



(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)



1-0037541

(51)⁷ C07D 209/30; A61K 31/407; A61K 31/437; A61P 31/14; C07D 513/04; C07D 209/32; C07D 209/42; C07D 471/04; A61K 31/404 (13) B

(21) 1-2019-06406

(22) 18/05/2018

(86) PCT/EP2018/063029 18/05/2018

(87) WO 2018/215316 29/11/2018

(30) 17172247.3 22/05/2017 EP

(45) 27/11/2023 428

(43) 25/06/2020 387ASC

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

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

2. KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (BE)

Waaistraat 6, bus 5105, 3000 Leuven, Belgium

(72) BONFANTI, Jean-François (FR); KESTELEYN, Bart, Rudolf, Romanie (BE);

BARDIOT, Dorothee, Alice, Marie-Eve (FR); MARCHAND, Arnaud, Didier, M

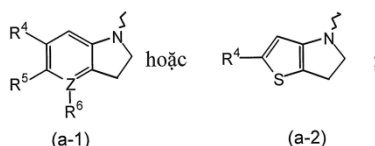
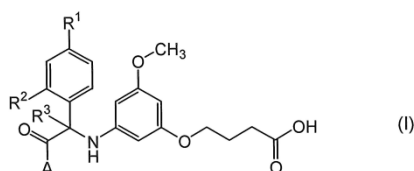
(FR); COESEMANS, Erwin (BE); DE BOECK, Benoît, Christian, Albert, Ghislain

(BE); RABOISSON, Pierre, Jean-Marie, Bernard (FR).

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

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

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất indolin được thể. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm hoặc chế phẩm chứa tổ hợp của hợp chất, dược phẩm hoặc chế phẩm để sử dụng làm thuốc, tốt hơn là để ngăn chặn hoặc điều trị lây nhiễm virus dengue. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình điều chế hợp chất này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất indolin được thế. Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm hoặc dạng điều chế tổ hợp của hợp chất, đề cập đến chế phẩm hoặc dạng điều chế để sử dụng làm thuốc, tốt hơn là để ngăn ngừa hoặc điều trị lây nhiễm virus dengue. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình điều chế hợp chất.

Tình trạng kỹ thuật được đề cập

Flavivirus, được truyền qua muỗi hoặc con ve, gây nhiễm trùng đe dọa tính mạng ở người, như viêm não và sốt xuất huyết. Bốn serotyp khác biệt, nhưng có liên quan gần với nhau của flavivirus dengue được biết, được gọi là DENV-1, -2, -3, và -4. Dengue là đặc thù ở hầu hết các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới, chủ yếu ở khu vực thành thị và bán đô thị. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), 2,5 tỷ người trong đó 1 tỷ trẻ em có nguy cơ mắc DENV (WHO, 2002). Ước tính có khoảng 50 đến 100 triệu ca sốt dengue [DF], nửa triệu trường hợp mắc bệnh dengue nặng (tức là sốt xuất huyết dengue [DHF] và hội chứng sốc dengue [DSS]), và hơn 20.000 cái chết xảy ra mỗi năm trên toàn thế giới. DHF đã trở thành nguyên nhân hàng đầu gây ra nhập viện và tử vong ở trẻ em ở vùng địa phương. Cùng đó, dengue là nguyên nhân phổ biến nhất của bệnh arboviral. Vì những vụ dịch lớn gần đây ở các nước nằm ở Mỹ Latin, Đông Nam Á và Tây Thái Bình Dương (bao gồm Brazil, Puerto Rico, Venezuela, Campuchia, Indonesia, Việt Nam, Thái Lan), số ca mắc dengue đã tăng mạnh trong những năm qua. Không chỉ những ca mắc dengue tăng khi bệnh lan sang các khu vực mới, mà các vụ dịch có xu hướng nghiêm trọng hơn.

Sau khi bị nhiễm serotyp khác, các kháng thể khác loại đã có từ trước tạo thành phức hợp với serotyp virus dengue lây nhiễm mới nhưng không vô hiệu hóa mầm bệnh. Thay vào đó, virus xâm nhập vào các tế bào được cho là được tạo điều kiện, dẫn đến sự nhân lên của virus không kiểm soát được và chuẩn độ virus pic cao hơn. Trong cả nhiễm trùng tiên phát và thứ phát, chuẩn độ virus cao hơn có liên quan đến bệnh dengue nặng hơn. Vì kháng thể của mẹ có thể dễ dàng truyền sang nhi nhi bằng cách cho con bú, đây là một trong những lý do khiến trẻ bị ảnh hưởng với bệnh dengue nặng hơn người lớn.

Ở những vị trí có hai hoặc nhiều serotyp lưu hành đồng thời, còn được gọi là vùng lưu hành nặng, nguy cơ mắc bệnh dengue nghiêm trọng cao hơn đáng kể do tăng nguy cơ bị nhiễm trùng thứ phát nặng hơn. Ngoài ra, trong một số trường hợp vùng lưu hành nặng, xác suất của sự xuất hiện của chủng do virus cao hơn tăng, lần lượt tăng xác suất của 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 ngăn ngừa dịch bệnh của Mỹ (CDC), cả hai loại muỗi đều đang có mặt ở miền Nam Texas. Sự lây lan ở phía Bắc của muỗi mang dengue không chỉ giới hạn ở Mỹ, mà còn được quan sát thấy ở châu Âu.

Dengvaxia[®], vaccin dengue được tạo ra bởi Sanofi Pasteur lần đầu được chấp thuận ở Mexico và đã nhận được sự chấp thuận trong khi chờ đợi ở nhiều quốc gia. Tuy nhiên, vaccin để lại cơ hội cải thiện đáng kể do hiệu quả hạn chế, đặc biệt là chống lại DENV-1 và -2, hiệu quả thấp trong đối tượng flavivirus-naïve và lịch trình dùng thuốc kéo dài.

Mặc dù có những thiếu sót, vaccin là một chất biến đổi quá trình trong dịch địa phương vì nó sẽ bảo vệ một lượng lớn dân số, nhưng có khả năng không phải ở mức độ rất nhỏ, người mắc bệnh dengue nhiều nhất. Ngoài ra, lịch trình dùng thuốc và hiệu quả rất hạn chế trong các đối tượng flavivirus-naïve khiến nó không phù hợp và có khả năng không đáng giá/có lợi đối với khách du lịch từ các khu vực không có dịch đến khu vực dịch dengue. Những thiếu sót nêu trên của vaccin dengue là lý do tại sao cần phải có thuốc kháng virus dự phòng trước khi phơi nhiễm.

Hơn nữa, ngày nay, thuốc kháng virus đặc hiệu để điều trị hoặc ngăn ngừa lây nhiễm virus sốt dengue không có sẵn. Rõ ràng, vẫn có nhu cầu về y tế chưa được đáp ứng để ngăn ngừa hoặc điều trị lây nhiễm virus ở động vật, cụ thể ở người và đặc biệt đối với nhiễm virus gây ra bởi Flavivirus, đặc biệt hơn là virus Dengue. Hợp chất với hiệu lực kháng virus tốt, không có hoặc mức độ tác dụng phụ thấp, hoạt tính phổ rộng chống lại nhiều serotyp virus Dengue, độc tính thấp và/hoặc được động học tốt hoặc đặc tính dược học tốt được đánh giá là rất cần.

WO-2010/021878 bộc lộ các dẫn xuất 2-phenylpyrolidin và indolin như cơ đối vận thụ thể bậc hạ lạnh để điều trị bệnh viêm và trung tâm. WO-2013/045516 bộc lộ các dẫn xuất indol và indolin để sử dụng trong điều trị lây nhiễm virus dengue.

Sáng chế đề cập đến hợp chất, dẫn xuất indolin được thể, thể hiện hoạt tính hiệu cao chống lại bốn (4) serotyp của virus Dengue.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

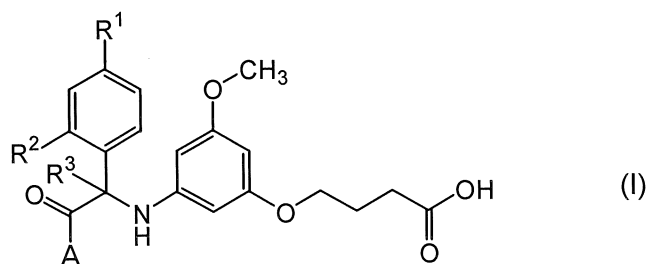
Sáng chế dựa trên phát hiện bất ngờ rằng ít nhất một vấn đề được nêu trên có thể được giải quyết bằng các hợp chất hiện tại của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến hợp chất đã thể hiện có hoạt tính kháng virus tiềm năng chống lại toàn bộ bốn (4) serotyp đã biết hiện nay. Sáng chế cũng chứng minh rằng các hợp chất này ức chế hiệu quả sự tăng sinh của virus Dengue (DENV). Do đó, các hợp chất này tạo thành lớp hữu ích của hợp chất tiềm năng có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa lây nhiễm virus ở động vật, động vật có vú và người, cụ thể hơn để điều trị và/hoặc ngăn ngừa lây nhiễm virus Dengue.

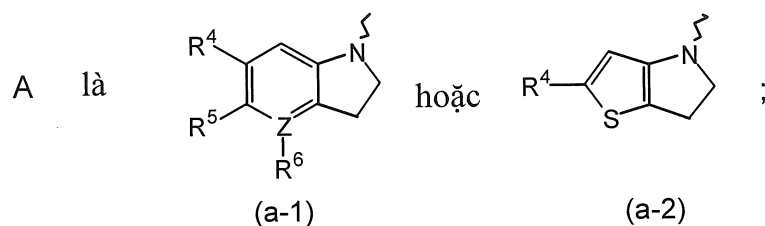
Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất này làm thuốc và đề cập đến việc sử dụng chúng để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa lây nhiễm virus, cụ thể là virus thuộc họ virus Dengue ở động vật hoặc động vật có vú, cụ thể hơn là ở người. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế toàn bộ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

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa lây nhiễm virus dengue ở người bằng cách sử dụng lượng hiệu quả của một hoặc nhiều hợp chất, hoặc muối được dụng của nó tùy ý kết hợp với một hoặc nhiều thuốc kháng, như chất chống virus khác, cho bệnh nhân cần nó.

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), bao gồm bất kỳ dạng đồng phân hóa học lập thể của nó:



trong đó



trong đó

R¹ là clo, R² là hydro, R³ là hydro, A là (a-1), R⁴ là pentaflorosulfanyl, R⁵ là hydro, Z là cacbon, và R⁶ là hydro; hoặc

R¹ là clo, R² là hydro, R³ là hydro, A là (a-1), R⁴ là triflometyl, R⁵ là hydro, Z là cacbon, và R⁶ là metyl; hoặc

R¹ là clo, R² là hydro, R³ là hydro, A là (a-1), R⁴ là triflometyl, R⁵ là flo, Z là cacbon, và R⁶ là hydro; hoặc

R¹ là clo, R² là hydro, R³ là hydro, A là (a-1), R⁴ là triflometoxy, R⁵ là hydro, Z là cacbon, và R⁶ là metyl; hoặc

R¹ là clo, R² là hydro, R³ là hydro, A là (a-1), R⁴ là triflometoxy, R⁵ là flo, Z là cacbon, và R⁶ là hydro; hoặc

R¹ là flo, R² là metoxy, R³ là hydro, A là (a-1), R⁴ là triflometoxy, R⁵ là hydro, Z là cacbon, và R⁶ là hydro; hoặc

R¹ là clo, R² là hydro, R³ là đoteri, A là (a-1), R⁴ là triflometoxy, R⁵ là hydro, Z là cacbon, và R⁶ là hydro; hoặc

R¹ là clo, R² là -OCH₂CH₂OH, R³ là hydro, A là (a-1), R⁴ là triflometoxy, R⁵ là hydro, Z là cacbon, và R⁶ là hydro; hoặc

R¹ là clo, R² là hydro, R³ là hydro, A là (a-1), R⁴ là triflometyl, R⁵ là metoxy, Z là nito, và R⁶ vắng mặt; hoặc

R¹ là clo, R² là hydro, R³ là hydro, A là (a-2), và R⁴ là triflometyl; hoặc

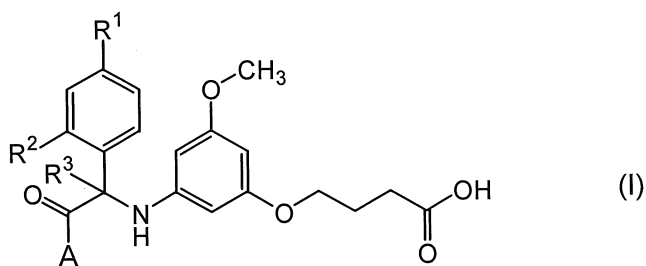
R^1 là clo, R^2 là hydro, R^3 là hydro, A là (a-1), R^4 là triflometylthio, R^5 là hydro, Z là cacbon, và R^6 là hydro;

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

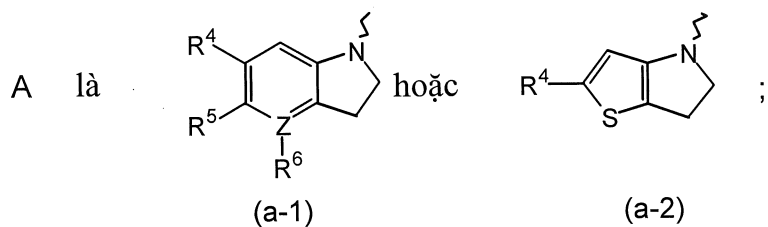
Nhóm thứ nhất của hợp chất có công thức (I) là các hợp chất có công thức (I) trong đó gốc A là (a-1).

Nhóm thứ hai của hợp chất có công thức (I) là các hợp chất có công thức (I) trong đó gốc A là (a-2).

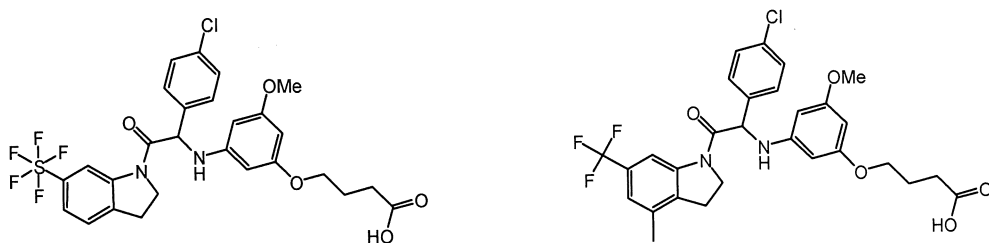
Theo một phương án thay thế, sáng chế cũng đề cập đến hợp chất có công thức (I),

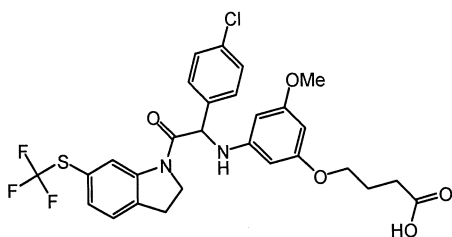
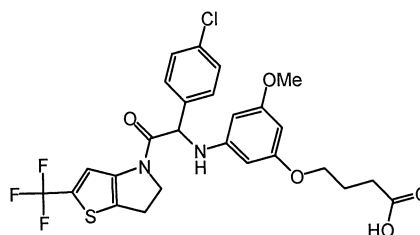
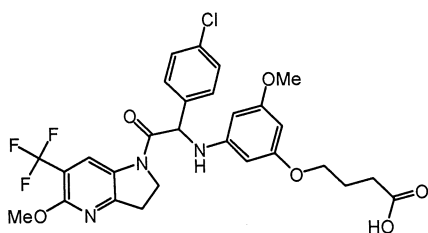
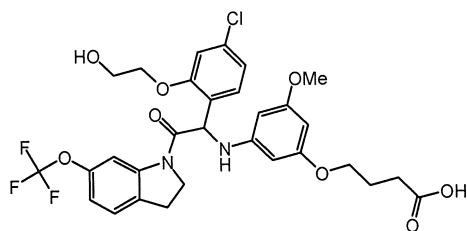
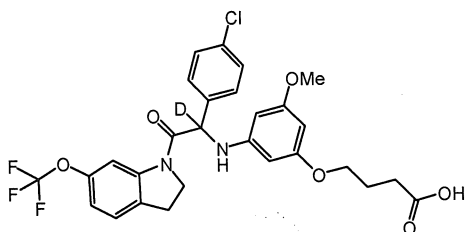
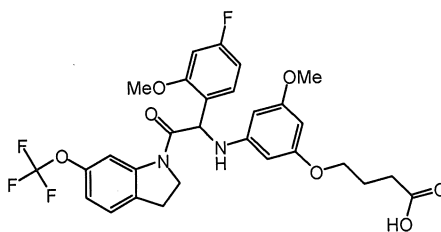
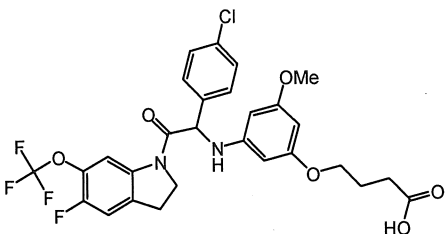
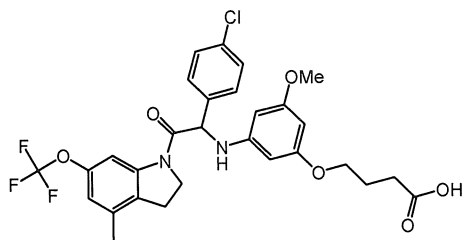
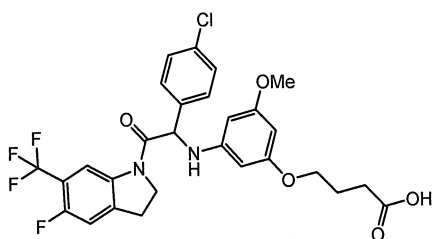


trong đó



trong đó hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:





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

Một phần của sáng chế là dược phẩm bao gồm hợp chất được đề cập ở trên hoặc dạng đồng phân lập thể, muối, solvat hoặc chất đa hình được dụng của nó cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Muối được dụng của hợp chất này bao gồm muối cộng axit hoặc muối bazơ của nó. Muối cộng axit thích hợp được tạo thành từ axit tạo thành muối không gây độc. Muối bazơ thích hợp được tạo thành từ bazơ tạo thành muối không gây độc.

Muối axit được dùng như được đề cập ở trên có nghĩa là bao gồm các dạng muối cộng axit không gây gộc có hoạt tính điều trị mà hợp chất có công thức (I) có thể hình thành. Các muối cộng axit được dùng này có thể thuận tiện thu được bằng cách điều trị dạng bazơ với axit tương ứng. Axit tương ứng này bao gồm, ví dụ, axit vô cơ như axit hydrohalic, ví dụ axit clohydric hoặc bromhydric, sulfuric, nitric, phosphoric và axit tương tự; hoặc axit hữu cơ như, ví dụ, axetic, propanoic, hydroxyaxetic, lactic, pyruvic, oxalic (tức là, etandioic), malonic, suxinic (tức là, axit butan-dioic), maleic, fumaric, malic, tartaric, xitric, metansulfonic, etansulfonic, benzensulfonic, p-toluensulfonic, xyclamic, salixylic, p-amino-salixylic, axit pamoic và axit tương tự.

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 bao gồm hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều phân tử dung môi được dùng, ví dụ, etanol.

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

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng làm sản phẩm tinh thể hoặc vô định hình. Chúng có thể được thu ví dụ làm nút rắn, bột, hoặc màng mỏng bằng các phương pháp như tạo kết tủa, tạo tinh thể, làm khô lạnh, sấy khô, hoặc làm bay hơi khô. Chúng có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất khác theo sáng chế hoặc kết hợp với một hoặc nhiều thuốc khác. Thông thường, chúng sẽ được sử dụng làm dạng bào chế liên quan đến một hoặc nhiều tá dược được dùng. Thuật ngữ “tá dược” được sử dụng ở đây tả bất kỳ thành phần ngoài (các) hợp chất theo sáng chế. Sự lựa chọn tá dược phụ thuộc chủ yếu vào các yếu tố như cách thức dùng cụ thể, hiệu quả của tá dược trên độ tan và độ ổn định, và bản chất của dạng liều lượng.

Hợp chất theo sáng chế hoặc bất kỳ phân nhóm của nó có thể được bào chế thành các dạng dược cho mục đích sử dụng. Vì các chế phẩm phù hợp có thể được trích dẫn toàn bộ chế phẩm thường sử dụng cho thuốc dùng toàn thân. Để bào chế dược phẩm theo sáng chế, lượng hữu hiệu của hợp chất cụ thể, tùy ý ngoài dạng muối, khi thành phần có hoạt tính được kế hợp trong hỗn hợp riêng với chất mang được dùng, chất mang có thể có nhiều dạng khác nhau phụ thuộc vào dạng điều chế mong muốn để sử dụng. Các dược phẩm này đáng mong đợi ở dạng liều lượng phù hợp, ví dụ, dùng cho miệng hoặc trực tràng. Ví dụ, trong việc điều chế chế phẩm ở dạng liều lượng cho miệng, bất

kỳ môi trường được thường có thể được sử dụng như, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và tương tự trong trường hợp dạng điều chế lỏng cho đường miệng như hỗn dịch, xirô, còn ngọt, nhũ tương, và dung dịch; hoặc chất mang rắn như tinh bột, đường, cao lanh, chất pha loãng, chất bôi trơn, chất gắn kết, chất phân rã và tương tự trong trường hợp bột, viên tròn, viên nang, và viên nén. Vì việc dễ dùng, viên nén và viên nang là dạng đơn vị liều lượng dùng cho miệng có lợi, trong đó trường hợp chất mang được rắn rõ ràng được sử dụng. Cũng bao gồm dạng điều chế dạng rắn có thể được chuyển hóa, ngay trước khi sử dụng, thành dạng lỏng.

Đặc biệt có lợi để bào chế được phẩm nói trên ở dạng liều đơn vị để dễ dàng sử dụng và đồng nhất liều lượng. Dạng liều đơn vị như được sử dụng ở đây dùng để chỉ đơn vị vật lý phân lập thích hợp làm liều đơn nhất, mỗi đơn vị bao gồm số lượng được xác định trước của thành phần có hoạt tính được tính để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn có liên quan đến chất mang được yêu cầu. Ví dụ về dạng liều lượng đơn vị này là viên nén (bao gồm viên nén có khía hoặc được phủ), viên nang, viên tròn, lớp phủ bột, viên nhện, thuốc đạn, dung dịch tiêm hoặc hỗn dịch và tương tự, và phức số phân ly của nó.

Người có hiểu biết trung bình trong việc điều trị bệnh lây nhiễm sẽ có khả năng xác định lượng hữu hiệu từ kết quả thử nghiệm trình bày sau đây. Nhìn chung, dự tính rằng lượng hằng ngày hiệu quả nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 50 mg/kg trọng lượng cơ thể, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 mg/kg đến 10 mg/kg trọng lượng cơ thể. Nó có thể thích hợp để sử dụng liều cần như hai, ba, bốn hoặc nhiều liều phụ ở vào những khoảng thời gian thích hợp trong suốt cả ngày. Liều phụ này có thể được bào chế dưới dạng liều đơn vị, ví dụ, bao gồm 1 đến 1000 mg, và cụ thể là 5 đến 200 mg thành phần có hoạt tính mỗi dạng liều đơn vị.

Liều và tần suất sử dụng chính xác phụ thuộc vào hợp chất cụ thể theo sáng chế được sử dụng, tình trạng cụ thể được điều trị, mức độ nghiêm trọng của tình trạng được điều trị, độ tuổi, khối lượng và tình trạng thể chất chung của bệnh nhân cụ thể cũng như các loại thuốc khác mà bệnh nhân có thể dùng, như được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, điều hiển nhiên là lượng hữu hiệu có thể giảm hoặc tăng phụ thuộc vào đáp ứng của đối tượng được điều trị và/hoặc phụ thuộc vào đánh giá của bác sĩ kê hợp chất theo sáng chế. Phạm vi lượng hiệu quả đề cập trên

là do đó chỉ hướng dẫn và không dự định giới hạn phạm vi hoặc việc sử dụng sáng chế ở bất kỳ mức độ nào.

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

Như được sử dụng ở đây, bất kỳ công thức hóa học nào với các liên kết thể hiện chỉ như dòng rắn và không như liên kết được chèn rắn hoặc liên kết được chèn lộn xộn, hoặc được chỉ định khác như có cấu hình cụ thể (ví dụ R, S) quanh một hoặc nhiều nguyên tử, dự tính mỗi chất đồng phân lập thể, hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất đồng phân lập thể.

Trước đây và sau đây, thuật ngữ “hợp chất có công thức (I)” và “hợp chất trung gian của công thức tổng hợp (I)” có nghĩa là để bao gồm chất đồng phân lập thể của nó và dạng tautome của nó.

Thuật ngữ “chất đồng phân lập thể”, “dạng đồng phân lập thể” hoặc “dạng đồng phân hóa học lập thể” trước đây hoặc sau đây được sử dụng thay thế cho nhau.

Sáng chế bao gồm toàn bộ chất đồng phân lập thể của hợp chất theo sáng chế như chất đồng phân lập thể tinh khiết hoặc như hỗn hợp chứa hai hoặc nhiều chất đồng phân lập thể. Chất đồng phân đối ảnh là chất đồng phân lập thể là những hình ảnh phản chiếu không thể thay thế của nhau. Hỗn hợp 1:1 của một cặp chất đồng phân đối ảnh là hỗn hợp raxemat hoặc raxemic. Đồng phân không đối quang (hoặc chất đồng phân lập thể không đối quang) là chất đồng phân lập thể mà không là chất đồng phân đối ảnh, nghĩa là chúng không liên quan như hình ảnh phản chiếu.

Thuật ngữ “chất đồng phân lập thể” cũng bao gồm bất kỳ đồng phân quay, còn được gọi là chất đồng phân hình thể, hợp chất có công thức (I) có thể tạo thành.

Do đó, sáng chế bao gồm chất đồng phân đối ảnh, đồng phân không đối quang, raxemat, chất đồng phân E, chất đồng phân Z, chất đồng phân cis, chất đồng phân trans, đồng phân quay, và hỗn hợp của chúng, bất cứ khi nào có thể về mặt hóa học.

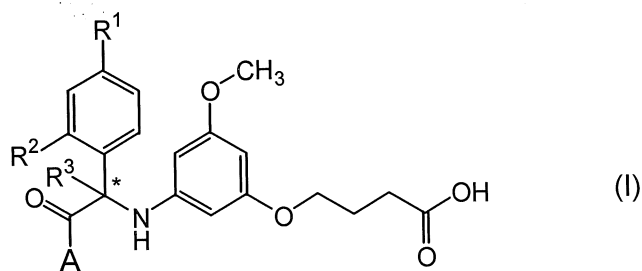
Ý nghĩa của tất cả các thuật ngữ đó, nghĩa là chất đồng phân đối ảnh, đồng phân không đối quang, raxemat, chất đồng phân E, chất đồng phân Z, chất đồng phân cis, chất đồng phân trans và hỗn hợp của nó được biết bởi người có hiểu biết trung bình.

Cấu hình tuyệt đối được chỉ định theo hệ thống Cahn-Ingold-Prelog. Cấu hình tại nguyên tử bất đối xứng được chỉ định bằng R hoặc S. Chất đồng phân lập thể được phân giải mà cấu hình tuyệt đối không được biết có thể được thiết kế bằng (+) hoặc (-) phụ thuộc vào hướng mà chúng quay mặt phẳng phân cực ánh sáng. Ví dụ, chất đồng phân đối ảnh được phân giải mà cấu hình tuyệt đối không được biết có thể được thiết kế bằng (+) hoặc (-) phụ thuộc vào hướng mà chúng quay mặt phẳng phân cực ánh sáng.

Khi chất đồng phân lập thể cụ thể được xác định, điều đó có nghĩa là chất đồng phân lập thể này về cơ bản là không có, nghĩa là liên quan ít hơn 50%, tốt hơn là ít hơn 20%, tốt hơn nữa là ít hơn 10%, thậm chí tốt hơn nữa là ít hơn 5%, ưu tiên tốt hơn nữa là ít hơn 2% và tốt nhất là ít hơn 1%, của chất đồng phân lập thể khác. Do đó, khi hợp chất có công thức (I) ví dụ được chỉ định là (R), có nghĩa là hợp chất về cơ bản không có chất đồng phân (S).

Một vài hợp chất theo công thức (I) cũng có thể tồn tại ở dạng tautome của chúng. Dạng này trong chừng mực chúng có thể tồn tại, mặc dù không được chỉ định rõ ràng trong công thức (I) trên được dự định bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Hợp chất có công thức (I) theo sáng chế toàn bộ có ít nhất một nguyên tử cacbon bất đối xứng như được chỉ định trong hình vẽ bên dưới bằng nguyên tử cacbon dán với *:



Do sự có mặt của tâm không đối xứng này, “hợp chất có công thức (I)” có thể là chất đồng phân đối ảnh (R), chất đồng phân đối ảnh (S), dạng racemic, hoặc bất kỳ tổ hợp nào của hai chất đồng phân đối ảnh riêng rẽ theo tỷ lệ bất kỳ. Khi cấu hình ® hoặc (S) tuyệt đối của chất đồng phân đối ảnh không được biết, chất đồng phân đối ảnh này có thể được xác định bằng cách chỉ ra chất đồng phân đối ảnh là quay phải (+) hoặc quay trái (-) sau khi đo vòng quay quang học cụ thể của chất đồng phân đối ảnh cụ thể này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến nhóm thứ nhất của hợp chất có công thức (I) trong đó hợp chất có công thức (I) có vòng quay cụ thể (+).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến nhóm thứ hai của hợp chất có công thức (I) trong đó hợp chất có công thức (I) có vòng quay cụ thể (-).

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp LC/MS

Phép đo kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được thực hiện bằng cách sử dụng bơm LC, mảng điot (DAD) hoặc máy dò UV và cột như cụ thể trong phương pháp tương ứng. Nếu cần, máy dò bổ sung được bao gồm (xem bảng của phương pháp bên dưới).

Dòng từ cột được mang đến khối phổ kế (MS) được tạo cấu hình với nguồn ion áp suất khí quyển. Đó là trong kiến thức của người có hiểu biết trung bình để thiết lập các tham số điều chỉnh (ví dụ phạm vi quét, thời gian dừng...) để thu được ion cho phép sự xác định của khối lượng phân tử đơn đồng vị danh nghĩa của hợp chất (MW). Việc thu thập dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm thích hợp.

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

Ở đây, “SQD” nghĩa là máy dò mạch bốn cực đơn, “MSD” máy dò chọn lọc khối, “RT” nhiệt độ phòng, “BEH” lai chủng etylsiloxan/silica được tạo cầu, “DAD” máy dò mảng điot, “HSS” ứng suất cao.

Mã phương pháp LC/MS (dòng được biểu hiện là mL/phút; nhiệt độ cột (T) là °C; thời gian chạy là phút).

Mã phương pháp	Dụng cụ	Cột	Pha động	Gradient	Dòng ----- Col T	Thời gian chạy (phút)
LC-A	Nước: Acquity® UPLC® - DAD-Quattro Micro™	Nước: BEH® C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm)	A: 95% CH ₃ COON H ₄ 7mM / 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	84,2% A trong 0,49 phút, đến 10,5% A trong 2,18 phút, giữ trong 1,94 phút, trở lại 84,2% A trong 0,73 phút, giữ trong 0,73 phút.	0,343 mL/p hút ----- 40°C	6,2
LC-B	Nước: Acquity® H-Class - DAD và SQD2TM	Nước: BEH® C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm)	A: 95% CH ₃ COON H ₄ 7mM / 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	84,2% A/15,8% B đến 10,5% A trong 2,18 phút, giữ trong 1,96 phút, trở lại 84,2% A/15,8% B trong 0,73 phút, giữ trong 0,49 phút.	0,343 mL/p hút ----- 40°C	6,1
LC-C	Nước: Acquity® UPLC® - DAD-SQD	Nước: BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm)	A: 10mM CH ₃ COON H ₄ trong 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	Từ 95% A đến 5% A trong 1,3 phút, giữ trong 0,7 phút.	0,8 mL/p hút ----- 55°C	2
LC-D	Nước: Acquity® UPLC® - DAD-SQD	Nước: HSS T3 (1,8 µm, 2,1 x 100 mm)	A: 10mM CH ₃ COON H 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/p hút ----- 55°C	3,5

Phương pháp SFC/MS

Phép đo SFC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký dòng siêu chảy phân tích (SFC) được tạo bởi máy bơm nhị phân vận chuyển cacbon dioxide (CO₂) và chất điều biến, bộ phận chính mẫu tự động, lò cột, máy dò mảng diot được trang bị bằng tế bào dòng áp suất cao đứng lên đến 400 thanh. Nếu được tạo hình bằng dòng khối phổ kế (MS) từ cột được mang đến (MS). Đó là trong kiến thức của người có hiểu biết trung

bình để thiết lập thông số điều chỉnh (ví dụ phạm vi quét, thời gian chờ...) để thu được ion cho phép xác định khối lượng phân tử đơn đồng vị hiện hành của hợp chất (MW).

Việc thu thập dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm thích hợp. Phương pháp SFC/MS phân tích (dòng được biểu hiện là mL/phút; nhiệt độ cột (T) là °C; thời gian chạy là phút, áp suất trở lại (BPR) là bars).

Mã phương pháp	cột	pha động	gradient	Dòng ----- Col T	Thời gian chạy ----- --- BPR
SFC-A	Daicel Chiralpak® AS3 cột (3,0 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0,2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O)	10%-50% B trong 6 phút, giữ 3,5 phút	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-B	Daicel Chiralpak® OD3 cột (3,0 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0,2% iPrNH ₂)	10%-50% B trong 6 phút, giữ 3,5 phút	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-C	Daicel Chiralpak® AS3 cột (3,0 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0,2% iPrNH ₂)	10%-50% B trong 6 phút, giữ 3,5 phút	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-D	Daicel Chiralcel® OD-3 cột (3 µm, 100 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0,3% iPrNH ₂)	40% B giữ 3 phút	3,5 ----- 35	3 ----- 105
SFC-E	Whelk®-O-(R,R) cột (5,0 µm, 250 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0,2% iPrNH ₂)	10%-50% B trong 6 phút, giữ 3,5 phút	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-F	Daicel Chiralpak® ID3 cột (3,0 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0,2% iPrNH ₂)	10%-50% B trong 6 phút, giữ 3,5 phút	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-G	Regis Whelk O1, S,S cột (3 µm, 100 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: MeOH	40% B giữ 3 phút,	3,5 ----- 35	3 ----- 103
SFC-H	Daicel Chiralcel® OD-3 cột (3 µm, 100 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: MeOH	40% B giữ 3 phút,	3,5 ----- 35	3 ----- 103

Mã phương pháp	cột	pha động	gradient	Dòng ----- Col T	Thời gian chạy ----- --- BPR
SFC-I	Daicel Chiralcel® OD-3 cột (3 µm, 100 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: MeOH	30% B giữ 3 phút,	3,5 ----- 35	3 ----- 103

Điểm nóng chảy

Các giá trị là giá trị pic hoặc phạm vi nóng chảy, và được thu bằng tính bất định thử nghiệm thường liên quan đến phương pháp phân tích này.

DSC823e (chỉ định là DSC)

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

Vòng quay quang học:

Vòng quay quang học được đo trên phân cực kế Perkin-Elmer 341 với đèn natri và được báo cáo như sau: $[\alpha]_D^T$ (λ , c g/100ml, dung môi, T°C).

$[\alpha]_D^T = (100\alpha) / (l \times c)$: trong đó l là độ dài đường dẫn là dm và c là nồng độ là g/100 ml đối với một mẫu ở nhiệt độ T (°C) và bước sóng λ (là nm). Nếu bước sóng của ánh sáng được sử dụng là 589 nm (dòng natri D), sau đó biểu tượng D có thể được sử dụng thay thế. Tín hiệu của vòng quay (+ hoặc -) nên luôn luôn được đưa ra. Khi sử dụng phương trình này, nồng độ và dung môi luôn được cung cấp trong ngoặc đơn sau khi quay. Vòng quay được báo cáo bằng cách sử dụng độ và không có đơn vị nồng độ được đưa ra (nó được coi là g/100 ml).

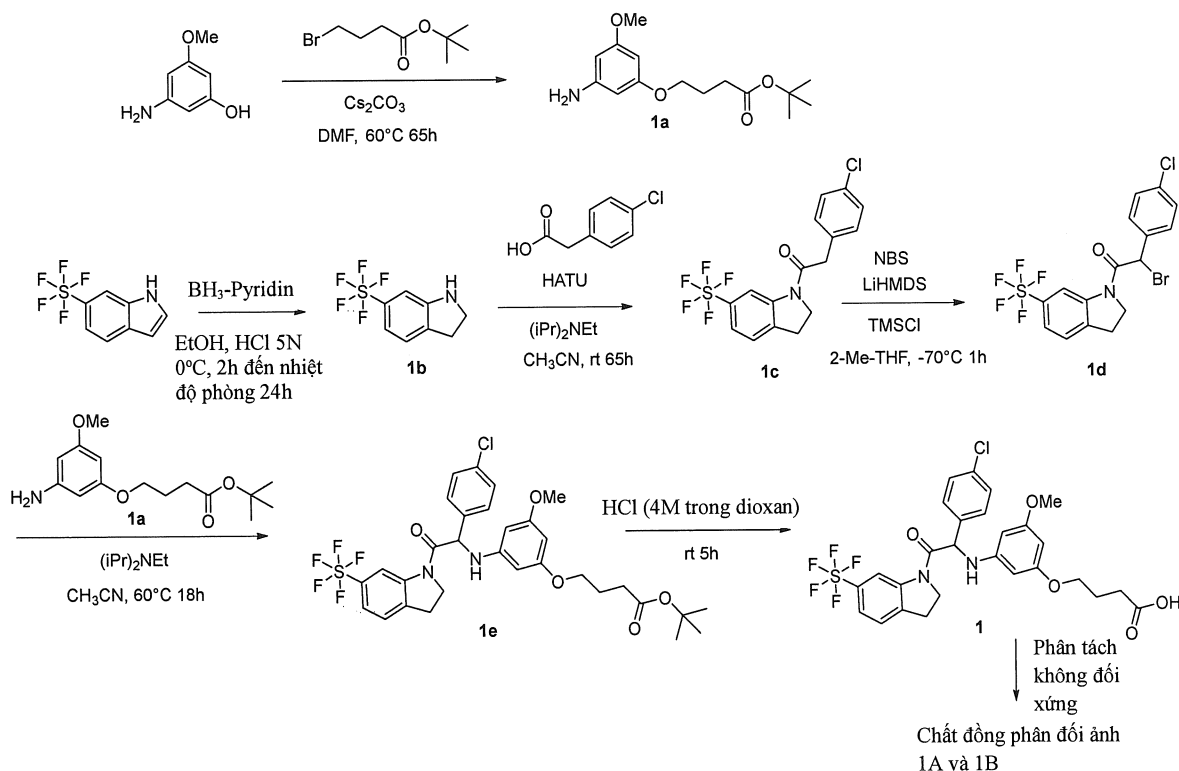
Chữ viết tắt được sử dụng trong phần thử nghiệm

(M+H) ⁺ MH ⁺	Ion phân tử được proton hóa	iPrNH ₂	isopropylamin
aq.	chứa nước	iPrOH	2-propanol
Boc	tert-butyloxycarbonyl	K ₂ CO ₃	kali cacbonat
Boc ₂ O	di-tert-butyl dicacbonat	KNO ₃	kali nitrat
br	broad	LiAlH ₄	liti nhôm hydrua

CH ₃ CN	axetonitril	m/z	tỷ lệ khối lượng so với điện tích
CHCl ₃	cloroform	Me	metyl
CH ₂ Cl ₂	diclometan	MeOH	metanol
CH ₃ OH	metanol	MgSO ₄	magie sulfat
CO ₂	cacbon dioxit	min	phút
CsCO ₃	xesi cacbonat	MTBE	metyl-tert-butylete
d	Mức đôi	N ₂	nitơ
DCM	diclometan	Na ₂ CO ₃	natri cacbonat
DIEA	diisopropyletylamin	Na ₂ SO ₄	natri sulfat
DIPE	diisopropyl ete	NaBH ₄	natri bohydrua
DMA	dimetylxetamit	NaCl	natri clorua
DMAP	4-dimetylaminopyridin	NaHCO ₃	natri bicacbonat
DME	1,2-dimetoxyetan	NaOH	natri hydroxit
DMF	dimetylformamit	NH ₄ Cl	amoni clorua
DMSO	dimetyl sulfoxit	NH ₄ HCO ₃	amoni bicacbonat
EDCI	1-etyl-3-(3-dimetyl-amino-propyl)-carbodiimide	NMP	N-metylpyrrolidon
eq.	đương lượng	q	Mức bốn
Et ₂ O	dietyl ete	rt hoặc RT	nhiệt độ phòng
Et ₃ N	trietylamin	SEMC1	2-(trimetylsilyl)etoxymetyl clorua
EtOAc	etyl axetat	s	Mức đơn
EtOH	etanol	t	Mức ba
H ₂	hydro	tBuOK	kali <i>tert</i> -butanolaat
HNO ₃	axit nitric	TEA	trietylamin
H ₂ O	nước	TFA	axit trifloaxetic
H ₂ SO ₄	axit sulfuric	THF	tetrahydrofuran
HATU	O-(7-aza-1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyl-uron hexaflophosphat - CAS [148893-10-1]	2-Me-THF	2-metyltetrahydrofuran
HCl	axit clohydric	TMSCl	trimetylsilyl clorua
HPLC	kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao	TMSCF ₃	triflometyltrimetylsilan

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(pentafluor- λ^6 -sulfanyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoic (hợp chất 1) và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnh 1A và 1B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 1a:

Bổ sung từng phần hỗn hợp rắn chứa 3-amino-5-metoxyphecol [CAS 162155-27-3] (26,4 g, 0,19 mol) và Cs_2CO_3 (123,6 g, 0,379 mol) vào dung dịch khuấy cơ học chứa *tert*-butyl 4-bromobutanoat [CAS 110661-91-1] (42,3 g, 0,19 mol) trong DMF (600 mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong 65 giờ, và cho phép đạt tới nhiệt độ phòng. Hỗn hợp được đổ vào H_2O (2,5 L). Sản phẩm được chiết bằng Et_2O (2 lần). Lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO_4 và được lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và được đồng bay hơi bằng toluen. Phần cặn được tinh chế thông qua HPLC pha thường (pha tĩnh: silicagel 60A 25-40 μm (Merck), pha động: gradien từ 20% EtOAc, 80% heptan đến 60% EtOAc, 40% heptan) thu được *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphecol)butanoat **1a** (27 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 1b:

Ở nhiệt độ 0°C , BH_3 -Pyridin (1,46 mL, 14,5 mmol) được bổ sung từ từ vào dung dịch chứa 6-(pentafluoro- λ^6 -sulfanyl)-1*H*-indol [CAS 1379811-84-3] (1,0 g, 4,11 mmol) trong EtOH (8,5 mL). HCl 5N (7 mL) được bổ sung từ từ. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 2 giờ và cho phép làm ấm dần đến nhiệt độ phòng trong khi khuấy qua đêm. Sau khi làm lạnh xuống 0°C (bể đá), 50% NaOH (2 mL) được bổ sung nhỏ giọt và khuấy tiếp tục trong 15 phút. Nước (50 mL) được bổ sung và sản phẩm được chiết bằng

Et₂O/EtOAc 2/1. 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 tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (25 g) sử dụng gradien của heptan/CH₂Cl₂ 100/0 đối với 0/100. Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 45°C để thu được 6-(pentafluoro-λ⁶-sulfanyl)indolin 1b (328 mg).

Tổng hợp hợp chất trung gian 1c:

Hỗn hợp chứa axit 6-(pentafluoro-λ⁶-sulfanyl)indolin 1b (328 mg, 1,34 mmol), 2-(4-clophenyl)axetic [CAS 1878-66-6] (228 mg, 1,34 mmol) đã tạo ra, HATU (778 mg, 2,0 mmol) và diisopropyletylamin (663 μL, 4,0 mmol) trong CH₃CN (15 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 65 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong 2-Me-THF (50 mL) và được rửa bằng HCl 1N (25 mL) và nước muối. 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 tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (12 g) sử dụng gradien của heptan/EtOAc 100/0 đối với 0/100. Các phần mong muốn được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Sản phẩm được kết tinh từ CH₂Cl₂/EtOAc, được lọc ra, được rửa (3x) bằng EtOAc, và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 45°C để tạo ra 2-(4-clophenyl)-1-(6-(pentafluoro-λ⁶-sulfanyl)indolin-1-yl)-etanon 1c (209 mg). Phần lọc được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được khuấy lên trong Et₂O (2 mL), được lọc ra, được rửa (3x) bằng Et₂O, và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 45°C để tạo ra sản phẩm thứ hai của hợp chất trung gian 1c (155 mg).

Tổng hợp hợp chất trung gian 1d:

Ở nhiệt độ -70°C, trong dòng N₂, LiHMDS 1M trong THF (1,78 mL, 1,78 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp chứa 2-(4-clophenyl)-1-(6-(pentafluoro-λ⁶-sulfanyl)indolin-1-yl)etanon 1c (354 mg, 0,89 mmol) trong 2-Me-THF (35 mL) và hỗn hợp được giữ ở nhiệt độ -70°C trong 30 phút. TMSCl (182 μL, 1,42 mmol) được bổ sung nhỏ giọt. Hỗn hợp được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ -70°C và dung dịch chứa N-bromosuccinimide (198 mg, 1,11 mmol) trong hỗn hợp dung môi chứa THF (1,5 mL) và 2-Me-THF (5 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ -78°C, phản ứng được dừng bằng dung dịch nước bão hòa chứa NH₄Cl (50 mL). Bể lạnh

được lấy ra và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 50 phút. Nước (10 mL) được bổ sung và lớp hữu cơ được tách, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(6-(pentafluoromethyl)sulfonyl)indolin-1-yl)etanon 1d (424 mg), được sử dụng trong bước tiếp theo.

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

Hỗn hợp chứa 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(6-(pentafluoromethyl)sulfonyl)indolin-1-yl)etanon 1d (424 mg, 0,89 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxypenoxy)butanoat 1a (260 mg, 0,92 mmol) và diisopropyletylamin (306 μL , 1,78 mmol) trong CH_3CN (30 mL) được khuấy ở 60°C trong 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng đạt tới nhiệt độ phòng, và được đổ vào nước đã khuấy (150 mL). Sản phẩm được chiết (2x) bằng Et_2O . Lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (40 g) sử dụng gradien của heptan/ EtOAc / EtOH 100/0/0 đối với 40/45/15). Các phần mong muốn được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và được làm đông bay hơi bằng dioxan.

Phần cặn (602 mg, chứa 58% hợp chất trung gian 1e) được trộn với HCl 4M trong dioxan (4 mL) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ. Phần rắn được lọc ra, được rửa bằng dioxan (3x) và Et_2O (2x), và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 45°C để tạo ra axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(pentafluoromethyl)sulfonyl)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoic thô (hợp chất 1, 309 mg). Mẫu phân tích (60 mg) của hợp chất raxemic 1 cũng được tinh chế thông qua HPLC điều chế (pha tĩnh: RP XBridge[®] Prep C18 OBD – 10 μm , 30 x 150 mm, pha động: dung dịch NH_4HCO_3 0,25% trong nước, CH_3CN). Phần tinh khiết được thu gom và phần dễ bay hơi hữu cơ được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Dung dịch nước còn lại được làm đông bay hơi trong điều kiện áp suất giảm bằng o-xylen. Phần cặn được hòa tan trong hỗn hợp dung môi chứa CH_3CN và nước, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được làm đông bay hơi bằng dioxan. Phần cặn được làm đông khô từ hỗn hợp dung môi chứa CH_3CN (2 mL) và nước (0,8 mL) để tạo ra

axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(pentafluoro- λ^6 -sulfanyl)indolin-1-yl)ethyl)amino)-5-methoxyphenoxy)butanoic tinh khiết (hợp chất 1, 40 mg) dưới dạng bột.

Chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 1 (249 mg) được tách thông qua SFC không đối xứng điều chế (pha tĩnh: Chiralpak[®] Diacel AD 20 x 250 mm, pha động: CO₂, EtOH + 0,4% iPrNH₂). Các phần sản phẩm của chất đồng phân đối ảnh được rửa giải thứ nhất được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được làm đồng bay hơi bằng MeOH. Phần cặn được khuấy lên trong nước (3,5 mL) và MeOH (1 mL), phần rắn được lọc ra, được rửa (3x) bằng nước/MeOH 4/1, và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 45°C để tạo ra Chất đồng phân đối ảnh 1A (41 mg). Các phần sản phẩm của chất đồng phân đối ảnh được rửa giải thứ hai được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được làm đồng bay hơi bằng MeOH. Phần cặn được khuấy lên trong nước (3 mL) và MeOH (0,6 mL), phần rắn được lọc ra, được rửa (3x) bằng nước/MeOH 4/1, và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 45°C để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 1B (48 mg).

Hợp chất 1:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,86 (quin, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,33 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,12 - 3,25 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,84 (t, $J=6,5$ Hz, 2 H) 3,99 - 4,13 (m, 1 H) 4,47 - 4,59 (m, 1 H) 5,57 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H) 5,76 (t, $J=2,1$ Hz, 1 H) 5,91 - 5,96 (m, 2 H) 6,45 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H) 7,39 - 7,50 (m, 3 H) 7,51 - 7,62 (m, 3 H) 8,58 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H) 12,12 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): Rt 1,09 min, MH⁺ 621

Chất đồng phân đối ảnh 1A:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,85 (quin, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,26 (br t, $J=6,8$ Hz, 2 H) 3,15 - 3,25 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,84 (br t, $J=6,4$ Hz, 2 H) 4,02 - 4,12 (m, 1 H) 4,48 - 4,60 (m, 1 H) 5,59 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 5,76 (t, $J=2,0$ Hz, 1 H) 5,93 (t, $J=2,0$ Hz, 1 H) 5,96 (t, $J=2,0$ Hz, 1 H) 6,47 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H) 7,42 - 7,47 (m, 3 H) 7,53 - 7,59 (m, 3 H) 8,58 (d, $J=2,2$ Hz, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-D): Rt 1,99 min, MH⁺ 621

$[\alpha]_D^{20}$: -44,6° (c 0,28, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-A): R_t 3,54 min, MH^+ 621 độ tinh khiết không đối xứng 97,9%.

Chất đồng phân đối ảnh 1B:

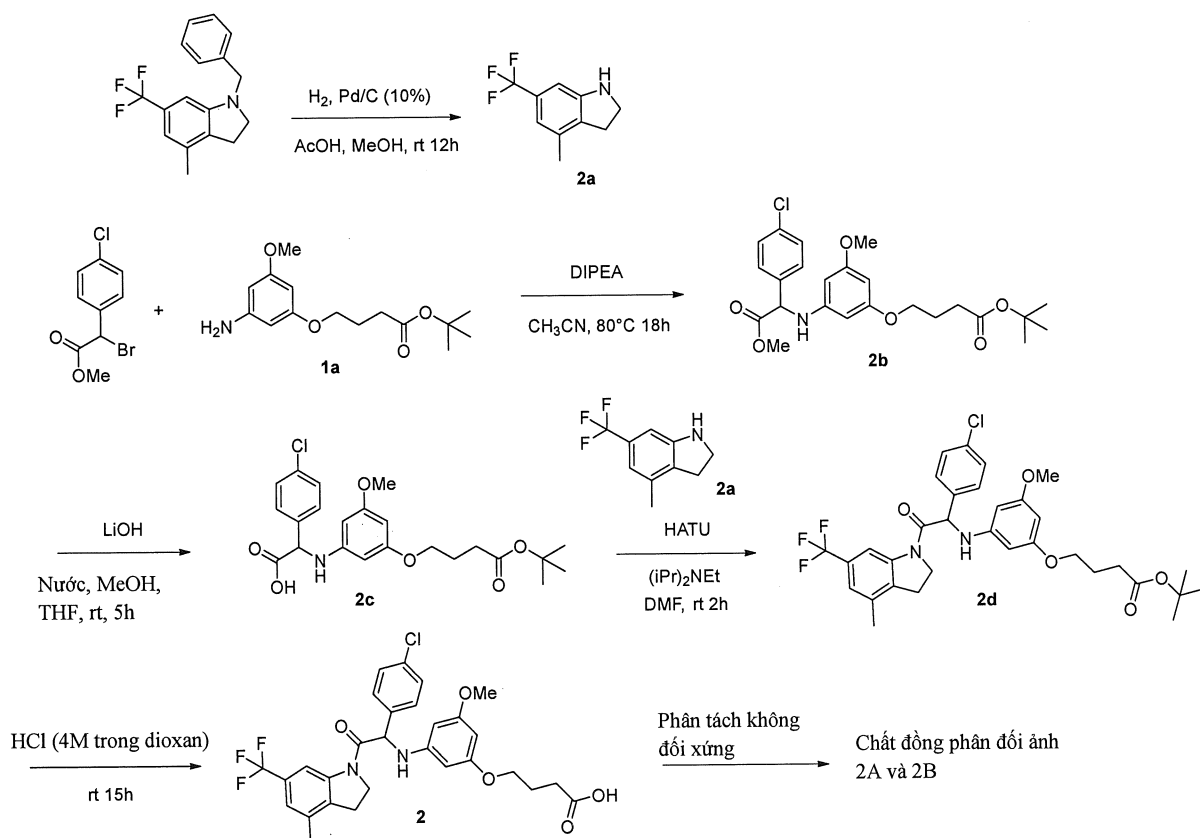
1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,86 (quin, $J=6,8$ Hz, 2 H) 2,33 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H) 3,14 - 3,29 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,84 (t, $J=6,4$ Hz, 2 H) 4,01 - 4,11 (m, 1 H) 4,48 - 4,58 (m, 1 H) 5,58 (d, $J=9,1$ Hz, 1 H) 5,76 (t, $J=2,0$ Hz, 1 H) 5,93 (t, $J=1,8$ Hz, 1 H) 5,94 - 5,96 (m, 1 H) 6,48 (d, $J=9,1$ Hz, 1 H) 7,41 - 7,48 (m, 3 H) 7,52 - 7,61 (m, 3 H) 8,58 (d, $J=2,2$ Hz, 1 H) 12,13 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-D): R_t 1,98 min, MH^+ 621

$[\alpha]_D^{20}$: +46,0° (c 0,265, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-A): R_t 3,82 min, MH^+ 621 độ tinh khiết không đối xứng 99,0%.

Ví dụ 2: tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(4-metyl-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoic (hợp chất 2) và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnh 2A và 2B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 2a:

Pd/C (10%) (1,18 g) được bổ sung vào dung dịch chứa 1-benzyl-4-metyl-6-(triflometyl)indolin [CAS 1156512-79-6] (11,8 g, 40,5 mmol) trong AcOH (11,8 mL) và MeOH (118 mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ trong điều kiện khí H₂. Hỗn hợp được lọc qua tấm Celite[®] và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hấp thụ bằng CH₂Cl₂, được rửa bằng nước, nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (heptan/EtOAc 9/1). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được làm bay hơi đến khô để thu được 8,2 g 4-metyl-6-(triflometyl)indolin 2a.

Tổng hợp hợp chất trung gian 2b:

tert-butyl 4-(3-amino-5-metoxypheoxy)butanoat 1a (2,94 g, 10,5 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa methyl 2-bromo-2-(4-clophenyl)axetat [CAS 24091-92-7] (2,51 g, 9,53 mmol) trong CH₃CN (200 mL). Diisopropyletylamin (2,46 mL, 14,3 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 80°C qua đêm. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong CH₂Cl₂ và được rửa bằng HCl 1N. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc, và được làm bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel (100 g) sử dụng gradien của EtOAc:EtOH (3:1)/heptan 0/100 đối với 50/50. Phần sản phẩm được thu gom, và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-metoxi-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoatas 2b (3,74 g) dưới dạng dầu màu vàng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 2c:

Liti hydroxit (336 mg, 14,0 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-metoxi-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoatas 2b (3,74 g, 7,02 mmol) trong hỗn hợp dung môi chứa nước (25 mL), MeOH (25 mL) và THF (75 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ. NH₄Cl nước bão hòa (50 mL) được bổ sung và phần dễ bay hơi hữu cơ được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Dung dịch nước cặn được axit hóa bằng HCl 1N đến pH 2 và chiết hai lần bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ đã thu gom được làm khô trên MgSO₄, được lọc, và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được làm khô trong

chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được axit 2-((3-(4-(*tert*-butoxy)-4-oxobutoxy)-5-metoxypheyl)amino)-2-(4-clophenyl)axetic 2c (3,22 g) dưới dạng dầu màu nâu đặc.

Tổng hợp hợp chất trung gian 2d:

N,N-Diisopropyletylamin (1,58 mL, 9,57 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa axit 2-((3-(4-(*tert*-butoxy)-4-oxobutoxy)-5-metoxypheyl)amino)-2-(4-clophenyl)axetic 2c (1,44 g, 3,19) và 4-metyl-6-(triflometyl)indolin 2a (953 mg, 3,51 mmol) trong DMF khô (30 mL). HATU (1,82 g, 4,78 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được rót vào nước (400 mL) và huyền phù trắng được chiết bằng EtOAc. Lớp nước được làm bão hòa bằng cách bổ sung NaCl và được chiết lại bằng EtOAc. Lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước muối, nước, được làm khô trên MgSO₄ và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel (100 g) sử dụng gradien của EtOAc:EtOH (3:1)/heptan 0/100 to 60/40). Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn (1,41 g) được tinh chế thông qua HPLC điều chế (pha tĩnh: RP XBridge[®] Prep C18 OBD – 10 µm, 50 x 150 mm, pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, CH₃CN). Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(4-metyl-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat 2d (808 mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Tổng hợp hợp chất 2 và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnhs 2A và 2B:

Tert-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(4-metyl-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat 2d (808 mg, 1,28 mmol) được trộn với HCl 4M trong dioxan (9,6 mL) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 15 giờ. Khí nitơ được sủi bọt thông qua hỗn hợp phản ứng trong 30 phút. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(4-metyl-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoic (hợp chất 2, 735 mg) dưới dạng chất rắn màu nâu nhạt.

Chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 2 (735 mg) được tách thông qua SFC không đối xứng điều chế (pha tĩnh: Chiralcel[®] Diacel OD 20 x 250 mm, pha động: CO₂, EtOH

+ 0,4% iPrNH₂). Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được Chất đồng phân đối ảnh 2A làm sản phẩm được rửa giải thứ nhất và Chất đồng phân đối ảnh 2B làm sản phẩm được rửa giải thứ hai. Các phần cặn được trộn với EtOAc và nước. Hỗn hợp được axit hóa đến pH 1-2 bằng HCl 1N. Các lớp được tách và lớp nước được chiết hai lần bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc, và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được chất đồng phân đối ảnh 2A (216 mg) và chất đồng phân đối ảnh 2B (184 mg), tương ứng.

Hợp chất 2:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (br quin, *J*=6,9 Hz, 2 H) 2,25 (s, 3 H) 2,33 (br t, *J*=7,1 Hz, 2 H) 3,07 - 3,20 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,84 (br t, *J*=6,4 Hz, 2 H) 3,97 - 4,09 (m, 1 H) 4,48 - 4,60 (m, 1 H) 5,57 (br d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 5,76 (t, *J*=1,8 Hz, 1 H) 5,90 - 5,99 (m, 2 H) 6,43 (br d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 7,25 (s, 1 H) 7,44 (d, *J*=8,4 Hz, 2 H) 7,56 (br d, *J*=8,4 Hz, 2 H) 8,22 (s, 1 H) 12,15 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 1,14 min, MH⁺ 577

Chất đồng phân đối ảnh 2A:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,8 Hz, 2 H) 2,25 (s, 3 H) 2,34 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,05 - 3,23 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, *J*=6,4 Hz, 2 H) 4,03 (td, *J*=10,2, 7,3 Hz, 1 H) 4,54 (td, *J*=10,2, 6,2 Hz, 1 H) 5,57 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 5,76 (t, *J*=2,0 Hz, 1 H) 5,91 - 5,99 (m, 2 H) 6,42 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 7,24 (s, 1 H) 7,44 (d, *J*=8,4 Hz, 2 H) 7,56 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H) 8,22 (s, 1 H) 12,17 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 1,26 min, MH⁺ 577

[α]_D²⁰: -39,0° (c 0,438, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-B): R_t 5,11 min, MH⁺ 577 độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 2B:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,88 (quin, *J*=6,9 Hz, 2 H) 2,25 (s, 3 H) 2,34 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,06 - 3,24 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, *J*=6,4 Hz, 2 H) 3,97 -

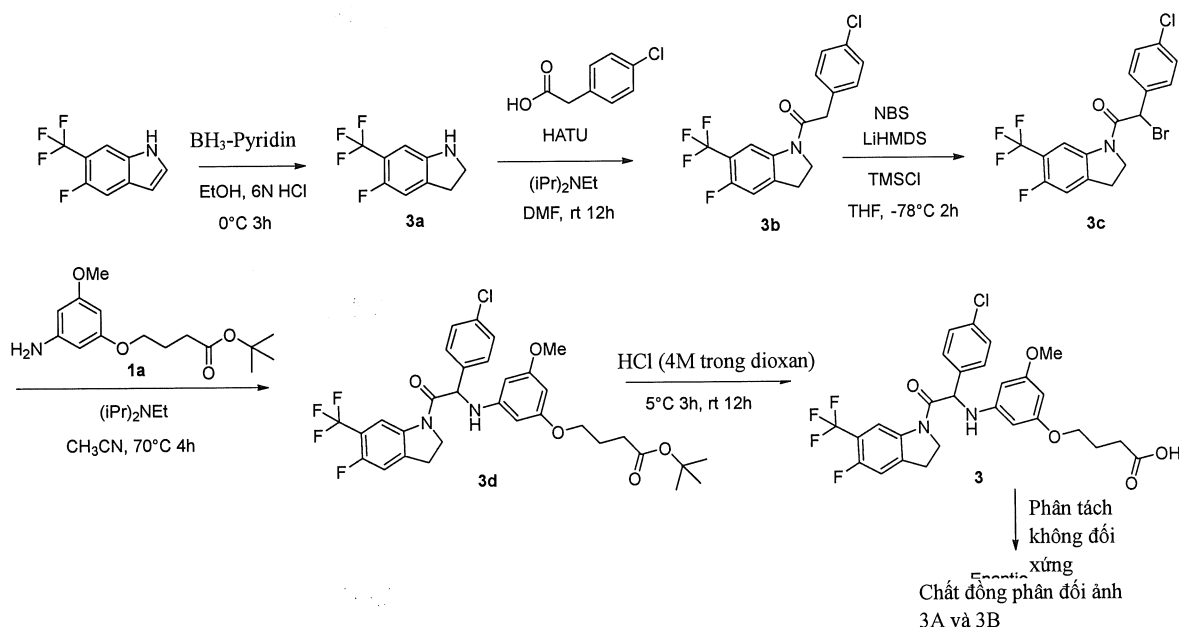
4,11 (m, 1 H) 4,55 (td, $J=10,3, 6,8$ Hz, 1 H) 5,58 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H) 5,77 (t, $J=2,0$ Hz, 1 H) 5,92 - 5,99 (m, 2 H) 6,43 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 7,25 (s, 1 H) 7,41 - 7,50 (m, 2 H) 7,52 - 7,60 (m, 2 H) 8,23 (s, 1 H) 12,17 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 1,25 min, MH^+ 577

$[\alpha]_D^{20}$: +47,1° (c 0,384, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-B): R_t 8,00 min, MH^+ 577 độ tinh khiết không đối xứng 99,6%.

Ví dụ 3: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-flu-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxiphenoxy)butanoic (hợp chất 3) và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnh 3A và 3B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 3a:

Ở nhiệt độ 0°C, BH_3 -Pyridin (10,45 mL, 103,4 mmol) được bổ sung từ từ vào dung dịch chứa 5-flu-6-(triflometyl)-1H-indol [CAS 1493800-10-4] (7,0 g, 34,5 mmol) trong EtOH (45 mL). HCl 6N (105 mL) được bổ sung nhỏ giọt trong khi duy trì nhiệt độ dưới 10°C. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 3 giờ. Nước được bổ sung và hỗn hợp được bazơ hóa đến pH 8,5 bằng dung dịch chứa NaOH được cô (nhiệt độ dưới 20°C). EtOAc được bổ sung. Lớp hữu cơ được tách, 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. Toluene được bổ sung và được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm (để loại bỏ vết của pyridin). Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (20-45 μm ,

120 g, CH₂Cl₂/MeOH 98,5/1,5). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 5-flo-6-(triflometyl)indolin 3a (3,5 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 3b:

Hỗn hợp chứa axit 5-flo-6-(triflometyl)indolin 3a (500 mg, 2,44 mmol), 2-(4-clophenyl)axetic [CAS 1878-66-6] (457 mg, 2,64 mmol), HATU (1,39 g, 3,66 mmol) và diisopropyletylamin (1,2 mL, 7,31 mmol) trong DMF (10 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp được đổ vào nước đá, kết tủa được lọc ra và được hấp thụ bằng CH₂Cl₂. Lớp hữu cơ được làm khô trên MgSO₄ và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Hợp chất được kết tinh từ CH₃CN và được làm khô để thu được 2-(4-clophenyl)-1-(5-flo-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon 3b (854 mg).

Tổng hợp hợp chất trung gian 3c:

Ở nhiệt độ -78°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1M trong THF (4,78 mL, 4,78 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp chứa 2-(4-clophenyl)-1-(5-flo-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon 3b (854 mg, 2,39 mmol) trong THF (7 mL). TMSCl (485 µL, 3,82 mmol) được bổ sung nhỏ giọt. Hỗn hợp được khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (510 mg, 2,87 mmol) trong THF (7 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ -78°C, phản ứng được dừng bằng dung dịch nước bão hòa chứa NH₄Cl. EtOAc được bổ sung và 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 tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 40 g, CH₂Cl₂/heptan 50/50). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(5-flo-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon 3c (820 mg).

Tổng hợp hợp chất trung gian 3d:

Hỗn hợp chứa 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(5-flo-6-(triflometyl)indolin-1-yl)etanon 3c (820 mg, 1,88 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxypheoxy)-butanoat 1a (528 mg, 1,88 mmol) và diisopropyletylamin (388 µL, 2,25 mmol) trong CH₃CN (20 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hấp thụ bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được rửa hai lần bằng dung dịch chứa HCl 1N, nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên

silicagel (15-40 μm , 40 g, CH_2Cl_2 100%). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-flo-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)-butanoat 3d (1,07 g).

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

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-flo-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat 3d (1,07 g, 1,68 mmol) trong HCl (4M trong dioxan) (20 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Kết tủa được lọc ra, được rửa bằng diisopropyl ete và được làm khô. Phần cặn được tinh chế via sắc ký pha đảo (pha tĩnh: YMC-actus Triart-C18 10 μm 30 x 150 mm, pha động: gradien từ 65% NH_4HCO_3 0,2%, 35% CH_3CN đối với 25% NH_4HCO_3 0,2%, 75% CH_3CN) để tạo ra Hợp chất 3 (540 mg). Mẫu phân tích (30 mg) cũng được tinh chế thông qua sắc ký pha đảo (pha tĩnh: YMC-actus Triart-C18 10 μm 30 x 150mm, pha động: gradien từ 65% NH_4HCO_3 0,2 35% CH_3CN to 25% NH_4HCO_3 0,2%, 75% CH_3CN) để thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-flo-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy) butanoic (hợp chất 3, 30 mg, 0,16 H_2O). Lượng còn lại của hợp chất 3 (510 mg) được sử dụng để tách chất đồng phân đối ảnh không đối xứng thông qua SFC không đối xứng điều chế (pha tĩnh: Whelk O1 S,S 5 μm 250 x 30 mm, pha động: 60% CO_2 , 40% MeOH). Chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ nhất (250 mg) được tinh chế thêm bằng sắc ký nhanh trên silicagel (20-45 μm , 24 g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98/2). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được, sau khi hóa cứng trong heptan/diisopropyl ete, Chất đồng phân đối ảnh 3A (170 mg). chất đồng phân đối ảnh rửa giải thứ hai (249 mg) được hóa cứng trong heptan/diisopropyl ete để thu được Chất đồng phân đối ảnh 3B (182 mg).

Hợp chất 3:

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,78 - 1,92 (m, 2 H) 2,26 (br s, 2 H) 3,15 - 3,31 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,84 (br s, 2 H) 4,02 (br d, $J=7,88$ Hz, 1 H) 4,54 (br d, $J=5,99$ Hz, 1 H) 5,58 (br d, $J=8,51$ Hz, 1 H) 5,76 (br s, 1 H) 5,90 - 5,99 (m, 2 H) 6,42 (br d, $J=8,51$ Hz, 1 H) 7,44 (br d, $J=7,88$ Hz, 3 H) 7,55 (br d, $J=7,88$ Hz, 2 H) 8,38 (br d, $J=6,31$ Hz, 1 H) 11,60 - 12,92 (m, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,94 min, MH^+ 581

Điểm nóng chảy: 206°C

Chất đồng phân đối ảnh 3A:

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,86$ Hz, 2 H) 2,29 - 2,39 (m, 2 H) 3,18 - 3,30 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, $J=6,46$ Hz, 2 H) 4,03 (td, $J=10,25$, 7,25 Hz, 1 H) 4,54 (td, $J=10,17$, 6,15 Hz, 1 H) 5,58 (d, $J=8,51$ Hz, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=11,35$ Hz, 2 H) 6,43 (d, $J=8,83$ Hz, 1 H) 7,43 - 7,48 (m, 3 H) 7,55 (d, $J=8,51$ Hz, 2 H) 8,39 (d, $J=6,31$ Hz, 1 H) 12,08 - 12,27 (m, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,95 min, MH^+ 581

$[\alpha]_D^{20}$: -48,9° (c 0,315, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-G): R_t 1,65 min, MH^+ 581 độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 3B:

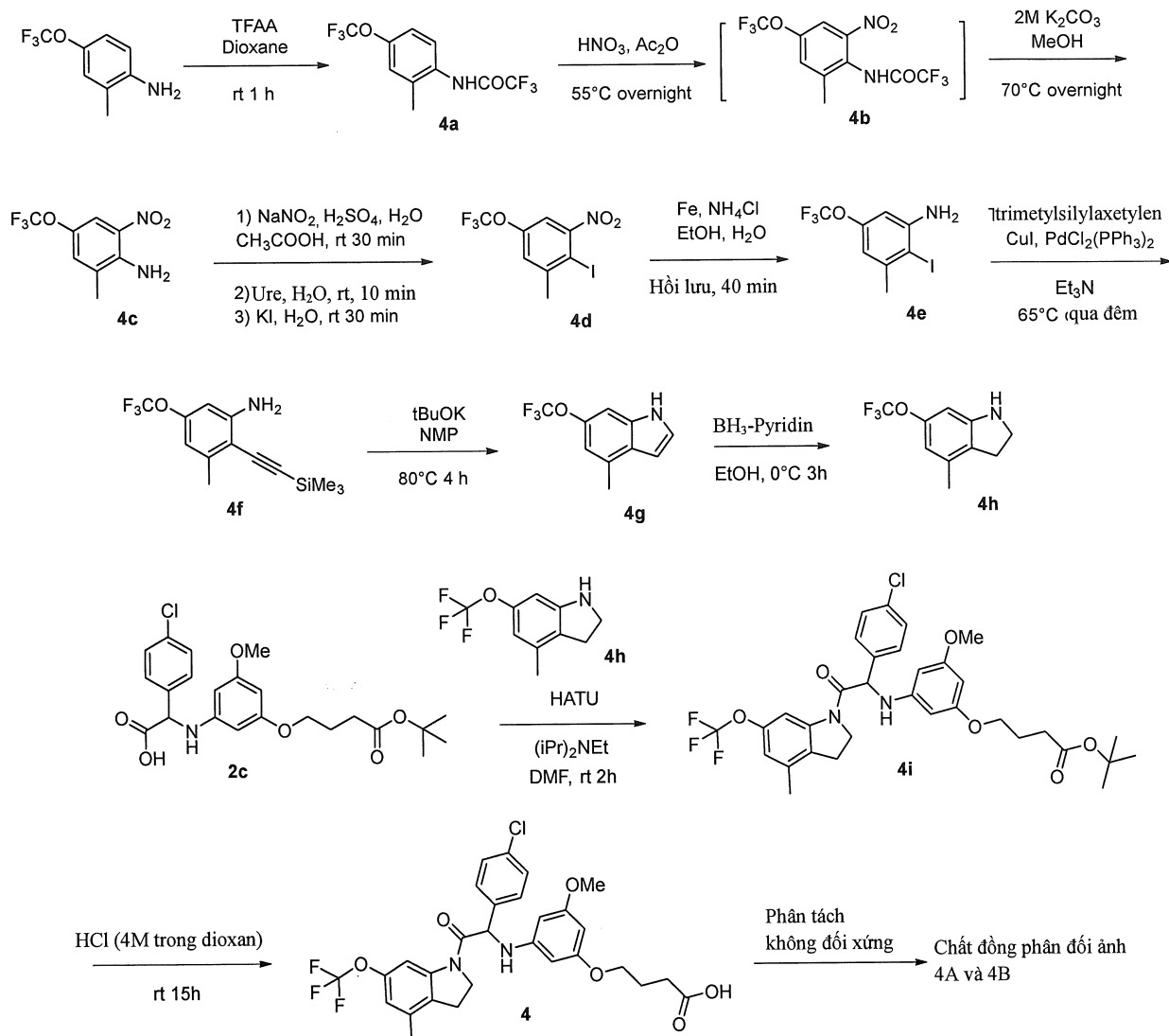
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,54$ Hz, 2 H) 2,25 - 2,46 (m, 2 H) 3,15 - 3,31 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (br t, $J=6,31$ Hz, 2 H) 3,98 - 4,07 (m, 1 H) 4,50 - 4,59 (m, 1 H) 5,58 (br d, $J=8,83$ Hz, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,95 (br d, $J=12,30$ Hz, 2 H) 6,43 (br d, $J=8,83$ Hz, 1 H) 7,42 - 7,48 (m, 3 H) 7,56 (br d, $J=8,20$ Hz, 2 H) 8,39 (br d, $J=6,31$ Hz, 1 H) 11,40 - 12,54 (m, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,94 min, MH^+ 581

$[\alpha]_D^{20}$: +47,8° (c 0,27, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-G): R_t 2,14 min, MH^+ 581 độ tinh khiết không đối xứng 99,43%.

Ví dụ 4: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(4-metyl-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoic (hợp chất 4) và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnh 4A và 4B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 4a:

Bổ sung trifloaxetic anhydrua (8 mL, 57,2 mmol) vào dung dịch chứa 2-metyl-4-(triflometoxy)anilin [CAS 86256-59-9] (10,0 g, 52,3 mmol) trong dioxan (20 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được phân chia giữa EtOAc và HCl 1N. Các pha được tách. Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch bão hòa chứa NaHCO₃ trong nước, H₂O và nước muối, được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 14,7 g of 2,2,2-triflo-N-(2-metyl-4-(triflometoxy)phenyl)axetamit 4a dưới dạng bột trắng. Hợp chất được sử dụng trong bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất trung gian 4c:

Bổ sung nhỏ giọt 70% axit nitric (3,9 mL) vào axetic anhydrua (11,4 mL, 61,1 mmol), được làm lạnh ở nhiệt độ 0°C. 2,2,2-Triflo-N-(2-metyl-4-(triflometoxy)phenyl)-

axetamit 4a (5 g, 17,4 mmol) được bổ sung từng phần và hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 55°C trong 12 giờ. Sau khi làm lạnh xuống nhiệt độ phòng, hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng EtOAc và được rửa bằng H₂O. Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối, được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong metanol (46 mL). 2M K₂CO₃ (23 mL, 46 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 70°C trong 4 giờ. Nhiều K₂CO₃ 2M (10 mL, 20 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 70°C trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô một phần trong điều kiện áp suất giảm để loại bỏ metanol. Phần cặn được chiết bằng EtOAc. Pha hữu cơ được rửa bằng H₂O và nước muối, được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel sử dụng gradien của EtOAc (20% đến 50%) trong heptan để thu được 3,6 g 2-metyl-6-nitro-4-(triflometoxy)anilin 4c dưới dạng chất rắn màu vàng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 4d:

Bổ sung nhỏ giọt dung dịch chứa natri nitrit (0,806 g, 11,7 mmol) trong H₂SO₄/H₂O (2 mL, 1/1) vào dung dịch chứa 2-metyl-6-nitro-4-(triflometoxy)anilin 4c (1,8 g, 7,69 mmol) trong axit axetic (10,9 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. H₂O (22 mL) và ure (0,802 g, 13,4 mmol) được bổ sung. Sau 10 phút ở nhiệt độ phòng, dung dịch chứa kali iodua (1,7 g, 10,2 mmol) trong H₂O (11 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Chất rắn màu vàng được lọc ra, được rửa bằng H₂O và được làm khô để thu được 2,4 g 2-iodo-1-metyl-3-nitro-5-(triflometoxy)benzen 4d.

Tổng hợp hợp chất trung gian 4e:

Bổ sung dung dịch chứa NH₄Cl (2,7 g, 49,9 mmol) trong H₂O (30 mL) vào dung dịch chứa 2-iodo-1-metyl-3-nitro-5-(triflometoxy)benzen 4d (3,5 g, 10,0 mmol) trong EtOH (30 mL). Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C. Sắt (2,6 g, 46,9 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt trong điều kiện hồi lưu trong 40 phút. Sau khi làm lạnh xuống nhiệt độ phòng, hỗn hợp phản ứng được lọc qua Celite®. Phần rắn được rửa bằng EtOH. Phần lọc được cô một phần trong điều kiện áp suất giảm để loại bỏ EtOH. Phần cặn được phân chia giữa EtOAc và dung dịch bão hòa chứa NaHCO₃ trong nước. Các pha được tách. Pha hữu cơ được rửa bằng H₂O và nước muối, được làm

khô trên Na_2SO_4 , được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel sử dụng gradien của EtOAc (0% đến 25%) trong heptan để thu được 2,9 g 2-iodo-3-metyl-5-(triflometoxy)anilin 4e dưới dạng dầu màu vàng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 4f:

Dung dịch chứa 2-iodo-3-metyl-5-(triflometoxy)anilin 4e (2,9 g, 9,1 mmol) trong triethylamin (23 mL) được loại khí bằng argon trong 15 phút. Diclobis(triphenylphosphin)paladi(II) (0,327 g, 0,47 mmol), đồng(I) iodua (0,164 g, 0,86 mmol) và trimetylsilylaxetylen (1,8 mL, 13,1 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 65°C trong 12 giờ. Sau khi làm lạnh xuống nhiệt độ phòng, hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng H_2O và được chiết bằng EtOAc (3x). Pha hữu cơ được thu gom, được rửa bằng H_2O và nước muối, được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel sử dụng gradien của EtOAc (0% đến 20%) trong heptan để thu được 2,6 g 3-metyl-5-(triflometoxy)-2-((trimetylsilyl)etynyl)anilin 4f dưới dạng dầu màu cam.

Tổng hợp hợp chất trung gian 4g:

Bổ sung *t*BuOK (3,1 g, 27,8 mmol) vào dung dịch chứa 3-metyl-5-(triflometoxy)-2-((trimetylsilyl)etynyl)anilin 4f (2,7 g, 9,3 mmol) trong NMP (27 mL). Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 4 giờ. Sau khi làm lạnh xuống nhiệt độ phòng, hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng H_2O và được chiết bằng EtOAc (2x). Pha hữu cơ được thu gom, được rửa bằng H_2O và nước muối, được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel sử dụng gradien của EtOAc (0% đến 20%) trong heptan để thu được 1,7 g 4-metyl-6-(triflometoxy)-1*H*-indol 4g dưới dạng dầu màu cam.

Tổng hợp hợp chất trung gian 4h:

Ở nhiệt độ 0°C , BH_3 -Pyridin (1,2 mL, 11,6 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa 4-metyl-6-(triflometoxy)-1*H*-indol 4g (0,5 g, 2,32 mmol) trong EtOH (3 mL). HCl 6N (6 mL) được bổ sung từ từ nhỏ giọt trong khi duy trì phản ứng nhiệt độ dưới 10°C . Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 3 giờ. Nước (12 mL) được bổ sung và hỗn hợp được bazơ hóa cho đến khi pH 8-9 bằng dung dịch được cô chứa NaOH

trong nước (nhiệt độ phản ứng được giữ dưới 20°C). Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Toluene được bổ sung và dung dịch được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 450 mg 4-metyl-6-(triflometoxy)indolin 4h.

Tổng hợp hợp chất trung gian 4i:

N,N-Diisopropyletylamin (1,58 mL, 9,57 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa axit 2-((3-(4-(*tert*-butoxy)-4-oxobutoxy)-5-metoxypheyl)amino)-2-(4-clophenyl)axetic 2c (1,44 g, 3,19) và 4-metyl-6-(triflometoxy)indolin 4h (846 mg, 3,51 mmol) trong DMF khô (30 mL). HATU (1,82 g, 4,78 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được rót vào nước (400 mL) và huyền phù trắng được chiết bằng EtOAc. Lớp nước được làm bão hòa bằng cách bổ sung NaCl và được chiết lại bằng EtOAc. Lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước muối, nước, được làm khô trên MgSO₄ và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel (100 g) sử dụng gradien của EtOAc:EtOH (3:1)/heptan 0/100 to 60/40. Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn (1,47 g) được tinh chế thông qua HPLC điều chế (pha tĩnh: RP XBridge[®] Prep C18 OBD – 10 µm, 50 x 150 mm, pha động: 0,25% NH₄HCO₃ solution trong nước, CH₃CN). Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(4-metyl-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat 4i (821 mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Tổng hợp hợp chất 4 và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnh 4A và 4B:

Tert-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(4-metyl-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat 4i (821 mg, 1,27 mmol) được trộn với HCl 4M trong dioxan (9,5 mL) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 15 giờ. Khí nitơ được thổi bọt thông qua hỗn hợp phản ứng trong 30 phút. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(4-metyl-6-(triflometyl)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoic (hợp chất 4, 750 mg) dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt.

Chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 4 (750 mg) được tách thông qua SFC không đối xứng điều chế (pha tĩnh: Chiralcel[®] Diacel OD 20 x 250 mm, pha động: CO₂, EtOH + 0,4% iPrNH₂). Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được Chất đồng phân đối ảnh 4A làm sản phẩm được rửa giải thứ nhất và Chất đồng phân đối ảnh 4B làm sản phẩm được rửa giải thứ hai. Các phần cặn được trộn bằng EtOAc và nước. Hỗn hợp được axit hóa đến pH 1-2 bằng HCl 1N. Các lớp được tách và lớp nước được chiết hai lần bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc, và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được chất đồng phân đối ảnh 4A (213 mg) và chất đồng phân đối ảnh 4B (194 mg) tương ứng.

Hợp chất 4:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=7,0 Hz, 2 H) 2,20 (s, 3 H) 2,33 (t, *J*=7,1 Hz, 2 H) 2,98 - 3,16 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,84 (t, *J*=6,4 Hz, 2 H) 4,04 (td, *J*=10,4, 7,0 Hz, 1 H) 4,53 (td, *J*=10,3, 6,4 Hz, 1 H) 5,56 (d, *J*=9,1 Hz, 1 H) 5,76 (t, *J*=2,0 Hz, 1 H) 5,91 - 5,98 (m, 2 H) 6,45 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 6,87 (s, 1 H) 7,38 - 7,47 (m, 2 H) 7,50 - 7,61 (m, 2 H) 7,89 (s, 1 H) 12,18 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): Rt 1,14 min, MH⁺ 593

Chất đồng phân đối ảnh 4A:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,9 Hz, 2 H) 2,20 (s, 3 H) 2,34 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 2,98 - 3,16 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, *J*=6,4 Hz, 2 H) 4,05 (td, *J*=10,4, 7,0 Hz, 1 H) 4,53 (td, *J*=10,3, 6,4 Hz, 1 H) 5,56 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 5,76 (t, *J*=1,8 Hz, 1 H) 5,91 - 5,99 (m, 2 H) 6,45 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 6,88 (s, 1 H) 7,38 - 7,49 (m, 2 H) 7,51 - 7,61 (m, 2 H) 7,89 (s, 1 H) 12,17 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): Rt 1,29 min, MH⁺ 593

[α]_D²⁰: -39,6° (c 0,455, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-C): Rt 3,34 min, MH⁺ 593 độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 4B:

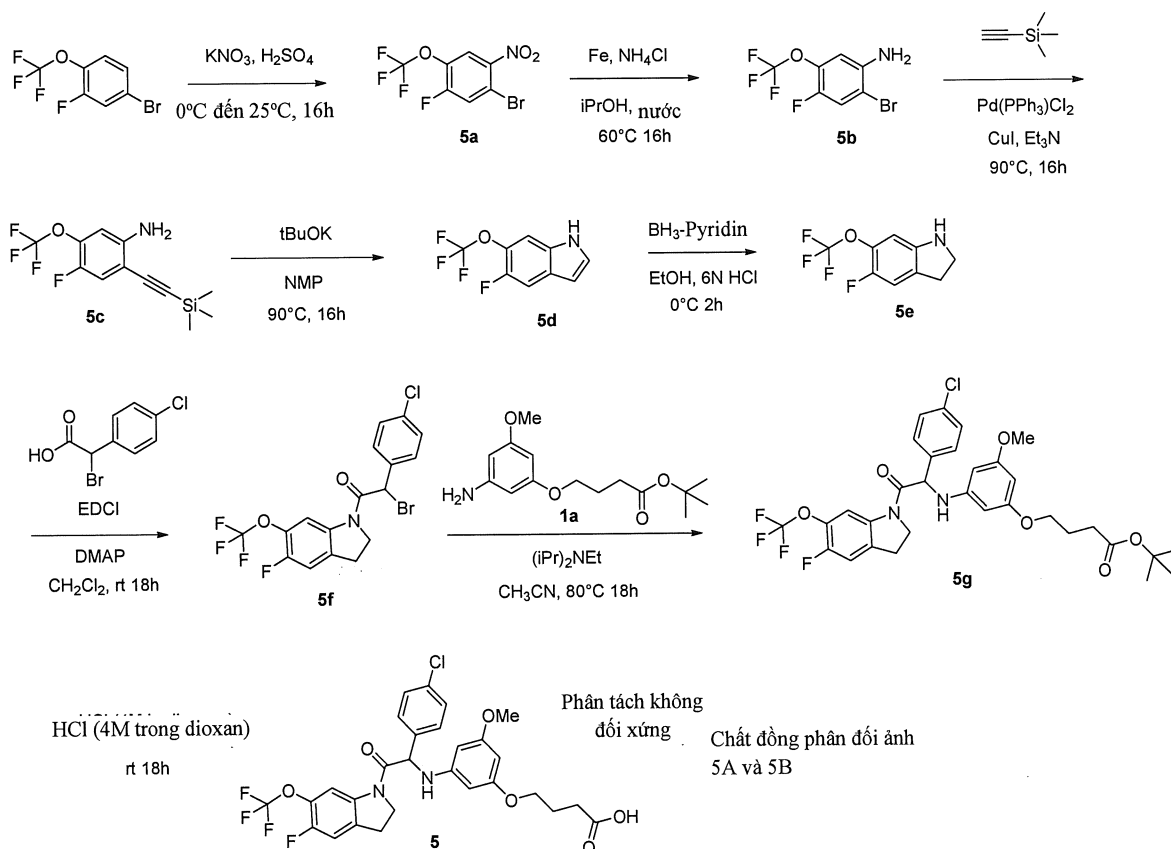
^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,88 (quin, $J=6,9$ Hz, 2 H) 2,20 (s, 3 H) 2,34 (t, $J=7,1$ Hz, 2 H) 2,98 - 3,16 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,85 (t, $J=6,4$ Hz, 2 H) 4,05 (td, $J=10,3, 7,1$ Hz, 1 H) 4,53 (td, $J=10,2, 6,6$ Hz, 1 H) 5,56 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 5,76 (t, $J=1,8$ Hz, 1 H) 5,92 - 5,99 (m, 2 H) 6,46 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H) 6,88 (s, 1 H) 7,38 - 7,49 (m, 2 H) 7,50 - 7,63 (m, 2 H) 7,89 (s, 1 H) 12,16 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 1,30 min, MH^+ 593

$[\alpha]_D^{20}$: +43,7° (c 0,38, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-C): R_t 3,16 min, MH^+ 593 độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 5: Tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-flo-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoethyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (hợp chất 5) và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnh 5A và 5B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 5a:

Dung dịch chứa 4-bromo-2-flo-1-(triflometoxy)benzen [CAS 105529-58-6] (98,7 g, 381,1 mmol) trong H_2SO_4 được cô (98%, 200 mL), được làm lạnh xuống 0°C với bể đá. KNO_3 (43,0 g, 425,3 mmol) bổ sung từng phần. Sau khi bổ sung, bể đá được

loại bỏ và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng được rót vào nước đá (2 L) trong khi khuấy. Hỗn hợp được chiết bằng CH_2Cl_2 (3x 500 mL). Các lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng dung dịch NaHCO_3 nước bão hòa (2x 500 mL), nước muối (500 mL), được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 1-bromo-5-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethoxy)benzen 5a (117,2 g), được sử dụng trong bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất trung gian 5b:

Bổ sung bột ion khử (64,3 g, 1,15 mol) trong điều kiện khí N_2 vào huyền phù đã khuấy chứa 1-bromo-5-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethoxy)benzen 5a (70,0 g, 230 mmol) và NH_4Cl (123,2 g, 2,30 mol) trong $i\text{PrOH}$ (1 L) và nước (330 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 60°C trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng EtOAc (1 L) và được lọc qua Celite[®]. Phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được phân chia giữa EtOAc (1 L) và nước (800 mL). Các lớp được tách và pha hữu cơ được rửa bằng nước muối (1 L), được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng cách chưng cất trong điều kiện áp suất giảm (bơm dầu, b.p. $60\sim 64^\circ\text{C}$). 2-Bromo-4-fluoro-5-(trifluoromethoxy)anilin 5b (47,3 g) được thu dưới dạng dầu màu vàng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 5c:

Bổ sung CuI (1,28 g, 6,72 mmol) và $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (2,40 g, 3,42 mmol) vào hỗn hợp chứa 2-bromo-4-fluoro-5-(trifluoromethoxy)anilin 5b (18,4 g, 67,2 mmol) và etynyl(trimethyl)silan (19,9 g, 202,4 mmol, 28,00 mL) trong Et_3N (300 mL). Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt trong điều kiện khí N_2 ở nhiệt độ 90°C trong 16 giờ. Sau khi làm lạnh xuống nhiệt độ phòng, hỗn hợp được pha loãng bằng MTBE (300 mL) và được lọc qua Celite[®]. Phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (ISCO[®], 220 g SepaFlash[®] cột nhanh Silica, dung môi rửa giải hấp: gradien 0 đến 5% EtOAc trong ete dầu mỏ @100mL/phút). 4-fluoro-5-(trifluoromethoxy)-2-((trimethylsilyl)etynyl)anilin 5c (16,1 g, độ tinh khiết 90%) được thu dưới dạng dầu màu nâu.

Tổng hợp hợp chất trung gian 5d:

Hỗn hợp chứa 4-flo-5-(triflometoxy)-2-((trimetylsilyl)etynyl)anilin 5c (16,1 g, 55,3 mmol) và tBuOK (18,6 g, 165,8 mmol) trong NMP (220,00 mL) được gia nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong 16 giờ trong điều kiện khí N₂. Sau khi làm lạnh xuống nhiệt độ phòng, hỗn hợp phản ứng được rót vào nước đá (1 L) và được chiết bằng MTBE (3x 300mL). Pha hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước (2x 200 mL), nước muối (300 mL), được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (ISCO[®], 120 g cột nhanh SepaFlash[®] Silica, dung môi rửa giải hấp: gradien 0 đến 5% EtOAc trong ete dầu mỏ @ 85 mL/phút) để thu được sản phẩm 5-flo-6-(triflometoxy)-1*H*-indol 5d (11 g) dưới dạng dầu màu xanh lá thẫm. Phần cặn được kết hợp với phần khác (tổng lượng = 17,2 g) và được tinh chế thêm bằng cách chưng cất trong điều kiện áp suất giảm (bơm dầu, b.p. 60~64°C) để tạo ra 5-flo-6-(triflometoxy)-1*H*-indol 5d (14,7 g, độ tinh khiết 95%) dưới dạng dầu không màu.

Tổng hợp hợp chất trung gian 5e:

Ở nhiệt độ 0°C, BH₃-pyridin (13,8 mL, 136,9 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa 5-flo-6-(triflometoxy)-1*H*-indol 5d (6 g, 27,4 mmol) trong EtOH (40 mL). HCl 6N (90 mL) được bổ sung nhỏ giọt trong khi duy trì nhiệt độ dưới 10°C. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 2 giờ. Nước (100 mL) được bổ sung và hỗn hợp được bazơ hóa đến pH 8-9 với dung dịch chứa NaOH được cô trong nước (nhiệt độ phản ứng được giữ dưới 20°C). Hỗn hợp được chiết bằng CH₂Cl₂. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Toluene được bổ sung và dung dịch được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 5,52 g 5-flo-6-(triflometoxy)indolin 5e. Hợp chất được sử dụng trong bước phản ứng tiếp theo không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất trung gian 5f:

Bổ sung EDCI (0,51 g, 2,7 mmol) vào hỗn hợp chứa axit 2-bromo-2-(4-clophenyl)axetic [CAS 3381-73-5] (0,61 g, 2,4 mmol), 5-flo-6-(triflometoxy)indolin 5e (0,55 g, 2,2 mmol) và DMAP (0,027 g, 0,22 mmol) trong CH₂Cl₂ (14 mL). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. Hỗn hợp được pha loãng bằng dung dịch K₂CO₃ 10% trong nước. Các lớp được gạn. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu

được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(5-flo-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon 5f (1,1 g, dầu màu tím). Hợp chất được sử dụng trong bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất trung gian 5g:

Hỗn hợp chứa 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(5-flo-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon 5f (1,1 g, 2,2 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)butanoat 1a (1,0 g, 3,3 mmol) và diisopropyletylamin (1,5 mL, 8,7 mmol) trong CH₃CN (29 mL) được khuấy ở 80°C trong 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (30 µm, 40 g, heptan/EtOAc gradien 85/15 với 75/25). Các phần chứa hợp chất được thu gom được mong muốn và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-flo-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat 5g (480 mg, độ tinh khiết 57% bởi LC/MS).

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

Hỗn hợp chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-flo-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat 5g (0,48 g, 0,42 mmol, 57% purity) trong HCl (4M trong dioxan) (4,6 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, được hấp thụ trong Et₃N (5 mL) và được cô lại trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (30 µm, 24 g, CH₂Cl₂/ MeOH gradien 99/1 với 96/4). Phần tinh khiết được thu gom và được làm bay hơi đến khô. Phần cặn (150 mg) cũng được tinh chế thông qua HPLC pha đảo (pha tĩnh: YMC-actus Triart-C18 10 µm 30 x 150mm, pha động: gradien từ 65% NH₄HCO₃ 0,2%, 35% CH₃CN với 25% NH₄HCO₃ 0,2%, 75% CH₃CN) để thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-flo-6-(triflometoxy)indolin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (hợp chất 5, 71 mg). Chất đồng phân đối ảnh (55 mg) được tách thông qua SFC không đối xứng (pha tĩnh: Chiralcel® OD-H 5 µm 250 x 20 mm, pha động: 55% CO₂, 45% MeOH) để thu được, sau khi làm khô lạnh từ hỗn hợp dung môi chứa CH₃CN/nước chất đồng phân đối ảnh được rửa giải thứ nhất 5A (25 mg, chất rắn màu trắng) và chất đồng phân đối ảnh được rửa giải thứ hai 5B (25 mg, chất rắn màu trắng).

Hợp chất 5:

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,86 (quin, $J=6,70$ Hz, 2 H) 2,24 - 2,43 (m, 2 H) 3,06 - 3,25 (m, 2 H) 3,61 (s, 3H) 3,84 (br t, $J=6,31$ Hz, 2 H) 3,94 - 4,13 (m, 1 H) 4,46 - 4,57 (m, 1 H) 5,56 (br d, $J=8,83$ Hz, 1 H) 5,75 (s, 1 H) 5,93 (s, 1 H) 5,95 (s, 1 H) 6,45 (br d, $J=8,83$ Hz, 1 H) 7,44 (br d, $J=8,20$ Hz, 3 H) 7,54 (br d, $J=8,20$ Hz, 2 H) 8,16 (br d, $J=6,62$ Hz, 1 H) 12,12 (br s, 1H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 3,00 min, MH^+ 597

Chất đồng phân đối ảnh 5A:

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,86 (quin, $J=6,94$ Hz, 2 H) 2,25 - 2,44 (m, 2 H) 3,06 - 3,26 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,84 (t, $J=6,46$ Hz, 2 H) 4,05 (td, $J=10,32$, 7,09 Hz, 1 H) 4,48 - 4,55 (m, 1 H) 5,56 (d, $J=8,83$ Hz, 1 H) 5,76 (t, $J=1,89$ Hz, 1 H) 5,94 (br d, $J=11,98$ Hz, 2 H) 6,45 (d, $J=8,83$ Hz, 1 H) 7,42 - 7,46 (m, 3 H) 7,54 (d, $J=8,20$ Hz, 2 H) 8,16 (br d, $J=6,94$ Hz, 1 H) 12,01 (br s, 1H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 3,00 min, MH^+ 597

$[\alpha]_D^{20}$: $-35,8^\circ$ (c 0,257, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-H): R_t 1,34 min, MH^+ 597 độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 5B:

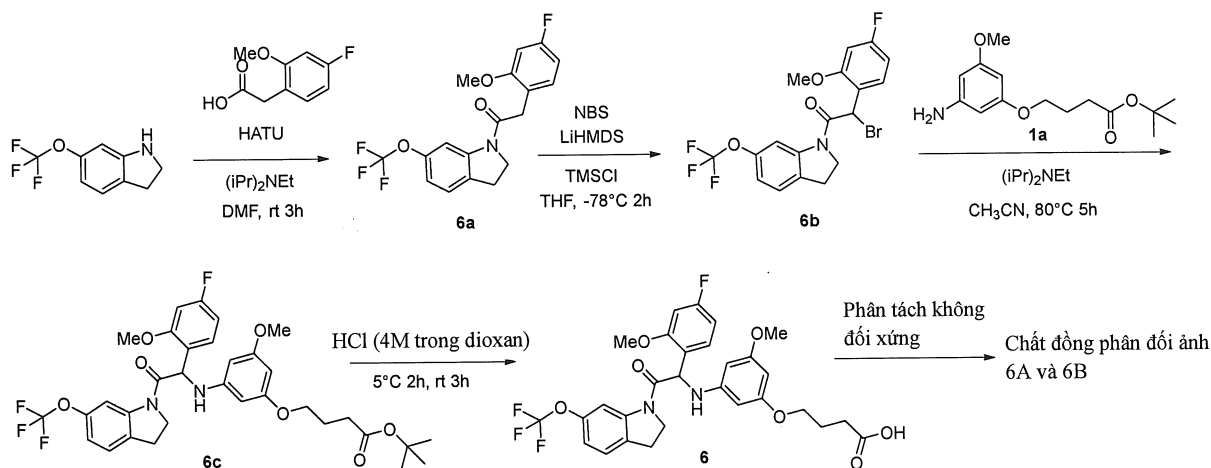
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,85 (quin, $J=6,86$ Hz, 2 H) 2,27 (t, $J=7,25$ Hz, 2 H) 3,10 - 3,31 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,78 - 3,90 (m, 2 H) 4,05 (td, $J=10,40$, 7,25 Hz, 1 H) 4,52 (td, $J=10,32$, 6,46 Hz, 1 H) 5,57 (d, $J=8,83$ Hz, 1 H) 5,75 (t, $J=1,89$ Hz, 1 H) 5,94 (br d, $J=16,39$ Hz, 2 H) 6,45 (d, $J=8,83$ Hz, 1 H) 7,41 - 7,46 (m, 3 H) 7,55 (d, $J=8,51$ Hz, 2 H) 8,16 (br d, $J=6,94$ Hz, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 3,00 min, MH^+ 597

$[\alpha]_D^{20}$: $+52,8^\circ$ (c 0,231, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-H): R_t 3,14 min, MH^+ 597 độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 6: tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-flo-2-metoxyphenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (hợp chất 6) và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnh 6A và 6B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 6a:

Hỗn hợp chứa axit 6-(triflometoxy)indolin [CAS 959235-95-1] (2 g, 9,84 mmol), 2-(4-flo-2-metoxypheyl)axetic [CAS 886498-61-9] (2,17 g, 10,8 mmol), HATU (5,62 g, 14,8 mmol) và diisopropyletylamin (4,9 mL, 29,5 mmol) trong DMF (20 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Nước và đá được bổ sung và kết tủa được lọc ra và được làm khô để thu được 2-(4-flo-2-metoxypheyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon 6a (3,44 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 6b:

Ở nhiệt độ -78°C trong dòng N_2 , LiHMDS (18,7 mL, 18,7 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp chứa 2-(4-flo-2-metoxypheyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon 6a (3,44 g, 9,32 mmol) trong THF (45 mL). TMSCl (1,42 mL, 11,2 mmol) được bổ sung nhỏ giọt. Hỗn hợp được khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ -78°C và *N*-bromosuxinimit (1,83 g, 10,2 mmol) trong THF (35 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ -78°C , phản ứng được dừng bằng dung dịch NH_4Cl bão hòa. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-bromo-2-(4-flo-2-metoxypheyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon 6b (4,48 g). Hợp chất thô được sử dụng không cần thêm bước tinh chế trong bước tiếp theo.

Tổng hợp hợp chất trung gian 6c:

Hỗn hợp chứa 2-bromo-2-(4-flo-2-metoxypheyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon 6b (2,0 g, 4,46 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxypheoxy)butanoat 1a (1,26 g, 4,46 mmol) và diisopropyletylamin (1,15 mL, 6,69 mmol) trong CH_3CN (45

mL) được khuấy ở 80°C trong 5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 μ m, 40 g, heptan/EtOAc 85/15). Các phần chứa hợp chất mong muốn được thu gom và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-flo-2-metoxyphe-nyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphe-noxy)butanoat 6c (1,6 g, độ tinh khiết 67% bởi LC/MS).

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

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-flo-2-metoxyphe-nyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphe-noxy)butanoat 6c (1,5 g, 2,31 mmol) trong HCl (4M trong dioxan) (15 mL) được khuấy ở 5°C trong 2 giờ và ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm và NaOH 3N được bổ sung cho đến khi độ pH trung tính được thu. Dung dịch được chiết bằng EtOAc. Lốp hữu cơ được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (20-45 μ m, 40 g, CH₂Cl₂/MeOH gradien 99,5/0,5 với 95/5). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất 6 (646 mg). Phần nhỏ được kết tinh từ CH₃CN/diisopropyl ete để thu được axit 4-(3-((1-(4-flo-2-metoxyphe-nyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphe-noxy)butanoic (hợp chất 6, 35 mg). Lượng còn lại (600 mg) được sử dụng để phân tách không đối xứng chất đồng phân đối ảnh thông qua SFC không đối xứng (pha tĩnh: Chiralcel® OD-H 5 μ m 250 x 20 mm, pha động: 60% CO₂, 40% MeOH). Để tạo ra Chất đồng phân đối ảnh 6A làm sản phẩm được rửa giải thứ nhất và Chất đồng phân đối ảnh 6B làm sản phẩm được rửa giải thứ hai. Các chất đồng phân đối ảnh được tinh chế thêm bằng sắc ký nhanh trên silicagel (20-45 μ m, 12 g, CH₂Cl₂/MeOH gradien 100/0 với 95/5). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được, sau khi hóa cứng trong diisopropyl ete/pentan (+ một vài giọt CH₃CN), chất đồng phân đối ảnh 6A (108 mg) và chất đồng phân đối ảnh 6B (108 mg), tương ứng.

Hợp chất 6:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,82 Hz, 2 H) 2,33 (t, *J*=7,33 Hz, 2 H) 3,08 - 3,27 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,78 - 3,91 (m, 5 H) 3,92 - 4,02 (m, 1 H) 4,33

- 4,42 (m, 1 H) 5,59 (d, $J=8,59$ Hz, 1 H) 5,75 (s, 1 H) 5,87 (br d, $J=7,07$ Hz, 2 H) 6,39 (br d, $J=8,59$ Hz, 1 H) 6,78 (td, $J=8,46, 2,27$ Hz, 1 H) 6,94 - 7,02 (m, 2 H) 7,29 - 7,35 (m, 2 H) 8,03 (s, 1 H) 12,14 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-B): R_t 2,76 min, MH^+ 593

Điểm nóng chảy: 164°C

Chất đồng phân đối ảnh 6A:

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,78$ Hz, 2 H) 2,31 - 2,47 (m, 2 H) 3,10 - 3,28 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,80 - 3,93 (m, 5 H) 3,93 - 4,06 (m, 1 H) 4,33 - 4,44 (m, 1 H) 5,59 (br d, $J=8,51$ Hz, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,88 (br d, $J=8,83$ Hz, 2 H) 6,39 (br d, $J=8,83$ Hz, 1 H) 6,79 (td, $J=8,43, 2,05$ Hz, 1 H) 6,95 - 7,04 (m, 2 H) 7,30 - 7,37 (m, 2 H) 8,03 (s, 1 H) 12,16 (br s, 1 H)

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

$[\alpha]_D^{20}$: -37,3° (c 0,255, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-I): R_t 1,03 min, MH^+ 593 độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 6B:

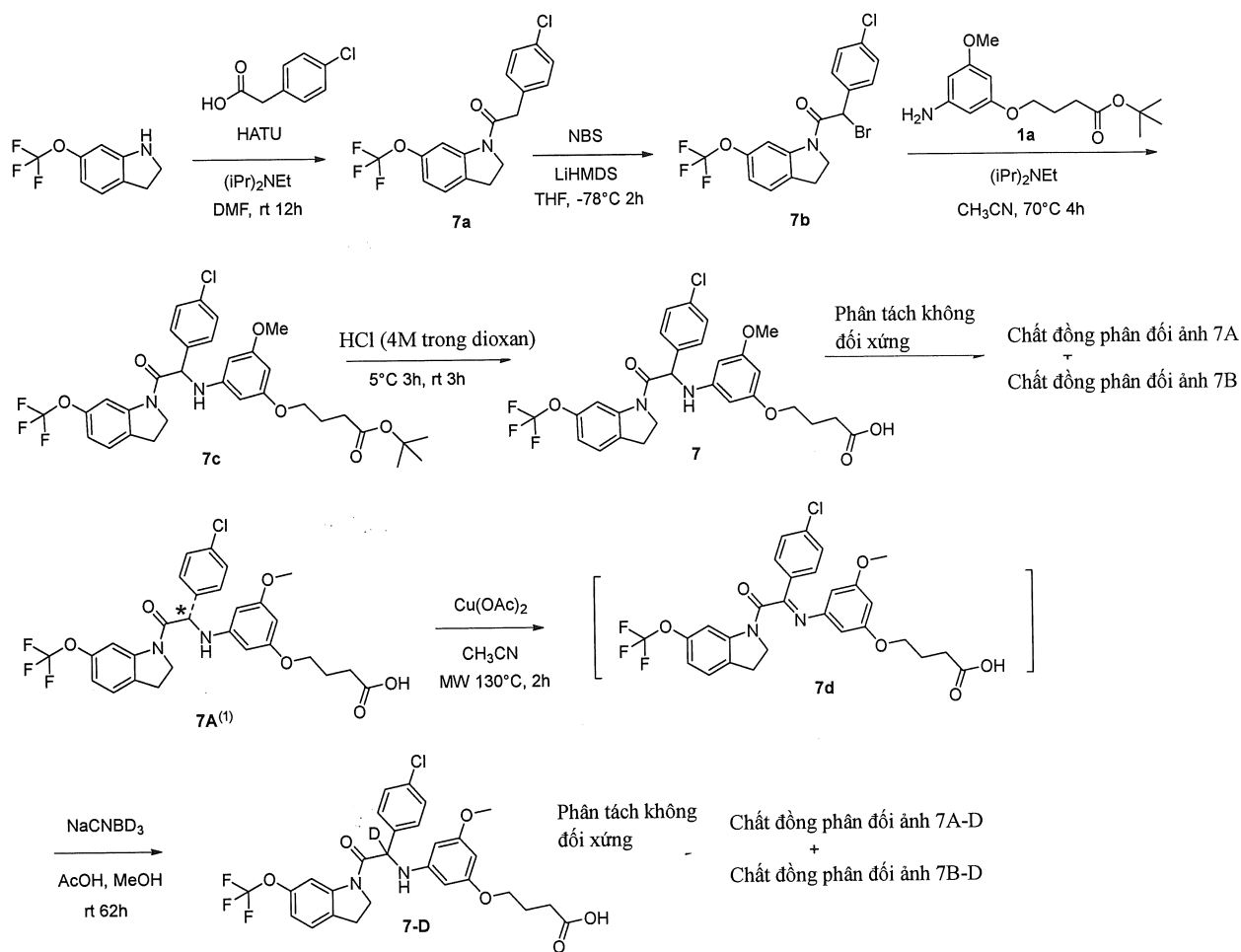
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,87 (quin, $J=6,86$ Hz, 2 H) 2,30 - 2,45 (m, 2 H) 3,09 - 3,26 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,80 - 3,93 (m, 5 H) 3,93 - 4,06 (m, 1 H) 4,33 - 4,44 (m, 1 H) 5,59 (br d, $J=8,51$ Hz, 1 H) 5,76 (s, 1 H) 5,88 (br d, $J=8,83$ Hz, 2 H) 6,39 (br d, $J=8,51$ Hz, 1 H) 6,79 (td, $J=8,43, 2,05$ Hz, 1 H) 6,95 - 7,04 (m, 2 H) 7,30 - 7,37 (m, 2 H) 8,03 (br s, 1 H), 12,18 (br s, 1H)

LC/MS (phương pháp LC-A): R_t 2,88 min, MH^+ 593

$[\alpha]_D^{20}$: +32,7° (c 0,294, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-I): R_t 1,82 min, MH^+ 593 độ tinh khiết không đối xứng 99,56%.

Ví dụ 7: tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-1-deuterio-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (hợp chất 7-D) và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnh 7A-D và 7B-D



(¹) Hóa học lập thể tuyệt đối của tâm không đối xứng (*) của chất đồng phân đối ảnh 7A không được xác định

Tổng hợp hợp chất trung gian 7a:

Hỗn hợp chứa axit 6-(triflometoxy)indolin [CAS 959235-95-1] (2 g, 9,84 mmol), 2-(4-clophenyl)axetic [CAS 1878-66-6] (1,85 g, 10,8 mmol), HATU (5,6 g, 14,8 mmol) và diisopropyletylamin (4,9 mL, 29,5 mmol) trong DMF (40 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Nước được bổ sung và kết tủa được lọc ra. Phần cặn được hấp thụ bằng EtOAc. Dung dịch hữu cơ được rửa bằng 10% dung dịch nước chứa K₂CO₃, nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (15-40 μm, 80 g, heptan/EtOAc gradien 90/10 với 60/40). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon **7a** (3 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 7b:

Ở nhiệt độ -78°C , trong dòng N_2 , LiHMDS 1,5 M trong THF (11,2 mL, 16,9 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp chứa 2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon 7a (3 g, 8,43 mmol) trong THF (50 mL). Hỗn hợp được khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (1,65 g, 9,3 mmol) trong THF (30 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ -78°C , phản ứng được dừng bằng dung dịch bão hòa chứa NH_4Cl . Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được tách, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon 7b (3,6 g). Hợp chất được sử dụng như vậy trong bước tiếp theo.

Tổng hợp hợp chất trung gian 7c:

Hỗn hợp chứa 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etanon 7b (3,6 g, 8,3 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)-butanoat 1a (2,3 g, 8,3 mmol) và diisopropyletylamin (1,7 mL, 9,94 mmol) trong CH_3CN (80 mL) được khuấy ở 70°C trong 4 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, được pha loãng bằng EtOAc, và được rửa bằng HCl 1N và nước. Pha hữu cơ được tách, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Hợp chất được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 μm , 120 g, heptan/EtOAc 80/20). Phần tinh khiết được thu gom và được làm bay hơi đến khô để thu được, sau khi tinh chế từ diisopropyl ete, *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat 7c (2,6 g).

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

Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat 7c (2,4 g, 3,8 mmol) trong HCl (4M trong dioxan) (24 mL) được khuấy ở 5°C trong 3 giờ và ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Kết tủa được lọc ra và được làm khô để thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic làm muối HCl (hợp chất 7, 2 g, 0,8 đương lượng HCl, 0,07 đương lượng H_2O). Hợp chất 7 (2 g, muối HCl) được trung hòa trước khi phân tách không đối xứng bằng việc xử lý dung dịch

chứa Hợp chất 7 (muối HCl) bằng NaOH 1N và làm bay hơi lớp hữu cơ trong điều kiện áp suất giảm. Chất đồng phân đối ảnh được tách thông qua SFC không đối xứng điều chế (pha tĩnh: Chiralcel® OD-H 5 μ m 250 x 30 mm, pha động: 50% CO₂, 50% iPrOH (+ 0,3% iPrNH₂)) và được tinh chế thêm thông qua SFC không đối xứng điều chế (pha tĩnh: Cyano® 6 μ m 150 x 21,2 mm, pha động: 80% CO₂, 20% MeOH (+ 0,3% iPrNH₂)). Sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Hai chất đồng phân đối ảnh được hấp thụ bằng EtOAc và được rửa bằng HCl 1N. 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. Chất đồng phân đối ảnh được rửa giải thứ nhất được hóa cứng từ ete/diisopropyl ete để thu được chất đồng phân đối ảnh 7A (616 mg). Chất đồng phân đối ảnh được rửa giải thứ hai được hóa cứng từ ete/diisopropyl ete để thu được chất đồng phân đối ảnh 7B (715 mg).

Hợp chất 7:

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

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

Điểm nóng chảy: 150°C

Chất đồng phân đối ảnh 7A:

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

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

[α]_D²⁰: -48,5° (c 0,27, DMF)

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

Chất đồng phân đối ảnh 7B:

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

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

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

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

Tổng hợp hợp chất được đơteri hóa 7-D và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnh 7A-D và 7B-D:

Đồng(II) axetat (241 mg, 1,33 mmol) được bổ sung trong 1 phần vào dung dịch chứa chất đồng phân đối ảnh 7A (384 mg, 0,663 mmol) trong CH_3CN (15 mL) ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt trong ống bịt kín trong lò vi sóng được bức xạ ở nhiệt độ 130°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn được hấp thụ bằng CH_2Cl_2 và nước. Các lớp được tách. Lớp nước được chiết lại bằng CH_2Cl_2 . Lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước muối và nước, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc, và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn, chứa hợp chất thô trung gian 7d được hòa tan trong MeOH (20 mL). Natri xyanoborodeuterit (349 mg, 5,31 mmol) và hai giọt axit axetic được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 55 giờ. Bổ sung natri xyanoborodeuterit (48 mg, 0,663 mmol) và một vài giọt axit axetic được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 7 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được trộn với nước và Et_2O . Hệ thống hai pha được axit hóa đến pH 1-2 bằng cách bổ sung HCl 1N. Các lớp được tách. Lớp nước được chiết lại bằng Et_2O . Các lớp hữu cơ đã thu gom được làm khô trên MgSO_4 và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-1-deuterio-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoic raxemic (hợp chất 7-D, 242 mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 7-D (242 mg) được tách thông qua SFC điều chế (pha tĩnh: Kromasil (R,R) Whelk-O1 10/100, pha động: CO₂, EtOH + 0,4% iPrNH₂). Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra Chất đồng phân đối ảnh 7A-D làm sản phẩm được rửa giải thứ nhất và Chất đồng phân đối ảnh 7B-D làm sản phẩm được rửa giải thứ hai. Các chất đồng phân đối ảnh được trộn với trong Et₂O và nước. Hỗn hợp được axit hóa đến pH 1-2 bằng HCl 1N. Các lớp được tách và lớp nước được chiết hai lần bằng Et₂O. Các lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được Chất đồng phân đối ảnh 7A-D (85 mg, 92% đơteri hóa theo ¹H HMR) và Chất đồng phân đối ảnh 7B-D (77 mg, 92% đơteri hóa theo ¹H HMR) dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt.

Chất đồng phân đối ảnh 7A-D:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=7,0 Hz, 2 H) 2,34 (t, *J*=7,1 Hz, 2 H) 3,07 - 3,25 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,84 (t, *J*=6,4 Hz, 2 H) 4,05 (td, *J*=10,3, 7,1 Hz, 1 H) 4,52 (td, *J*=10,3, 6,4 Hz, 1 H) 5,76 (t, *J*=2,0 Hz, 1 H) 5,92 - 5,98 (m, 2 H) 6,45 (s, 1 H) 7,01 (dd, *J*=8,1, 1,5 Hz, 1 H) 7,33 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 7,39 - 7,49 (m, 2 H) 7,51 - 7,60 (m, 2 H) 8,03 (s, 1 H) 12,17 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): *R*_t 1,13 min, MH⁺ 580

[α]_D²⁰: +54,2° (c 0,41, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): *R*_t 5,51 min, MH⁺ 580, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 7B-D:

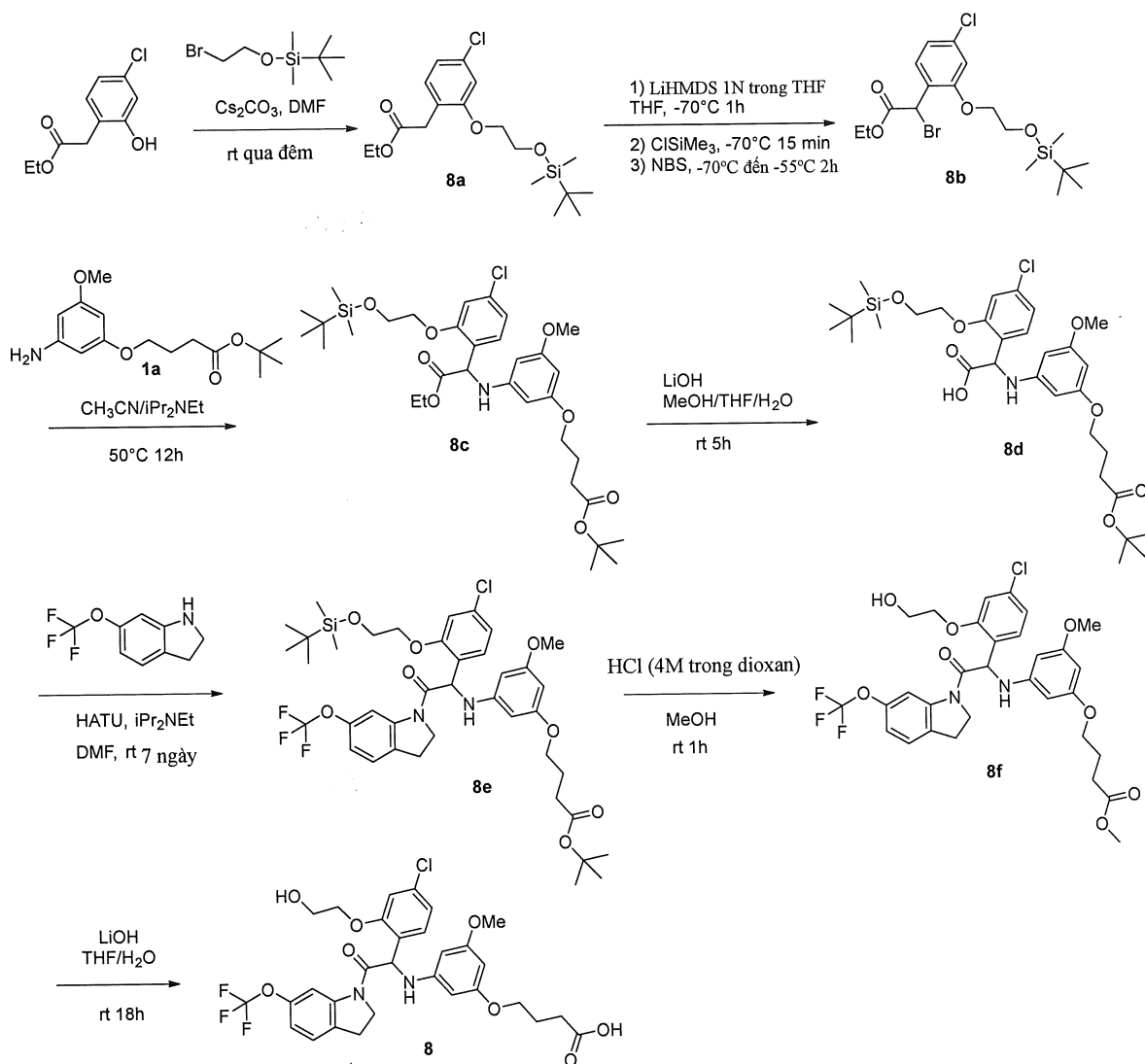
¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=6,9 Hz, 2 H) 2,34 (t, *J*=7,3 Hz, 2 H) 3,07 - 3,25 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,84 (t, *J*=6,6 Hz, 2 H) 4,05 (td, *J*=10,4, 7,3 Hz, 1 H) 4,52 (td, *J*=10,3, 6,4 Hz, 1 H) 5,76 (t, *J*=2,0 Hz, 1 H) 5,92 - 5,98 (m, 2 H) 6,45 (s, 1 H) 7,01 (dd, *J*=8,1, 1,5 Hz, 1 H) 7,33 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 7,40 - 7,49 (m, 2 H) 7,51 - 7,62 (m, 2 H) 8,03 (s, 1 H) 12,16 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): *R*_t 1,10 min, MH⁺ 580

$[\alpha]_D^{20}$: -50,1° (c 0,459, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-E): R_t 6,10 min, MH^+ 580, độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Ví dụ 8: tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clo-2-(2-hydroxyetoxy)phenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (hợp chất 8).



Tổng hợp hợp chất trung gian 8a:

Bổ sung (2-bromoethoxy)(*tert*-butyl)dimethylsilan [CAS 86864-60-0] (6,26 mL, 29,1 mmol) vào hỗn hợp chứa etyl 2-(4-clo-2-hydroxyphenyl)axetat [CAS 1261826-30-5] (5,2 g, 24,2 mmol) và xesi cacbonat (15,8 g, 48,5 mmol) trong DMF (90 mL) ở nhiệt độ $10^\circ C$. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Nước được bổ sung và hỗn hợp được chiết bằng EtOAc. Pha hữu cơ được làm khô trên $MgSO_4$, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký

nhanh trên silicagel (15-40 μ m, 80 g, heptan/EtOAc 80/20). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để thu được ethyl 2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxy)-4-clophenyl)axetat 8a (7,8 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 8b:

Bổ sung dung dịch chứa ethyl 2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxy)-4-clophenyl)axetat 8a (7,8 g, 20,9 mmol) trong THF (45 mL) vào dung dịch đã làm lạnh (-70°C) chứa liti bis(trimethylsilyl)amit 1M trong THF (41,8 mL, 41,8 mmol). Sau khi khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ -70°C , chlorotrimethylsilan (4,24 mL, 33,5 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở -70°C trong 15 phút. *N*-Bromosuxinimit (4,46 g, 25,1 mmol) trong THF (45 mL) được bổ sung và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ -55°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được rót vào H_2O và chiết hai lần bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được thu gom, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được ethyl 2-bromo-2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxy)-4-clophenyl)axetat 8b (10,1 g), which được sử dụng trong bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất trung gian 8c:

Hỗn hợp chứa ethyl 2-bromo-2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxy)-4-clophenyl)axetat 8b (2,0 g, 4,429 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxypenoxy)butanoat 1a (1,62 g, 5,76 mmol) và diisopropyletylamin (1,53 mL, 8,86 mmol) trong CH_3CN (40 mL) được khuấy ở 50°C trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 μ m, 80 g, heptan/EtOAc gradien 85/15 với 60/40). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxy)-4-clophenyl)-2-etoxy-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypenoxy)-butanoat 8c (1,1 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 8d:

Liti hydroxit monohydrat (142 mg, 3,37 mmol) trong nước (7,5 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxy)-4-clophenyl)-2-etoxy-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoat 8c (1,1 g, 1,69 mmol) trong THF/ CH_3OH (1/1) (15 mL) ở nhiệt độ 10°C . Phản ứng được

khuấy ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ, được pha loãng bằng nước và làm lạnh xuống 0°C. Dung dịch được axit hóa từ từ đến pH 6-7 bằng HCl 0,5N, và được chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được axit 2-((3-(4-(*tert*-butoxy)-4-oxobutoxy)-5-metoxyphenyl)amino)-2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxy)-4-clophenyl) axetic 8d (675 mg). Hợp chất được sử dụng không cần thêm bước tinh chế trong bước tiếp theo.

Tổng hợp hợp chất trung gian 8e:

Bổ sung HATU (617 mg, 1,62 mmol), diisopropyletylamin (536 µL, 3,24 mmol) và 6-(triflometoxy)indolin [CAS 959235-95-1] (220 mg, 1,08 mmol) vào dung dịch chứa axit 2-((3-(4-(*tert*-butoxy)-4-oxobutoxy)-5-metoxyphenyl)amino)-2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxy)-4-clophenyl) axetic 8d (675 mg, 1,08 mmol) trong DMF (6 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Hỗn hợp phản ứng was được pha loãng bằng nước. Kết tủa được lọc ra, được rửa bằng nước và được hấp thụ bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được rửa bằng 10% dung dịch chứa K₂CO₃ và nước, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxy)-4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat 8e (385 mg). Hợp chất được sử dụng không cần tinh chế thêm trong bước phản ứng tiếp theo.

Tổng hợp hợp chất trung gian 8f:

Dưới dòng N₂ ở nhiệt độ 5°C, HCl (4M trong dioxan) (1,19 mL, 4,76 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa *tert*-butyl 4-(3-((1-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxy)-4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat 8e (385 mg, 0,476 mmol) trong MeOH (5 mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp được làm lạnh xuống 0°C, được bazơ hóa bằng 10% dung dịch nước chứa K₂CO₃ và được chiết bằng EtOAc. Pha hữu cơ được tách, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và dung môi được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (15-40 µm, 24 g, CH₂Cl₂/MeOH 99/1). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để thu được metyl 4-(3-((1-(4-clo-2-(2-hydroxyetoxy)phenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat 8f (99 mg).

Tổng hợp hợp chất 8:

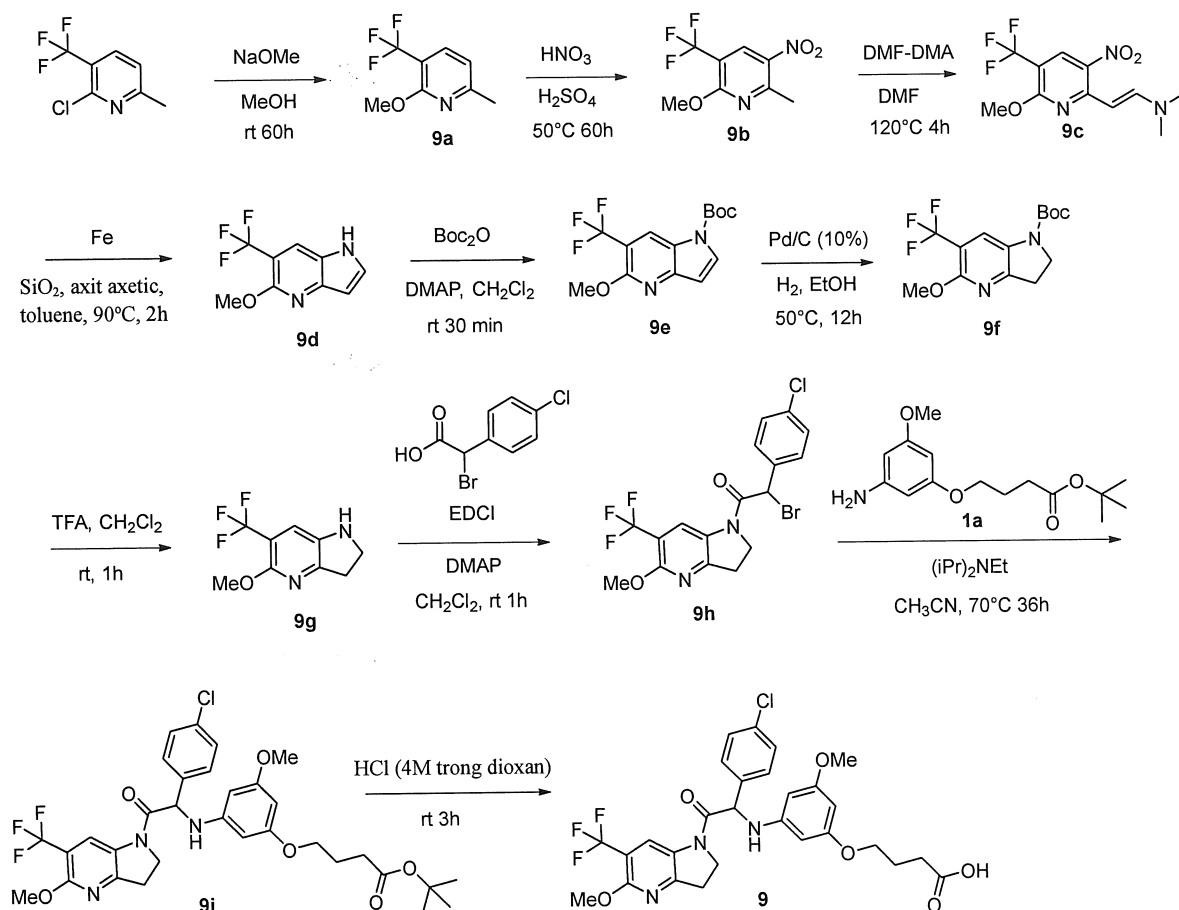
Liti hydroxit monohydrat (32 mg, 0,76 mmol) trong nước (2,5 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa metyl 4-(3-((1-(4-clo-2-(2-hydroxyetoxy)phenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoat 8f (99 mg, 0,152 mmol) trong THF (2,5 mL) ở nhiệt độ 10°C. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ nhiệt độ phòng trong 18 giờ, và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (20-45 μ m, 12 g, CH₂Cl₂/MeOH gradien 99/1 với 90/10). Các phần chứa hợp chất mong muốn được thu gom và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Bước tinh chế thứ hai được thực hiện thông qua HPLC pha đảo (pha tĩnh: YMC-actus Triart-C18 10 μ m 30 x 150mm, pha động: gradien từ 65% NH₄HCO₃ 0,2%, 35% CH₃CN đến 25% NH₄HCO₃ 0,2%, 75% CH₃CN) để thu được, sau khi làm khô lạnh từ hỗn hợp chứa nước/CH₃CN (8/2), axit 4-(3-((1-(4-clo-2-(2-hydroxyetoxy)phenyl)-2-oxo-2-(6-(triflometoxy)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoic (hợp chất 8, 16 mg).

Hợp chất 8:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,86 (quin, *J*=6,86 Hz, 2 H) 2,28 - 2,47 (m, 2 H) 3,10 - 3,27 (m, 2 H) 3,61 (s, 3 H) 3,68 - 3,88 (m, 4 H) 4,06 - 4,23 (m, 3 H) 4,39 (td, *J*=10,09, 6,62 Hz, 1 H) 5,70 - 5,76 (m, 2 H) 5,91 (br d, *J*=9,14 Hz, 2 H) 6,44 (d, *J*=8,83 Hz, 1 H) 6,99 - 7,03 (m, 2 H) 7,12 (d, *J*=1,89 Hz, 1 H) 7,34 (d, *J*=8,20 Hz, 2 H) 8,02 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-B): Rt 2,65 min, MH⁺ 639

Ví dụ 9: tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxy-6-(triflometyl)-2,3-dihydro-1H-pyrol[3,2-*b*]pyridin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoic (hợp chất 9).



Tổng hợp hợp chất trung gian 9a:

Huyền phù chứa 2-clo-6-metyl-3-(triflometyl)pyridin [CAS 1099597-74-6] (4,8 g, 24,6 mmol trong natri metoxit (25% trong MeOH) (24 mL, 105 mmol) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 60 giờ. Hỗn hợp được đổ vào nước đá và chiết hai lần bằng Et₂O. Các lớp hữu cơ đã thu gom được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-metoxi-6-metyl-3-(triflometyl)pyridin 9a (4,69 g). Sản phẩm được sử dụng như vậy trong bước tiếp theo.

Tổng hợp hợp chất trung gian 9b:

HNO₃ (2,32 mL, 49,1 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch làm lạnh (0°C) chứa 2-metoxi-6-metyl-3-(triflometyl)pyridin 9a (4,69 g, 24,5 mmol) trong H₂SO₄ (63,3 mL, 1,128 mol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 50°C trong 60 giờ. hỗn hợp phản ứng được rót cẩn thận vào nước đá và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 30 phút. Phần rắn được lọc ra và được rửa bằng nước để thu được 2-metoxi-6-metyl-5-nitro-3-(triflometyl)pyridin 9b (4,38 g) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 9c:

2-metoxý-6-metyl-5-nitro-3-(triflometyl)pyridin 9b (4,38 g, 18,5 mmol) được hòa tan trong DMF khô (84 mL) dưới khí N₂. DMF-DMA (12,2 mL, 91,5 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 120°C trong 4 giờ. Sau khi làm lạnh xuống nhiệt độ phòng, hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn rắn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel (120 g) sử dụng gradien của ete dầu mỏ/EtOAc từ 100/0 đến 60/40). Phần tinh khiết được thu gom và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để thu được (*E*)-2-(6-metoxý-3-nitro-5-(triflometyl)pyridin-2-yl)-*N,N*-dimetyletenamin 9c (4,5 g) dưới dạng chất rắn màu đỏ.

Tổng hợp hợp chất trung gian 9d:

(*E*)-2-(6-metoxý-3-nitro-5-(triflometyl)pyridin-2-yl)-*N,N*-dimetyletenamin 9c (4,5 g, 15,5 mmol) được hòa tan trong toluen (87 mL) trong khí N₂. Silicagel (4,64 g), bột sắt (8,63 g, 154,5 mmol) và axit axetic (35,4 mL) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 90°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc qua Celite® và phần rắn được rửa nhiều lần bằng EtOAc. Phần lọc đã kết hợp được làm bay hơi và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel (ete dầu mỏ/EtOAc gradien 100/0 với 65/35) để thu được 5-metoxý-6-(triflometyl)-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin 9d (3,1 g) dưới dạng chất rắn màu vàng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 9e:

5-metoxý-6-(triflometyl)-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin 9d (2,04 g, 9,44 mmol) được hòa tan trong CH₂Cl₂ khô (90 mL) dưới khí N₂. DMAP (123 mg, 1,01 mmol) và Boc₂O (2,49 g, 11,4 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, được cô trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh trên silicagel (ete dầu mỏ/EtOAc gradien 100/0 với 96/4) để thu được *tert*-butyl 5-metoxý-6-(triflometyl)-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin-1-carboxylat 9e (2,95 g) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 9f:

tert-butyl 5-metoxý-6-(triflometyl)-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin-1-carboxylat 9e (1,45 g, 4,59 mmol) được hòa tan trong EtOH (30 mL) và phản ứng được thổi bằng nitơ. Pd/C (10%) (976 mg, 0,917 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng được hydro hóa qua đêm ở nhiệt độ 50°C. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh xuống nhiệt độ phòng và được lọc qua Celite®. Bánh lọc được rửa bằng EtOH và phần lọc được cô trong điều

kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (ete dầu mỏ/EtOAc gradien 100/0 với 95/5) để thu được *tert*-butyl 5-metoxi-6-(triflometyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin-1-carboxylat 9f (1,2 g) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 9g:

Dung dịch chứa *tert*-butyl 5-metoxi-6-(triflometyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin-1-carboxylat 9f (1,2 g, 3,77 mmol) trong TFA/CH₂Cl₂ (1/1) (19 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng CH₂Cl₂ (60 mL), được rửa bằng dung dịch Na₂CO₃ chứa nước bão hòa (60 mL) và nước muối (60 mL). Lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh trên silicagel (40 g, ete dầu mỏ/EtOAc gradien 80/20 với 40/60) để thu được 5-metoxi-6-(triflometyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin 9g (745 mg) dưới dạng chất rắn màu vàng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 9h:

5-metoxi-6-(triflometyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin 9g (350 mg, 1,60 mmol) được hòa tan trong CH₂Cl₂ khô (6,5 mL) dưới khí N₂. DMAP (28 mg, 0,229 mmol) và axit 2-bromo-2-(4-clophenyl) axetic [CAS 3381-73-5] (460 mg, 1,84 mmol) được bổ sung. EDCI (383 mg, 1,998 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng CH₂Cl₂, làm lạnh xuống 0°C và dung dịch nước bão hòa chứa K₂CO₃ được bổ sung. Các lớp được tách và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, được làm khô trên Na₂SO₄ và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh trên silicagel (40 g, ete dầu mỏ/EtOAc gradien 100/0 với 60/40). Bước tinh chế thứ hai được thực hiện trên silicagel (40 g, toluen/Et₂O gradien 100/0 với 90/10). Bước tinh chế thứ ba được thực hiện (12 g, toluen/Et₂O gradien 98/2 với 97/3). Phần tinh khiết được thu gom và được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(5-metoxi-6-(triflometyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl)etanon 9h (407 mg) dưới dạng bột màu xanh lá nhạt.

Tổng hợp hợp chất trung gian 9i:

2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(5-metoxi-6-(triflometyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl)etanon 9h (400 mg, 0,89 mmol) và *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxypenoxy)butanoat 1a (300 mg, 1,07 mmol) được hòa tan trong CH₃CN khô (40

mL) dưới khí N₂. Diisopropyletylamin (232 μ L, 1,33 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt đến 70°C trong 36 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng 20 mL EtOAc, và được rửa bằng HCl 1M và nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh trên silicagel (40 g, toluen/EtOAc gradien 100/0 với 94/6). Bước tinh chế thứ hai được thực hiện bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel (2x12 g, ete dầu mỏ/axeton gradien 100/0 với 95/5). Phần tinh khiết được thu gom và được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxyl)-6-(triflometyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxylphenoxy)butanoat 9i (341 mg) dưới dạng bột màu trắng.

Tổng hợp hợp chất 9:

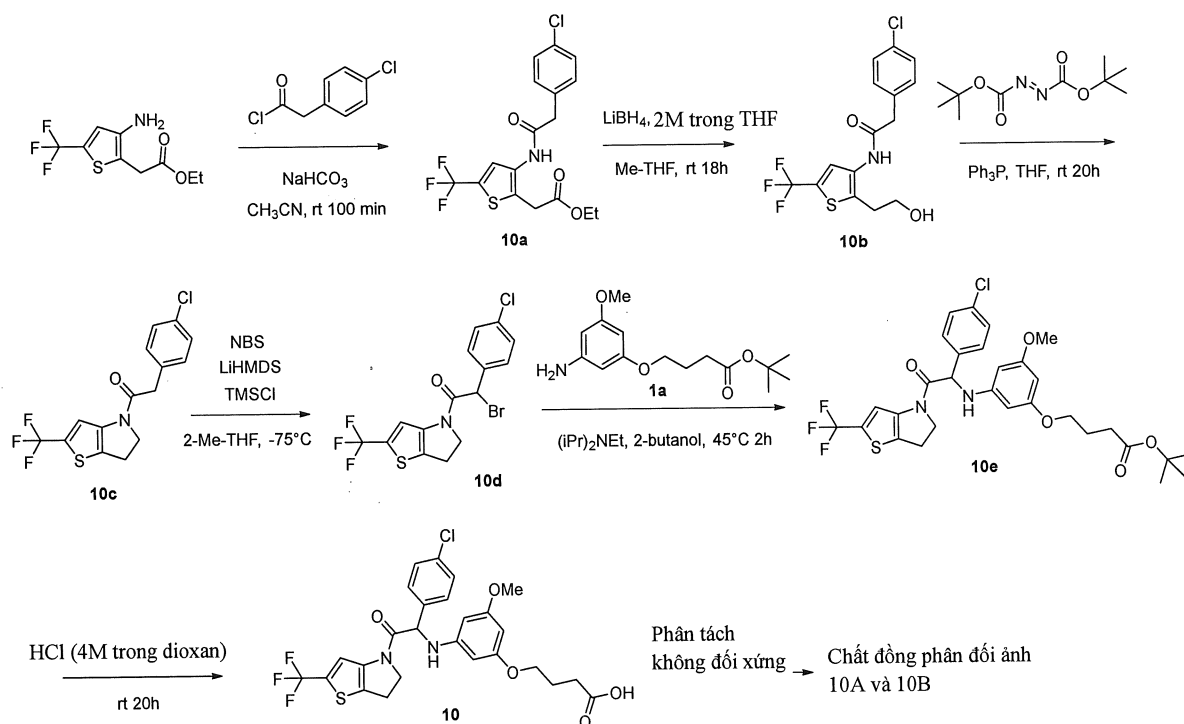
Tert-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxyl)-6-(triflometyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxylphenoxy)butanoat 9i (341 mg, 0,525 mmol) được hòa tan dưới khí N₂ trong HCl (4M trong dioxan) (6,62 mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh trên silicagel (40 g, toluen/EtOAc/AcOH gradien 99/0/1 với 50/49/1). Bước tinh chế thứ hai được thực hiện trên silicagel (2x12 g, CH₂Cl₂/MeOH/AcOH gradien 99/0/1 với 96/3/1). Bước tinh chế thứ ba được thực hiện trên silicagel (12 g, CH₂Cl₂/MeOH/AcOH gradien 98/1/1 với 96,5/2,5/1). Phần tinh khiết được thu gom và được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-(5-metoxyl)-6-(triflometyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl)-2-oxoetyl)amino)-5-metoxylphenoxy)butanoic (hợp chất 9, 72 mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 9:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,84 - 1,91 (m, 2 H) 2,30 - 2,37 (m, 2 H) 3,21 - 3,30 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,80 - 3,89 (m, 2 H) 3,94 (s, 3 H) 3,98 - 4,12 (m, 1 H) 4,56 (td, *J*=10,64, 6,15 Hz, 1 H) 5,58 (d, *J*=8,83 Hz, 1 H) 5,76 (t, *J*=1,89 Hz, 1 H) 5,95 (br d, *J*=10,72 Hz, 2 H) 6,40 (d, *J*=8,83 Hz, 1 H) 7,44 (d, *J*=8,51 Hz, 2 H) 7,56 (d, *J*=8,51 Hz, 2 H) 8,53 (s, 1 H) 12,06 - 12,26 (m, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-A): Rt 2,87 min, MH⁺ 594

Ví dụ 10: tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(2-(triflometyl)-5,6-dihydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrol-4-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoic (hợp chất 10) và sự phân tách không đối xứng thành chất đồng phân đối ảnh 10A và 10B.



Tổng hợp hợp chất trung gian 10a:

Dung dịch chứa etyl 2-(3-amino-5-(triflometyl)thiophen-2-yl)axetat ([CAS 860398-39-6] (1,49 g, 5,88 mmol) trong CH₃CN (40 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng dưới khí N₂. NaHCO₃ (0,544 g, 6,47 mmol) và 2-(4-clophenyl)axetyl clorua ([CAS 25026-34-0] (861 μ L, 5,88 mmol) được bổ sung, và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 100 phút. Hỗn hợp được đổ vào H₂O khuấy (200 mL) và được chiết bằng Et₂O (2x 100 mL). Lớp hữu cơ đã thu gom 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 kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (50 g) sử dụng gradien của heptan/EtOAc 100/0 với 80/20. Các phần mong muốn được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được đồng bay hơi bằng toluen để tạo ra etyl 2-(3-(2-(4-clophenyl)axetamido)-5-(triflometyl)thiophen-2-yl)axetat 10a (1,15 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 10b:

Dung dịch chứa LiBH₄ 2M trong THF (2,59 mL, 5,18 mmol) được bổ sung từ từ vào dung dịch khuấy chứa etyl 2-(3-(2-(4-clophenyl)axetamido)-5-

(triflometyl)thiophen-2-yl)axetat 10a (1,05 g, 2,59 mmol) trong 2-Me-THF (20 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. Hỗn hợp được đổ vào hỗn hợp khuấy chứa H₂O (100 mL) và Et₂O (100 mL). HCl 1N (10 mL) được bổ sung nhỏ giọt (tạo bọt), và sau khi khuấy trong 15 phút, các lớp được tách. 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 tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (25 g) sử dụng gradien của heptan/iPrOH 100/0 với 50/50. Các phần mong muốn được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và được đồng bay hơi bằng toluen. Phần cặn được khuấy lên trong toluen (6 mL) ở nhiệt độ 45°C trong 15 phút, được lọc ra ở nhiệt độ phòng, được rửa bằng toluen (3x), và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 2-(4-clophenyl)-*N*-(2-(2-hydroxyetyl)-5-(triflometyl)thiophen-3-yl)axetamit 10b (1,15 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 10c:

Triphenylphosphin (1,02 g, 3,85 mmol) được bổ sung vào dung dịch đã khuấy chứa 2-(4-clophenyl)-*N*-(2-(2-hydroxyetyl)-5-(triflometyl)thiophen-3-yl)axetamit 10b (1,0 g, 2,75 mmol) trong THF (20 mL) dưới khí N₂. Di-*tert*-butyl azodicarboxylat (0,71 g, 3,02 mmol) được bổ sung và dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. Phần bay hơi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (25 g) sử dụng gradien của CH₂Cl₂/heptan 0/100 với 100/0. Các phần mong muốn được thu gom và được cô trong điều kiện áp suất giảm xuống thể tích dư là 15 mL. Sản phẩm được tinh chế trong khoảng thời gian 4 ngày. Phần rắn được lọc ra, được rửa bằng heptan (4x) và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 2-(4-clophenyl)-1-(2-(triflometyl)-5,6-dihydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrol-4-yl)etanon 10c (0,75 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 10d:

Ở nhiệt độ -75°C, dưới dòng N₂, LiHMDS 1M trong THF (4,34 mL, 4,34 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp chứa 2-(4-clophenyl)-1-(2-(triflometyl)-5,6-dihydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrol-4-yl)etanon 10c (750 mg, 2,17 mmol) trong 2-Me-THF (30 mL) và hỗn hợp được giữ ở nhiệt độ -75°C trong 20 phút. TMSCl (444 µL, 3,47 mmol) được bổ sung nhỏ giọt. Hỗn hợp được khuấy trong 20 phút ở nhiệt độ -75°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (502 mg, 2,82 mmol) trong THF (5 mL) được bổ

sung nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 20 phút ở nhiệt độ -75°C , phản ứng được dừng bằng dung dịch nước bão hòa chứa NH_4Cl (25 mL). Bể lạnh được lấy ra và hỗn hợp phản ứng được khuấy cho tới khi nhiệt độ phản ứng đạt đến -15°C . Nước (25 mL) và DIPE (25 mL) được bổ sung và hỗn hợp được khuấy trong 10 phút. Lớp hữu cơ được tách và pha nước được chiết bằng Et_2O . Các lớp hữu cơ đã thu gom được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(2-(triflometyl)-5,6-dihydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrol-4-yl)etanon 10d (921 mg), được sử dụng trong bước tiếp theo.

Tổng hợp hợp chất trung gian 10e:

Hỗn hợp chứa 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(2-(triflometyl)-5,6-dihydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrol-4-yl)etanon 10d (921 mg, 2,17 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxyphenoxy)butanoat 1a (1,22 g, 4,34 mmol) và diisopropyletylamin (747 μL , 4,34 mmol) trong 2-butanol (15 mL) được khuấy ở 45°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng đạt tới nhiệt độ phòng, và được đổ vào nước đã khuấy (50 mL). Sản phẩm được chiết (2x) bằng Et_2O . Các lớp hữu cơ đã thu gom được làm khô trên MgSO_4 , được lọc, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được làm đồng bay hơi bằng dioxan (2x). Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (40 g) sử dụng gradien của heptan/ EtOAc / EtOH 100/0/0 với 40/45/15. Các phần mong muốn được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và được làm đồng bay hơi bằng dioxan (2x) để tạo ra *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(2-(triflometyl)-5,6-dihydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrol-4-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat 10e (1,36 g), được sử dụng trong bước tiếp theo.

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

tert-Butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(2-(triflometyl)-5,6-dihydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrol-4-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoat 10e (1,36 g, 2,17 mmol), được trộn với HCl 4M trong dioxan (15 mL) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. Phần rắn được lọc ra, được rửa bằng dioxan (3x), và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C . Phần cặn (1,4 g) được tinh chế thông qua HPLC điều chế (pha tĩnh: RP XBridge[®] Prep C18 OBD – 10 μm , 50 x 150 mm, pha động: 0,25% dung dịch NH_4HCO_3 trong nước, CH_3CN). Các phần mong muốn được

thu gom và phần dễ bay hơi hữu cơ được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Dung dịch nước còn lại được chiết (2x) bằng hỗn hợp dung môi chứa Et₂O/2-Me-THF (2/1). Lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc, và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(2-(triflometyl)-5,6-dihydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrol-4-yl)etyl)amino)-5-metoxypenoxy)butanoic thô (hợp chất 10, 0,54 g). Mẫu phân tích (40 mg) được hòa tan trong Et₂O đã khuấy (1 mL) và HCl 4M trong dioxan (250 µL) được bổ sung. Sau khi khuấy trong 2 phút, sản phẩm được lọc ra, được rửa (3x) bằng Et₂O/dioxan (4/1), và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra Hợp chất 10 (20 mg).

Chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 10 (500 mg) được tách thông qua SFC không đối xứng điều chế (pha tĩnh: Chiralpak[®] Diacel IC 20 x 250 mm, pha động: CO₂, EtOH). Các phần sản phẩm của chất đồng phân đối ảnh được rửa giải thứ nhất được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (12g) sử dụng gradien của heptan/EtOAc:EtOH:AcOH 100/0:0:0 với 60/30:9,8:0,2. Các phần mong muốn được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được làm đồng bay hơi bằng DCM. Phần cặn được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra Chất đồng phân đối ảnh 10A (164 mg). Các phần sản phẩm của chất đồng phân đối ảnh được rửa giải thứ hai được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (12g) sử dụng gradien của heptan/EtOAc:EtOH:AcOH 100/0:0:0 với 60/30:9,8:0,2. Các phần mong muốn được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được làm đồng bay hơi bằng DCM. Phần cặn được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra chất đồng phân đối ảnh 10B (167 mg).

Hợp chất 10:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*) δ ppm 1,87 (t, J=6,8 Hz, 2 H), 2,31 - 2,37 (m, 2 H), 3,26 - 3,38 (m, 2 H), 3,62 (s, 3 H), 3,84 (br t, J=6,4 Hz, 2 H), 4,29 (td, J=10,5, 6,8 Hz, 1 H), 4,79 (td, J=10,2, 6,2 Hz, 1 H), 5,49 (s, 1 H), 5,76 (t, J=2,0 Hz, 1 H), 5,91 - 5,97 (m, 2 H), 7,44 (d, J=8,4 Hz, 2 H), 7,54 (d, J=8,8 Hz, 2 H), 7,76 (s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-D): Rt 1,93 min, MH⁺ 569

Chất đồng phân đối ảnh 10A:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,83 - 1,91 (m, 2 H), 2,30 - 2,36 (m, 2 H), 3,23 - 3,30 (m, 2 H), 3,62 (br s, 3 H), 3,85 (br s, 2 H), 4,30 (m, $J=9,5$ Hz, 1 H), 4,79 (m, $J=6,8$ Hz, 1 H), 5,48 (br d, $J=8,8$ Hz, 1 H), 5,76 (br s, 1 H), 5,94 (br d, $J=9,0$ Hz, 2 H), 6,35 (br d, $J=8,1$ Hz, 1 H), 7,43 (br d, $J=7,3$ Hz, 2 H), 7,54 (br d, $J=8,1$ Hz, 2 H), 7,76 (br s, 1 H), 12,10 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 1,03 min, MH^+ 569

$[\alpha]_D^{20}$: +36,9° (c 0,4445, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-F): R_t 5,52 min, MH^+ 569 độ tinh khiết không đối xứng 100%.

Chất đồng phân đối ảnh 10B:

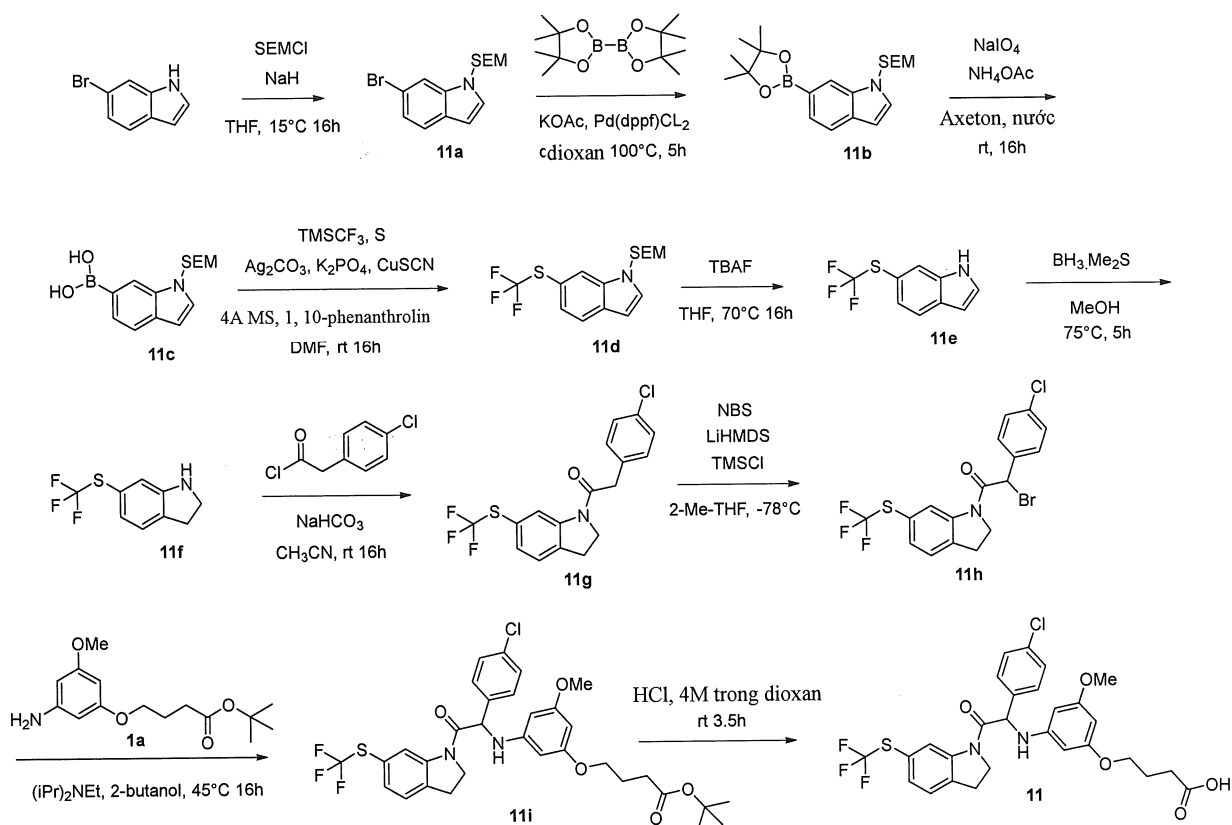
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,83 - 1,91 (m, 2 H), 2,34 (br t, $J=6,8$ Hz, 2 H), 3,23 - 3,30 (m, 2 H), 3,62 (s, 3 H), 3,85 (br t, $J=5,9$ Hz, 2 H), 4,25 - 4,35 (m, 1 H), 4,75 - 4,83 (m, 1 H), 5,48 (br d, $J=8,4$ Hz, 1 H), 5,76 (br s, 1 H), 5,94 (br d, $J=8,8$ Hz, 2 H), 6,35 (br d, $J=8,4$ Hz, 1 H), 7,43 (br d, $J=7,7$ Hz, 2 H), 7,54 (br d, $J=7,9$ Hz, 2 H), 7,76 (s, 1 H), 12,11 (br s, 1 H)

LC/MS (phương pháp LC-C): R_t 1,03 min, MH^+ 569

$[\alpha]_D^{20}$: -39,1° (c 0,437, DMF)

SFC không đối xứng (phương pháp SFC-F): R_t 6,98 min, MH^+ 569 độ tinh khiết không đối xứng 97%.

Ví dụ 11: tổng hợp axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-((triflometyl)thio)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoic (hợp chất 11)



Tổng hợp hợp chất trung gian 11a:

Bổ sung từng phần 6-bromo-1H-indol [CAS 52415-29-9] (100 g, 510 mmol) vào huyền phù chứa NaH (26,5 g, 663 mmol, 60% trong dầu) trong THF (100 mL) ở nhiệt độ 0°C được. Phản ứng được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ 15°C. Sau khi làm lạnh xuống 0°C, SEMCl (93,6 g, 561 mmol, 99,5 mL) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 16 h at 15°C và được đổ vào dung dịch amoni clorua chứa nước bão hòa (200 mL). Hỗn hợp được pha loãng bằng etyl axetat (300 mL). Các lớp được tách và lớp nước được chiết bằng etyl axetat (2x 200 mL). Lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước muối (500 mL), được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel sử dụng ete dầu mỏ. Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được 6-bromo-1-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-1H-indol 11a (134 g) dưới dạng dầu màu vàng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 11b:

Hỗn hợp chứa 6-bromo-1-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-1H-indol 11a (134 g, 411 mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametyl-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolan) (158,5 g, 624 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (15,02 g, 20,5 mmol) và KOAc (161,2 g, 1,64 mol) trong 1,4-dioxan

(1,5 L) được khuấy ở 100°C trong 5 giờ dưới khí N₂. Phản ứng được làm lạnh xuống 25°C và được lọc qua tấm Celite[®]. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel (ete dầu mỏ/ethyl axetat gradien 100/0 với 50/1). Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được 6-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-1*H*-indol 11b (104 g) dưới dạng dầu màu vàng nhạt.

Tổng hợp hợp chất trung gian 11c:

Bổ sung NaIO₄ (119 g, 557 mmol) và NH₄OAc (53,7 g, 696 mmol) vào dung dịch chứa 6-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-1*H*-indol 11b (52 g, 139 mmol) trong axeton (2,4 L) và H₂O (2,4 L). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 16 giờ. Phản ứng được lặp lại 2 lần ở cùng một tỷ lệ (52 g của hợp chất 11b) và hỗn hợp phản ứng của các phản ứng được thu gom để xử lý. Kết tủa được lọc ra và dung môi (axeton) được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Ethyl axetat (5 L) được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp nước được chiết bằng ethyl axetat (3x 5 L). Các lớp hữu cơ đã thu gom được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và được cô trong chân không để thu được axit (1-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-1*H*-indol-6-yl)boronic 11c (85 g) dưới dạng chất rắn màu nâu đen được sử dụng trong bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất trung gian 11d:

Hỗn hợp chứa TMSCF₃ (207,5 g, 1,46 mol), CuSCN (10,7 g, 87,6 mmol), S₈ (224,6 g, 875,6 mmol), (1-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-1*H*-indol-6-yl)boronic acid 11c (85 g, 292 mmol), Ag₂CO₃ (161 g, 584 mmol), K₃PO₄ (186 g, 876 mmol), 1,10-phenanthrolin (31,6 g, 175 mmol) và sàng phân tử 4Å (85 g) trong DMF (1 L) được khuấy ở 25°C trong 16 giờ dưới khí N₂. Hỗn hợp phản ứng được lọc qua tấm Celite[®]. Phần lọc được pha loãng bằng MTBE (1 L), được rửa bằng nước (3x 500 mL), được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột trên silicagel (ete dầu mỏ/ethyl axetat 100/1). Phần sản phẩm được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được 6-((triflometyl)thio)-1-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-1*H*-indol 11d (38 g) dưới dạng dầu màu vàng.

Tổng hợp hợp chất trung gian 11e:

Bổ sung TBAF, 3H₂O (345 g, 1,09 mol) và etan-1,2-diamin (131,45 g, 2,19 mol) vào dung dịch chứa 6-((triflometyl)thio)-1-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-1*H*-indol 11d (38 g, 109 mmol) trong THF (1,5 L). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 70°C trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh xuống 25°C và được đổ vào trong NaHCO₃ chứa nước bão hòa (3 L). Hỗn hợp nước được chiết bằng etyl axetat (3x 1 L). Các lớp hữu cơ đã thu gom được làm khô trên Na₂SO₄, được lọc và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng HPLC điều chế (cột: Phenomenex Gemini C18 250 x 50mm 10 µm, pha động: nước (0,05% amoniac hydroxit thể tích/thể tích), CH₃CN) để thu được 6-((triflometyl)thio)-1*H*-indol 11e (10,1 g) dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt.

Tổng hợp hợp chất trung gian 11f:

Hỗn hợp chứa 6-((triflometyl)thio)-1*H*-indol 11e (1,0 g, 4,6 mmol) và phức hợp boran dimetyl sulfua (7 mL) được gia nhiệt trong ống đã bịt ở nhiệt độ 75°C trong 5 giờ. Hỗn hợp phản ứng đạt tới nhiệt độ phòng và được bổ sung nhỏ giọt vào MeOH đã khuấy (30 mL) (tỏa nhiệt). Sau khi bổ sung, dung dịch thu được được gia nhiệt dưới điều kiện hồi lưu trong 3 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (25 g) sử dụng gradien của heptan/CH₂Cl₂ 100/0 với 40/60. Các phần mong muốn được thu gom, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và được làm đồng bay hơi bằng dioxan. Sản phẩm được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 6-((triflometyl)thio)indolin 11f (0,79 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 11g:

Dung dịch chứa 6-((triflometyl)thio)indolin 11f (0,79 g, 3,6 mmol) trong CH₃CN (30 mL) được khuấy dưới khí N₂. NaHCO₃ (0,333 g, 3,96 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được làm lạnh trên bề đá. Dung dịch chứa 2-(4-clophenyl)axetyl clorua ([CAS 25026-34-0] (0,852 g, 4,51 mmol) trong CH₃CN (20 mL) được bổ sung, và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Hỗn hợp được đổ vào H₂O đã khuấy (100 mL). Kết tủa được lọc ra và được rửa bằng nước (4x 10 mL). Phần rắn được khuấy lên trong Et₂O/heptan (3/2) (20 mL), được lọc ra, được rửa bằng Et₂O/heptan (3/2) (2x 10 mL) và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 2-(4-clophenyl)-1-(6-((triflometyl)thio)indolin-1-yl)etanon 11g (1,033 g).

Tổng hợp hợp chất trung gian 11h:

Ở nhiệt độ -78°C , dưới dòng N_2 , LiHMDS 1M trong THF (5,56 mL, 5,56 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp chứa 2-(4-clophenyl)-1-(6-((triflometyl)thio)indolin-1-yl)etanon 11g (1,033 mg, 2,78 mmol) trong 2-Me-THF (40 mL) và hỗn hợp được giữ ở nhiệt độ -78°C trong 20 phút. TMSCl (568 μL , 4,45 mmol) được bổ sung nhỏ giọt. Hỗn hợp được khuấy trong 35 phút ở nhiệt độ -78°C và dung dịch chứa *N*-bromosuxinimit (643 mg, 3,61 mmol) trong THF (8 mL) được bổ sung nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 35 phút ở nhiệt độ -78°C , phản ứng được dừng bằng dung dịch nước bão hòa chứa NH_4Cl (30 mL). Bể lạnh được lấy ra và hỗn hợp phản ứng được khuấy cho đến khi phản ứng đạt tới nhiệt độ phòng. Nước (30 mL) và DIPE (30 mL) được bổ sung và hỗn hợp được khuấy trong 20 phút. Lớp hữu cơ được tách, được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để thu được 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(6-((triflometyl)thio)indolin-1-yl)etanon 11h (1,25 g), được sử dụng trong bước tiếp theo.

Tổng hợp hợp chất trung gian 11i:

Hỗn hợp chứa 2-bromo-2-(4-clophenyl)-1-(6-((triflometyl)thio)indolin-1-yl)etanon 11h (1,25 mg, 2,78 mmol), *tert*-butyl 4-(3-amino-5-metoxypheoxy)butanoat 1a (1,56 g, 5,56 mmol) và diisopropyletylamin (957 μL , 5,56 mmol) trong 2-butanol (25 mL) được khuấy ở 45°C trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng đạt tới nhiệt độ phòng, và được đổ vào nước đã khuấy (100 mL). Sản phẩm được chiết (2x) bằng CH_2Cl_2 . Lớp hữu cơ đã thu gom được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO_4 , được lọc, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh trên silicagel (40 g) sử dụng gradien của heptan/EtOAc/EtOH 100/0/0 với 70/20/10. Các phần mong muốn được thu gom và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra *tert*-butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-((triflometyl)thio)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat 11i (2,0 g), được sử dụng trong bước tiếp theo.

Tổng hợp hợp chất 11:

tert-Butyl 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-((triflometyl)thio)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxypheoxy)butanoat 11i (1,81 g, 2,78 mmol), được trộn với HCl 4M trong dioxan (20 mL) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3,5

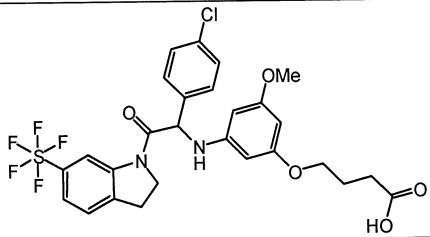
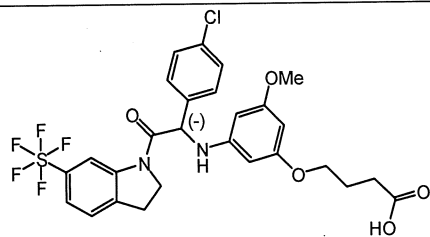
giờ. Phần rắn được lọc ra, được rửa bằng dioxan (3x) và Et₂O (20mL). Chất rắn được hòa tan trong CH₂Cl₂ (100 mL) và được trộn bằng nước (50mL) và Na₂CO₃ chứa nước bão hòa (30mL). Sau khi khuấy trong 15 phút, các lớp được tách. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế thông qua HPLC điều chế (pha tĩnh: RP XBridge[®] Prep C18 OBD – 10 μm, 30 x 150 mm, pha động: 0,25% NH₄HCO₃ solution trong nước, CH₃CN). CH₃CN được làm bay hơi và dung dịch nước cặn được axit hóa đến pH 3 bằng HCl 1N. Sản phẩm được chiết bằng EtOAc (100mL). Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối (50mL), được làm khô trên MgSO₄, được lọc, được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và được làm đồng bay hơi bằng CH₂Cl₂ để thu được axit 4-(3-((1-(4-clophenyl)-2-oxo-2-(6-((triflometyl)thio)indolin-1-yl)etyl)amino)-5-metoxyphenoxy)butanoic (hợp chất 11, 164 mg).

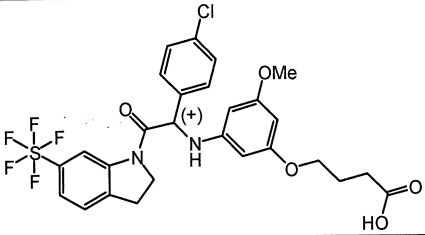
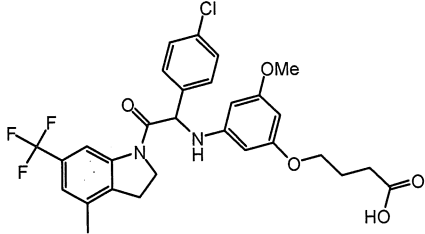
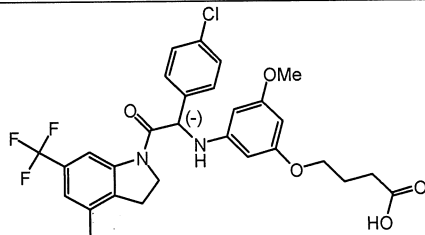
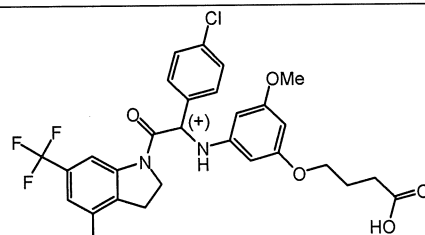
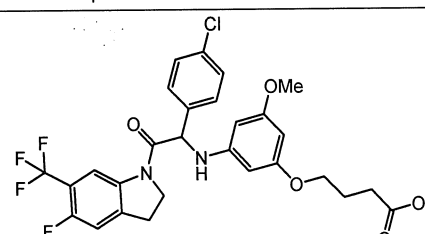
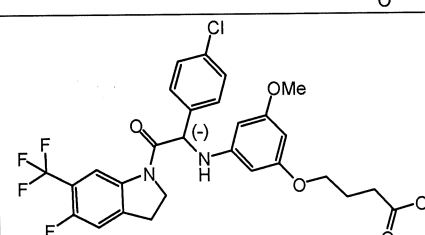
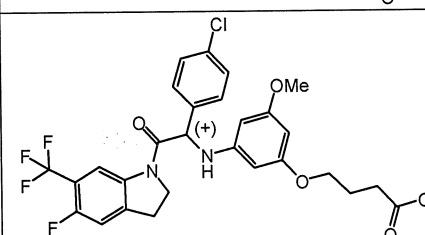
Hợp chất 11:

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,87 (quin, *J*=7,1 Hz, 2 H) 2,25 - 2,38 (m, 2 H) 3,16 - 3,27 (m, 2 H) 3,62 (s, 3 H) 3,81 - 3,87 (m, 2 H) 3,95 - 4,08 (m, 1 H) 4,44 - 4,56 (m, 1 H) 5,57 (br d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 5,74 - 5,77 (m, 1 H) 5,90 - 5,98 (m, 2 H) 6,47 (br d, *J*=8,8 Hz, 1 H) 7,34 - 7,40 (m, 2 H) 7,41 - 7,48 (m, 2 H) 7,51 - 7,59 (m, 2 H) 8,39 (s, 1 H) 12,16 (br s, 1 H)

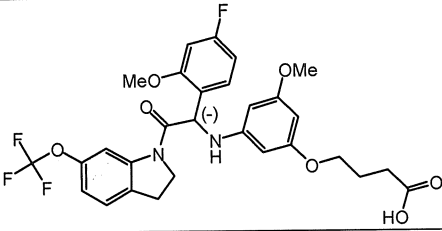
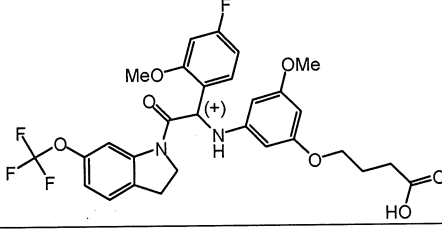
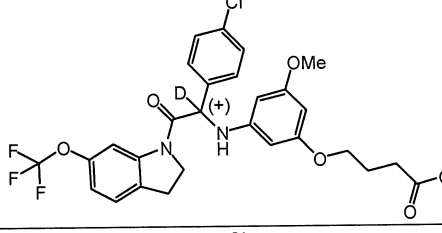
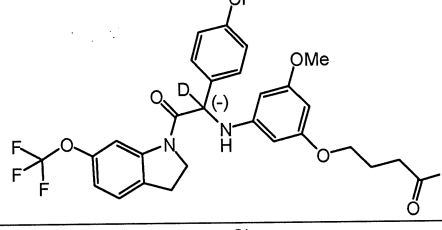
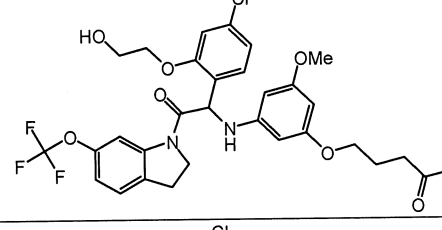
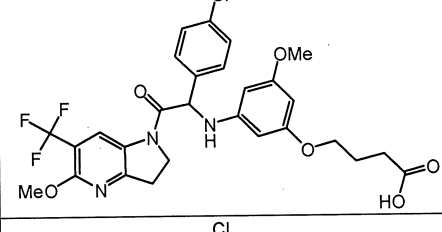
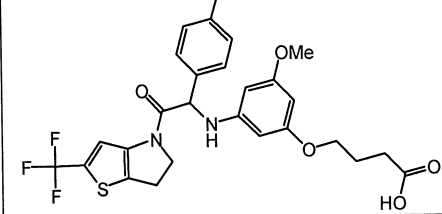
LC/MS (phương pháp LC-C): Rt 1,12 min, MH⁺ 595

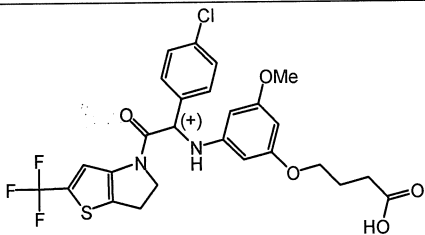
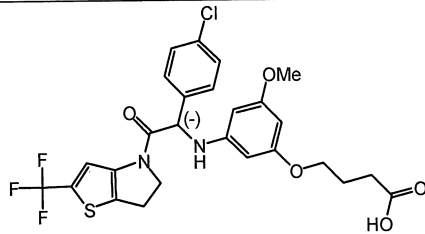
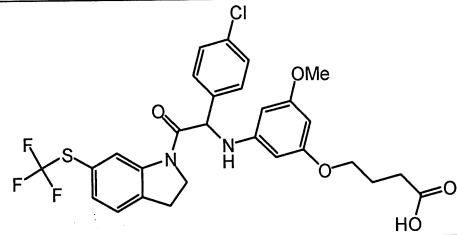
Bảng: Các hợp chất được điều chế như được mô tả bên dưới

Hợp chất	Cấu trúc	Vòng quay quang học
1		racemic
1A		[α] _D ²⁰ = -44,6°

Hợp chất	Cấu trúc	Vòng quay quang học
1B		$[\alpha]_D^{20} = +46,0^\circ$
2		raxemic
2A		$[\alpha]_D^{20} = -39,0^\circ$
2B		$[\alpha]_D^{20} = +47,1^\circ$
3		raxemic
3A		$[\alpha]_D^{20} = -48,9^\circ$
3B		$[\alpha]_D^{20} = +47,8^\circ$

Hợp chất	Cấu trúc	Vòng quay quang học
4		raxemic
4A		$[\alpha]_D^{20} = -39,6^\circ$
4B		$[\alpha]_D^{20} = +43,7^\circ$
5		raxemic
5A		$[\alpha]_D^{20} = -35,8^\circ$
5B		$[\alpha]_D^{20} = +52,8^\circ$
6		raxemic

Hợp chất	Cấu trúc	Vòng quay quang học
6A		$[\alpha]_D^{20} = -37,3^\circ$
6B		$[\alpha]_D^{20} = +32,7^\circ$
7A-D		$[\alpha]_D^{20} = +54,2^\circ$
7B-D		$[\alpha]_D^{20} = -50,1^\circ$
8		raxemic
9		raxemic
10		raxemic

Hợp chất	Cấu trúc	Vòng quay quang học
10A		$[\alpha]_D^{20} = +36,9^\circ$
10B		$[\alpha]_D^{20} = -39,1^\circ$
11		raxemic

Hoạt tính kháng virus của hợp chất theo sáng chế

Thử nghiệm kháng virus DENV-2

Hoạt tính kháng virus của toàn bộ các hợp chất theo sáng chế được thử nghiệm chống lại chủng DENV-2 16681 được dán nhãn bằng protein huỳnh quang màu xanh lá cây được tăng cường (eGFP). Môi trường nuôi cấy gồm môi trường thiết yếu tối thiểu bổ sung bằng 2% của huyết thanh thai bò bất hoạt nhiệt, 0,04% gentamycin (50mg/mL) và 2mM L-glutamin. Tế bào vero, thu được từ ECACC, được tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy và 25μL được bổ sung vào đĩa 384 lỗ (2500 tế bào/lỗ), trong đó đã có hợp chất kháng virus. Thông thường, các đĩa này chứa pha loãng liên tiếp 5 lần của 9 bước pha loãng của hợp chất thử nghiệm với 200 lần nồng độ cuối cùng trong 100% DMSO (200nL). Ngoài ra, mỗi nồng độ hợp chất được thử nghiệm gấp bốn lần (phạm vi nồng độ cuối cùng: 25μM – 0,000064μM hoặc 2,5μM – 0,0000064μM cho hợp chất có hoạt tính nhất). Cuối cùng, mỗi đĩa chứa các lỗ được chỉ định làm đối chứng viut (chứa các tế bào và virus với sự vắng mặt của hợp chất), đối chứng tế bào (chứa tế bào với sự vắng mặt của viut và hợp chất) và đối chứng môi trường (chứa môi trường với sự vắng mặt của tế bào, viut và hợp chất). 25μL môi trường nuôi cấy được bổ sung ngoài trừ tế bào Vero vào lỗ được chỉ định làm đối chứng môi trường. Khi tế bào được bổ sung vào đĩa, đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng để cho phép tế bào phân phối đồng đều trong các lỗ. Tiếp theo, các đĩa được ủ trong máy ấp được làm ẩm hoàn

toàn (37°C, 5% CO₂) cho đến ngày tiếp theo. Sau đó, chủng DENV-2 16681, được dán nhãn bằng eGFP, được bổ sung tại bội số lần tiêm (MOI) là 0,5. Do đó, 15µL hỗn dịch virus được bổ sung vào toàn bộ lỗ chứa hợp chất thử nghiệm và vào lỗ được chỉ định làm đối chứng virus. Song song, 15µL 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 máy ấp được làm ấm hoàn toàn (37°C, 5% CO₂). Vào ngày đọc, huỳnh quang eGFP được đo bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang tự động ở 488 nm (laze màu xanh). Bằng cách sử dụng hệ thống LIMS nội bộ, đường cong đáp ứng liều ức chế cho mỗi hợp chất được tính và nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC₅₀) được xác định. Do đó, ức chế phần trăm (I) cho mọi nồng độ thử nghiệm được đo bằng cách sử dụng công thức sau: $I = 100 * (S_T - S_{CC}) / (S_{VC} - S_{CC})$; S_T, S_{CC} và S_{VC} là lượng tín hiệu eGFP trong các lỗ hợp chất thử nghiệm, đối chứng tế bào và đối chứng virus, tương ứng. EC₅₀ biểu diễn nồng độ của hợp chất mà tại đó việc sao chép virus được ức chế bằng 50%, như được đo bằng cách khử 50% cường độ huỳnh quang eGFP so với đối chứng virus. EC₅₀ được tính bằng cách sử dụng phép nội suy tuyến tính (bảng 1).

Song song, độc tính của hợp chất được đánh giá trên các đĩa tương tự. Khi việc đọc đối với tín hiệu eGFP hoàn thành, 40µL ATPlite, sự biến màu khả năng sống được của tế bào, được bổ sung vào toàn bộ lỗ của đĩa 384 lỗ. ATP có trong toàn bộ tế bào có hoạt tính trao đổi chất và sự sụt giảm nồng độ rất nhanh khi tế bào trải qua hoại tử hoặc sự tự chết theo chương trình của tế bào. Hệ thống thử nghiệm ATPlite được dựa trên việc sản xuất ánh sáng gây ra bởi phản ứng ATP với luciferaza và D-luxiferin được bổ sung. Các đĩa được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, các đĩa được đo trên ViewLux. Nồng độ gây độc tế bào tối đa một nửa (CC₅₀) cũng được xác định, được định nghĩa là nồng độ cần để làm giảm tín hiệu phát quang bằng 50% so với nồng độ của lỗ đối chứng tế bào. Cuối cùng, chỉ số chọn lọc (SI) được xác định cho các hợp chất, được tính như sau: $SI = CC_{50} / EC_{50}$.

Bảng 1: EC₅₀, CC₅₀, và SI cho các 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	0,00064	3	13	4	19800	3
1A	0,0013	3	12	3	9200	3
1B	0,00011	3	13	4	104092	3
2	0,00038	3	12	4	32100	3
2A	0,015	3	12	3	799	3
2B	0,000078	4	14	4	166670	4
3	0,00056	3	13	3	22700	3
3A	0,036	3	12	3	346	3
3B	0,00012	3	13	3	91000	3
4	0,00011	4	12	4	96000	4
4A	0,011	3	13	3	1180	3
4B	0,000057	4	13	4	186421	4
5	0,00011	3	10	3	90900	3
5A	0,0023	6	10	9	4440	6
5B	0,00012	4	12	4	>54214	4
6	0,00063	3	12	3	19500	3
6A	0,25	3	11	3	46	3
6B	0,00039	3	15	4	39700	3
7A-D	0,000100	3	12	3	118813	3
7B-D	0,016	3	9,6	3	584	3
8	0,00015	3	13	4	86800	3
9	0,00099	4	12	4	12600	4
10	0,00052	3	19	3	40900	3
10A	0,00030	3	14	3	58900	3
10B	0,037	3	12	3	330	3
11	0,00028	3	13	3	43300	3

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

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

Hoạt tính kháng virus của hợp chất theo sáng chế được thử nghiệm chống lại DENV-1 chủng TC974#666 (NCPV), DENV-2 chủng 16681, DENV-3 chủng H87 (NCPV) và DENV-4 chủng H241 (NCPV) trong thử nghiệm RT-qPCR. Do đó, tế bào Vero được lây nhiễm bằng DENV-1, hoặc -2, hoặc -3, hoặc -4 với sự có mặt hoặc vắng mặt của hợp chất thử nghiệm. Tại ngày thứ ba sau khi lây nhiễm, tế bào được phân giải và các sản phẩm phân giải 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 tạo ra tỷ lệ nghịch với lượng biểu hiện ARN của các đích này. Sự ức chế của sự sao chép DENV bằng hợp chất thử nghiệm dẫn đến sự thay đổi của Cp's đối với gen 3'UTR. Mặt khác, nếu hợp chất thử nghiệm gây độc cho tế bào, tác dụng tương tự trên sự biểu hiện β -actin

sẽ được quan sát. Phương pháp $\Delta\Delta C_p$ so sánh được sử dụng để tính EC_{50} , được dựa trên sự biểu hiện gen tương đối của gen đích (3'UTR) được chuẩn hóa bằng gen giữ nhà tế bào (β -actin). Ngoài ra, các giá trị CC_{50} được xác định dựa trên các giá trị C_p thu được đối với gen giữ nhà β -actin.

Bảng 2: Đoạn môi và đầu dò được sử dụng cho thời gian thực, RT-PCR định lượng

Đoạn môi/đầu 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</i> -5'-AAGGACTAG-ZEN-AGGTTAGAGGAGACCCCCC-3'- <i>IABkFQ</i>
Factin743	β -actin	5'-GGCCAGGTCATCACCATT-3'
Ractin876	β -actin	5'-ATGTCCACGTCACACTTCATG-3'
Pactin773	β -actin	<i>HEX</i> -5'-TTCCGCTGC-ZEN-CCTGAGGCTCTC-3'- <i>IABkFQ</i>

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

^b Trình tự nucleotit của các đoạn môi và đầu dò được chọn từ vùng bảo tồn trong vùng 3'UTR của hệ gen virus dengue, dựa trên sự sắp xếp của trình tự 300 nucleotit của 4 serotyp dengue đã lắng trong Genbank (Gong et al., 2013, Methods Mol Biol, Chapter 16).

Môi trường nuôi cấy gồm môi trường thiết yếu tối thiểu bổ sung với 2% huyết thanh thai bò bất hoạt nhiệt, 0,04% gentamycin (50mg/mL) và 2mM L-glutamin. 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 96 lỗ (10000 tế bào/lỗ), chứa hợp chất kháng virus. Thông thường, các đĩa này chứa pha loãng liên tiếp 5 lần của 9 bước pha loãng của hợp chất thử nghiệm với 200 lần nồng độ cuối cùng trong 100% DMSO (500nL phạm vi 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 nhất). Ngoài ra, mỗi đĩa chứa lỗ được chỉ định làm đối chứng virus (chứa tế bào và virus với sự vắng mặt của hợp chất) và đối chứng tế bào (chứa tế bào với sự vắng mặt của virus và hợp chất). Khi tế bào được bổ sung trong đĩa, các đĩa được ủ trong máy áp được làm ẩm hoàn toàn (37°C, 5% CO₂) cho tới ngày tiếp theo. Virus Dengue serotyp-1, 2, 3 và 4 được pha loãng để thu được C_p là khoảng 22-24 trong thử nghiệm. Do đó,

25 μ L hỗn dịch virus được bổ sung vào toàn bộ lỗ chứa hợp chất thử nghiệm và vào lỗ được chỉ định làm đối chứng virus. Song song, 25 μ L of môi trường nuôi cấy được bổ sung vào đối chứng tế bào. Tiếp theo, các đĩa được ủ trong 3 ngày trong máy áp được làm ẩm hoàn toàn (37°C, 5% CO₂). Sau 3 ngày, chất nổi bề mặt được lấy ra khỏi các lỗ và các tế bào được rửa hai lần bằng PBS đá lạnh (~100 μ L). Các hạt tế bào trong đĩa 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 phân giải Cells-to-CT™, theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Life Technologies). Các sản phẩm phân giải tế bào có thể được bảo quản ở nhiệt độ -80°C hoặc được sử dụng ngay lập tức trong bước phiên mã ngược.

Trong bước điều chế của bước phiên mã ngược, hỗn hợp A (bảng 3A) được điều chế và 7,57 μ L/lỗ được phân tán trong đĩa 96 lỗ. Sau khi bổ sung 5 μ L các sản phẩm phân giải tế bào, bước biến chất 5 phút ở nhiệt độ 75°C được thực hiện (bảng 3B). Sau đó, 7,43 μ 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 μ L/lỗ được phân tán trong đĩa qPCR LightCycler 96 lỗ mà bổ sung 3 μ L cADN và qPCR được thực hiện theo các điều kiện trong bảng 4B trên LightCycler 480.

Sử dụng phần mềm LightCycler và hệ thống LIMS nội bộ, đường cong đáp ứng liều đối với mỗi hợp chất được tính và nồng độ hiệu quả tối thiểu một nửa (EC₅₀) và nồng độ gây độc tế bào tối thiểu một nửa (CC₅₀) được xác định (bảng 5-8).

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

Hỗn hợp A					
A	Đĩa	8			
	Mẫu	828			
	Mục hỗn hợp	Nồng độ			Thể tích phản ứng (μ L)
		Đơn vị	Lượng tồn	Cuối cùng	20
	Thể tích (μ L)				
	Milli-Q H ₂ O				7,27
	R3utr425	μ M	20	0,27	0,15
	Ractin876	μ M	20	0,27	0,15
	Hỗn hợp thể tích/lỗ (μ L)				7,57

Các sản phẩm phân giải tế bào	5,00
-------------------------------------	------

B Bước biến chất:

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

C Mix B

Mẫu	864				
Mục hỗn hợp	Nồng độ			Thể tích (μl)	
	Đơn vị	Lượng tồn	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
dNTPs	mM	10,00	1,00	2,00	1728,0
Chất ức chế Rnaza	U/μl	40,00	1,00	0,50	432,0
Nhiệt độ phòng mở rộng	U/μl	50,00	0,33	0,13	112,3
Hỗn hợp thể tích tổng (μl)				7,43	

D Quy trình tổng hợp
cADN

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

Bảng 4: Hỗn hợp qPCR và quy trình

A Hỗn hợp C

Hỗn hợp C

Mẫu	833			Thể tích phản ứng (μl)	25
Mục hỗn hợp	Nồng độ			Thể tích (μl)	
	Đơn vị	Lượng tồn	Cuối cùng	1 mẫu	x mẫu
Mức PCR H ₂ O 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
Hỗn hợp thể tích / ống (μl)				22,02	
cADN				3,00	

B Quy trình qPCR3

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	Tỷ lệ	40 vòng
preincub/denat	95°C	10 min	4,4	
Biến chất	95°C	10 sec	4,4	
Ủ	58°C	1 min	2,2	
Độ giãn dài	72°C	1 sec	4,4	
Làm lạnh	40°C	10 sec	1,5	

Bảng 5: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất chống lại serotyp 1 trong thử nghiệm RT-qPCR

RT-qPCR serotyp 1 TC974#666						
hợp chất#	EC ₅₀ (μM)	N	CC ₅₀ (μM)	N	SI	N
1B	0,000096	4	>2,5	4	>79500	4
2B	0,000091	5	>1,0	5	>33100	5
3B	0,00010	3	>2,5	3	>54200	3
4B	0,00011	4	>1,0	4	>45200	4
5B	0,00033	3	>1,0	3	>5910	3
6B	0,00064	4	13	4	20500	4
7A-D	0,00024	3	>1,0	3	>6180	3
10A	0,00022	5	13	5	56000	5

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

Bảng 6: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất chống lại serotyp 2 trong thử nghiệm RT-qPCR

RT-qPCR serotyp 2 16681						
hợp chất#	EC ₅₀ (μM)	N	CC ₅₀ (μM)	N	SI	N
1B	0,00018	4	>2,5	4	>11700	4
2B	0,000061	4	>1,0	4	>36300	4
3B	0,000096	3	>2,5	3	>46900	3

4B	0,000067	4	>1,0	4	>39400	4
5B	0,00029	3	>1,0	3	>5770	3
6B	0,00041	3	15	4	28100	3
7A-D	0,00016	3	>1,0	3	>9330	3
10A	0,00011	6	15	5	131977	5

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

Bảng 7: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất chống lại serotyp 3 trong thử nghiệm RT-qPCR

hợp chất#	RT-qPCR serotyp 3 H87					
	EC ₅₀ (μ M)	N	CC ₅₀ (μ M)	N	SI	N
1B	0,0019	4	>2,5	4	>1590	4
2B	0,00085	4	>1,0	4	>2050	4
3B	0,0015	3	>2,5	3	>3870	3
4B	0,00092	4	>1,0	4	>2360	4
5B	0,0026	3	>1,0	3	>719	3
6B	0,0056	4	13	4	2520	4
7A-D	0,0024	3	>1,0	3	>574	3
10A	0,0042	5	15	5	6210	5

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

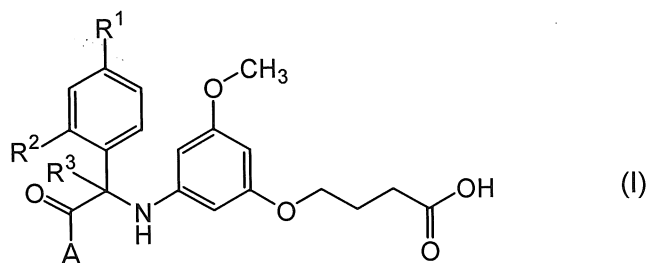
Bảng 8: EC₅₀, CC₅₀, và SI đối với hợp chất chống lại serotyp 4 trong thử nghiệm RT-qPCR

hợp chất#	RT-qPCR serotyp 4 H241					
	EC ₅₀ (μ M)	N	CC ₅₀ (μ M)	N	SI	N
1B	0,0096	4	8,8	4	2980	4
2B	0,010	4	4,1	4	1020	4
3B	0,014	3	3,6	1	333	1
4B	0,012	3	6,8	2	563	2
5B	0,020	3	8,4	3	618	3
6B	0,029	4	9,7	3	317	3
7A-D	0,013	3	8,2	3	1000	3
10A	0,030	5	3,2	5	105	5

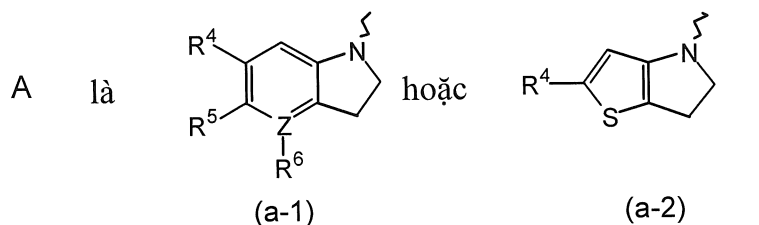
N= số lượng thử nghiệm độc lập trong đó các hợp chất được thử nghiệm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I), bao gồm bất kỳ dạng đồng phân hóa học lập thể nào của nó,



trong đó



trong đó

R^1 là clo, R^2 là hydro, R^3 là hydro, A là (a-1), R^4 là pentaflorosulfanyl, R^5 là hydro, Z là cacbon, và R^6 là hydro; hoặc

R^1 là clo, R^2 là hydro, R^3 là hydro, A là (a-1), R^4 là triflometyl, R^5 là hydro, Z là cacbon, và R^6 là metyl; hoặc

R^1 là clo, R^2 là hydro, R^3 là hydro, A là (a-1), R^4 là triflometoxy, R^5 là flo, Z là cacbon, và R^6 là hydro; hoặc

R^1 là clo, R^2 là hydro, R^3 là hydro, A là (a-1), R^4 là triflometoxy, R^5 là hydro, Z là cacbon, và R^6 là metyl; hoặc

R^1 là clo, R^2 là hydro, R^3 là hydro, A là (a-1), R^4 là triflometoxy, R^5 là flo, Z là cacbon, và R^6 là hydro; hoặc

R^1 là flo, R^2 là metoxy, R^3 là hydro, A là (a-1), R^4 là triflometoxy, R^5 là hydro, Z là cacbon, và R^6 là hydro; hoặc

R^1 là clo, R^2 là hydro, R^3 là đoteri, A là (a-1), R^4 là triflometoxy, R^5 là hydro, Z là cacbon, và R^6 là hydro; hoặc

R^1 là clo, R^2 là $-OCH_2CH_2OH$, R^3 là hydro, A là (a-1), R^4 là triflometoxy, R^5 là hydro, Z là cacbon, và R^6 là hydro; hoặc

R^1 là clo, R^2 là hydro, R^3 là hydro, A là (a-1), R^4 là triflometyl, R^5 là metoxy, Z là nitơ, và R^6 vắng mặt; hoặc

R^1 là clo, R^2 là hydro, R^3 là hydro, A là (a-2), và R^4 là triflometyl; hoặc

R^1 là clo, R^2 là hydro, R^3 là hydro, A là (a-1), R^4 là triflometylthio, R^5 là hydro, Z là cacbon, và R^6 là hydro;

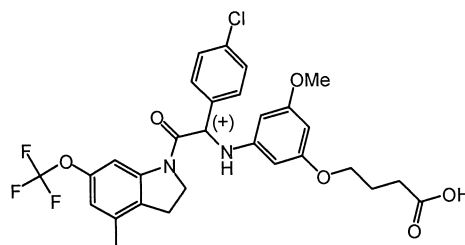
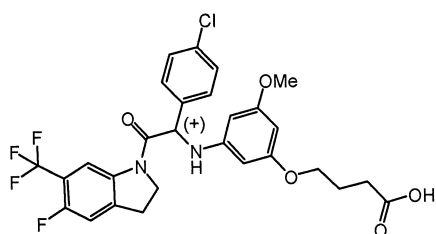
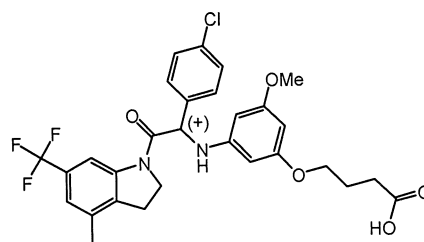
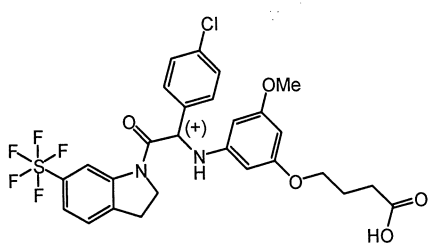
hoặc muối, solvat hoặc chất đa hình được dụng của nó.

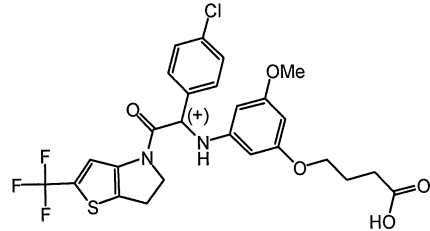
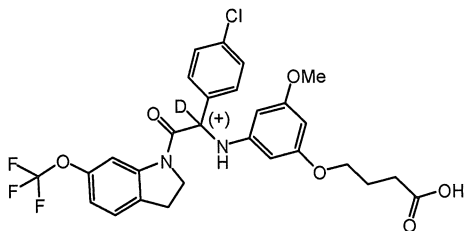
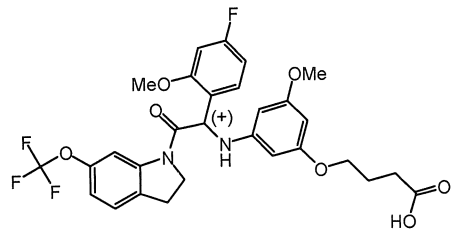
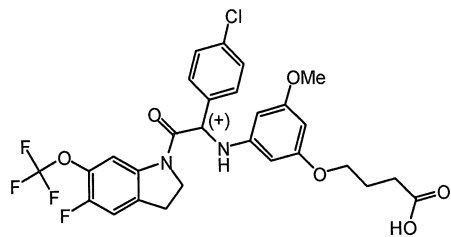
2. Hợp chất theo điểm 1 trong đó A là (a-1).

3. Hợp chất theo điểm 1 trong đó A là (a-2).

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 trong đó hợp chất này có góc quay cụ thể (+).

5. Hợp chất theo điểm 1 trong đó hợp chất này được chọn từ:





6. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.
7. Dược phẩm theo điểm 6 chứa thành phần có hoạt tính thứ hai hoặc thành phần có hoạt tính khác nữa.
8. Dược phẩm theo điểm 7 trong đó thành phần có hoạt tính thứ hai hoặc thành phần có hoạt tính khác này là chất chống virus.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Janssen Pharmaceuticals, Inc.
Katholieke Universiteit Leuven

<120> Hợp chất indolin được thể làm chất ức chế sự sao chép của virus dengue và được phẩm chứa hợp chất này

<130> TIP 374

<150> EP17172247.3

<151> 2017-05-22

<160> 14

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Virus dengue

<400> 1

cggttagagg agacccctc

19

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Virus dengue

<400> 2

gagacagcag gatctctggt c

21

<210> 3

<211> 28

<212> ADN

<213> Virus dengue

<400> 3

aaggactaga ggtagagga gaccccc

28

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> Virus dengue

<400> 4

ggccaggtca tcaccatt

18

<210> 5

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Virut dengue

<400> 5
 atgtccacgt cacacttcat g 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virut dengue

<400> 6
 ttccgctgcc ctgaggctct c 21

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virut dengue

<400> 7
 tcggagccgg agtttacaaa 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virut dengue

<400> 8
 tcttaacgtc cgcccatgat 20

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

<400> 9
 attccacaca atgtggcat 19

<210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Virut dengue

<400> 10
 ggatagacca gagatcctgc tgt 23

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Virut dengue

<400> 11
cattccattt tctggcggttc 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Virut dengue

<400> 12
caatccatct tgcggcgctc 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Virut dengue

<400> 13
cagcatcatt ccaggcacag 20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Virut dengue

<400> 14
caacatcaat ccaggcacag 20