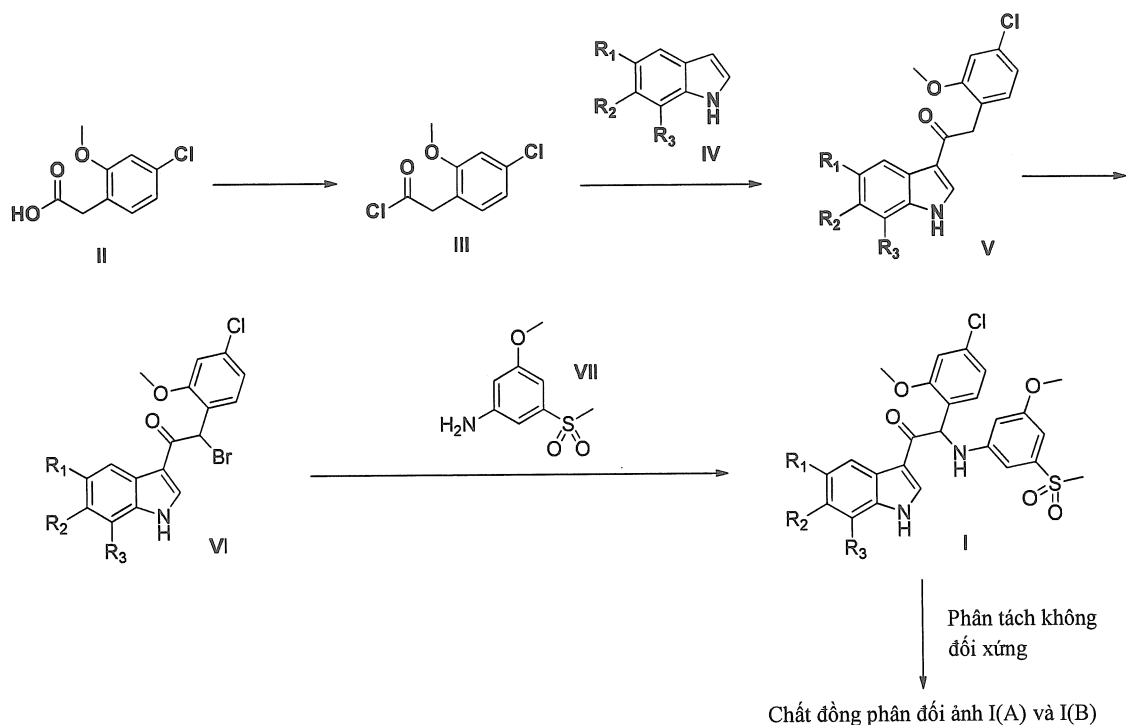
Các dạng đồng phân lập thể tinh khiết của các hợp chất này và hợp chất trung gian như được đề cập trong bản mô tả này được định nghĩa là các chất đồng phân về cơ bản không có các dạng đồng phân đối ảnh hoặc đồng phân không đối quang khác có cùng cấu trúc phân tử cơ bản của các hợp chất hoặc hợp chất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

Các dạng đồng phân lập thể tinh khiết của các hợp chất và hợp chất trung gian được sử dụng theo sáng chế có thể thu được bằng cách áp dụng các quy trình đã biết

trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, các chất đồng phân đối ảnh có thể được tách riêng khỏi nhau bằng cách kết tinh chọn lọc muối đồng phân không đối quang của chúng với các axit hoặc bazơ quang hoạt. Ví dụ của nó là axit tartric, axit dibenzoyltartric, axit ditoluoyltartric và axit camphosulfonic. Theo cách khác, các chất đồng phân đối ảnh có thể được tách riêng bằng các kỹ thuật sắc ký sử dụng các pha cố định không đối xứng. Các dạng đồng phân hóa học lập thể tinh khiết này cũng có thể thu được từ các dạng đồng phân hóa học lập thể tinh khiết tương ứng của các nguyên liệu ban đầu thích hợp, với điều kiện là phản ứng xảy ra theo cách lập thể đặc thù. Tốt hơn là, nếu chất đồng phân lập thể cụ thể được mong muốn, hợp chất này sẽ được tổng hợp bằng phương pháp điều chế lập thể đặc thù. Các phương pháp này sẽ có lợi nếu sử dụng các nguyên liệu ban đầu tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh.

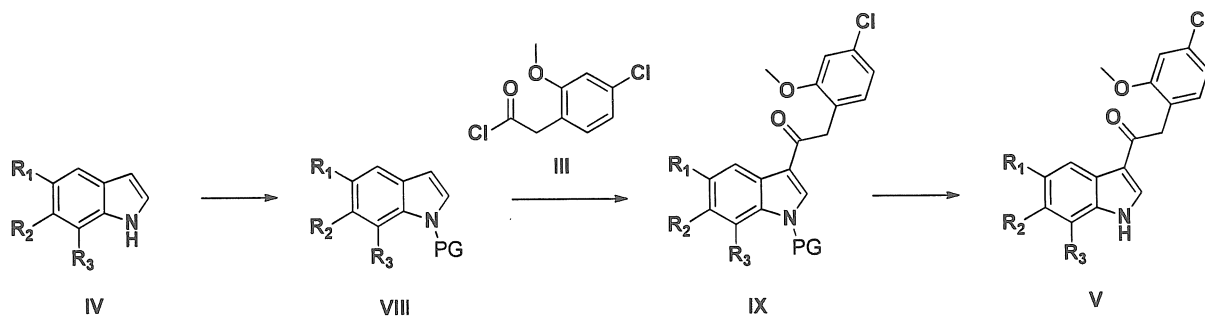
Phương pháp tổng hợp chung

Việc tổng hợp các hợp chất có công thức chung I có thể được thực hiện như được chỉ ra trên sơ đồ 1. Axit 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetic (II) có thể được biến đổi thành 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetyl clorua (III) bằng chất phản ứng clo hóa như, ví dụ, thionyl clorua. Phản ứng Friedel-Crafts của axit clorua III với indol được thể có công thức chung IV có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng axit Lewis như, ví dụ, Et_2AlCl hoặc TiCl_4 trong dung môi thích hợp như, ví dụ, CH_2Cl_2 hoặc 1,2-dicloetan, và trong điều kiện phản ứng thích hợp mà thường (nhưng không duy nhất) bao gồm làm nguội, để tạo ra indol được axyl hóa ở vị trí 3 có công thức chung V. Việc đưa vào gốc anilin ở vị trí alpha so với gốc cacbonyl của hợp chất có công thức chung V có thể được thực hiện bằng trình tự phản ứng bao gồm ví dụ brom hóa V bằng chất phản ứng như, ví dụ, phenyltrimetylamoni tribromua trong dung môi thích hợp như, ví dụ, THF, để tạo ra hợp chất có công thức chung VI, và phản ứng tiếp theo của hợp chất có công thức chung VI với 3-metoxi-5-(metylsulfonyl)anilin (VII) trong dung môi thích hợp như, ví dụ, CH_3CN , và thường sử dụng bazơ như, ví dụ, TEA hoặc DIPEA, để tạo ra hợp chất có công thức chung I dưới dạng hỗn hợp racemic. Sự phân tách không đối xứng của hợp chất có công thức chung I có thể được thực hiện bằng ví dụ phép sắc ký không đối xứng để tạo ra các chất đồng phân đối ảnh A và B có công thức chung I.



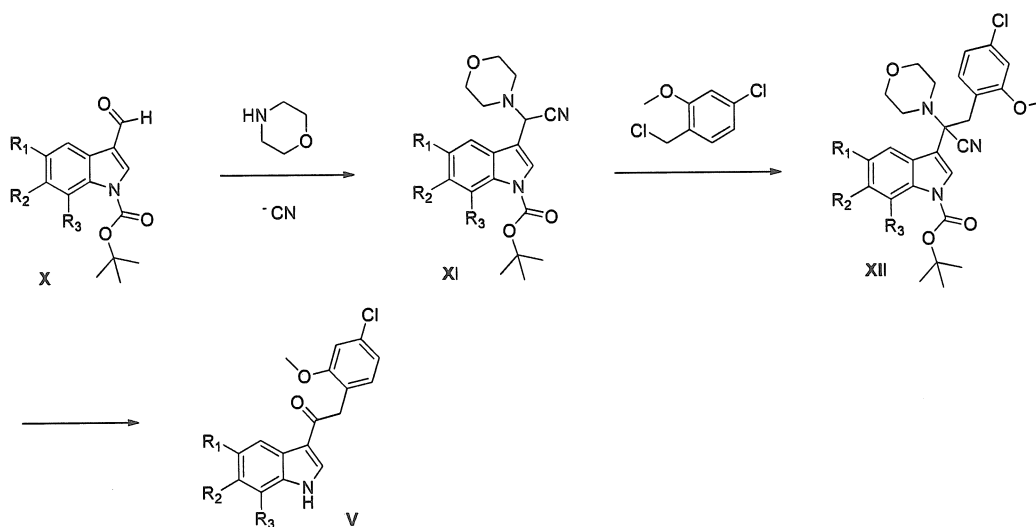
Sơ đồ 1

Trong một vài trường hợp, việc tổng hợp hợp chất trung gian có công thức chung V thông qua phương pháp tổng hợp Friedel-Crafts, có lợi nếu có mặt nhóm bảo vệ (PG) tại indol-N trong suốt bước phản ứng Friedel-Crafts, như được chỉ ra trong sơ đồ 2. Với mục đích này, indol được thể có công thức chung IV có thể được biến đổi trước tiên thành hợp chất trung gian có công thức chung VIII được bảo vệ ở N, như, ví dụ, hợp chất trung gian có công thức chung VIII được tosyl hóa ở N (PG = Ts), sử dụng chất phản ứng như, ví dụ, tosyl clorua, trong sự có mặt của bazơ như, ví dụ, natri hydrua. Phản ứng Friedel-Crafts của indol được thể có công thức chung IV bằng axit clorua III có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng axit Lewis như, ví dụ, Et_2AlCl hoặc TiCl_4 trong dung môi phù hợp như, ví dụ, CH_2Cl_2 hoặc 1,2-dicloetan, và trong điều kiện phản ứng phù hợp mà thông thường (nhưng không duy nhất) gồm việc làm lạnh, để tạo ra indol có công thức chung IX được bảo vệ ở N được axyl hóa ở vị trí 3. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ PG indol-N của hợp chất trung gian có công thức chung IX có thể được thực hiện bằng chất phản ứng như, ví dụ, LiOH (đối với PG = Ts) trong hỗn hợp dung môi như, ví dụ, THF/nước ở nhiệt độ phản ứng phù hợp, để tạo ra indol có công thức chung V được axyl hóa ở vị trí 3.



Sơ đồ 2

Theo phương pháp khác, hợp chất trung gian có công thức chung V cũng có thể được điều chế như được chỉ ra trong sơ đồ 3: indol 3-carbaldehyt được thể được bảo vệ bởi *N*-Boc có công thức chung X có thể được biến đổi thành loại Strecker tương ứng của hợp chất trung gian có công thức chung XI bằng cách phản ứng với morpholin trong sự có mặt của chất phản ứng như, ví dụ, natri xyanua và natri bisulfit và trong dung môi phù hợp như, ví dụ, hỗn hợp của nước và dung môi hữu cơ có khả năng trộn lẫn với nước như, ví dụ, dioxan. Quá trình alkyl hóa của hợp chất có công thức chung XI với 4-clo-2-metoxi-benzylclorua có thể được thực hiện trong sự có mặt của bazơ như, ví dụ, kali hexametyldisilazan và trong dung môi phù hợp như, ví dụ, DMF để tạo ra hợp chất có công thức chung XII. Việc đưa hợp chất có công thức chung XII vào điều kiện thủy phân axit chứa nước phù hợp như, ví dụ, bằng cách xử lý bằng dung dịch axit clohydric chứa nước ở nhiệt độ cao, tạo ra hợp chất trung gian có công thức chung V.



Sơ đồ 3

Ví dụ

Phương pháp LC/MS

Phép đo sắc ký lỏng cao áp (HPLC) được thực hiện bằng cách sử dụng bơm LC, mảng điot (DAD) hoặc bộ dò UV và cột như được chỉ rõ trong các phương pháp tương ứng. Nếu cần, các bộ dò bổ sung được bao gồm (xem bảng liệt kê các phương pháp dưới đây).

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

Các hợp chất được mô tả bằng thời gian lưu trữ (R_t) thử nghiệm của chúng và ion. Nếu không được chỉ rõ theo cách khác trong bảng số liệu, ion phân tử được báo cáo tương ứng với $[M+H]^+$ (phân tử được proton hóa) và/hoặc $[M-H]^-$ (phân tử được khử proton hóa). Trong trường hợp hợp chất không thể được ion hóa trực tiếp, thì loại sản phẩm cộng được chỉ rõ (nghĩa là $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$, v.v.). Đối với các phân tử với nhiều kiểu đồng vị (Br, Cl), giá trị được báo cáo là giá trị thu được đối với khối lượng chất đồng vị thấp nhất. Tất cả các kết quả thu được với độ bất định thử nghiệm mà thường có liên quan đến phương pháp được sử dụng.

Sau đây, trong bản mô tả này, “SQD” nghĩa là Bộ dò tứ cực đơn, “MSD” là bộ dò chọn lọc khối lượng, “RT” là nhiệt độ trong phòng, “BEH” là thể lai silic oxit/etylsiloxan được liên kết cầu, “DAD” là bộ dò mảng điot, “HSS” là silic oxit độ bền cao.

Mã phương pháp LCMS (lưu lượng được biểu thị bằng mL/phút; nhiệt độ cột (T) tính bằng °C; thời gian chạy tính bằng phút)

Mã phương pháp	Thiết bị	Cột	Pha động	Gradient	Dòng chảy ----- Nhiệt độ cột	Thời gian chạy (phút)
----------------	----------	-----	----------	----------	------------------------------------	-----------------------

LC-A	Waters: Acquity® UPLC® - DAD-SQD	Waters: BEH C18 (1,7µm, 2,1x50m m)	A: 10mM CH ₃ COONH ₄ trong 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	Từ 95% A đến 5% A trong 1,3 phút, được giữ trong 0,7 phút	0,8 mL/phút ----- 55°C	2
LC-B	Waters: Acquity® UPLC® - DAD-SQD	Waters: HSS T3 (1,8µm, 2,1x100m m)	A: 10mM CH ₃ COONH ₄ trong 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	Từ 100% A đến 5% A trong 2,10 phút, đến 0% A trong 0,90 phút, đến 5% A trong 0,5 phút	0,7 mL/phút ----- 55°C	3,5
LC-C	Waters: Acquity® UPLC® - DAD-Quattro Micro™	Waters: BEH C18 (1,7µm, 2,1x100m m)	A: 95% CH ₃ COONH ₄ 7mM / 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	84,2% A trong 0,49 phút, đến 10,5% A trong 2,18 phút, được giữ trong 1,94 phút, trở về 84,2% A trong 0,73 phút, được giữ trong 0,73 phút	0,343 mL/phút ----- 40°C	6,2
LC-D	Waters: Acquity® UPLC® - DAD-máy dò Acquity® TQ	Waters: BEH C18 (1,7µm, 2,1x50m m)	A: 10mM CH ₃ COONH ₄ (được điều chỉnh ở pH 10) B: CH ₃ CN	Từ 50% A đến 10% A trong 3,5 phút, được giữ trong 1,5 phút	0,5 mL/phút ----- 40°C	5

Phương pháp SFC-MS

Phép đo SFC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ sắc ký lỏng siêu tới hạn (SFC) phân tích bao gồm bơm hai thành phần để phân phối cacbon dioxide (CO₂) và chất cải biến, thiết bị lấy mẫu tự động, lò sấy cột, bộ dò mảng điốt được trang bị ô dòng chảy áp suất cao lên đến 400 bar. Nếu được tạo cấu hình với khối phổ kế (MS), dòng chảy từ cột được đưa đến (MS). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết cách thiết lập các thông số điều chỉnh (ví dụ, khoảng quét, thời gian dừng...) để thu được các ion cho phép nhận diện khối lượng phân tử (MW) đơn đồng vị danh định của hợp chất. Việc thu nhận số liệu được thực hiện bằng phần mềm thích hợp.

Phương pháp SFC-MS phân tích (lưu lượng được biểu thị bằng mL/phút; nhiệt độ cột (T) tính bằng °C; thời gian chạy tính bằng phút, áp suất ngược (BPR) tính bằng bar.

Mã phương pháp	Cột	Pha động	Gradient	Dòng chảy ----- Nhiệt độ cột	Thời gian chạy ----- - BPR
SFC-A	WHELK-O1 (S,S) 5 µm 250 x 4,6 mm Regis	A: CO ₂ B: MeOH	50% B giữ 7 phút,	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-B	Cột Daicel Chiralpak® IC-H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH	40% B giữ 7 phút,	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-C	WHELK-O1 (S,S) 5 µm 250 x 4,6 mm Regis	A: CO ₂ B: MeOH	60% B giữ 9 phút,	3 ----- 35	9 ----- 100
SFC-D	Cột Daicel Chiralpak® IA-H (5 µm, 250 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH	50% B giữ 7 phút,	3 ----- 35	7 ----- 100

Mã phương pháp	Cột	Pha động	Gradient	Dòng chảy	Thời gian chạy
				Nhiệt độ cột	- BPR
SFC-E	Cột Daicel Chiralpak® AS3 (3,0 μ m, 150 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH +0,2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O	10%-50% B trong 6 phút, giữ 3,5 phút	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-F	Cột Daicel Chiralpak® AD-H (5,0 μ m, 150 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: iPrOH +0,3% iPrNH ₂	30% B giữ 7 phút	3 ----- 35	7 ----- 100

Điểm nóng chảy

Các giá trị là giá trị đỉnh hoặc khoảng tan chảy, và thu được với độ bất định thử nghiệm thường có liên quan đến phương pháp phân tích này.

DSC823e (được biểu thị dưới dạng DSC)

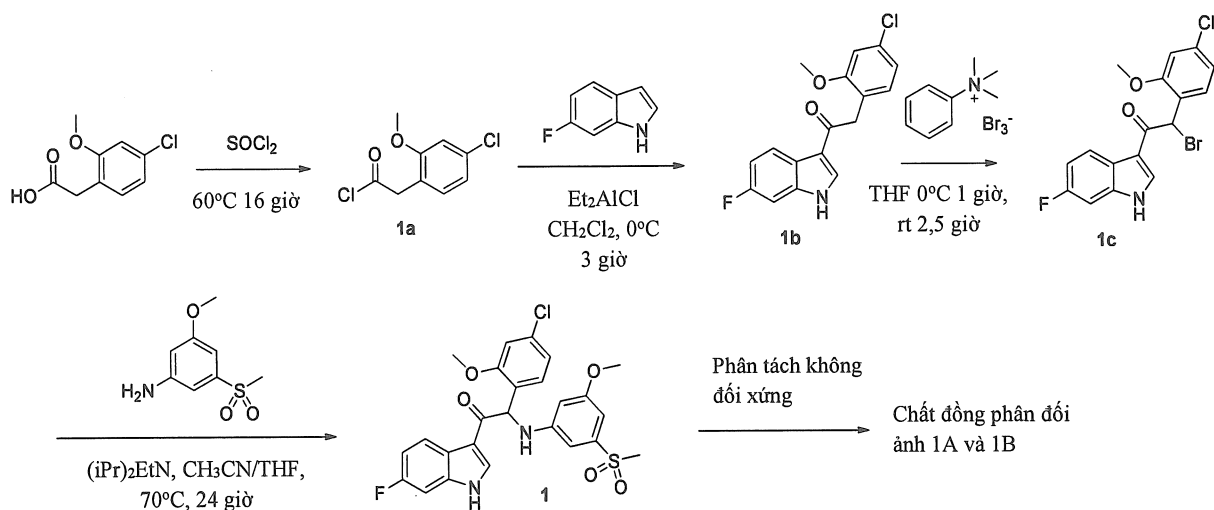
Đối với một số hợp chất, điểm nóng chảy được xác định bằng DSC823e (Mettler-Toledo). Điểm nóng chảy được xác định bằng gradient nhiệt độ bằng 10°C/phút. Nhiệt độ tối đa là 300°C.

Sự quay quang học

Sự quay quang học được xác định trên phân cực kế Perkin-Elmer 341 với đèn natri và được biểu thị như sau: $[\alpha]^{\circ}(\lambda, c \text{ g/100ml, dung dịch, T}^{\circ}\text{C})$.

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

Ví dụ 1: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-flo-1*H*-indol-3-yl)-2-((3-metox-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)etanon (hợp chất 1) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 1A và 1B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 1a:

Axit 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetic [CAS 170737-95-8] (5,8 g, 28,9 mmol) được bổ sung trong các phần nhỏ vào thionyl clorua (50 mL) và dung dịch thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ 60°C . Dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm và đồng bay hơi với toluen để thu được 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetyl clorua 1a (6,5 g) dưới dạng cặn dầu, cặn dầu này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất trung gian 1b:

Dietyl nhôm clorua 1M trong hexan (37,1 mL, 37,1 mmol) được bổ sung nhỏ giọt ở nhiệt độ 0°C vào dung dịch chứa 6-flo-1*H*-indol [CAS 399-51-9] (3,34 g, 24,76 mmol) trong CH_2Cl_2 (100 mL). Sau 30 phút ở nhiệt độ 0°C , dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetyl clorua 1a (6,3 g, 28,76 mmol) trong CH_2Cl_2 (100 mL) được bổ sung từ từ ở nhiệt độ 0°C . Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 3 giờ. Nước đá được bổ sung và phần kết tủa được lọc, được rửa bằng nước và một lượng nhỏ CH_2Cl_2 . Phần rắn được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 70°C qua đêm để thu được 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-flo-1*H*-indol-3-yl)etanon 1b (4,9 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 1c:

Ở nhiệt độ 0°C , dung dịch chứa phenyltrimetylamonitribromua [CAS 4207-56-1] (5,8 g, 15,4 mmol) trong THF (65 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp chứa 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-flo-1*H*-indol-3-yl)etanon 1b (4,9 g, 15,4 mmol) trong

THF (60 mL). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 2,5 giờ. Phần kết tủa được lọc và được rửa bằng EtOAc. Phần dịch lọc kết hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hấp thụ bằng EtOAc và được rửa bằng nước. Phần kết tủa xuất hiện trong lớp hữu cơ và được lọc và được làm khô để tạo ra mẻ thứ nhất của 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-flo-1*H*-indol-3-yl)etanon 1c (4,6 g). Lớp hữu cơ được tách, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được kết tinh từ EtOAc, phần kết tủa được lọc, được rửa bằng Et₂O và được làm khô trong chân không để tạo ra phần thứ hai của 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-flo-1*H*-indol-3-yl)etanon 1c (1,6 g).

Tổng hợp hợp chất 1 và phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh 1A và 1B:

Hỗn hợp chứa 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-flo-1*H*-indol-3-yl)etanon 1c (3 g, 7,56 mmol), 3-metox-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (2,28 g, 11,35 mmol) và diisopropyletylamin (1,95 mL, 11,35 mmol) trong CH₃CN (60 mL) và THF (30 mL) được khuấy ở nhiệt độ 70°C trong 24 giờ. Phản ứng được pha loãng bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được rửa bằng HCl 1N (2 lần) và nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 80 g, pha động: CH₂Cl₂/MeOH 99,5/0,5). Quá trình tinh chế lần thứ hai được thực hiện bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 80 g, pha động: CH₂Cl₂/MeOH 99,7/0,3). Các phân đoạn tinh khiết được kết hợp và được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-flo-1*H*-indol-3-yl)-2-((3-metox-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)etanon (hợp chất 1, 2 g) dưới dạng hỗn hợp raxemic.

Các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 1 được tách riêng thông qua SFC không đối xứng (pha cố định: Chiralpak® AD-H 5 µm 20 x 250 mm, pha động: 50% CO₂, 50% MeOH) tạo ra 740 mg chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất và 720 mg chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai. Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất được kết tinh từ CH₃CN/Et₂O. Phần kết tủa được lọc và được làm khô để thu được chất đồng phân đối ảnh 1A (645 mg). Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai được kết tinh

từ CH₃CN/Et₂O. Phần kết tủa được lọc và được làm khô để thu được chất đồng phân đối ảnh 1B (632 mg).

Hợp chất 1:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,24 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 6,58 (s, 2 H) 6,91 (s, 1 H) 6,97 (dd, *J*=8,7, 1,9 Hz, 1 H) 7,02 - 7,09 (m, 2 H) 7,12 (d, *J*=1,9 Hz, 1 H) 7,27 (dd, *J*=9,5, 1,9 Hz, 1 H) 7,35 (d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 8,14 (dd, *J*=8,7, 5,5 Hz, 1 H) 8,44 (s, 1 H) 12,10 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,08 phút, MH⁺ 517

Điểm nóng chảy: 174°C

Chất đồng phân đối ảnh 1A:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,24 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 6,59 (s, 2 H) 6,91 (s, 1 H) 6,97 (dd, *J*=8,8, 2,2 Hz, 1 H) 7,02 - 7,10 (m, 2 H) 7,12 (d, *J*=2,2 Hz, 1 H) 7,27 (dd, *J*=9,6, 2,2 Hz, 1 H) 7,35 (d, *J*=8,2 Hz, 1 H) 8,14 (dd, *J*=8,8, 5,7 Hz, 1 H) 8,44 (s, 1 H) 12,10 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,09 phút, MH⁺ 517

[α]_D²⁰: +130,3° (c 0,277, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-D): R_t 3,41 phút, MH⁺ 517, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Điểm nóng chảy: 220°C

Chất đồng phân đối ảnh 1B:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,24 (d, *J*=7,6 Hz, 1 H) 6,53 - 6,65 (m, 2 H) 6,91 (s, 1 H) 6,97 (dd, *J*=8,6, 2,0 Hz, 1 H) 7,01 - 7,09 (m, 2 H) 7,12 (d, *J*=2,0 Hz, 1 H) 7,27 (dd, *J*=9,6, 2,0 Hz, 1 H) 7,35 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 8,14 (dd, *J*=8,6, 5,6 Hz, 1 H) 8,43 (s, 1 H) 12,09 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,09 phút, MH⁺ 517

[α]_D²⁰: -135,3° (c 0,283, DMF)

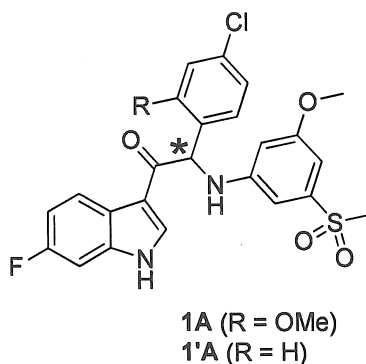
SFC không đối xứng (phương pháp SFC-D): R_t 4,89 phút, MH⁺ 517, độ tinh khiết không đối xứng 99,35%.

Điểm nóng chảy: 218°C

Ví dụ 1.1: Độ ổn định bất đối xứng của chất đồng phân đối ảnh 1A ở độ pH 7,4

Độ ổn định bất đối xứng của chất đồng phân đối ảnh 1A (R = OMe) được đánh giá bằng cách xác định lượng dư đồng phân đối ảnh (ee%) sau khi ủ trong 24 giờ và 48 giờ trong dung dịch được đệm ở độ pH 7,4 ở nhiệt độ 40°C và 60°C. Để đánh giá ảnh hưởng của phân tử thế metoxy của chất đồng phân đối ảnh 1A (R = OMe) đến độ ổn định chống lại sự racemic hóa, độ ổn định bất đối xứng của chất đồng phân đối ảnh 1'A (R = H) được thử nghiệm trong cùng điều kiện.

Với mục đích này, dung dịch 5 μ M được đệm (pH = 7,4) chứa hợp chất 1A và 1'A được điều chế bằng cách trộn 25 μ L dung dịch 100 μ M chứa hợp chất 1A hoặc 1'A trong DMSO bằng 475 μ L đệm chứa nước có độ pH 7,4. Các mẫu được lấy 24 giờ và 48 giờ sau khi ủ ở nhiệt độ 40°C và 60°C. Các mẫu phân tích được phân tích bằng SFC không đối xứng (dò MS) và độ tinh khiết không đối xứng được biểu thị dưới dạng lượng dư đồng phân đối ảnh (ee % = % chất đồng phân đối ảnh A - % chất đồng phân đối ảnh B). Cả 2 chất đồng phân đối ảnh 1A và 1'A có độ tinh khiết không đối xứng bằng 100% trước khi ủ.



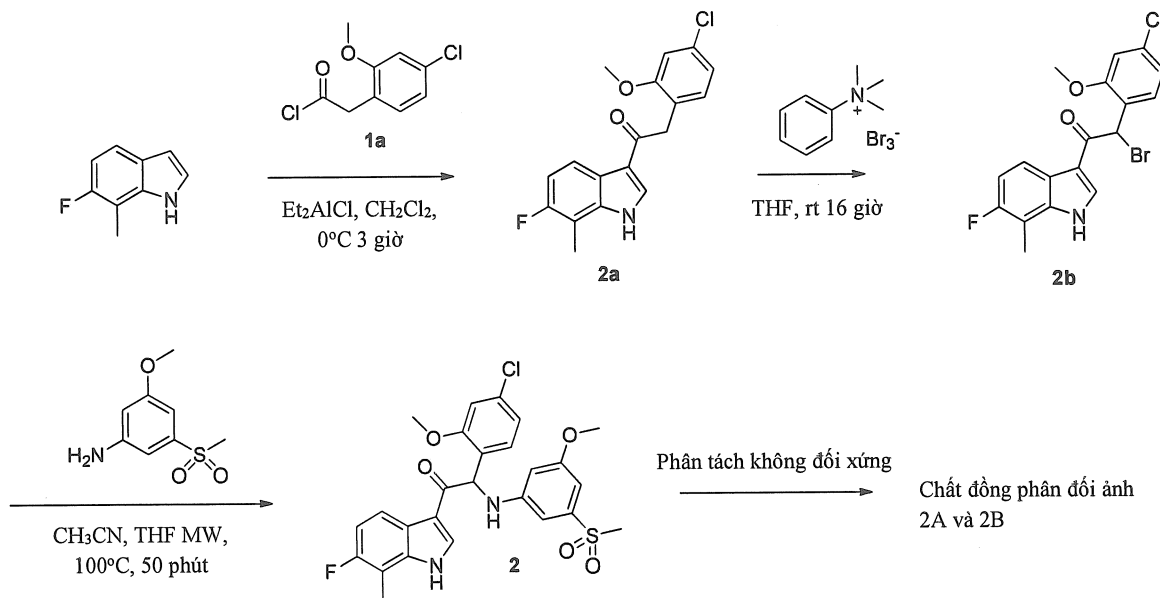
Hợp chất	Nhiệt độ	ee%	
		Thời điểm lấy mẫu (giờ)	
		24	48
1A	40°C	100	100
	60°C	95	88
1'A	40°C	21	10

60°C

0

0

Ví dụ 2: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-flo-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)-2-((3-metoxi-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)etanon (hợp chất 2) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 2A và 2B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 2a:

Dietyl nhôm clorua 1M trong hexan (20 mL, 20,0 mmol) được bổ sung nhỏ giọt ở nhiệt độ 0°C vào dung dịch chứa 6-flo-7-metyl-1*H*-indol [CAS 57817-10-4] (1,50 g, 10,1 mmol) trong CH₂Cl₂ (45 mL). Sau 30 phút ở nhiệt độ 0°C, dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetyl clorua (3,30 g, 15,1 mmol, tổng hợp: xem ví dụ 1) trong diclometan (30 mL) được bổ sung từ từ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 3 giờ. Dung dịch muối Rochelle 1M (50 mL) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Phần rắn được lọc và được phân bố giữa EtOAc và HCl 1N. Các pha được tách riêng. Pha chứa nước được chiết bằng EtOAc. Các pha hữu cơ được kết hợp, được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được nghiền thành bột bằng EtOAc và heptan. Phần kết tủa được lọc để thu được 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-flo-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 2a (2,00 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 2b:

Dung dịch chứa phenyltrimethylamoni tribromua [CAS 4207-56-1] (2,49 g, 6,6 mmol) trong THF (45 mL) được bổ sung nhỏ giọt ở nhiệt độ 0°C vào dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-flo-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 2a (2,00 g, 6,0 mmol) trong THF (65 mL). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Phần kết tủa được lọc và được rửa bằng EtOAc. Phần dịch lọc kết hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hấp thụ với lượng tối thiểu của axetonitril. Phần kết tủa được lọc, được rửa bằng axetonitril và được làm khô trong chân không để thu được mẻ thứ nhất của 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-flo-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 2b (1,51 g). Phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hấp thụ với lượng tối thiểu của axetonitril. Phần kết tủa được lọc, được rửa bằng axetonitril và được làm khô trong chân không để thu được phần thứ hai của 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-flo-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 2b (0,70 g).

Tổng hợp hợp chất 2 và phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh 2A và 2B:

Hỗn hợp chứa 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-flo-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 2b (1,8 g, 4,36 mmol) và 3-metoxy-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (2,6 g, 13,0 mmol) trong THF (9 mL) và CH₃CN (9 mL) được làm nóng ở nhiệt độ 100°C trong điều kiện chiếu xạ vi sóng trong 50 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng EtOAc và được rửa bằng HCl 1N. Các pha được tách riêng. Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa trong nước và nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hấp thụ với lượng tối thiểu của axetonitril. Phần kết tủa được lọc, được rửa bằng axetonitril và được làm khô trong chân không để thu được 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-flo-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)-2-((3-metoxy-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)etanon (hợp chất 2, 1,7 g) dưới dạng hỗn hợp raxemic.

Quá trình phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 2 (1,59 g) được thực hiện thông qua SFC điều chế (pha cố định: (S,S)-Whelk-O1 5 µm 250 x 21,1 mm, pha động: 50% CO₂, 50% MeOH). Các phân đoạn sản phẩm được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (746 mg) được tinh chế tiếp bằng sắc ký cột trên silicagel (15-40 µm, 24 g, pha động: CH₂Cl₂/MeOH 99,5/0,5). Các phân đoạn tinh khiết được kết hợp và được

làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm (560 mg). Phần cặn được hóa rắn bằng cách nghiền thành bột với hỗn hợp chứa Et₂O và một vài giọt CH₃CN. Phần rắn được lọc và được làm khô trong chân không để thu được chất đồng phân đối ảnh 2A (473 mg). Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (732 mg) được tinh chế tiếp bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel (15-40 μ m, 24 g, pha động: CH₂Cl₂/MeOH 99,5/0,5). Các phân đoạn tinh khiết được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm (550 mg). Phần cặn được hóa rắn bằng cách nghiền thành bột bằng hỗn hợp chứa Et₂O và một vài giọt CH₃CN. Phần rắn được lọc và được làm khô trong chân không để thu được chất đồng phân đối ảnh 2B (457 mg).

Hợp chất 2:

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2,38 (d, *J*=1,5 Hz, 3 H) 3,10 (s, 3 H) 3,73 (s, 3 H) 4,01 (s, 3 H) 6,27 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 6,55 – 6,63 (m, 2 H) 6,93 (m, 1 H) 6,94 – 7,09 (m, 3 H) 7,13 (d, *J*=1,9 Hz, 1 H) 7,35 (d, *J*=8,3 Hz, 1 H) 7,97 (dd, *J*=8,7, 5,3 Hz, 1 H) 8,45 (s, 1H) 12,23 (br. s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-D): R_t 1,68 phút, MH⁺ 531

Chất đồng phân đối ảnh 2A:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2,37 - 2,39 (m, 3 H) 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 4,01 (s, 3 H) 6,26 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 6,54 - 6,63 (m, 2 H) 6,92 (s, 1 H) 6,97 (dd, *J*=8,4, 1,9 Hz, 1 H) 7,02 (dd, *J*=9,9, 9,0 Hz, 1 H) 7,07 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 7,13 (d, *J*=1,9 Hz, 1 H) 7,35 (d, *J*=8,4 Hz, 1 H) 7,96 (dd, *J*=8,5, 5,4 Hz, 1 H) 8,45 (s, 1 H) 12,24 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,20 phút, MH⁺ 531

[α]_D²⁰: +104,5° (c 0,2545, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-A): R_t 4,22 phút, MH⁺ 531, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 2B:

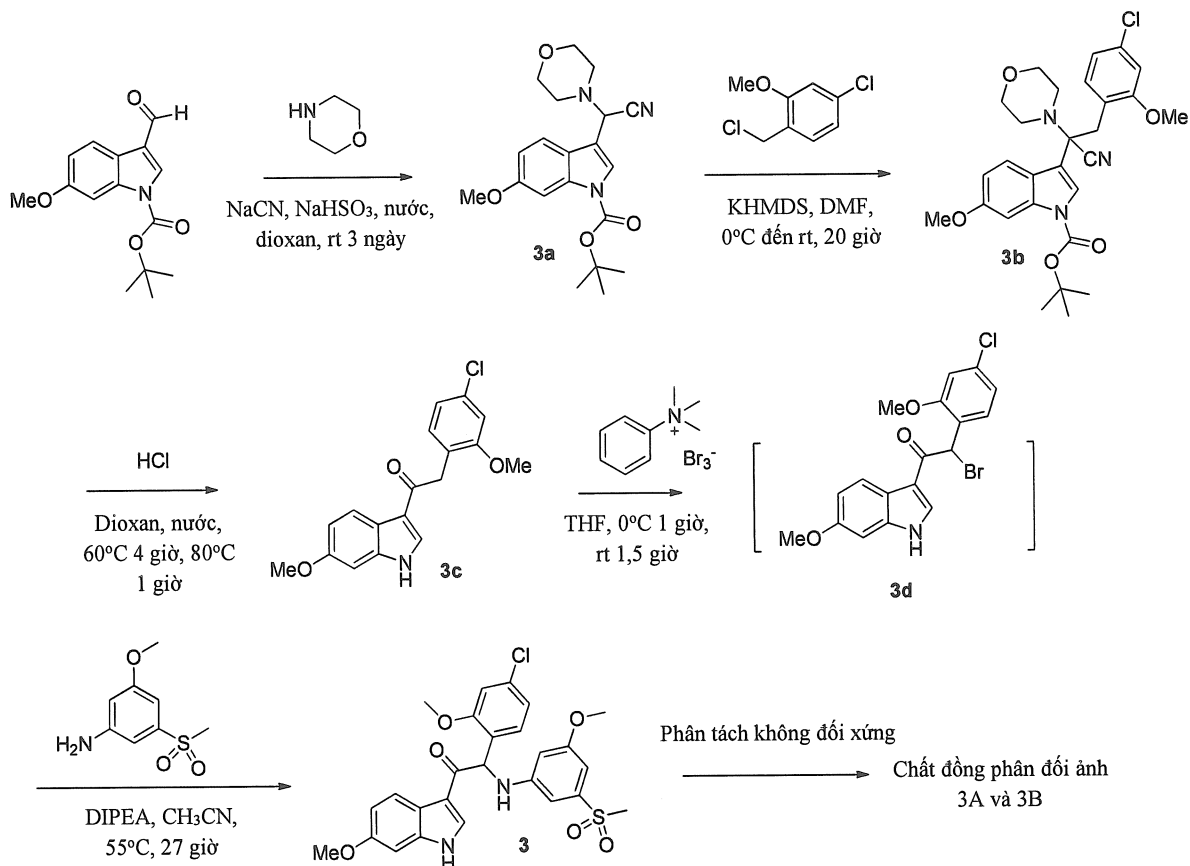
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,36 - 2,41 (m, 3 H) 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 4,01 (s, 3 H) 6,26 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 6,57 - 6,64 (m, 2 H) 6,92 (s, 1 H) 6,97 (dd, $J=8,2, 1,9$ Hz, 1 H) 6,99 - 7,04 (m, 1 H) 7,07 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,13 (d, $J=1,9$ Hz, 1 H) 7,35 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,96 (dd, $J=8,7, 5,2$ Hz, 1 H) 8,45 (s, 1 H) 12,24 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,20 phút, MH^+ 531

$[\alpha]_D^{20}$: $-104,1^\circ$ (c 0,2536, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-A): R_t 5,12 phút, MH^+ 531, độ tinh khiết không đối xứng 99,53%.

Ví dụ 3: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-metoxi-1*H*-indol-3-yl)-2-((3-metoxi-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)etanon (hợp chất 3) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 3A và 3B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 3a:

Dung dịch chứa NaHSO₃ (5,7 g, 54,5 mmol) trong nước (45 mL) được bổ sung vào dung dịch đang khuấy chứa *tert*-butyl 3-formyl-6-metoxyl-1*H*-indol-1-carboxylat [CAS 847448-73-1] (10 g, 36,3 mmol) trong dioxan (45 mL). Sau 15 phút, morpholin (4,8 mL, 54,5 mmol) được bổ sung và 35 phút sau, natri xyanua (NaCN) (1,96 g, 40 mmol) được bổ sung. Huyền phù thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày, cho tới khi hoàn thành phản ứng. Sản phẩm được lọc và được rửa bằng hỗn hợp theo tỷ lệ 1/1 của dioxan/nước (3 x 35 mL), và sau đó bằng nước (3 x 45 mL) và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 60°C. Phần rắn được khuấy trong Et₂O (125 mL), được lọc, được rửa bằng Et₂O (3 lần) và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra *tert*-butyl 3-(xyano(morpholino)metyl)-6-metoxyl-1*H*-indol-1-carboxylat 3a (12,3 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 3b:

Hỗn hợp chứa *tert*-butyl 3-(xyano(morpholino)metyl)-6-metoxyl-1*H*-indol-1-carboxylat 3a (6,0 g, 16,2 mmol) trong DMF khan (80 mL) được khuấy trong môi trường khí N₂ trong khi làm lạnh trên bể nước đá. Dung dịch chứa KHMDS 0,5 M trong toluen (35,5 mL, 17,8 mmol) được bổ sung nhỏ giọt trong 10 phút. Sau khi khuấy trong 10 phút nữa, 4-clo-1-(clometyl)-2-metoxylbenzen [CAS 101079-84-9] (3,09 g, 16,2 mmol) được bổ sung và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. Hỗn hợp phản ứng được rót vào nước lạnh (400 mL) và sản phẩm được chiết bằng Et₂O (2 lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và đồng bay hơi với xylen. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh (pha cố định: Grace Reveleris® silica 120 g, pha động: heptan/EtOAc gradien 100/0 đến 20/80). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và đồng bay hơi với dioxan để thu được *tert*-butyl 3-(2-(4-clo-2-metoxylphenyl)-1-xyano-1-morpholinoetyl)-6-metoxyl-1*H*-indol-1-carboxylat 3b (7,75 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 3c:

Bổ sung dung dịch chứa HCl 6 M trong isopropanol (36,8 mL, 220 mmol) vào huyền phù đã khuấy của *tert*-butyl 3-(2-(4-clo-2-metoxylphenyl)-1-xyano-1-morpholinoetyl)-6-metoxyl-1*H*-indol-1-carboxylat 3b (7,75 g, 14,7 mmol) trong dioxan (40 mL) và nước (20 mL). Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ 60°C

trong 4 giờ và sau đó ở nhiệt độ 80°C trong 1 giờ. Sau khi làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được để yên trong 20 giờ để cho phép quá trình kết tinh của sản phẩm phản ứng. Sản phẩm được lọc, được rửa bằng hỗn hợp theo tỷ lệ 1/1/1 của *i*PrOH/H₂O/dioxan (2x 15 mL) và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-metox-1*H*-indol-3-yl)etanon 3c (3,67 g).

Tổng hợp hợp chất 3 và phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh 3A và 3B:

Hỗn hợp đã khuấy chứa 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-metox-1*H*-indol-3-yl)etanon 3c (2 g, 6,07 mmol) trong THF (80 mL) được làm lạnh trên bề nước đá trong môi trường khí N₂. Phenyltrimetylamoni tribromua [CAS 4207-56-1] (2,39 g, 6,37 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và sau đó ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. 3-metox-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (3,66 g, 18,2 mmol) được bổ sung và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong CH₃CN (100 mL). Diisopropyletylamin (2,09 mL, 12,1 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được làm nóng ở nhiệt độ 55°C trong 27 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cho phép làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và được rót vào nước đang khuấy (400 mL). Sản phẩm được chiết bằng 2-MeTHF (2 lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn (8 g) được tinh chế bằng sắc ký nhanh (pha cố định: Grace Reveleris® silica 120 g, pha động: heptan/EtOAc gradien từ 100/0 đến 0/100). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn (5,4 g) được tinh chế tiếp bằng HPLC điều chế (pha cố định: RP XBridge® Prep C18 OBD - 10 µm, 50 x 150 mm, pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, CH₃CN). Các phân đoạn sản phẩm được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và sau đó được đồng bay hơi với MeOH. Phần cặn được kết tinh từ hỗn hợp chứa EtOAc (15 mL), CH₃CN (2 mL) và MeOH (2 mL). Phần rắn được lọc, được rửa bằng EtOAc (3 lần) và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-metox-1*H*-indol-3-yl)-2-((3-metox-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)etanon (hợp chất 3, 681 mg) dưới dạng hỗn hợp raxemic.

Quá trình phân tách không đối xứng của các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 3 (0,63 g) được thực hiện thông qua phân tách không đối xứng pha bình thường (pha cố định: AS 20 μ M, pha động: 100% metanol). Các phân đoạn sản phẩm được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất được tinh chế bằng sắc ký nhanh (pha cố định: Grace Reveleris® silica 12 g, pha động: heptan/EtOAc/EtOH gradien từ 100/0/0 đến 40/45/15). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp và được làm bay hơi, và đồng bay hơi với EtOAc. Dầu còn lại được hóa rắn bằng cách khuấy lên trong H₂O (4 mL) và bổ sung từ từ MeOH (1,6 mL). Sau khi khuấy trong 20 phút, sản phẩm được lọc, được rửa (3 lần) bằng hỗn hợp theo tỷ lệ 1/2 của MeOH/H₂O và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 3A (168 mg) dưới dạng chất rắn vô định hình. Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai được tinh chế bằng sắc ký nhanh (pha cố định: Grace Reveleris® silica 12 g, pha động: heptan/EtOAc/EtOH gradien từ 100/0/0 đến 40/45/15). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và đồng bay hơi với EtOAc. Bọt còn lại được hóa rắn bằng cách khuấy lên trong H₂O (4 mL) và bổ sung từ từ MeOH (2 mL). Sau khi khuấy trong 15 phút, sản phẩm được lọc, được rửa (3 lần) bằng hỗn hợp theo tỷ lệ 1/2 của MeOH/H₂O và được làm khô ở nhiệt độ 50°C trong chân không để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 3B (146 mg) dưới dạng chất rắn vô định hình.

Hợp chất 3:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,77 (s, 3 H) 4,01 (s, 3 H) 6,21 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 6,54 - 6,64 (m, 2 H) 6,83 (dd, *J*=8,7, 2,3 Hz, 1 H) 6,91 (t, *J*=1,4 Hz, 1 H) 6,94 - 6,99 (m, 2 H) 7,04 (d, *J*=7,7 Hz, 1 H) 7,12 (d, *J*=2,0 Hz, 1 H) 7,35 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 8,02 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 8,30 (s, 1 H) 11,84 (s, 1 H) LC/MS (phương pháp LC-A): *R*_t 1,20 phút, MH⁺ 529

Chất đồng phân đối ảnh 3A:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,77 (s, 3 H) 4,01 (s, 3 H) 6,22 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 6,55 - 6,61 (m, 2 H) 6,84 (dd, *J*=8,8, 2,2 Hz, 1 H) 6,91 (t, *J*=1,8 Hz, 1 H) 6,94 - 7,00 (m, 2 H) 7,07 (d, *J*=7,0 Hz, 1 H) 7,13 (d, *J*=1,8 Hz, 1 H) 7,35 (d, *J*=8,4 Hz, 1 H) 8,02 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 8,32 (d, *J*=2,9 Hz, 1 H) 11,87 (d, *J*=2,6 Hz, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,08 phút, MH^+ 529

$[\alpha]_D^{20}$: +134,9° (c 0,545, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 4,31 phút, MH^+ 529, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 3B:

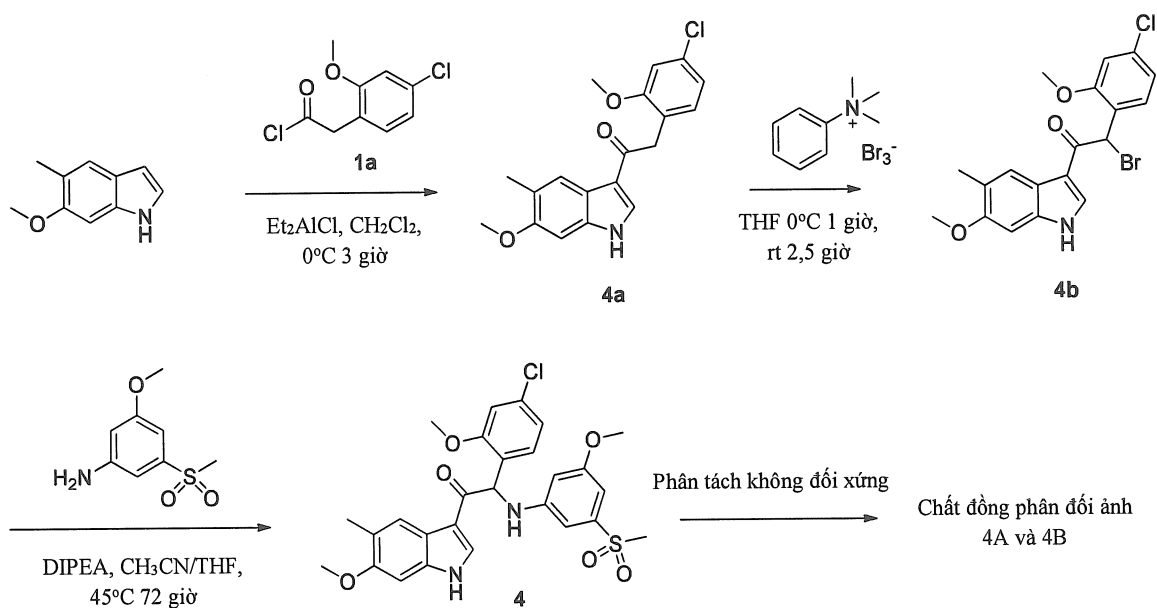
1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,77 (s, 3 H) 4,01 (s, 3 H) 6,21 (d, $J=8,1$ Hz, 1 H) 6,54 - 6,62 (m, 2 H) 6,83 (dd, $J=8,6, 2,4$ Hz, 1 H) 6,91 (t, $J=1,5$ Hz, 1 H) 6,94 - 6,99 (m, 2 H) 7,07 (d, $J=7,0$ Hz, 1 H) 7,13 (d, $J=1,8$ Hz, 1 H) 7,35 (d, $J=8,1$ Hz, 1 H) 8,02 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 8,32 (d, $J=2,9$ Hz, 1 H) 11,87 (br d, $J=2,2$ Hz, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,08 phút, MH^+ 529

$[\alpha]_D^{20}$: -116,7° (c 0,51, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 4,63 phút, MH^+ 529, độ tinh khiết không đối xứng 94,7%.

Ví dụ 4: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-2-((3-metoxi-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(6-metoxi-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 4) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 4A và 4B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 4a:

Dietyl nhôm clorua 1M trong hexan (13,5 mL, 13,5 mmol) được bổ sung nhỏ giọt ở nhiệt độ 0°C vào dung dịch chứa 6-metoxi-5-metyl-1*H*-indol [CAS 1071973-95-9] (1,45 g, 9 mmol) trong CH₂Cl₂ (45 mL). Sau 30 phút ở nhiệt độ 0°C, dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxi-phenyl)axetyl clorua 1a (2,4 g, 10,9 mmol) trong CH₂Cl₂ (45 mL) được bổ sung từ từ ở nhiệt độ 0°C. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 3 giờ. Nước đá được bổ sung và phần kết tủa được lọc và được rửa bằng nước. Phần rắn được làm khô trong chân không để thu được 2-(4-clo-2-metoxi-phenyl)-1-(6-metoxi-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 4a (2,1 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 4b:

Ở nhiệt độ 0°C, dung dịch chứa phenyltrimetylamonitribromua [CAS 4207-56-1] (2,4 g, 6,4 mmol) trong THF (65 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp chứa 2-(4-clo-2-metoxi-phenyl)-1-(6-metoxi-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 4a (2,1 g, 6,1 mmol) trong THF (60 mL). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và ở nhiệt độ phòng trong 2,5 giờ. Phần kết tủa được lọc và được rửa bằng EtOAc. Phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hấp thụ bằng một lượng diisopropylete tối thiểu. Phần kết tủa được lọc và được làm khô trong chân không để thu được 2-brom-2-(4-clo-2-metoxi-phenyl)-1-(6-metoxi-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 4b (2,36 g).

Tổng hợp hợp chất 4 và phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh 4A và 4B

Hỗn hợp chứa 2-brom-2-(4-clo-2-metoxi-phenyl)-1-(6-metoxi-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 4b (4,0 g, 9,46 mmol), 3-metoxi-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (2,86 g, 14,2 mmol) và diisopropyletylamin (2,44 mL, 14,2 mmol) trong CH₃CN/THF (1/1) (100 mL) được khuấy ở nhiệt độ 45°C trong 72 giờ. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc. Lốp hữu cơ được rửa 2 lần bằng HCl 1N, được rửa bằng nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Hợp chất được kết tinh từ CH₃CN/diisopropylete để thu được 2-(4-clo-2-metoxi-phenyl)-2-((3-metoxi-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(6-metoxi-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 4, 1,1 g) dưới dạng hỗn hợp raxemic.

Quá trình phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 4 được thực hiện thông qua SFC điều chế không đối xứng (pha cố định: (S,S)-Whelk-O1 5 μ m 250 x 21,1 mm, pha động: 45% CO₂, 55% MeOH) tạo ra 500 mg chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất và 531 mg chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai. Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất được kết tinh từ CH₃CN/Et₂O để thu được chất đồng phân đối ảnh 4A (401 mg). Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai được kết tinh từ CH₃CN/Et₂O để thu được chất đồng phân đối ảnh 4B (396 mg).

Hợp chất 4:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2,21 (s, 3 H) 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,79 (s, 3 H) 4,01 (s, 3 H) 6,20 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 6,58 (s, 2 H) 6,88 - 6,93 (m, 2 H) 6,96 (dd, *J*=8,5, 1,9 Hz, 1 H) 7,02 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 7,12 (d, *J*=1,9 Hz, 1 H) 7,34 (d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 7,89 (s, 1 H) 8,24 (s, 1 H) 11,78 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): *R*_t 3,16 phút, MH⁺ 543

Điểm nóng chảy: 208°C

Chất đồng phân đối ảnh 4A:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2,21 (s, 3 H) 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,79 (s, 3 H) 4,01 (s, 3 H) 6,20 (d, *J*=7,6 Hz, 1 H) 6,58 (d, *J*=1,6 Hz, 2 H) 6,87 - 6,93 (m, 2 H) 6,96 (dd, *J*=8,2, 1,9 Hz, 1 H) 7,02 (d, *J*=7,6 Hz, 1 H) 7,12 (d, *J*=1,9 Hz, 1 H) 7,34 (d, *J*=8,2 Hz, 1 H) 7,89 (s, 1 H) 8,25 (s, 1 H) 11,78 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): *R*_t 3,15 phút, MH⁺ 543

[α]_D²⁰: +141,8° (c 0,3936, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-C): *R*_t 4,95 phút, MH⁺ 543, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Điểm nóng chảy: 173°C

Chất đồng phân đối ảnh 4B:

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 2,21 (s, 3 H) 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,79 (s, 3 H) 4,01 (s, 3 H) 6,20 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 6,58 (s, 2 H) 6,88 - 6,93 (m, 2 H) 6,96 (dd, $J=8,2$, 1,9 Hz, 1 H) 7,02 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,12 (d, $J=1,9$ Hz, 1 H) 7,34 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,90 (s, 1 H) 8,25 (s, 1 H) 11,79 (br. s., 1 H)

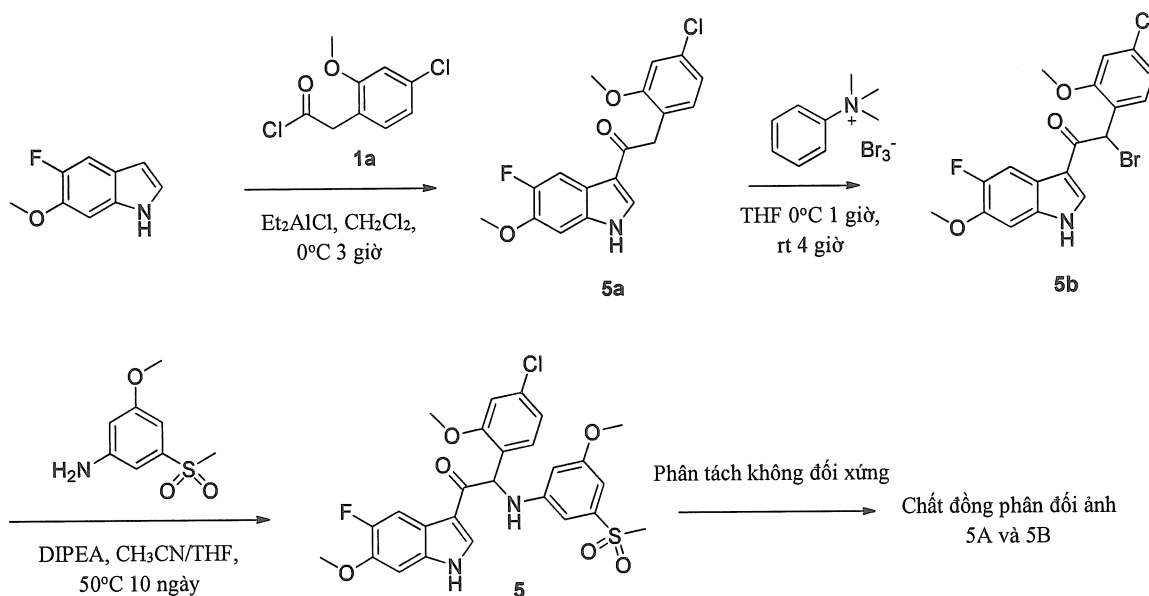
LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,15 phút, MH^+ 543

$[\alpha]_D^{20}$: $-142,2^\circ$ (c 0,3909, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-C): R_t 6,84 phút, MH^+ 543, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Điểm nóng chảy: 174°C

Ví dụ 5: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(5-flo-6-metoxi-1*H*-indol-3-yl)-2-((3-metoxi-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)etanon (hợp chất 5) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 5A và 5B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 5a:

Dietyl nhôm clorua 1M trong hexan (15,7 mL, 15,7 mmol) được bổ sung nhỏ giọt ở nhiệt độ 0°C vào dung dịch chứa 5-flo-6-metoxi-1*H*-indol [CAS 1211595-72-0] (2 g, 12,1 mmol) trong CH_2Cl_2 (50 mL). Sau 30 phút ở nhiệt độ 0°C , dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetyl clorua 1a (3,2 g, 14,6 mmol) trong CH_2Cl_2 (50 mL)

được bổ sung từ từ ở nhiệt độ 0°C. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 3 giờ. Nước đá được bổ sung và phần kết tủa được lọc, được rửa bằng nước và một lượng tối thiểu CH₂Cl₂. Chất rắn được làm khô trong chân không để thu được 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-flo-6-metox-1*H*-indol-3-yl)etanon 5a (2,82 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 5b:

Ở nhiệt độ 0°C, dung dịch chứa phenyltrimetylamoni tribromua [CAS 4207-56-1] (3,5 g, 8,1 mmol) trong THF (20 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-flo-6-metox-1*H*-indol-3-yl)etanon 5a (2,82 g, 8,1 mmol) trong THF (46 mL). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Phần kết tủa được lọc và được rửa bằng EtOAc. Phần dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc và được rửa bằng nước. Pha hữu cơ được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hấp thụ bằng một lượng tối thiểu của EtOAc. Phần kết tủa được lọc và được làm khô trong chân không để thu được 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-flo-6-metox-1*H*-indol-3-yl)etanon 5b (2,5 g).

Tổng hợp hợp chất 5 và phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh 5A và 5B:

Hỗn hợp chứa 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-flo-6-metox-1*H*-indol-3-yl)etanon 5b (2,5 g, 5,86 mmol), 3-metox-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (1,415 g, 7,03 mmol) và diisopropyletylamin (1,515 mL, 8,79 mmol) trong CH₃CN (55 mL) và THF (100 mL) được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 10 ngày. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 80 g, pha động: CH₂Cl₂/CH₃OH 99,25/0,75). Các phân đoạn tinh khiết được kết hợp và được làm bay hơi. Hợp chất được hòa tan trong EtOAc và được khuấy bằng HCl 1N trong 15 phút. Chất kết tủa xuất hiện, được lọc và được làm khô trong chân không để thu được 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-flo-6-metox-1*H*-indol-3-yl)-2-((3-metox-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)etanon (hợp chất 5, 1,3 g) dưới dạng hỗn hợp raxemic.

Quá trình phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 5 được thực hiện thông qua SFC điều chế không đối xứng (pha cố định: Chiralpak® IC 5 µm 250 x 20 mm, pha động: 55% CO₂, 45% MeOH). Các phân đoạn sản phẩm được

kết hợp và được làm bay hơi. Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất được hóa rắn bằng cách nghiền thành bột bằng heptan/diisopropylete. Phần rắn được lọc và được làm khô trong chân không để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 5A (502 mg) dưới dạng bột trắng vô định hình. Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai được hóa rắn bằng cách nghiền thành bột bằng heptan/diisopropylete. Phần rắn được lọc và được làm khô trong chân không để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 5B (490 mg) dưới dạng bột trắng vô định hình.

Hợp chất 5:

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,85 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,21 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 6,58 (d, $J=1,3$ Hz, 2 H) 6,90 (s, 1 H) 6,97 (dd, $J=8,2$, 1,9 Hz, 1 H) 7,06 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,10 - 7,18 (m, 2 H) 7,34 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,82 (d, $J=12,0$ Hz, 1 H) 8,35 (s, 1 H) 11,98 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,01 phút, MH^+ 547

Điểm nóng chảy: 182°C

Chất đồng phân đối ảnh 5A:

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,85 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,21 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 6,58 (d, $J=1,3$ Hz, 2 H) 6,90 (s, 1 H) 6,97 (dd, $J=8,2$, 2,0 Hz, 1 H) 7,07 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,11 - 7,17 (m, 2 H) 7,34 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,82 (d, $J=11,7$ Hz, 1 H) 8,35 (s, 1 H) 11,98 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,00 phút, MH^+ 547

$[\alpha]_D^{20}$: +136,4° (c 0,28, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-B): R_t 3,43 phút, MH^+ 547, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 5B:

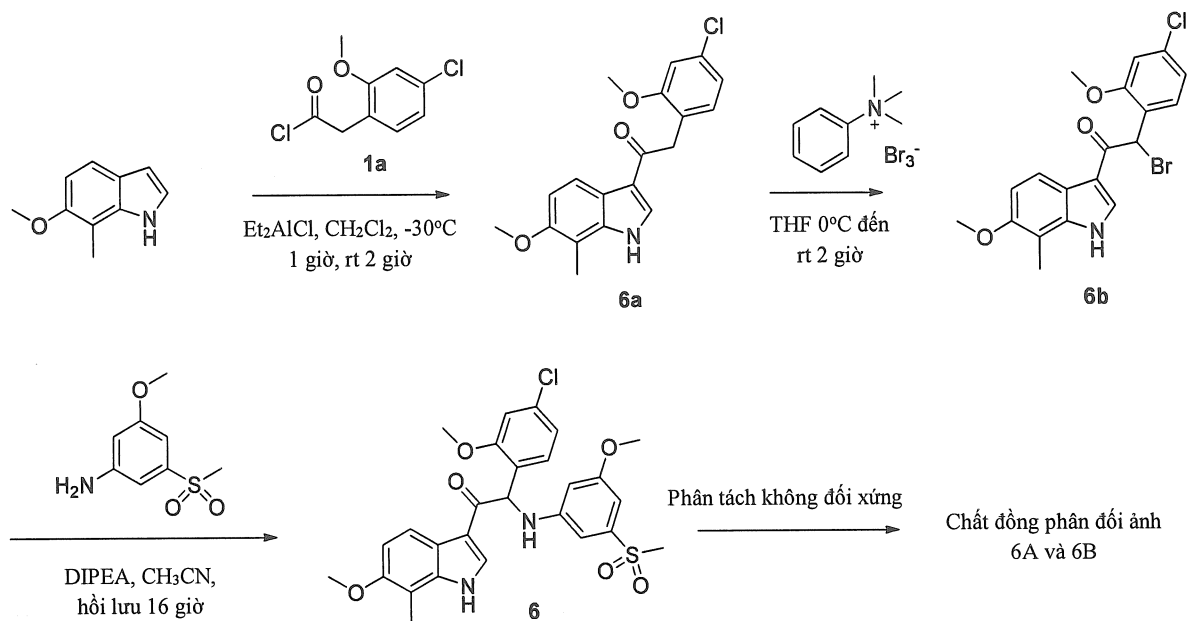
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,85 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,21 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 6,58 (d, $J=1,3$ Hz, 2 H) 6,90 (s, 1 H) 6,97 (dd, $J=8,2$, 2,0 Hz, 1 H) 7,07 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,11 - 7,19 (m, 2 H) 7,34 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,82 (d, $J=11,7$ Hz, 1 H) 8,35 (s, 1 H) 11,95 (br. s., 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,00 phút, MH^+ 547

$[\alpha]_D^{20}$: -126,3° (c 0,2755, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-B): R_t 4,80 phút, MH^+ 547, độ tinh khiết không đối xứng 98,06%.

Ví dụ 6: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-2-((3-metoxy-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(6-metoxy-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 6) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 6A và 6B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 6a:

Diethyl nhôm clorua 1M trong hexan (32,8 mL, 32,8 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch đã được làm lạnh ($-30^\circ C$) chứa 6-metoxy-7-metyl-1*H*-indol [CAS 19500-05-1] (3,53 g, 21,9 mmol) trong CH_2Cl_2 (150 mL). Sau khi khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ $-30^\circ C$, dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)axetyl clorua 1a (6,71 g, 30,6 mmol) trong CH_2Cl_2 (150 mL) được bổ sung từ từ ở nhiệt độ $-30^\circ C$. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ $-30^\circ C$ trong 1 giờ và được cho phép làm ấm đến nhiệt độ trong phòng trong khi khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được rót vào trong nước đá/muối Rochelle. Hỗn hợp được lọc trên tấm ngăn của dicalite® và bánh lọc được rửa nhiều lần bằng THF. Các lớp được tách riêng. Lớp chứa nước được chiết bằng THF. Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, nước, được làm khô trên $MgSO_4$, được lọc, và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn rắn được tạo huyền phù trong CH_2Cl_2 (50 mL) và phần rắn được lọc và được rửa bằng một lượng

nhỏ của CH_2Cl_2 và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-metoxi-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 6a (6,85 g) dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt.

Tổng hợp hợp chất trung gian 6b:

Ở nhiệt độ 0°C , dung dịch chứa phenyltrimetylamonitribromua [CAS 4207-56-1] (8,2 g, 21,8 mmol) trong THF (150 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-metoxi-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 6a (6,8 g, 19,8 mmol) trong THF (250 mL). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Phần kết tủa được lọc và được rửa bằng THF. Phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được kết tinh từ CH_2Cl_2 . Phần kết tủa được lọc, được rửa bằng CH_2Cl_2 (2 lần) và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được 2-brom-2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-metoxi-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 6b (5,38 g).

Tổng hợp hợp chất 6 và phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh 6A và 6B:

Hỗn hợp chứa 2-brom-2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-metoxi-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 6b (1,96 g, 4,65 mmol), 3-metoxi-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (1,40 g, 6,97 mmol) và diisopropyletylamin (1,20 mL, 6,97 mmol) trong CH_3CN (50 mL) được gia nhiệt qua đêm trong điều kiện hồi lưu. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong CH_2Cl_2 và được rửa bằng HCl 0,5N và nước, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (pha cố định: Biotage® SNAP Ultra 100 g, pha động: EtOAc:EtOH(3:1)/heptan gradien 0/100 đến 50/50). Các phân đoạn tinh khiết được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-2-((3-metoxi-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(6-metoxi-7-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 6, 1,0 g) dưới dạng hỗn hợp racemic.

Quá trình phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 6 (1,0 g) được thực hiện thông qua SFC điều chế không đối xứng (pha cố định: Chiralcel® Diacel OD 20 x 250 mm, pha động: CO_2 , EtOH chứa 0,2% *i*PrNH₂). Các phân đoạn sản phẩm được kết hợp và được làm bay hơi. Chất đồng phân đối ảnh rửa

giải thứ nhất được hóa rắn bằng cách nghiền thành bột bằng hỗn hợp của MeOH/nước (1/1). Phần rắn được lọc và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 6A (368 mg) dưới dạng bột trắng vô định hình. Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai được hóa rắn bằng cách nghiền thành bột bằng hỗn hợp của MeOH/nước (1/1). Phần rắn được lọc và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 6B (303 mg) dưới dạng bột trắng vô định hình.

Chất đồng phân đối ảnh 6A:

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,29 (s, 3 H) 3,10 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,80 (s, 3 H) 4,02 (s, 3 H) 6,24 (d, $J=7,7$ Hz, 1 H) 6,56 - 6,59 (m, 1 H) 6,59 - 6,62 (m, 1 H) 6,92 (t, $J=1,6$ Hz, 1 H) 6,93 - 6,99 (m, 2 H) 7,06 (d, $J=7,7$ Hz, 1 H) 7,13 (d, $J=1,8$ Hz, 1 H) 7,35 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H) 7,94 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H) 8,35 (s, 1 H) 11,91 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,18 phút, MH^+ 543

$[\alpha]_D^{20}$: +122,9° (c 0,48, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 4,15 phút MH^+ 543, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 6B:

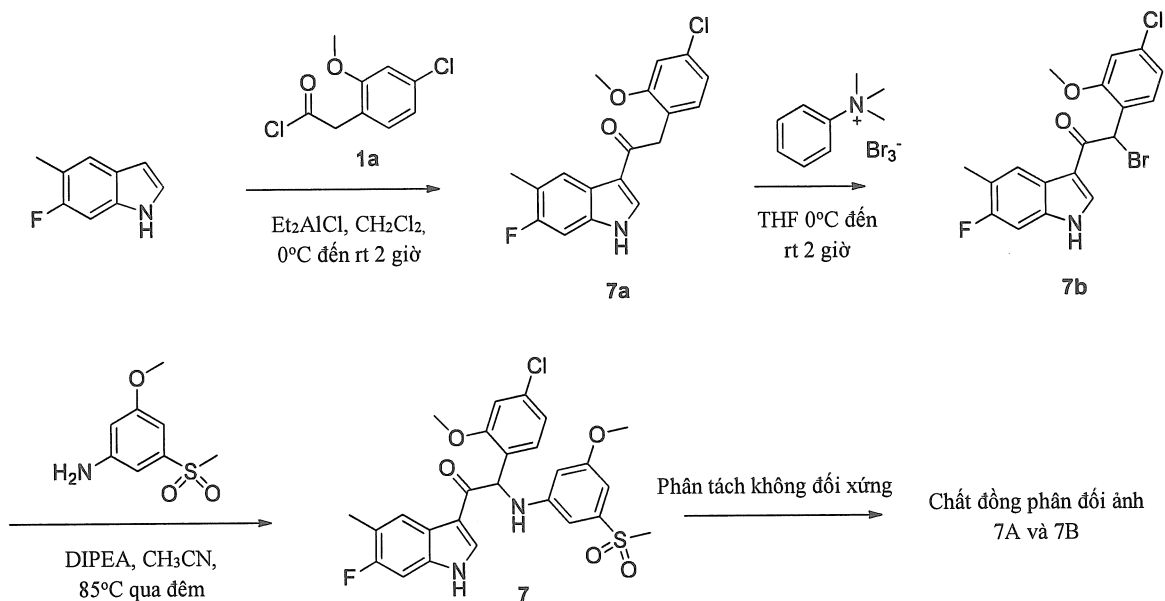
^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,29 (s, 3 H) 3,10 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,80 (s, 3 H) 4,02 (s, 3 H) 6,24 (d, $J=7,7$ Hz, 1 H) 6,57 - 6,59 (m, 1 H) 6,59 - 6,62 (m, 1 H) 6,92 (t, $J=1,8$ Hz, 1 H) 6,93 - 7,00 (m, 2 H) 7,06 (d, $J=7,7$ Hz, 1 H) 7,13 (d, $J=1,8$ Hz, 1 H) 7,35 (d, $J=8,1$ Hz, 1 H) 7,94 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 8,35 (d, $J=2,2$ Hz, 1 H) 11,91 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,22 phút, MH^+ 543

$[\alpha]_D^{20}$: -120,6° (c 0,2755, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 4,50 phút, MH^+ 543, độ tinh khiết không đối xứng 99,35%.

Ví dụ 7: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-flo-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)-2-((3-metox-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)etanon (hợp chất 7) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 7A và 7B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 7a:

Dung dịch chứa 6-flo-5-metyl-1*H*-indol [CAS 162100-95-0] (1,7 g, 11,4 mmol) trong CH_2Cl_2 (100 mL) được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C trong môi trường khí N_2 . Dung dịch chứa dietyl nhôm clorua 1M trong hexan (17,1 mL, 17,1 mmol) được bổ sung nhỏ giọt và hỗn hợp thu được được giữ ở nhiệt độ 0°C trong 15 phút. Dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetyl clorua 1a (3,50 g, 16 mmol) trong CH_2Cl_2 (50 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Tiếp tục khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được rót vào trong dung dịch đá/muối Rochelle đã khuấy. Sau khi đá tan, hỗn hợp được lọc trên dicalite® và bánh lọc được rửa nhiều lần bằng THF. Phần dịch lọc được kết hợp. Các lớp được tách riêng và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn rắn được tạo huyền phù trong CH_2Cl_2 (30 mL), phân kết tủa được lọc và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-flo-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 7a (2,76 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 7b:

Dung dịch được khuấy chứa 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-1-(6-flo-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 7a (2,76 g, 8,32 mmol) trong THF (350 mL) được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C . Dung dịch chứa phenyltrimetylamonitribromua [CAS 4207-56-1] (3,44 g, 9,15 mmol) trong THF (50 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Hỗn hợp phản ứng được

khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 2 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Phần rắn được loại bỏ bằng cách lọc và được rửa bằng THF. Phần dịch lọc được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được trộn bằng EtOAc (50 mL). Phần rắn được tách riêng bằng cách lọc, được rửa bằng một lượng nhỏ của EtOAc và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-flo-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 7b (3,21 g) dưới dạng chất rắn màu trắng, được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất 7 và phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh 7A và 7B:

Hỗn hợp chứa 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-flo-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)etanon 7b (1,6 g, 3,90 mmol), 3-metox-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (1,18 g, 5,84 mmol) và diisopropyletylamin (671 μ L, 3,90 mmol) trong CH₃CN (100 mL) được khuấy qua đêm ở nhiệt độ 85°C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong CH₂Cl₂ (100 mL), được rửa bằng HCl 1N (100 mL) và nước (100 mL), được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột (pha cố định: Grace Reveleris® silica 120 g, pha động: EtOAc:EtOH(3:1)/heptan gradien 0/100 đến 50/50). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được kết tủa từ CH₂Cl₂/heptan. Phần rắn được tách riêng bằng cách lọc và được rửa bằng CH₂Cl₂/heptan (1/1). Sản phẩm thô được tinh chế tiếp bằng HPLC điều chế (pha cố định: Uptisphere® C18 ODB – 10 μ m, 200 g, 5 cm, pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, CH₃CN). Các phân đoạn sản phẩm được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn rắn được trộn với EtOAc (20 mL) và phần rắn được tách riêng bằng cách lọc và được rửa bằng một lượng nhỏ của EtOAc để tạo ra 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(6-flo-5-metyl-1*H*-indol-3-yl)-2-((3-metox-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)etanon (hợp chất 7, 341 mg) dưới dạng hỗn hợp raxemic. Phần lọc được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn được hấp thụ bằng MeOH. Sau khi khuấy trong 30 phút, phần rắn được tách riêng bằng cách lọc để tạo ra mẫu thứ hai của hợp chất 7 (92 mg).

Quá trình phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 7 (402 mg) được thực hiện thông qua phân tách không đối xứng pha bình thường (pha cố

định: (S,S)-Whelk-O1, pha động: 100% metanol). Các phân đoạn sản phẩm được kết hợp và được làm bay hơi để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 7A dưới dạng sản phẩm chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất và chất đồng phân đối ảnh 7B dưới dạng sản phẩm chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai. Chất đồng phân đối ảnh 7A được tinh chế tiếp bằng sắc ký nhanh trên silicagel (pha cố định: Grace Reveleris® silica 12 g, pha động: heptan/EtOAc/EtOH 100/0/0 đến 40/45/15). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được nghiền thành bột với H₂O (1,75 mL) và MeOH (0,75 mL). Phần rắn được lọc, được rửa (2 lần) bằng H₂O/MeOH 7/3, và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 7A (48 mg). Chất đồng phân đối ảnh 7B được tinh chế tiếp bằng sắc ký nhanh trên silicagel (pha cố định: Grace Reveleris® silica 12 g, pha động: heptan/EtOAc/EtOH 100/0/0 đến 40/45/15). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được nghiền thành bột với H₂O (1,75 mL) và MeOH (0,75 mL). Phần rắn được lọc, được rửa (2 lần) bằng H₂O/MeOH 7/3, và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 7B (43 mg).

Hợp chất 7:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2,30 (d, *J*=0,9 Hz, 3 H) 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,22 (d, *J*=7,7 Hz, 1 H) 6,54 - 6,63 (m, 2 H) 6,92 (t, *J*=1,5 Hz, 1 H) 6,97 (dd, *J*=8,3, 1,9 Hz, 1 H) 7,01 (d, *J*=7,7 Hz, 1 H) 7,12 (d, *J*=1,8 Hz, 1 H) 7,22 (d, *J*=10,2 Hz, 1 H) 7,35 (d, *J*=8,4 Hz, 1 H) 8,02 (d, *J*=7,7 Hz, 1 H) 8,37 (s, 1 H) 11,97 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,19 phút, MH⁺ 531

Chất đồng phân đối ảnh 7A:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2,30 (d, *J*=1,5 Hz, 3 H) 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,22 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 6,56 - 6,60 (m, 2 H) 6,91 (t, *J*=1,7 Hz, 1 H) 6,97 (dd, *J*=8,3, 2,1 Hz, 1 H) 7,01 (d, *J*=7,7 Hz, 1 H) 7,12 (d, *J*=2,0 Hz, 1 H) 7,22 (d, *J*=10,1 Hz, 1 H) 7,34 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 8,02 (d, *J*=7,7 Hz, 1 H) 8,37 (s, 1 H) 11,96 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,15 phút, MH⁺ 531

$[\alpha]_{\text{D}20}$: -163,2° (c 0,435, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 4,26 phút, MH^+ 531, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 7B:

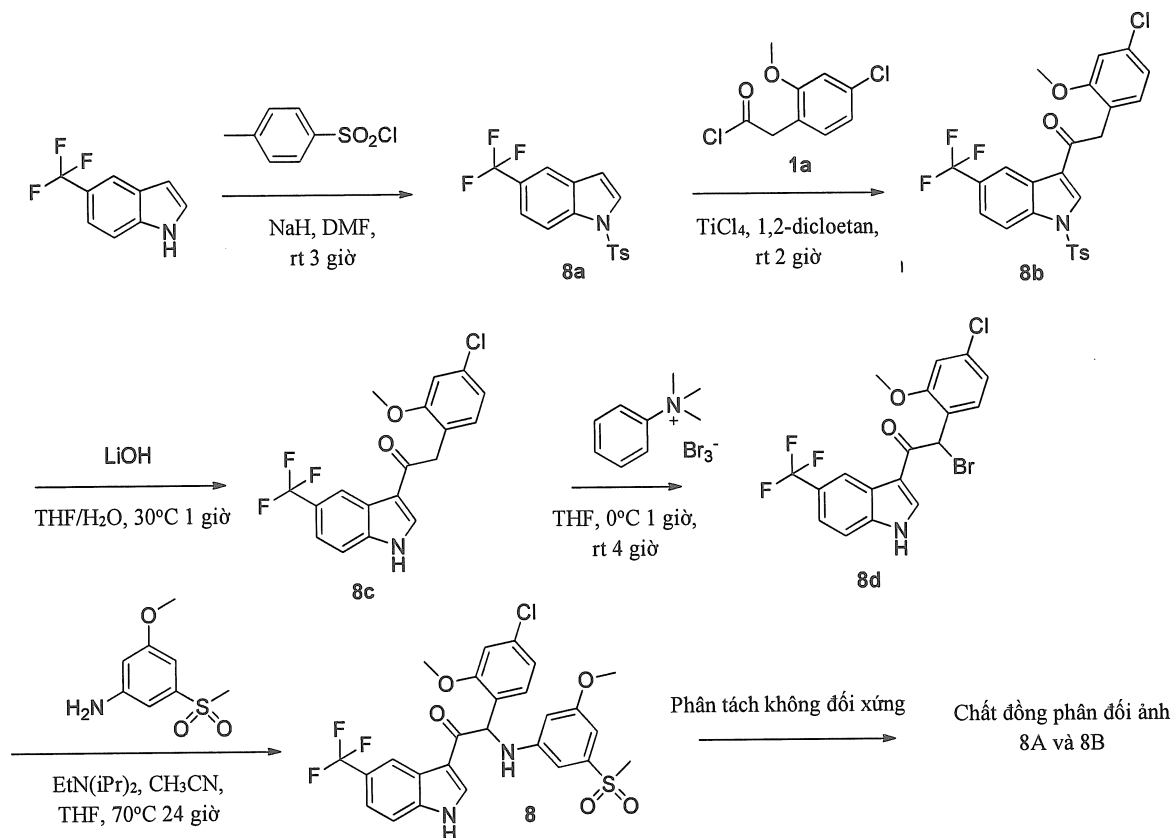
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 2,30 (d, $J=1,5$ Hz, 3 H) 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,22 (d, $J=7,7$ Hz, 1 H) 6,57 - 6,61 (m, 2 H) 6,92 (t, $J=1,8$ Hz, 1 H) 6,97 (dd, $J=8,1, 2,0$ Hz, 1 H) 7,01 (d, $J=7,7$ Hz, 1 H) 7,12 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H) 7,22 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 7,35 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H) 8,02 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 8,37 (d, $J=2,4$ Hz, 1 H) 11,97 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,15 phút, MH^+ 531

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +166,6° (c 0,5, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 3,78 phút, MH^+ 531, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 8: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-2-((3-metoxy-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(5-(triflometyl)-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 8) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 8A và 8B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 8a:

Ở nhiệt độ 0°C, trong dòng N_2 , natri hydrua (2,48 g, 64,8 mmol) được bổ sung từng phần vào hỗn hợp chứa 5-(triflometyl)-1*H*-indol [CAS 100846-24-0] (10 g, 54,0 mmol) trong DMF (150 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 30 phút. Dung dịch chứa tosyl clorua (11,3 g, 59,4 mmol) trong DMF (50 mL) được bổ sung nhỏ giọt và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Ở nhiệt độ 0°C, hỗn hợp được làm dừng bằng cách bổ sung thêm nước. Phần kết tủa được lọc và được làm khô qua đêm trong chân không ở nhiệt độ 70°C để thu được 1-tosyl-5-(triflometyl)-1*H*-indol 8a (18,4 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 8b:

Titan(IV) clorua (2,4 mL, 21,9 mmol) được bổ sung nhỏ giọt ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch chứa 1-tosyl-5-(triflometyl)-1*H*-indol 8a (3,7 g, 10,95 mmol) và 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetyl clorua 1a (4,8 g, 21,9 mmol, tổng hợp: xem ví dụ 1) trong 1,2-dicloetan (120 mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Nước đá được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ

được làm khô trên MgSO_4 , được lọc, và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel (15-40 μm , 80 g, pha động: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99,5/0,5). Các phân đoạn chứa hợp chất 8b được kết hợp và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Hợp chất được hấp thụ bằng $\text{CH}_3\text{CN}/\text{diisopropylete}$. Phần kết tủa được lọc và được làm khô để thu được 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(1-tosyl-5-(triflometyl)-1*H*-indol-3-yl)etanon 8b (2,8 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 8c:

Lithi hydroxit (0,64 g, 15,3 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(1-tosyl-5-(triflometyl)-1*H*-indol-3-yl)etanon 8b (3,2 g, 6,13 mmol) trong THF (18 mL) và nước (6 mL). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 1 giờ. Nước và EtOAc được bổ sung. Lốp hữu cơ được tách ra, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Chất rắn được hấp thụ bằng diisopropylete. Phần kết tủa được lọc và được làm khô để thu được 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-(triflometyl)-1*H*-indol-3-yl)etanon 8c (2,1 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 8d:

Ở nhiệt độ 0°C, dung dịch chứa phenyltrimetylamonitribromua [CAS 4207-56-1] (2,1 g, 5,7 mmol) trong THF (60 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp chứa 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-(triflometyl)-1*H*-indol-3-yl)etanon 8c (2,15 g, 5,7 mmol) trong THF (60 mL). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Phần kết tủa được lọc và được rửa bằng EtOAc. Phần dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc. Lốp hữu cơ được rửa bằng nước, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hấp thụ bằng diisopropylete. Phần kết tủa được lọc và được làm khô để thu được 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-(triflometyl)-1*H*-indol-3-yl)etanon 8d (2,5 g).

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

Hỗn hợp chứa 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-(triflometyl)-1*H*-indol-3-yl)etanon 8d (1 g, 2,24 mmol), 3-metoxi-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (496 mg, 2,46 mmol) và diisopropyletylamin (0,38 mL, 2,24 mmol) trong CH_3CN (50 mL) và THF (25 mL) được khuấy ở nhiệt độ 70°C trong 24 giờ. Dung dịch được cô

trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc và dung dịch được rửa bằng HCl 1N. Lớp hữu cơ được tách ra, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Hợp chất được kết tinh từ diisopropylete/CH₃CN để thu được 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-2-((3-metoxy-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(5-(triflometyl)-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 8, 310 mg) dưới dạng hỗn hợp raxemic.

Các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 8 được tách riêng thông qua SFC điều chế không đối xứng (pha cố định: Chiralpak® AD-H 5 µm 250 x 20 mm, pha động: 70% CO₂, 30% *i*PrOH +0,3% *i*PrNH₂) để thu được, sau khi kết tinh trong ete dầu mỏ/diisopropylete, 122 mg chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất 8A và 128 mg chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai 8B.

Hợp chất 8:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,10 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,99 (s, 3 H) 6,29 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 6,56 - 6,62 (m, 2 H) 6,92 (s, 1 H) 6,98 (dd, *J*=8,4, 2,0 Hz, 1 H) 7,09 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 7,13 (d, *J*=1,9 Hz, 1 H) 7,36 (d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 7,54 (dd, *J*=8,5, 1,6 Hz, 1 H) 7,69 (d, *J*=8,5 Hz, 1 H) 8,48 (s, 1 H) 8,61 (s, 1 H) 12,45 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,19 phút, MH⁺ 567

Điểm nóng chảy: 168°C

Chất đồng phân đối ảnh 8A:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,73 (s, 3 H) 3,99 (s, 3 H) 6,29 (d, *J*=7,6 Hz, 1 H) 6,60 (br s, 2 H) 6,92 (s, 1 H) 6,98 (dd, *J*=8,3, 1,8 Hz, 1 H) 7,07 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 7,13 (d, *J*=1,5 Hz, 1 H) 7,36 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 7,54 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 7,69 (d, *J*=8,6 Hz, 1 H) 8,49 (s, 1 H) 8,60 (s, 1 H) 12,41 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,25 phút, MH⁺ 567

[α]_D²⁰: -119,2° (c 0,2727, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-F): R_t 2,64 phút, MH⁺ 567, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 8B:

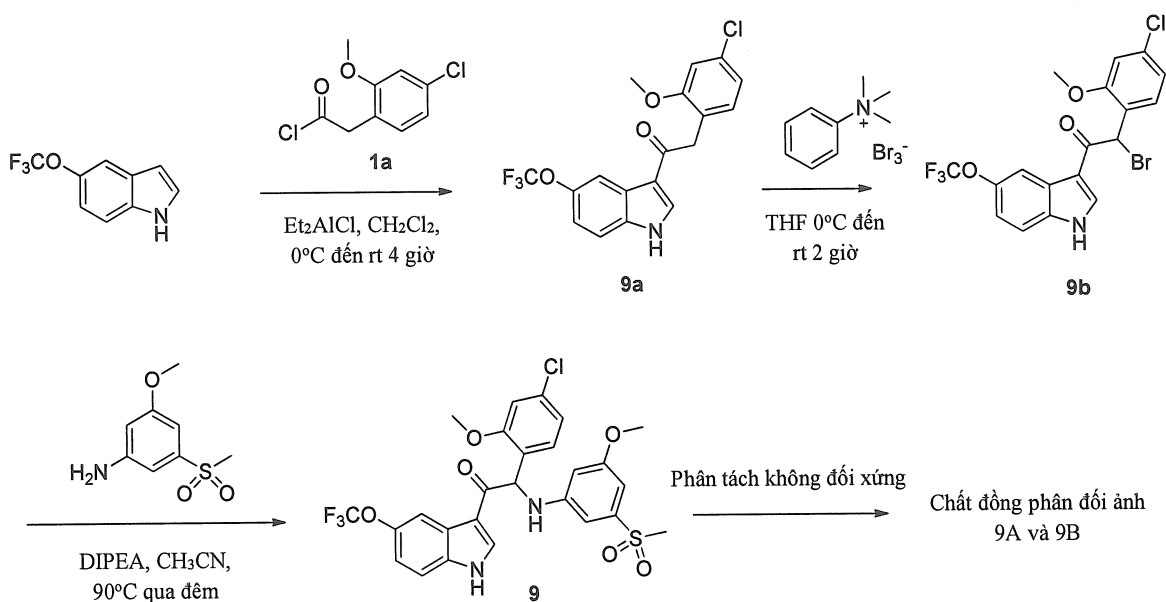
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,73 (s, 3 H) 3,99 (s, 3 H) 6,29 (d, $J=8,1$ Hz, 1 H) 6,60 (s, 2 H) 6,92 (s, 1 H) 6,98 (dd, $J=8,6$, 2,0 Hz, 1 H) 7,07 (d, $J=8,1$ Hz, 1 H) 7,13 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H) 7,36 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H) 7,54 (dd, $J=8,6$, 1,5 Hz, 1 H) 7,69 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H) 8,49 (s, 1 H) 8,60 (s, 1 H) 12,40 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 3,25 phút, MH^+ 567

$[\alpha]_D^{20}$: +125,1° (c 0,2455, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-F): R_t 3,44 phút, MH^+ 567, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 9: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-2-((3-metox-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 9) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 9A và 9B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 9a:

Dung dịch chứa 5-(triflometoxy)-1*H*-indol [CAS 262593-63-5] (3 g, 14,9 mmol) trong CH_2Cl_2 (150 mL) được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C trong môi trường khí N_2 . Dung dịch chứa dietyl nhôm clorua 1M trong hexan (22,4 mL, 22,4 mmol) được bổ sung nhỏ giọt và hỗn hợp thu được được giữ ở nhiệt độ 0°C trong 15 phút. Dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)axetyl clorua 1a (4,57 g, 20,9 mmol) trong CH_2Cl_2 (100 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Tiếp tục khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và hỗn hợp phản ứng sau đó được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp phản

ứng được rót vào trong dung dịch đá/muối Rochelle đã khuấy. Sau khi đá tan, hỗn hợp được lọc trên dicalite® và bánh lọc được rửa nhiều lần bằng THF. Phần lọc được kết hợp. Các lớp được tách riêng và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được nghiền thành bột bằng CH₂Cl₂ (50 mL). Chất kết tủa thu được được lọc và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 9a (4,39 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 9b:

Dung dịch đã khuấy chứa 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 9a (4,39 g, 11,4 mmol) trong THF (200 mL) được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C.

Dung dịch chứa phenyltrimetylamonitribromua [CAS 4207-56-1] (4,73 g, 12,6 mmol) trong THF (100 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Huyền phù thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Phần rắn được loại bỏ bằng cách lọc và được rửa bằng THF. Phần dịch lọc được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được trộn bằng EtOAc (30 mL). Phần rắn được tách riêng bằng cách lọc, được rửa bằng một lượng nhỏ của EtOAc và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 9b (5,0 g) dưới dạng chất rắn màu trắng, được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất 9 và phân tách không đối xứng của các chất đồng phân đối ảnh 9A và 9B:

Hỗn hợp chứa 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 9b (2,5 g, 5,40 mmol), 3-metoxi-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (1,49 g, 7,38 mmol) và diisopropyletylamin (931 µL, 5,40 mmol) trong CH₃CN (100 mL) được khuấy qua đêm ở nhiệt độ 90°C. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong CH₂Cl₂ (100 mL), được rửa bằng HCl 1N (100 mL) và nước (100 mL), được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột (pha cố định: Grace Reveleris® silica 120 g, pha động: EtOAc:EtOH(3:1)/heptan gradien 0/100 đến 50/50). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp và được làm bay hơi trong

điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được kết tủa từ EtOAc (10 mL) trong khi khuấy. Phần rắn được tách riêng bằng cách lọc và được rửa bằng một lượng nhỏ của EtOAc để tạo ra 2-(4-clo-2-metoxypheyl)-2-((3-metoxi-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 9, 477 mg) dưới dạng hỗn hợp raxemic. Phần lọc được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn được hấp thụ bằng EtOAc (5 mL). Sau khi khuấy qua đêm, phần rắn được tách riêng bằng cách lọc và được rửa bằng EtOAc để tạo ra mẫu thứ hai của hợp chất 9 (216 mg).

Quá trình phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 9 (663 mg) được thực hiện thông qua phân tách không đối xứng pha bình thường (pha cố định: AS 20 μ m, pha động: 100% metanol). Các phân đoạn sản phẩm được kết hợp và được làm bay hơi để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 9A dưới dạng sản phẩm chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất và chất đồng phân đối ảnh 9B dưới dạng sản phẩm chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai. Chất đồng phân đối ảnh 9A được khuấy trong H₂O (2 mL) và MeOH (3 mL) ở nhiệt độ 40°C. Phần rắn được lọc, được rửa (3 lần) bằng H₂O/MeOH 1/1, và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 45°C để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 9A (151 mg). Chất đồng phân đối ảnh 9B được tinh chế tiếp bằng sắc ký nhanh trên silicagel (pha cố định: Grace Reveleris® silica 12 g, pha động: heptan/EtOAc/EtOH 100/0/0 đến 40/45/15). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và đồng bay hơi với EtOAc. Phần cặn được khuấy trong MeOH (5 mL) và được kết tủa bằng cách bổ sung từ từ H₂O (4 mL). Phần rắn được lọc, được rửa (3 lần) bằng H₂O/MeOH 1/1, và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 9B (132 mg).

Hợp chất 9:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,73 (s, 3 H) 3,99 (s, 3 H) 6,26 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 6,57 - 6,62 (m, 2 H) 6,91 (t, *J*=1,9 Hz, 1 H) 6,98 (dd, *J*=8,4, 2,0 Hz, 1 H) 7,07 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H) 7,13 (d, *J*=2,0 Hz, 1 H) 7,22 (dd, *J*=8,6, 2,2 Hz, 1 H) 7,36 (d, *J*=8,4 Hz, 1 H) 7,59 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 8,06 (d, *J*=0,9 Hz, 1 H) 8,55 (s, 1 H) 12,28 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): *R*_t 1,31 phút, MH⁺ 583

Chất đồng phân đối ảnh 9A:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,73 (s, 3 H) 3,99 (s, 3 H) 6,26 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 6,55 - 6,62 (m, 2 H) 6,91 (t, $J=1,5$ Hz, 1 H) 6,98 (dd, $J=8,4$, 2,0 Hz, 1 H) 7,07 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,13 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H) 7,21 (dd, $J=8,8$, 1,8 Hz, 1 H) 7,36 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H) 7,59 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 8,07 (d, $J=0,9$ Hz, 1 H) 8,55 (s, 1 H) 12,29 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,20 phút, MH^+ 583

$[\alpha]_D^{20}$: +130,3° (c 0,555, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 3,10 phút, MH^+ 583, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 9B:

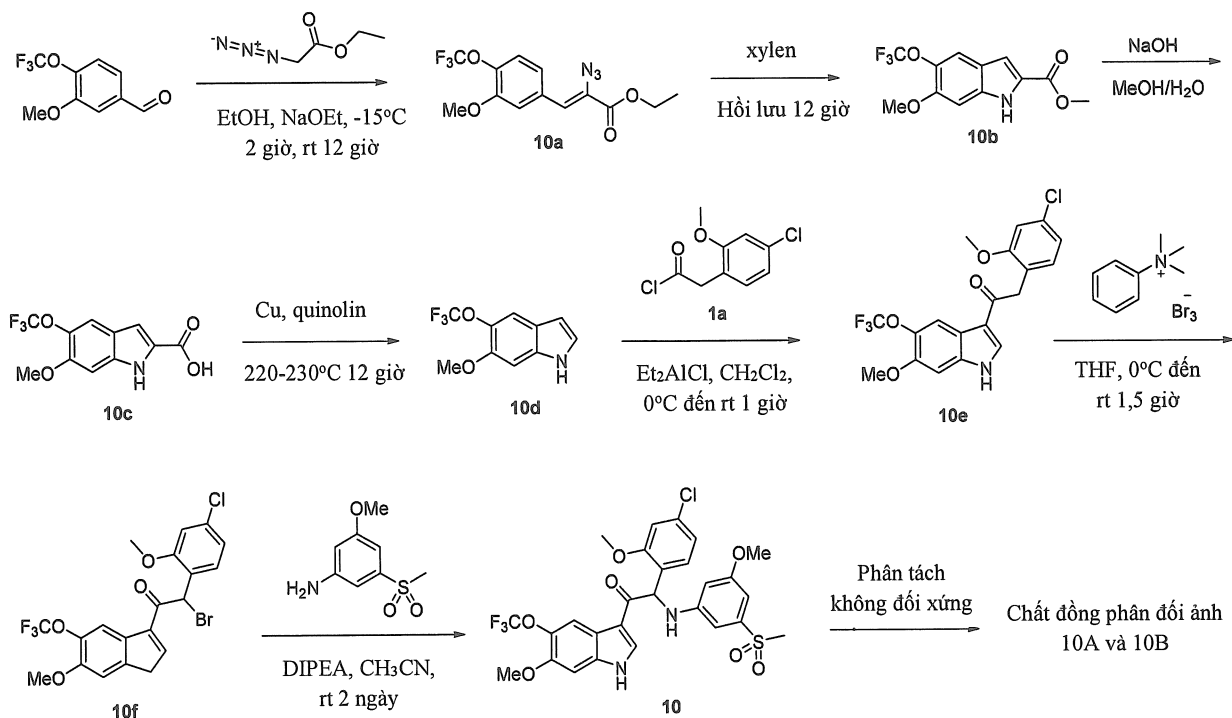
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,73 (s, 3 H) 3,99 (s, 3 H) 6,26 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 6,56 - 6,62 (m, 2 H) 6,92 (t, $J=2,0$ Hz, 1 H) 6,98 (dd, $J=8,1$, 2,0 Hz, 1 H) 7,07 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,13 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H) 7,22 (dd, $J=8,8$, 1,8 Hz, 1 H) 7,36 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H) 7,59 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 8,07 (d, $J=0,9$ Hz, 1 H) 8,55 (s, 1 H) 12,30 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,20 phút, MH^+ 583

$[\alpha]_D^{20}$: -133,2° (c 0,5, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 3,50 phút, MH^+ 583, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 10: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-2-((3-metox-5-(metylsulfonyl) phenyl) amino)-1-(6-metox-5-(triflometox)-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 10) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 10A và 10B.



Bổ sung nhỏ giọt dung dịch chứa NaOEt (0,69 mol, được điều chế từ 15,9 g Na và 700 mL EtOH) vào dung dịch đã làm lạnh (-15°C) chứa 3-metoxý-4-(triflometoxý) benzaldehyt [CAS 853771-90-1] (50 g, 230 mmol) và etyl azidoaxetat (89 g, 690 mmol) trong EtOH (400 mL), trong khoảng thời gian 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sau khi làm lạnh trên bề nước đá, phản ứng được làm dừng bằng dung dịch NH₄Cl bão hòa (1,2 L), và được khuấy trong 10 phút. Phần kết tủa được lọc, được rửa bằng nước, và được làm khô để thu được (Z)-etyl 2-azido-3-(3-metoxý-4-(triflometoxý)phenyl)acrylat 10a (32 g) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Tổng hợp hợp chất trung gian 10b:

Dung dịch chứa (Z)-etyl 2-azido-3-(3-metoxý-4-(triflometoxý)phenyl)acrylat 10a (3 g, 10 mmol) trong xylen (40 mL) được gia nhiệt trong điều kiện hồi lưu qua đêm. Sau khi làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng, dung môi được làm bay hơi đến khi khô. Phần cặn được nghiền thành bột bằng hexan (50 mL) và phần kết tủa được lọc để thu được metyl 6-metoxý-5-(triflometoxý)-1*H*-indol-2-cacboxylat 10b (hiệu suất: 1,4-1,6 g) dưới dạng chất rắn màu vàng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 10c:

Bổ sung NaOH (7 g, 175 mmol) vào hỗn hợp chứa methyl 6-metoxi-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-2-carboxylat 10b (25 g, 87 mmol) trong MeOH/H₂O (2/1, 300 mL) và hỗn hợp được gia nhiệt trong điều kiện hồi lưu cho đến khi thu được dung dịch trong. Sau khi làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng, phần lớn metanol được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm và dung dịch chứa nước còn lại được axit hóa bằng HCl đặc đến pH 3-4. Sản phẩm được chiết bằng EtOAc (2x 250 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô, và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được axit 6-metoxi-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-2-carboxylic 10c (22,7 g) dưới dạng chất rắn màu xám.

Tổng hợp hợp chất trung gian 10d:

Huyền phù của axit 6-metoxi-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-2-carboxylic 10c (7,5 g, 27 mmol) và Cu (1,22 g, 0,7 đương lượng) trong quinolin (150 mL) được gia nhiệt đến 220-230°C trong môi trường khí trơ trong 12 giờ. Sau khi làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được pha loãng bằng methyl *tert*-butyl ete (MTBE, 400 mL) và được rửa bằng dung dịch NaHSO₄ chứa nước bão hòa (2x 500 mL). Lớp hữu cơ được làm khô trên MgSO₄, được lọc qua tấm ngăn của silicagel, và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật cột sắc ký để thu được 6-metoxi-5-(triflometoxy)-1*H*-indol 10d (3,75 g) dưới dạng chất rắn màu vàng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 10e:

Dung dịch chứa 6-metoxi-5-(triflometoxy)-1*H*-indol 10d (1,61 g, 6,96 mmol) trong CH₂Cl₂ (150 mL) được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C trong môi trường khí N₂. Dung dịch chứa diethyl nhôm clorua 1M trong hexan (10,4 mL, 10,4 mmol) được bổ sung nhỏ giọt và hỗn hợp thu được được giữ ở nhiệt độ 0°C trong 30 phút. Dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)axetyl clorua 1a (2,28 g, 10,4 mmol) trong CH₂Cl₂ (75 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Tiếp tục khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C và dung dịch chứa kali natri tartrat tetrahydrat (muối Rochelle, 3,93 g, 13,9 mmol) trong nước (6 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ 0°C. THF (200 mL) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Na₂SO₄ (25g) được bổ sung, hỗn hợp được khuấy qua đêm, được lọc qua dicalite® và bánh lọc được rửa nhiều lần bằng THF (4x150 mL).

Phần lọc được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn rắn được khuấy trong hỗn hợp chứa diisopropyl ete (25 mL) và EtOAc (2 mL). Phần rắn được lọc, được rửa bằng DIPE (3 lần) và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-metoxy-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 10e (3,6 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 10f:

Dung dịch được khuấy chứa 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-metoxy-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 10e (3,6 g, 6,53 mmol) trong THF (130 mL) được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C, trong môi trường khí N₂. Phenyltrimetylamoni tribromua [CAS 4207-56-1] (2,58 g, 6,85 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 45 phút và ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Phần rắn được loại bỏ bằng cách lọc và được rửa bằng THF (2 lần). Phần dịch lọc được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-metoxy-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 10f (4,16 g), được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất 10 và phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh 10A và 10B:

Hỗn hợp chứa 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-1-(6-metoxy-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 10f (4,16 g, 6,50 mmol), 3-metoxy-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (2,62 g, 13,0 mmol) và diisopropyletylamin (2,24 mL, 13,0 mmol) trong CH₃CN được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 ngày trong môi trường khí N₂. Nước (250 mL) được bổ sung và sản phẩm được chiết bằng Et₂O (2 lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật cột sắc ký (pha cố định: Grace Reveleris® silica 100 g, pha động: heptan/EtOAc/EtOH gradien 100/0/0 đến 40/45/15). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế tiếp thông qua HPLC điều chế (pha cố định: RP XBridge® Prep C18 OBD – 10 µm, 50 x 150 mm, pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, CH₃CN). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn, chứa raxemic 2-(4-clo-2-metoxyphenyl)-2-((3-metoxy-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(6-metoxy-5-

(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 10, 380 mg), được đưa vào để phân tách không đối xứng bằng SFC điều chế (pha cố định: Chiralpak® Diacel AS 20 x 250 mm, pha động: CO₂, EtOH + 0,4% iPrNH₂). Các phân đoạn sản phẩm được kết hợp, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và đồng bay hơi với MeOH để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 10A dưới dạng sản phẩm chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất và chất đồng phân đối ảnh 10B dưới dạng sản phẩm chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai. Các chất đồng phân đối ảnh được kết tủa từ hỗn hợp dung môi của MeOH và nước, được lọc và được làm khô ở nhiệt độ 50°C trong chân không để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 10A (135 mg) và chất đồng phân đối ảnh 10B (144 mg).

Chất đồng phân đối ảnh 10A:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,87 (s, 3 H) 3,99 (s, 3 H) 6,22 (d, *J*=7,7 Hz, 1 H) 6,55 - 6,59 (m, 2 H) 6,88 - 6,91 (m, 1 H) 6,98 (dd, *J*=8,1, 1,8 Hz, 1 H) 7,08 (d, *J*=7,7 Hz, 1 H) 7,13 (d, *J*=2,2 Hz, 1 H) 7,21 (s, 1 H) 7,34 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 8,02 (d, *J*=1,5 Hz, 1 H) 8,41 (s, 1 H) 12,05 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp phương pháp LC-A): R_t 1,20 phút, MH⁺ 613

[α]_D²⁰: +81,4° (c 0,29, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 3,34 phút, MH⁺ 613, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 10B:

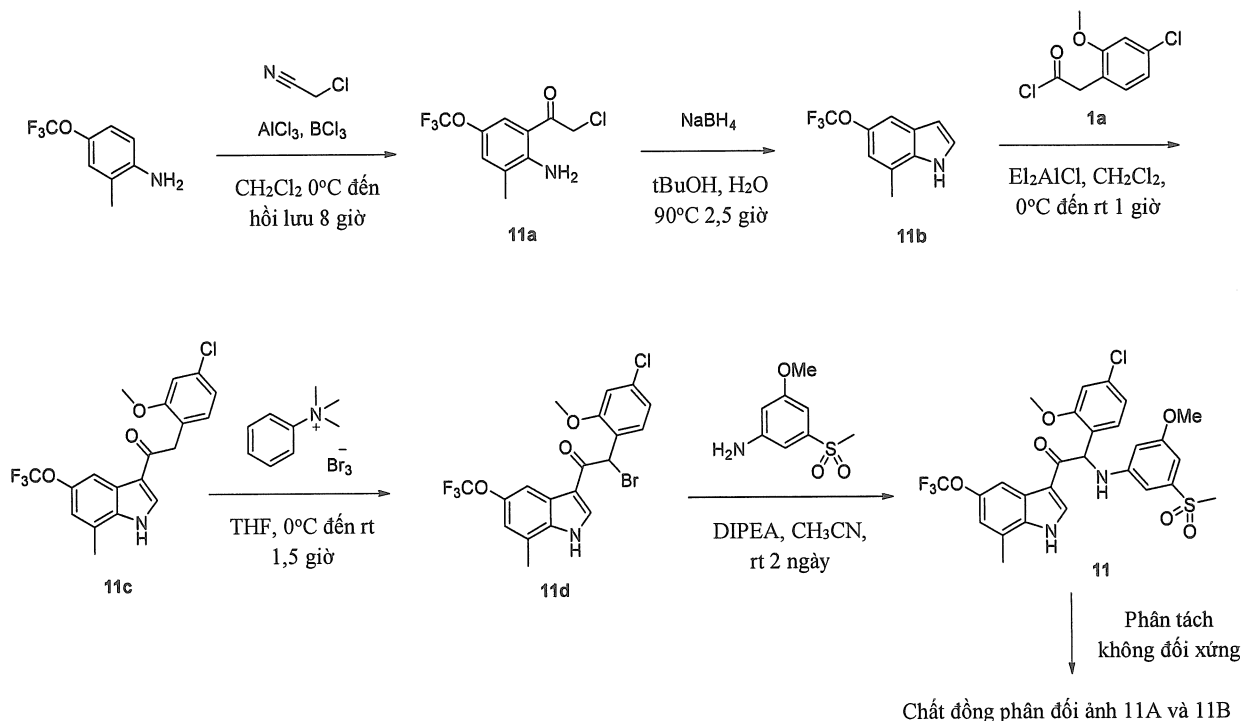
¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 3,87 (s, 3 H) 3,99 (s, 3 H) 6,22 (d, *J*=7,7 Hz, 1 H) 6,55 - 6,60 (m, 2 H) 6,90 (t, *J*=1,6 Hz, 1 H) 6,98 (dd, *J*=8,2, 2,0 Hz, 1 H) 7,08 (d, *J*=7,8 Hz, 1 H) 7,13 (d, *J*=2,2 Hz, 1 H) 7,21 (s, 1 H) 7,34 (d, *J*=8,4 Hz, 1 H) 8,01 (d, *J*=1,1 Hz, 1 H) 8,41 (s, 1 H) 12,08 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp phương pháp LC-A): R_t 1,20 phút, MH⁺ 613

[α]_D²⁰: -99,6° (c 0,261, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 3,69 phút, MH⁺ 613, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 11: Tổng hợp 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-2-((3-metox-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(7-metyl-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 11) và phân tách không đối xứng thành các chất đồng phân đối ảnh 11A và 11B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 11a:

Hỗn hợp chứa bo(III) clorua 1M trong CH_2Cl_2 (25,5 mL, 25,5 mmol) và nhôm(III) clorua (3,40 g, 25,5 mmol) được pha loãng bằng CH_2Cl_2 (20 mL) và làm lạnh trên bề nước đá trong môi trường khí N_2 . Dung dịch chứa 2-metyl-4-(triflometoxy)anilin [CAS 86256-59-9] (4,88 g, 25,5 mmol) và cloaxetonitril (3,24 mL, 51,0 mmol) trong CH_2Cl_2 (7,5 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Sau khi bổ sung, bề nước đá được loại bỏ và hỗn hợp được gia nhiệt trong điều kiện hồi lưu trong 8 giờ. Hỗn hợp được làm lạnh lại xuống nhiệt độ 0°C bằng cách sử dụng bề nước đá. HCl 2N (75 mL) được bổ sung nhỏ giọt, gây kết tủa mạnh. Huyền phù thu được được gia nhiệt trong điều kiện hồi lưu ở nhiệt độ 90 phút, và làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Phần rắn được loại bỏ bằng cách lọc. Bánh lọc được rửa bằng CH_2Cl_2 (4 lần). Phần lọc được kết hợp và các pha được tách riêng. Lớp hữu cơ được tách ra, được rửa bằng dung dịch NaHCO_3 chứa nước, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh (pha cố định: Biotage® SNAP Ultra Silica 100 g, pha động: heptan/ CH_2Cl_2 gradien 100/0 đến 0/100).

Các phân đoạn mong muốn được kết hợp và được cô đến khi thể tích còn lại bằng 30 mL. Phần kết tủa được lọc, được rửa bằng heptan và CH₂Cl₂, và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 1-(2-amino-3-metyl-5-(triflometoxy)phenyl)-2-cloetanon 11a (1,37 g). Phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn rắn được khuấy trong hỗn hợp chứa heptan (20 mL) và diisopropyl ete (3 mL), được lọc, được rửa bằng heptan (3 lần) và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra các phân đoạn thứ hai của 11a (0,24 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 11b:

Natri borohydrua (326 mg, 8,61 mmol) được bổ sung vào dung dịch đã khuấy chứa 1-(2-amino-3-metyl-5-(triflometoxy)phenyl)-2-cloetanon 11a (1,92 g, 7,17 mmol) trong *tert*-butanol (50 mL) và nước (5 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút và ở nhiệt độ 90°C trong 2,5 giờ. Nước (50 mL) được bổ sung và sản phẩm được chiết bằng dietyl ete (2 lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký nhanh (pha cố định: Biotage® SNAP Ultra Silica 25 g, pha động: heptan/EtOAc gradien 100/0 đến 20/80). Các phân đoạn mong muốn được kết hợp, được cô trong điều kiện áp suất giảm, đồng bay hơi với heptan và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 7-metyl-5-(triflometoxy)-1*H*-indol 11b (1,2 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 11c:

Dung dịch khuấy cơ học chứa 7-metyl-5-(triflometoxy)-1*H*-indol 11b (1,5 g, 6,97 mmol) trong CH₂Cl₂ (100 mL) được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C trong môi trường khí N₂. Dung dịch chứa dietyl nhôm clorua 1M trong hexan (10,5 mL, 10,5 mmol) được bổ sung nhỏ giọt và hỗn hợp thu được được giữ ở nhiệt độ 0°C trong 25 phút. Dung dịch chứa 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetyl clorua 1a (2,29 g, 10,5 mmol) trong CH₂Cl₂ (40 mL) được bổ sung nhỏ giọt trong khi giữ nhiệt độ phản ứng dưới 6°C. Tiếp tục khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và hỗn hợp phản ứng sau đó được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C và dung dịch chứa muối Rochelle [CAS 6100-16-9] (3,94 g, 13,9 mmol) trong nước (4 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được lọc qua dicalite® và bánh lọc được rửa bằng THF (5x 100 mL). Phần dịch

lọc được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn hóa rắn khi để yên qua đêm. Phần rắn được khuấy trong CH₃CN (5 mL), được lọc, được rửa bằng CH₃CN (3x 1,5 mL) và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(7-metyl-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 11c (1,9 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 11d:

Dung dịch được khuấy 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(7-metyl-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 11c (2,13 g, 5,35 mmol) trong THF (80 mL) được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C, trong môi trường khí N₂. Phenyltrimetylamoni tribromua [CAS 4207-56-1] (2,11 g, 5,62 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 40 phút và ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Phần rắn được loại bỏ bằng cách lọc và được rửa bằng THF (2 lần). Phần dịch lọc được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(7-metyl-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 11d (3,45 g), được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất 11 và phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh 11A và 11B:

Hỗn hợp chứa 2-brom-2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-1-(7-metyl-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon 11d (3,45 g, 6,87 mmol), 3-metoxi-5-(metylsulfonyl)anilin [CAS 62606-02-4] (2,76 g, 13,7 mmol) và diisopropyletylamin (2,37 mL, 13,7 mmol) trong CH₃CN (60 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 ngày trong môi trường khí N₂. Nước (125 mL) được bổ sung và sản phẩm được chiết bằng Et₂O (2 lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế thông qua HPLC điều chế (pha cố định: RP XBridge® Prep C18 OBD – 10 µm, 50 x 150 mm, pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, CH₃CN). Các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra raxemic 2-(4-clo-2-metoxyphe-nyl)-2-((3-metoxi-5-(metylsulfonyl)phenyl)amino)-1-(7-metyl-5-(triflometoxy)-1*H*-indol-3-yl)etanon (hợp chất 11, 1,74 g). Quá trình phân tách không đối xứng các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 11 (1,74 g) được thực hiện thông qua SFC điều chế (pha cố định: Chiralpak® Diacel AS 20 x 250 mm, pha động: CO₂, EtOH + 0,4% iPrNH₂). Các phân đoạn sản phẩm được kết hợp và

được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 11A dưới dạng sản phẩm chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất và chất đồng phân đối ảnh 11B dưới dạng sản phẩm chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai. Các chất đồng phân đối ảnh được kết tủa từ hỗn hợp dung môi của MeOH và nước, được lọc và được làm khô ở nhiệt độ 50°C trong chân không để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 11A (777 mg) và chất đồng phân đối ảnh 11B (712 mg).

Chất đồng phân đối ảnh 11A:

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,50 (s, 3 H) 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,28 (d, $J=7,8$ Hz, 1 H) 6,56 - 6,63 (m, 2 H) 6,92 (br s, 1 H) 6,97 (dd, $J=8,4$, 1,9 Hz, 1 H) 7,05 (br s, 1 H) 7,07 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,13 (d, $J=1,9$ Hz, 1 H) 7,35 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H) 7,90 (br s, 1 H) 8,53 (s, 1 H) 12,41 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp phương pháp LC-A): R_t 1,26 phút, MH^+ 597

$[\alpha]_D^{20}$: +81,3° (c 0,3455, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 2,96 phút, MH^+ 597, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 11B:

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,51 (s, 3 H) 3,09 (s, 3 H) 3,72 (s, 3 H) 4,00 (s, 3 H) 6,28 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 6,58 - 6,60 (m, 2 H) 6,92 (t, $J=1,8$ Hz, 1 H) 6,97 (dd, $J=8,4$, 1,9 Hz, 1 H) 7,05 (br s, 1 H) 7,06 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 7,13 (d, $J=2,1$ Hz, 1 H) 7,35 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H) 7,89 (br s, 1 H) 8,53 (s, 1 H) 12,37 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,26 phút, MH^+ 597

$[\alpha]_D^{20}$: -87,4° (c 0,342, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 3,44 phút, MH^+ 597, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Hoạt tính kháng virus của hợp chất theo sáng chế

Thử nghiệm kháng virus DENV-2

Hoạt tính kháng virus của tất cả các hợp chất theo sáng chế được thử nghiệm chống lại chủng DENV-2 16681 đã được đánh dấu bằng protein huỳnh quang xanh lục tăng cường (eGFP; bảng 1). Môi trường nuôi cấy gồm môi trường thiết yếu tối thiểu được bổ sung huyết thanh bào thai bê đã được bất hoạt bằng nhiệt 2%, gentamycin 0,04% (50mg/mL) và L-glutamin 2mM. Các tế bào Vero, thu được từ ECACC, được tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy và 25 μ L được bổ sung vào đĩa có 384 lỗ (2500 tế bào/lỗ), đã chứa hợp chất kháng virus. Thông thường, các đĩa này chứa dung dịch pha loãng 5 lần theo dãy của 9 bước pha loãng hợp chất thử nghiệm ở 200 lần nồng độ cuối cùng trong 100% DMSO (200nL). Ngoài ra, mỗi nồng độ hợp chất được thử nghiệm trong bốn bản sao (khoảng nồng độ cuối cùng: 25 μ M – 0,000064 μ M hoặc 2,5 μ M – 0,0000064 μ M đối với hợp chất có hoạt tính mạnh nhất). Cuối cùng, mỗi đĩa chứa các lỗ được chỉ định là đối chứng virus (chứa tế bào và virus trong điều kiện không chứa hợp chất), đối chứng tế bào (chứa tế bào, không chứa virus và hợp chất) và đối chứng môi trường (chứa môi trường, không chứa tế bào, virus và hợp chất). Các lỗ được chỉ định là đối chứng môi trường được bổ sung 25 μ L môi trường nuôi cấy thay vì các tế bào Vero. Ngay khi các tế bào đã được bổ sung vào các đĩa, các đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng để cho các tế bào phân phối đồng đều trong các lỗ. Tiếp theo, các đĩa được ủ trong thiết bị ủ được tạo ẩm đầy đủ (37°C, 5%CO₂) cho đến ngày tiếp theo. Sau đó, DENV-2 chủng 16681, được đánh dấu bằng eGFP, được bổ sung ở độ bội lây nhiễm (MOI) bằng 0,5. Do đó, 15 μ L huyền phù virus được bổ sung vào tất cả các lỗ chứa hợp chất thử nghiệm và vào các lỗ được chỉ định là đối chứng virus. Một cách song song, 15 μ L môi trường nuôi cấy được bổ sung vào đối chứng môi trường và đối chứng tế bào. Tiếp theo, các đĩa được ủ trong 3 ngày trong thiết bị ủ được tạo ẩm đầy đủ (37°C, 5%CO₂). Vào ngày đọc, huỳnh quang eGFP được xác định bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang tự động ở bước sóng 488 nm (laze màu xanh da trời). Sử dụng hệ LIMS nội bộ, đường cong đáp ứng liều lượng ức chế đối với mỗi hợp chất được tính toán và nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC₅₀) được xác định. Do đó, phần trăm ức chế (I) đối với mỗi nồng độ thử nghiệm được tính toán bằng cách sử dụng công thức sau: $I = 100 \cdot (S_T - S_{CC}) / (S_{VC} - S_{CC})$; S_T, S_{CC} và S_{VC} lần lượt là lượng tín hiệu eGFP trong các lỗ chứa hợp chất thử nghiệm, đối chứng tế bào và đối chứng virus. EC₅₀ là nồng độ của hợp chất tại đó sự sao chép của virus bị ức chế

50%, như được xác định bởi sự giảm 50% cường độ huỳnh quang eGFP so với đối chứng virus. EC₅₀ được tính toán bằng cách sử dụng phép nội suy tuyến tính.

Một cách song song, tính độc của các hợp chất được đánh giá trên cùng các đĩa. Ngay khi phép đọc tín hiệu eGFP đã được tiến hành, 40µL ATPlite, thuốc nhuộm xác định khả năng sống sót tế bào, được bổ sung vào tất cả các lỗ của đĩa có 384 lỗ. ATP có trong toàn bộ các tế bào có hoạt động chuyển hóa và nồng độ giảm rất nhanh khi các tế bào bị hoại tử hoặc chết theo chương trình. Hệ thống thử nghiệm ATPlite được dựa trên quá trình tạo ra ánh sáng do phản ứng của ATP với luxiferaza và D-luxiferin đã được bổ sung gây ra. Các đĩa được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, các đĩa được xác định trên ViewLux. Nồng độ gây độc tế bào tối đa một nửa (CC₅₀) cũng được xác định, nồng độ này được định nghĩa là nồng độ cần thiết để làm giảm tín hiệu phát sáng 50% so với của các lỗ đối chứng tế bào. Cuối cùng, chỉ số độ chọn lọc (SI) được xác định đối với các hợp chất này, chỉ số chọn lọc này được tính toán như sau: $SI = CC_{50}/EC_{50}$.

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

Hợp chất#	EC ₅₀ (µM)	N	CC ₅₀ (µM)	N	SI	N
1	0,00052	5	5,5	4	11500	4
1A	0,00026	8	4,3	8	19700	8
1B	0,012	6	6,5	6	530	6
2	0,00060	4	5,0	4	8410	4
2A	0,00026	4	4,8	4	22000	4
2B	0,026	4	7,4	4	285	4
3	0,00058	4	>11	6	37700	4
3A	0,00025	5	7,2	5	29800	5
3B	0,0038	3	>9,7	5	2480	3
4	0,00039	4	5,9	4	14900	4
4A	0,00027	11	4,2	13	16900	11
4B	0,036	5	12	5	341	5
5	0,00062	4	5,5	4	8780	4
5A	0,00041	5	5,0	5	12900	5
5B	0,068	4	13	4	206	4
6A	0,000068	8	>25	8	>65500	8
6B	0,019	4	11	4	603	4
7	0,00047	4	3,2	3	>7040	3
7A	0,013	3	6,8	3	538	3
7B	0,00020	5	3,2	5	18500	5
8	0,00013	6	2,9	7	30400	6

Hợp chất#	EC ₅₀ (μM)	N	CC ₅₀ (μM)	N	SI	N
8A	0,0030	3	7,4	3	2510	3
8B	0,000069	5	3,4	5	>40900	5
9	0,000074	6	3,1	8	>39100	6
9A	0,000067	9	2,9	9	>37500	9
9B	0,0038	5	6,2	6	1480	5
10A	0,00012	3	2,6	3	22600	3
10B	0,0039	3	9,8	3	2530	3
11A	0,000085	3	2,6	3	30100	3
11B	0,0041	3	9,2	3	2220	3

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

Thử nghiệm PCR-định lượng transcriptaza ngược tứ giá (RT-qPCR): Quy trình A.

Hoạt tính kháng virus của các hợp chất theo sáng chế được thử nghiệm chống lại DENV-1 chủng TC974#666 (NCPV; bảng 6), DENV-2 chủng 16681 (bảng 7), DENV-3 chủng H87 (NCPV; bảng 8) và DENV-4 chủng H241 (NCPV; bảng 9A) và SG/06K2270DK1/2005 (Eden; bảng 9B) trong thử nghiệm RT-qPCR. Do đó, các tế bào Vero được lây nhiễm với DENV-1, hoặc -2, hoặc -3, hoặc -4 trong sự có mặt hoặc vắng mặt của hợp chất thử nghiệm. Vào ngày 3 sau lây nhiễm, các tế bào được làm tan và các dịch tan tế bào được sử dụng để điều chế cADN của cả đích virus (3'UTR của DENV; bảng 2) và gen tham chiếu tế bào (β -actin, bảng 2). Sau đó, PCR thời gian thực kép được thực hiện trên thiết bị Lightcycler480. Giá trị Cp đã được tạo ra tỷ lệ nghịch với lượng biểu hiện ARN của các đích này. Sự ức chế sao chép DENV bởi hợp chất thử nghiệm dẫn đến sự chuyển dịch Cp đối với gen 3'UTR. Mặt khác, nếu hợp chất thử nghiệm là độc với tế bào, ảnh hưởng tương tự đến sự biểu hiện β -actin sẽ được quan sát thấy. Phương pháp $\Delta\Delta$ Cp so sánh được sử dụng để tính toán EC₅₀, phương pháp này được dựa trên sự biểu hiện gen tương đối của gen đích (3'UTR) đã được chuẩn hóa với gen giữ nhà tế bào (β -actin).

Bảng 2: Các đoạn môi và mẫu dò được sử dụng cho RT-PCR định lượng, thời gian thực.

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

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

^a Các yếu tố thuốc nhuộm chỉ thị (FAM, HEX) và yếu tố làm dừng (ZEN và IABkFQ) được thể hiện bằng chữ in đậm và in nghiêng.

^b Trình tự nucleotit của các đoạn môi và mẫu dò được chọn từ vùng bảo toàn trong vùng 3'UTR của hệ gen virus gây sốt dengue, dựa trên sự sắp hàng của 300 trình tự nucleotit của bốn týp huyết thanh gây sốt dengue được nộp lưu ở ngân hàng gen (Gong et al., 2013, Methods Mol Biol, Chapter 16).

Môi trường nuôi cấy gồm môi trường thiết yếu tối thiểu được bổ sung huyết thanh bào thai bê đã được bất hoạt bằng nhiệt 2%, gentamycin 0,04% (50mg/mL) và L-glutamin 2mM. Các tế bào Vero, thu được từ ECACC, được tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy và 75 μ L/lỗ được bổ sung trong đĩa có 96 lỗ (10000 tế bào/lỗ), đã chứa hợp chất kháng virus. Thông thường, các đĩa này chứa dung dịch pha loãng 5 lần theo dãy của 9 bước pha loãng hợp chất thử nghiệm ở 200 lần nồng độ cuối cùng trong 100% DMSO (500nL; khoảng nồng độ cuối cùng: 25 μ M – 0,000064 μ M hoặc 2,5 μ M – 0,0000064 μ M đối với hợp chất có hoạt tính mạnh nhất). Ngoài ra, mỗi đĩa chứa các lỗ được chỉ định là đối chứng virus (chứa tế bào và virus trong điều kiện không chứa hợp chất) và đối chứng tế bào (chứa tế bào, không chứa virus và hợp chất). Ngay khi các tế bào được bổ sung trong các đĩa, các đĩa được ủ trong thiết bị ủ được tạo ẩm đầy đủ (37°C, 5%CO₂) cho đến ngày tiếp theo. Virus gây sốt dengue týp huyết thanh -1,2, 3 và 4 được pha loãng để thu được Cp bằng ~22-24 trong thử nghiệm. Do đó, 25 μ L huyền phù virus được bổ sung đối với toàn bộ các lỗ chứa hợp chất thử nghiệm và đối với các lỗ được chỉ định là đối chứng virus. Một cách song song, 25 μ L môi trường nuôi cấy được bổ sung vào đối chứng tế bào. Tiếp theo, các đĩa được ủ trong 3 ngày trong thiết bị ủ được tạo ẩm đầy đủ (37°C, 5%CO₂). Sau 3 ngày, dịch nổi bề mặt được loại bỏ khỏi các lỗ và các tế bào được rửa 2 lần bằng PBS lạnh đá (~100 μ L). Các viên tròn tế bào trong các đĩa có 96 lỗ được bảo quản ở nhiệt độ -80°C trong ít nhất 1 ngày. Tiếp theo, ARN được chiết bằng cách sử dụng bộ kit làm tan Cells-to-CT™, theo

hướng dẫn của nhà sản xuất (Life Technologies). Các dịch tan tế bào có thể được bảo quản ở nhiệt độ -80°C hoặc được sử dụng ngay trong bước phiên mã ngược.

Để chuẩn bị bước phiên mã ngược, hỗn hợp A (bảng 3A) được điều chế và $7,57\mu\text{L}/\text{lỗ}$ được phân phối trong đĩa có 96 lỗ. Sau khi bổ sung $5\mu\text{L}$ dịch tan tế bào, bước biến tính 5 phút ở nhiệt độ 75°C được thực hiện (bảng 3B). Sau đó, $7,43\mu\text{L}$ hỗn hợp B được bổ sung (bảng 3C) và bước phiên mã ngược được bắt đầu (bảng 3D) để tạo ra cADN.

Cuối cùng, hỗn hợp RT-qPCR được điều chế, hỗn hợp C (bảng 4A), và $22,02\mu\text{L}/\text{lỗ}$ được phân phối trong đĩa LightCycler qPCR có 96 lỗ được bổ sung $3\mu\text{L}$ cADN và qPCR được thực hiện theo các điều kiện trong bảng 4B trên LightCycler 480.

Sử dụng phần mềm LightCycler và hệ LIMS nội bộ, đường cong đáp ứng liều lượng đối với mỗi hợp chất được tính toán và nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) và nồng độ gây độc tế bào tối đa một nửa (CC_{50}) được xác định.

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

A Hỗn hợp A

Đĩa	8				Thể tích phản ứng (μl)	20
Mẫu	828					
Thành phần của hỗn hợp	Nồng độ				Thể tích (μl)	
	Đơn vị	Gốc	Cuối cùng		1 mẫu	x mẫu
Milli-Q H ₂ O					7,27	6019,56
R3utr425	μM	20		0,27	0,15	124,20
Ractin876	μM	20		0,27	0,15	124,20
			Thể tích hỗn hợp/lỗ (μl)		7,57	
			Các dịch tan tế bào		5,00	

B Bước biến tính:

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
------	----------	-----------

Biến tính	75°C	5'
Giữ	4°C	giữ

C Hỗn hợp B

Mẫu	864				
Thành phần của hỗn hợp	Nồng độ			Thể tích (μl)	
	Đơn vị	Gốc	Cuối cùng	1 mẫu	x mẫu
Đệm HIFI mở rộng 2	X	10,00	1,00	2,00	1728,0
MgCl ₂	mM	25,00	3,50	2,80	2419,2
dNTP	mM	10,00	1,00	2,00	1728,0
Chất ức chế ARNaza	U/μl	40,00	1,00	0,50	432,0
RT mở rộng	U/μl	50,00	0,33	0,13	112,3
			Tổng thể tích hỗn hợp (μl)	7,43	

D Quy trình tổng hợp cADN

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

Bảng 4: Hỗn hợp qPCR và quy trình.

A Hỗn hợp C

Mẫu	833			Thể tích phản ứng (μl)	25
Thành phần của hỗn hợp	Nồng độ			Thể tích (μl)	
	Đơn vị	Gốc	Cuối cùng	1 mẫu	x mẫu
H ₂ O loại dùng cho PCR Roche				7,74	6447,42
Hỗn hợp Roche 2xMM	X	2	1	12,50	10412,50
F3utr258	μM	20	0,3	0,38	316,54
R3utr425	μM	20	0,3	0,38	316,54
P3utr343	μM	20	0,1	0,13	108,29

Factin743	μM	20	0,3	0,38	316,54
Ractin876	μM	20	0,3	0,38	316,54
Pactin773	μM	20	0,1	0,13	108,29
Thể tích hỗn hợp / Ống (μl)				22,02	
cADN				3,00	

B Quy trình qPCR3

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	Tỷ lệ biến đổi	
Ủ sơ bộ/biến tính	95°C	10 phút	4,4	40 chu kỳ
Biến tính	95°C	10 giây	4,4	
Ủ	58°C	1 phút	2,2	
Kéo giãn	72°C	1 giây	4,4	
Làm nguội	40°C	10 giây	1,5	

Thử nghiệm PCR-phiên mã ngược định lượng (RT-qPCR) từ giá: Quy trình B.

Hoạt tính kháng virus của các hợp chất theo sáng chế được thử nghiệm chống lại DENV-1 chủng Djibouti (D1/H/IMTSSA/98/606; bảng 6), DENV-2 chủng NGC (bảng 7), DENV-3 chủng H87 (bảng 8) và DENV-4 chủng SG/06K2270DK1/2005 (bảng 9B) trong thử nghiệm RT-qPCR. Các tế bào Vero-B hoặc Vero-M (5×10^4) được gieo trong đĩa có 96 lỗ. Một ngày sau, môi trường nuôi cấy được thay bằng 100 μL môi trường thử nghiệm chứa dung dịch pha loãng theo dãy 2 lần, 3 lần hoặc 5 lần của hợp chất (khoảng nồng độ: 50 $\mu\text{g/mL}$ – 0,00038 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ – 0,0076 $\mu\text{g/mL}$, và 50 $\mu\text{g/mL}$ – 0,00013 $\mu\text{g/mL}$, một cách tương ứng) và 100 μL chất cấy truyền virus gây sốt dengue (DENV). Sau khoảng thời gian ủ 2 giờ, các lớp đơn tế bào được rửa 3 lần bằng môi trường thử nghiệm để loại bỏ virus dư, không được hấp thụ và giống cấy được ủ thêm trong 4 ngày (DENV-2 NGC) hoặc 7 ngày (DENV-1 Djibouti chủng D1/H/IMTSSA/98/606, DENV-3 chủng H87 kiểu gốc, DENV-4 chủng H241, và DENV-4 chủng EDEN) trong sự có mặt của chất ức chế. Dịch nổi bề mặt được thu gom và lượng tải ARN virus được xác định bằng RT-PCR định lượng thời gian thực. Nồng độ hiệu quả 50% (EC_{50}), mà được định nghĩa là nồng độ hợp chất cần để ức chế sự sao chép ARN virus xuống 50%, được xác định bằng cách sử dụng phép nội suy logarit.

ARN được tách riêng từ 100 μL (hoặc trong một vài trường hợp là 150 μL) dịch nổi bề mặt bằng bộ kit NucleoSpin 96 Virus (Filter Service, Dürren, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trình tự của các đoạn mồi TaqMan (DENV-For, DENV-Rev; bảng 5) và mẫu dò TaqMan (DENV-Mẫu dò bảng 5) được chọn từ gen phi cấu trúc 3 (NS3) hoặc NS5, của các flavivirus tương ứng sử dụng phần mềm biểu thị đoạn mồi (Primer Express software) (phiên bản 2.0; Applied Biosystems, Lennik, Belgium). Mẫu dò TaqMan được đánh dấu huỳnh quang bằng 6-cacboxyflorescein (FAM) ở đầu 5' dưới dạng thuốc nhuộm chỉ thị, và bằng chất liên kết rãnh phụ (MGB) ở đầu 3' dưới dạng chất làm dừng (bảng 5). RT-PCR định lượng, một bước được thực hiện trong thể tích tổng cộng bằng 25 μL , chứa 13,9375 μL H_2O , 6,25 μL hỗn hợp chính (Eurogentec, Seraing, Belgium), 0,375 μL đoạn mồi xuôi, 0,375 μL đoạn mồi ngược, 1 μL mẫu dò, 0,0625 μL transcriptaza ngược (Eurogentec) và 3 μL mẫu. RT-PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hệ PCR thời gian thực nhanh ABI 7500 (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) sử dụng các điều kiện sau: 30 phút ở nhiệt độ 48°C và 10 phút ở nhiệt độ 95 °C, sau đó 40 chu kỳ 15 giây ở nhiệt độ 95°C và 1 phút ở nhiệt độ 60°C. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm ABI PRISM 7500 SDS (phiên bản 1.3.1; Applied Biosystems). Để định lượng tuyệt đối, các đường cong chuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng các dung dịch pha loãng 10 lần của các chế phẩm khuôn có nồng độ đã biết.

Bảng 5: Các đoạn mồi và mẫu dò được sử dụng cho RT-PCR định lượng, thời gian thực.

Đoạn mồi/Mẫu dò	Trình tự (5' $\rightarrow$ 3') ^a	Nguồn ^b	Đích
DENV-For	TCGGAGCCGGAGTTTACAAA (SEQ ID N.1)	DENV 2 NGC	NS3
DENV-Rev	TCTTAACGTCCGCCCATGAT (SEQ ID N.2)		
DENV-Mẫu dò	FAM-ATTCCACACAATGTGGCAT-MGB (SEQ ID N.3)		
DenS	GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT (SEQ ID N.4)	DENV-1, -3, -4	NS5
DenAS1-3	CATTCCATTTTCTGGCGTTC (SEQ ID N.5)	DENV-1, -3	
DenAS4	CAATCCATCTTGCGGCGCTC (SEQ ID N.6)	DENV-4	
DEN_1-3	FAM-CAGCATCATTCCAGGCACAG-	DENV-1, -3	

Đoạn mồi/Mẫu dò	Trình tự (5' → 3') ^a	Nguồn ^b	Đích
mẫu dò	MGB (SEQ ID N.7)		
DEN_4 mẫu dò	FAM -CAACATCAATCCAGGCACAG- MGB (SEQ ID N.8)	DENV-4	

^a Các yếu tố thuốc nhuộm chỉ thị (FAM) và yếu tố làm dừng (MGB/TAMRA) được thể hiện bằng chữ in đậm và in nghiêng.

^b Trình tự nucleotit và vị trí của các đoạn mồi và mẫu dò trong hệ gen được suy từ trình tự nucleotit của DENV 2 NGC (Số tiếp cận ngân hàng gen M29095; Irie et al., 1989), virus gây sốt dengue tít huyết thanh 1 Djibouti chủng D1/H/IMTSSA/98/606 (Số tiếp cận ngân hàng gen AF298808), virus gây sốt dengue tít huyết thanh 3 chủng H87 kiểu gốc (c93130), virus gây sốt dengue tít huyết thanh 4 chủng H241 (không có trình tự nào có sẵn), virus gây sốt dengue tít huyết thanh 4 chủng EDEN (không có trình tự nào có sẵn)

Thử nghiệm gây độc tế bào

Tác động gây độc tế bào tiềm năng của các hợp chất được đánh giá ở các tế bào Vero-B hoặc Vero-M bất động chưa bị lây nhiễm. Các tế bào được gieo ở mật độ 5×10^4 tế bào/lỗ trong đĩa có 96 lỗ trong sự có mặt của dung dịch pha loãng hai, ba hoặc năm lần theo dãy của hợp chất (nằm trong khoảng từ 50 µg/mL – 0,0038 µg/mL, 50 µg/mL – 0,0076 µg/mL, và 50 µg/mL – 0,00013 µg/mL, một cách tương ứng) và được ủ trong từ 4 đến 7 ngày. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ và 100 µL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-cacboxymetoxypheyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli/phenazinmetosulfat (MTS/PMS; Promega, Leiden, The Netherlands) trong PBS được bổ sung vào mỗi lỗ. Sau khoảng thời gian ủ 2 giờ ở nhiệt độ 37 °C, mật độ quang được xác định ở 498 nm. Hoạt tính gây độc tế bào được tính toán bằng cách sử dụng công thức sau: % độ sống sót tế bào = $100 \times (OD_{\text{Hợp chất}}/OD_{\text{CC}})$, trong đó $OD_{\text{Hợp chất}}$ và OD_{CC} lần lượt tương ứng với mật độ quang ở bước sóng 498 nm của giống cấy tế bào chưa bị lây nhiễm được xử lý bằng hợp chất và mật độ quang của giống cấy tế bào chưa bị lây nhiễm, chưa được xử lý. Nồng độ gây độc tế bào 50% (nghĩa là, nồng độ làm giảm số lượng tế bào tổng cộng xuống 50%; CC_{50}) được tính toán bằng cách sử dụng phép nội suy tuyến tính.

Bảng 6: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất đối với các hợp chất chống lại typ huyết thanh 1 trong thử nghiệm RT-qPCR

Hợp chất#	Quy trình A						Quy trình B					
	RT-qPCR typ huyết thanh 1 TC974#666						RT-qPCR typ huyết thanh 1 Djibouti					
	EC ₅₀ (μM)	N	CC ₅₀ (μM)	N	SI	N	EC ₅₀ (μM)	N	CC ₅₀ (μM)	N	SI	N
1A	0,0025	9	5,0	9	1950	9	<0,015	3	8	6	>533	3
2A	0,0024	6	5,3	6	2190	6	<0,014	2	7,3	3	>523	2
3A	0,0042	6	5,5	5	1360	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4A	0,00097	8	5,1	8	4400	8	<0,014	3	4,3	4	>306	3
5A	0,0036	6	5,2	6	1460	6	<0,014	2	9,2	2	>658	2
6A	0,0016	6	>10	6	>8160	6	<0,014	2	>92	3	>6571	2
7B	0,00040	3	2,2	2	6600	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8B	0,00045	5	1,9	6	3130	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9A	0,00011	4	1,7	5	13300	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10A	0,00027	2	1,6	2	5670	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11A	0,00013	2	>2,5	2	>22100	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND

N= số lượng thử nghiệm độc lập trong đó các hợp chất được thử nghiệm. ND: không xác định.

Bảng 7: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất chống lại tít huyết thanh 2 trong thử nghiệm RT-qPCR

Hợp chất#	Quy trình A						Quy trình B					
	RT-qPCR tít huyết thanh 2 16681						RT-qPCR tít huyết thanh 2 NGC-Tongalike					
	EC ₅₀ (μ M)	N	CC ₅₀ (μ M)	N	SI	N	EC ₅₀ (μ M)	N	CC ₅₀ (μ M)	N	SI	N
1A	0,00028	7	3,8	12	15300	8	<0,00027	4	11	4	>40470	4
2A	0,00024	5	4,9	6	21500	5	<0,00024	1	11	1	>45833	1
3A	0,00030	6	5,0	6	9970	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4A	0,00020	7	3,9	10	25400	6	0,00032	1	6,6	1	20339	1
5A	0,00034	5	5,8	6	19000	5	<0,00023	1	ND	ND	ND	ND
6A	0,00011	7	>10	6	>142306	6	<0,00024	1	> 92	1	>383333	1
7B	0,00017	3	2,9	5	23600	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8B	0,00031	4	2,2	6	23400	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9A	0,000057	3	2,2	4	31700	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10A	0,000057	3	1,6	3	28200	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11A	0,000051	3	>2,5	3	>69000	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND

N= số lượng thử nghiệm độc lập trong đó các hợp chất được thử nghiệm. ND: không xác định.

Bảng 8: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất chống typ huyết thanh 3 trong thử nghiệm RT-qPCR

Hợp chất#	Quy trình A						Quy trình B					
	RT-qPCR typ huyết thanh 3 H87						RT-qPCR typ huyết thanh 3 H87					
	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
1A	0,023	7	3,7	5	169	5	<0,015	3	8,0	6	>533	3
2A	0,019	4	4,3	3	224	3	<0,014	1	7,3	3	>521	1
3A	0,048	4	4,1	3	67	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4A	0,015	6	3,1	4	195	4	<0,014	1	4,3	4	>307	1
5A	0,053	4	4,4	2	75	2	0,022	1	9,2	2	422	1
6A	0,019	4	6,7	3	318	3	<0,014	1	> 92	3	>6571	1
7B	0,0078	3	1,6	3	240	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8B	0,0058	4	2,1	3	609	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9A	0,0021	3	1,6	1	474	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10A	0,0037	3	1,0	3	280	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11A	0,0012	3	>2,5	3	>2630	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND

N= số lượng thử nghiệm độc lập trong đó các hợp chất được thử nghiệm. ND: không xác định.

Bảng 9: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất chống týp huyết thanh 4 trong thử nghiệm RT-qPCR

A

Hợp chất#	Quy trình A					
	RT-qPCR týp huyết thanh 4 H241					
	EC50 (μ M)	N	CC50 (μ M)	N	SI	N
1A	0,093	10	3,0	9	30	9
2A	0,083	6	3,7	6	42	6
3A	0,11	6	3,8	4	37	4
4A	0,053	11	2,5	11	54	11
5A	0,10	6	4,0	6	39	6
6A	0,095	7	7,7	5	69	5
7B	0,044	5	2,2	5	53	5
8B	0,015	5	1,7	3	122	3
9A	0,012	5	1,5	5	121	5
10A	0,011	3	1,6	2	127	2
11A	0,011	3	3,1	3	>250	3

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

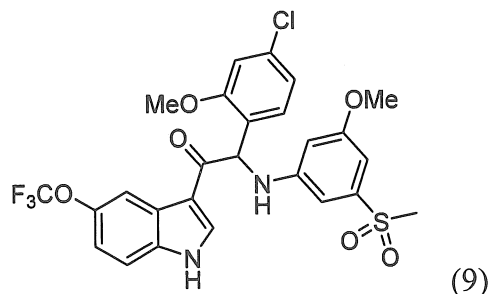
B

Hợp chất#	Quy trình A					
	RT-qPCR týp huyết thanh 4 EDEN					
	EC50 (μ M)	N	CC50 (μ M)	N	SI	N
1A	0,0024	5	4,6	5	1927	5
2A	0,0013	2	5,0	2	3913	2
3A	0,0030	2	5,4	2	1802	2
4A	0,00055	2	> 2,5	1	> 4520	1
5A	0,0029	2	5,5	2	1878	2
6A	0,00042	2	> 10	2	> 24085	2

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức 9:



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

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là: Chất đồng phân đối ảnh 9A, trong đó:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3,09 (s, 3H) 3,73 (s, 3H) 3,99 (s, 3H) 6,26 (d, $J=7,9$ Hz, 1H) 6,55 - 6,62 (m, 2H) 6,91 (t, $J=1,5$ Hz, 1H) 6,98 (dd, $J=8,4$, 2,0 Hz, 1H) 7,07 (d, $J=7,9$ Hz, 1H) 7,13 (d, $J=2,0$ Hz, 1H) 7,21 (dd, $J=8,8$, 1,8 Hz, 1H) 7,36 (d, $J=8,4$ Hz, 1H) 7,59 (d, $J=8,8$ Hz, 1H) 8,07 (d, $J=0,9$ Hz, 1H) 8,55 (s, 1H) 12,29 (br s, 1H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,20 phút, MH^+ 583

$[\alpha]_D^{20}$: +130,3° (c 0,555, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 3,10 phút, MH^+ 583, độ tinh khiết không đối xứng 100%,

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

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là: Chất đồng phân đối ảnh 9B, trong đó:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3,09 (s, 3H) 3,73 (s, 3H) 3,99 (s, 3H) 6,26 (d, $J=7,9$ Hz, 1H) 6,56 - 6,62 (m, 2H) 6,92 (t, $J=2,0$ Hz, 1H) 6,98 (dd, $J=8,1$, 2,0 Hz, 1H) 7,07 (d, $J=7,9$ Hz, 1H) 7,13 (d, $J=2,0$ Hz, 1H) 7,22 (dd, $J=8,8$, 1,8 Hz, 1H) 7,36 (d, $J=8,4$ Hz, 1H) 7,59 (d, $J=8,8$ Hz, 1H) 8,07 (d, $J=0,9$ Hz, 1H) 8,55 (s, 1H) 12,30 (br s, 1H)

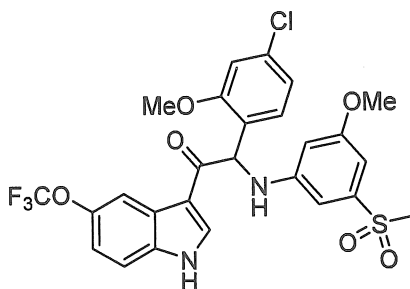
LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 1,20 phút, MH^+ 583

$[\alpha]_D^{20}$: -133,2° (c 0,5, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 3,50 phút, MH^+ 583, độ tinh khiết không đối xứng 100%,

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

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



5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là muối được dụng.

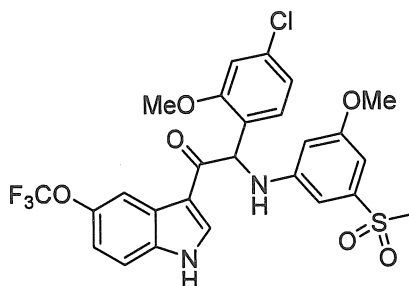
6. Hợp chất, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó hợp chất này là ở dạng tinh thể.

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

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

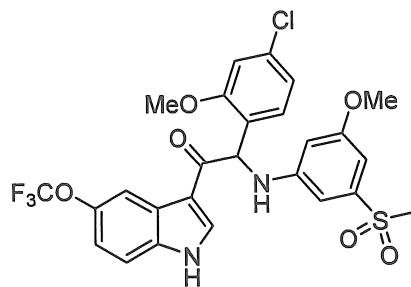
9. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 hoặc dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của nó cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

10. Hợp chất có công thức 9:



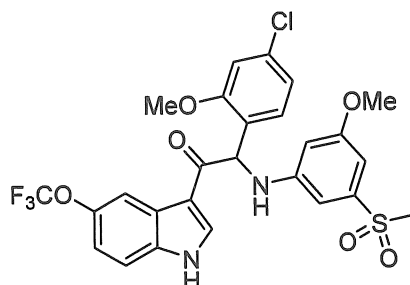
hoặc dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của nó để sử dụng làm thuốc.

11. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức 9:



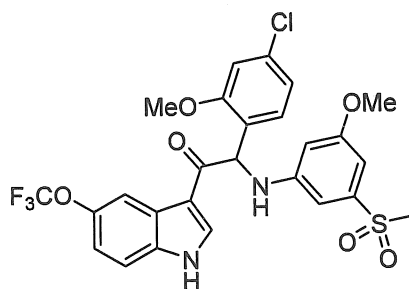
hoặc dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng để sử dụng làm thuốc.

12. Hợp chất có công thức 9:



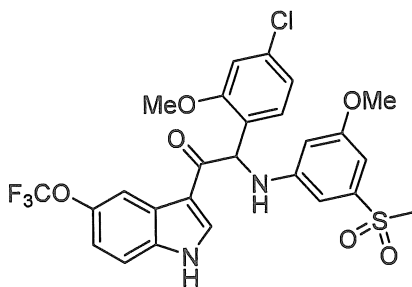
hoặc dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó để sử dụng trong điều trị sốt dengue.

13. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức 9:



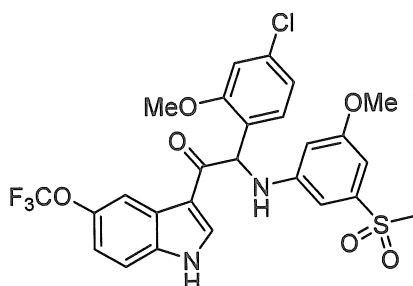
hoặc dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng để sử dụng trong điều trị sốt dengue.

14. Hợp chất có công thức 9:



hoặc dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó để sử dụng trong việc ức chế sự sao chép của (các) virus gây sốt dengue trong mẫu sinh học hoặc bệnh nhân.

15. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức 9:



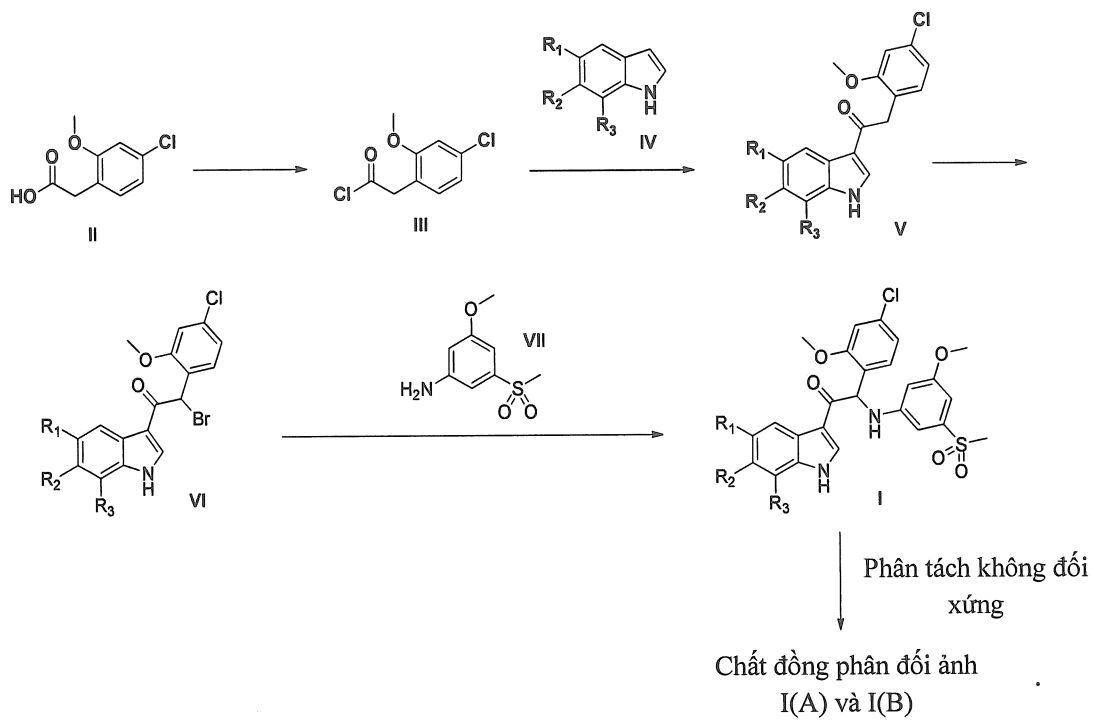
hoặc dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng để sử dụng trong việc ức chế sự sao chép của (các) virus gây sốt dengue trong mẫu sinh học hoặc bệnh nhân.

16. Phương pháp tổng hợp hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 bao gồm các bước:

- a) biến đổi axit 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetic (II) thành 2-(4-clo-2-metoxypheyl)axetyl clorua (III) tương ứng bằng chất phản ứng clo hóa;
- b) phản ứng Friedel-Crafts của axit clorua (III) với indol được thể có công thức chung (IV) được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng axit Lewis trong dung môi thích hợp và trong điều kiện phản ứng thích hợp, để tạo ra indol được axyl hóa ở vị trí 3 có công thức chung (V), trong đó R_1 là OCF_3 , R_2 là H và R_3 là H;
- c) brom hóa (V) bằng chất phản ứng trong dung môi thích hợp, để tạo ra hợp chất có công thức chung (VI);

d) cho hợp chất có công thức chung (VI) phản ứng với 3-metoxi-5-(metylsulfonyl)-anilin (VII) trong dung môi thích hợp và sử dụng bazơ để tạo ra hợp chất có công thức chung I dưới dạng hỗn hợp racemic;

e) phân tách không đối xứng hợp chất có công thức chung I để tạo ra các chất đồng phân đối ảnh A và B có công thức chung I, trong đó R_1 là OCF_3 , R_2 là H và R_3 là H



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Janssen Pharmaceuticals, Inc
Katholieke Universiteit Leuven

<120> Hợp chất indol được thể một lần hoặc hai lần dùng làm chất ức chế sự sao chép virus gây sốt dengue, được phẩm và phương pháp tổng hợp hợp chất này

<130> TIP 328 PCT

<150> EP15166900.9

<151> 2015-05-08

<150> EP16163342.5

<151> 2016-03-31

<160> 14

<170> BISSAP 1.2

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Virus gây sốt dengue

<220>

<221> Nguồn

<222> 1..20

<223> /Sinh vật = " virus gây sốt dengue"

/mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 1

tcggagccgg agtttcaaaa

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Virus gây sốt dengue

<220>

<221> Nguồn

<222> 1..20

<223> /Sinh vật = " virus gây sốt dengue"

/mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 2

tcttaacgtc cgcccatgat

20

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Virus gây sốt dengue

<220>

<221> Nguồn

<222> 1..19

<223> /Sinh vật = " virus gây sốt dengue"

/mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 3

attccacaca atgtggcat

19

<210> 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Virus gây sốt dengue

<220>
 <221> Nguồn
 <222> 1. . 23
 <223> /Sinh vật = " virus gây sốt dengue"
 /mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 4
 ggatagacca gagatcctgc tgt

23

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus gây sốt dengue

<220>
 <221> Nguồn
 <222> 1. . 20
 <223> /Sinh vật = " virus gây sốt dengue"
 /mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 5
 cattccattt tctggcgctc

20

<210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus gây sốt dengue

<220>
 <221> Nguồn
 <222> 1. . 20
 <223> /Sinh vật = " virus gây sốt dengue"
 /mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 6
 caatccatct tgcggcgctc

20

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus gây sốt dengue

<220>
 <221> Nguồn
 <222> 1. . 20
 <223> /Sinh vật = " virus gây sốt dengue"
 /mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 7
 cagcatcatt ccaggcacag

20

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus gây sốt dengue

<220>
 <221> Nguồn
 <222> 1. . 20
 <223> /Sinh vật = " virus gây sốt dengue"
 /mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 8

caacatcaat ccaggcacag

20

<210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virut gây sốt dengue

<220>
 <221> Nguồn
 <222> 1..19
 <223> /Sinh vật = " virut gây sốt dengue"
 /mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 9
 cggttagagg agaccctc

19

<210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virut gây sốt dengue

<220>
 <221> Nguồn
 <222> 1..21
 <223> /Sinh vật = " virut gây sốt dengue"
 /mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 10
 gagacagcag gatctctggt c

21

<210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Virut gây sốt dengue

<220>
 <221> Nguồn
 <222> 1..28
 <223> /Sinh vật = " virut gây sốt dengue"
 /mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 11
 aaggactaga ggtagagga gaccccc

28

<210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Virut gây sốt dengue

<220>
 <221> Nguồn
 <222> 1..18
 <223> /Sinh vật = " virut gây sốt dengue"
 /mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 12
 ggccaggtca tcaccatt

18

<210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virut gây sốt dengue

<220>
<221> Nguồn
<222> 1..21
<223> /Sinh vật = " virus gây sốt dengue"
/mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 13
atgtccacgt cacacttcat g

21

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Virus gây sốt dengue

<220>
<221> Nguồn
<222> 1..21
<223> /Sinh vật = " virus gây sốt dengue"
/mol_typ = "ADN chưa được chỉ định"

<400> 14
ttccgctgcc ctgaggctct c

21