

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **033845**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2019.12.02**

(51) Int. Cl. **C07D 209/42** (2006.01)  
**A61K 31/404** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201790700**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.09.30**

---

(54) **МОНО- ИЛИ ДИЗАМЕЩЕННЫЕ ИНДОЛЫ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСОВ ДЕНГЕ**

---

(31) **14187373.7; 15156073.7**

(56) **WO-A1-2013045516**

(32) **2014.10.01; 2015.02.23**

(33) **EP**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/EP2015/072534**

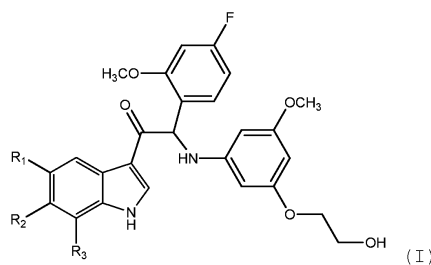
(87) **WO 2016/050831 2016.04.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US); КАТОЛИКЕ  
УНИВЕРСИТЕЙТ ЛЕВЕН (BE)**

(72) Изобретатель:  
**Кестелейн Барт Рудольф Романи  
(BE), Бонфанти Жан-Франсуа  
(FR), Йонкерс Тим Хьюго Мария,  
Рабуассон Пьер Жан-Мари Бернар,  
Бардьо Дороте Алис Мари-Эв,  
Маршан Арно Дидье М (BE)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Изобретение относится к соединениям моно- или дизамещенных индолов общей формулы (I), к фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения, и к применению указанных соединений для ингибирования репликации вируса денге и в качестве лекарственного средства для предупреждения или лечения вирусных инфекций, вызывающих денге.



**033845**  
**B1**

**033845**  
**B1**

Настоящее изобретение относится к соединениям моно- или дизамещенных индолов, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения, и к применению указанных соединений для ингибирования репликации вируса денге и в качестве лекарственного средства для предупреждения или лечения вирусных инфекций, вызывающих денге.

#### **Предпосылки к созданию изобретения**

Флавивirusы, которые переносятся комарами или клещами, являются причиной угрожающих жизни инфекций у человека, таких как энцефалит и геморрагическая лихорадка. Известно четыре различных, но тесно связанных серотипа флавивirusа, вызывающего денге, называемых DENV1, -2, -3 и -4. Денге характерна для большинства тропических и субтропических регионов всего мира, преимущественно в городских и полугородских областях. Согласно Всемирной организации здравоохранения (WHO) 2,5 млрд людей, из которых 1 млрд детей, подвержены риску инфицирования DENV (WHO, 2002). По оценкам, ежегодно во всем мире происходит от 50 до 100 млн случаев лихорадки денге [DF], 0,5 млн случаев заболевания денге в тяжелой форме (т.е. геморрагической лихорадкой денге [DHF] и шока при геморрагической лихорадке денге [DSS]) и более чем 20000 смертей. DHF является основной причиной госпитализации и смерти среди детей в эндемических регионах. В целом денге является наиболее распространенным следствием арбовирусного заболевания. Благодаря недавним крупным вспышкам в странах, расположенных в Латинской Америке, Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого Океана (в том числе в Бразилии, Пуэрто-Рико, Венесуэле, Камбодже, Индонезии, Вьетнаме, Таиланде), количество случаев денге сильно возросло за последние годы. Кроме того, что число случаев денге увеличивается по мере распространения заболевания в новых областях, но и вспышки имеют склонность становиться более тяжелыми.

Для предупреждения и/или контроля заболевания, ассоциированного с вирусной инфекцией, вызывающей денге, в настоящее время единственными доступными способами являются стратегии, направленные на уничтожение комаров, для контроля переносчика инфекции. Хотя и имеет место прогресс в развитии вакцин против денге, существует много трудностей. Они включают существование явления, называемого зависимое от антитела усиление (ADE).

Выздоровление от инфекции, вызванной одним серотипом, обеспечивает пожизненный иммунитет против данного серотипа, однако придает только частичную и временную защиту против последующей инфекции, вызванной одним из трех остальных серотипов. При следующем инфицировании другим серотипом уже существующие гетерологичные антитела формируют комплексы с вновь инфицирующим серотипом вируса денге, но не нейтрализуют патоген. Вместе с тем предполагают, что облегчается входение вируса в клетки, что приводит к неконтролируемой репликации вируса и повышению пика концентрации вирусов. Как при первичной, так и при вторичной инфекциях повышение титров вируса ассоциировано с заболеванием денге в более тяжелой форме. Одной из причин того, что дети более подвержены заболеванию денге в тяжелой форме, чем взрослые, может быть факт того, что материнские антитела могут легко передаваться младенцам при грудном вскармливании.

В местах с двумя или несколькими серотипами, которые циркулируют одновременно, также называемыми регионами с повышенной эндемичностью, риск заболевания денге в опасной форме значительно выше из-за повышенного риска перенести вторичную, более тяжелую инфекцию. Более того, в условиях повышенной эндемичности вероятность появления более вирулентных штаммов является повышенной, что, в свою очередь, повышает вероятность геморрагической лихорадки денге (DHF) или шока при геморрагической лихорадке денге.

Комары, которые переносят возбудителей денге, в том числе *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* (желтолихорадочный комар), движутся на север земного шара. Согласно Центрам по контролю и профилактике заболеваний (CDC) Соединенных Штатов (США) оба вида комаров в настоящее время являются повсеместными в южном Техасе. Распространение на север комаров, переносящих возбудителей денге, не ограничено распространением в США, а наблюдается также и в Европе.

Несмотря на большие усилия в течение последних 3 десятилетий, в настоящее время не существует вакцины, способной защитить людей от вирусного заболевания денге. Основной проблемой является создание вакцины, которая предоставляла бы защиту от всех четырех серотипов (квадривалентной вакцины) в одинаковой степени. Более того, в настоящее время отсутствуют конкретные противовирусные лекарственные средства для лечения или предупреждения лихорадки денге, вызванной вирусной инфекцией. Очевидно, что все еще существует большая нереализованная потребность медицины в терапевтических средствах для предупреждения или лечения вирусных инфекций у животных, более конкретно у людей, а особенно для вирусных инфекций, вызванных флавивirusами, более конкретно вирусом денге. Чрезвычайно необходимыми являются соединения с хорошей противовирусной активностью, которые не имеют побочных эффектов или имеют низкие уровни побочных эффектов, характеризуются широким спектром активности против множества серотипов вируса денге, низкой токсичностью и/или подходящими фармакокинетическими или динамическими свойствами.

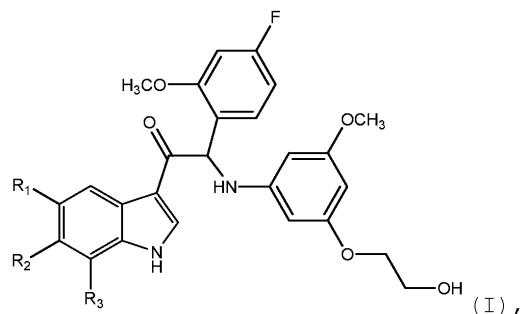
В настоящем изобретении предусматривают соединения, являющиеся производными моно- или дизамещенных индолов, которые проявляют сильную активность против всех четырех серотипов вируса денге. Также соединения согласно настоящему изобретению обладают хорошим фармакокинетическим

профилем, и, неожиданно, данные конкретные соединения проявляют улучшенную хиральную устойчивость.

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии того, что по меньшей мере одна из вышеупомянутых проблем может быть решена с помощью предложенных соединений по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение относится к соединению формулы (I),



или его фармацевтически приемлемой соли, где указанное соединение выбрано из группы, где

$R_1$  представляет собой H,  $R_2$  представляет собой F и  $R_3$  представляет собой H, F или  $CH_3$ ;

$R_1$  представляет собой F или  $CH_3$ ,  $R_2$  представляет собой  $OCH_3$  и  $R_3$  представляет собой H;

$R_1$  представляет собой H,  $R_2$  представляет собой Cl, и  $R_3$  представляет собой H или  $CH_3$ ;

$R_1$  представляет собой F,  $R_2$  представляет собой H и  $R_3$  представляет собой  $CH_3$ ;

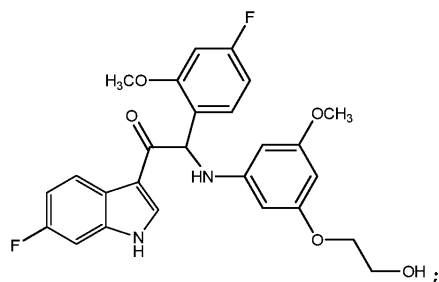
$R_1$  представляет собой H,  $R_2$  представляет собой  $OCH_3$  и  $R_3$  представляет собой Cl;

$R_1$  представляет собой F,  $R_2$  представляет собой F и  $R_3$  представляет собой H;

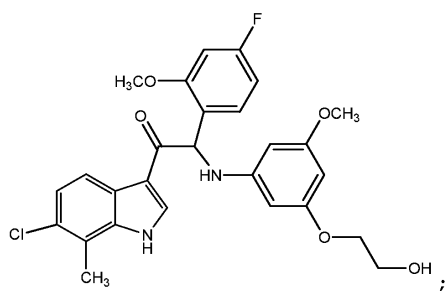
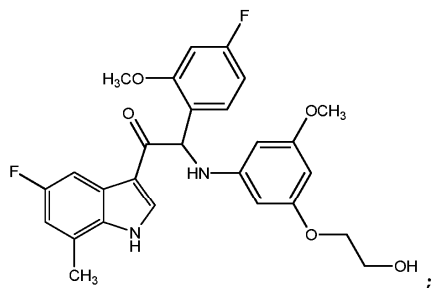
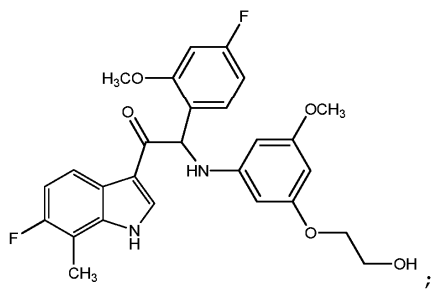
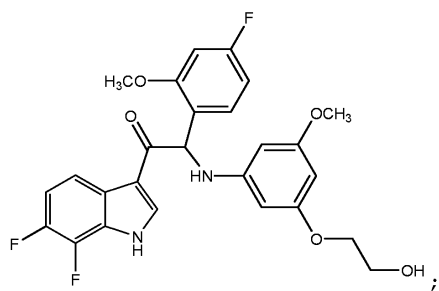
$R_1$  представляет собой H,  $R_2$  представляет собой  $OCH_3$  и  $R_3$  представляет собой  $CH_3$  или

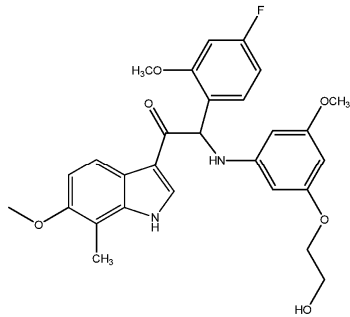
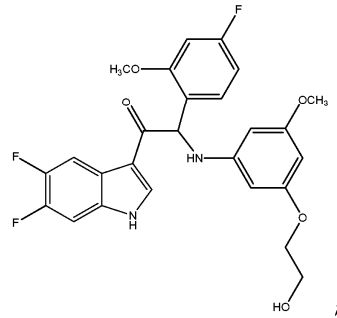
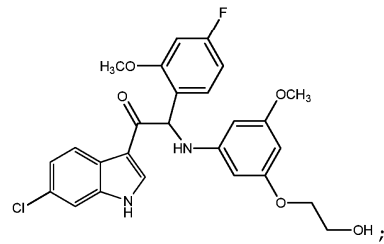
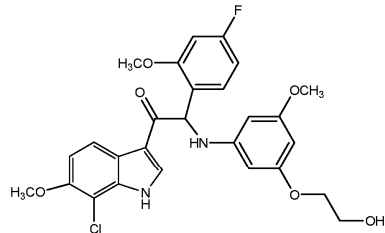
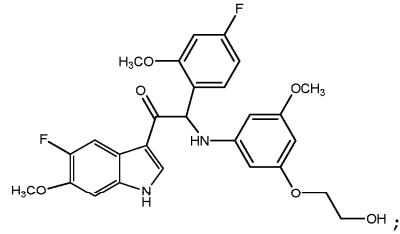
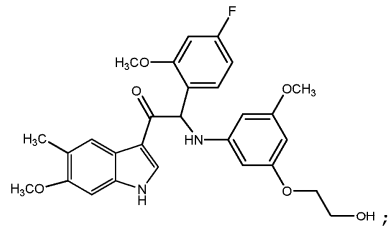
$R_1$  представляет собой  $CH_3$ ,  $R_2$  представляет собой H и  $R_3$  представляет собой F.

В предпочтительном варианте осуществления предложенного изобретения указанное соединение выбрано из группы:

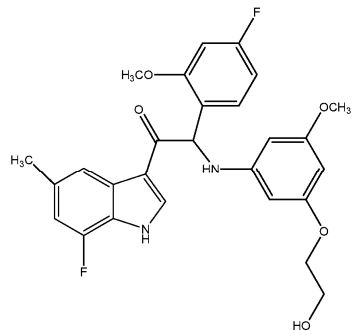


033845





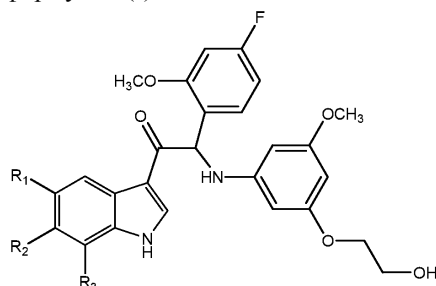
ИЛИ



Ещё одним объектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция для лечения денге, содержащая указанное выше соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

Ещё одним другим объектом настоящего изобретения является применение указанного выше соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли в качестве лекарственного препарата для лечения денге.

Ещё одним другим объектом настоящего изобретения является применение соединения, представленного следующей структурной формулой (I)



или его фармацевтически приемлемой соли, где указанное соединение выбрано из группы, где R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой F и R<sub>3</sub> представляет собой H, F или CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой F или CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> представляет собой OCH<sub>3</sub> и R<sub>3</sub> представляет собой H; R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой Cl и R<sub>3</sub> представляет собой H или CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой F, R<sub>2</sub> представляет собой H и R<sub>3</sub> представляет собой CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой OCH<sub>3</sub> и R<sub>3</sub> представляет собой Cl; R<sub>1</sub> представляет собой F, R<sub>2</sub> представляет собой F и R<sub>3</sub> представляет собой H; R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой OCH<sub>3</sub> и R<sub>3</sub> представляет собой CH<sub>3</sub> или R<sub>1</sub> представляет собой CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> представляет собой H, и R<sub>3</sub> представляет собой F, для ингибирования репликации вируса(вирусов) денге в биологическом образце или у пациента.

Фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I) включают их соли присоединения кислоты и основные соли. Подходящие соли присоединения кислоты образуются из кислот, которые образуют нетоксичные соли. Подходящие основные соли образуются из оснований, которые образуют нетоксичные соли.

Соединения по настоящему изобретению можно вводить в виде кристаллических или аморфных продуктов. Они могут быть получены, например, в виде твердой прессованной массы, порошков или пленок посредством таких способов, как осаждение, кристаллизация, лиофильная сушка, сушка распылением или сушка выпариванием. Как правило, их следует вводить в виде состава в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями. Выражение "наполнитель" используется в данном документе для описания любого ингредиента, отличного от соединения(соединений) по настоящему изобретению. Выбор наполнителя в большой степени зависит от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние наполнителя на растворимость и стабильность и природа лекарственной формы.

Соединения по настоящему изобретению или любая их подгруппа могут быть составлены в различные фармацевтические формы для целей введения. В качестве подходящих композиций могут быть упомянуты все композиции, обычно применяемые для системно вводимых лекарственных средств. Для получения фармацевтических композиций по настоящему изобретению эффективное количество конкретного соединения, необязательно в форме соли присоединения, в качестве активного ингредиента объединяют в однородную смесь с фармацевтически приемлемым носителем, при этом носитель может принимать широкое разнообразие форм в зависимости от формы препарата, требуемого для введения. Данные фармацевтические композиции предпочтительно представлены в виде единичной лекарственной формы, подходящей, например, для перорального или ректального введения. Например, при получении композиций в пероральной лекарственной форме может использоваться любая из общепринятых фармацевтических сред, такая как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п. в случае пероральных жидких препаратов, таких как суспензии, сиропы, настойки, эмульсии и растворы; или твердых носителей, таких как крахмалы, сахара, каолин, разбавители, смазывающие средства, связующие, средства для улучшения распадаемости таблеток и т.п. в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Благодаря своей простоте введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные пероральные единичные лекарственные формы, в случае которых очевидно используются твердые фармацевтические носители. Также включены препараты в твердой форме, которые могут быть преобразованы непосредственно перед применением в жидкие формы.

Особенно предпочтительным является составление вышеупомянутых фармацевтических композиций в виде единичной лекарственной формы для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, применяемая в данном документе, относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве единичных доз, при этом каждая единица содержит предварительно установленное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения необходимого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Примерами таких единичных

лекарственных форм являются таблетки (в том числе делимые или покрытые оболочкой таблетки), капсулы, пилюли, пакетики с порошком, пластинки, суппозитории, растворы или суспензии для инъекций и т.п., а также их отдельные множества.

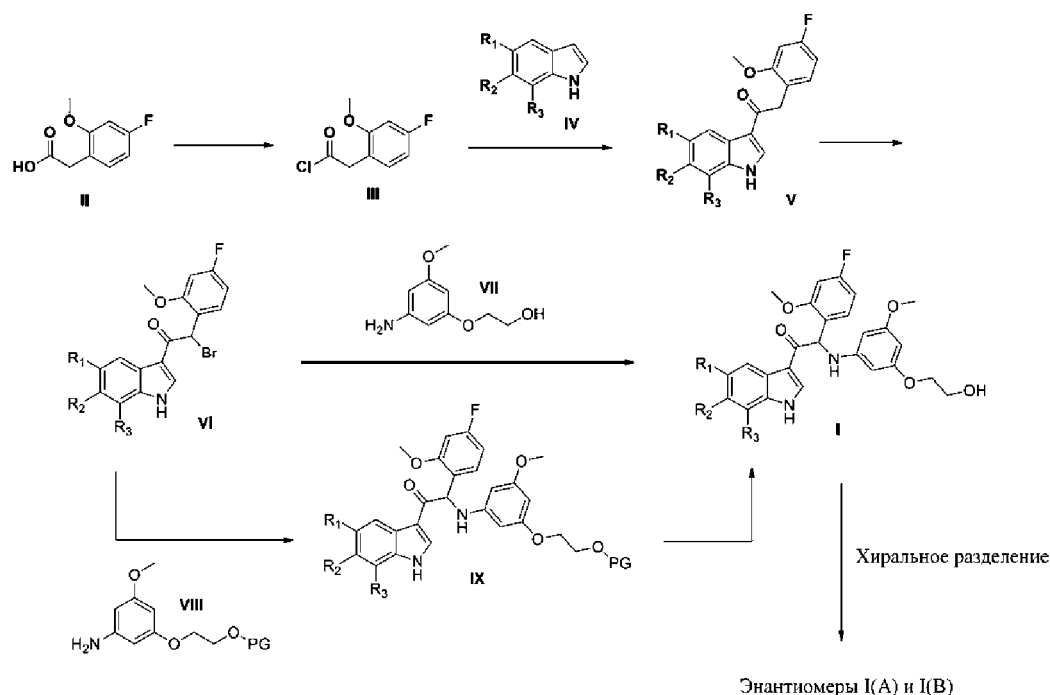
Специалисты в области лечения инфекционных заболеваний смогут определить эффективное количество, исходя из результатов тестов, представленных далее в данном документе. В целом, предполагается, что эффективное суточное количество будет составлять от 0,01 до 50 мг/кг массы тела, более предпочтительно от 0,1 до 10 мг/кг массы тела. Может быть целесообразным введение требуемой дозы в виде двух, трех, четырех или более частей дозы через соответствующие интервалы на протяжении дня. Указанные части дозы могут состояться в виде единичных лекарственных форм, например, содержащих от 1 до 1000 мг и, в частности, от 5 до 200 мг активного ингредиента на единичную лекарственную форму.

Точная дозировка и частота введения зависят от конкретного используемого соединения формулы (I), конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, подлежащего лечению, возраста, массы и общего физического состояния конкретного пациента, а также другого медикаментозного лечения, которое может получать индивидуум, что хорошо известно специалистам в данной области. Более того, очевидно, что эффективное количество может быть снижено или увеличено в зависимости от реакции подвергаемого лечению субъекта и/или в зависимости от оценки врача, назначающего соединения по настоящему изобретению. Таким образом, вышеупомянутые диапазоны эффективного количества являются только рекомендациями и не предназначены для ограничения в той или иной мере объема или применения настоящего изобретения.

Общие подходы синтеза.

Синтез соединений общей формулы (I) можно осуществлять, как изложено на схеме 1. 2-(4-Фтор-2-метоксифенил)уксусная кислота (II) может быть преобразована в соответствующий 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорид (III) с использованием реактива для хлорирования, такого как, например, тионилхлорид. Реакцию Фриделя-Крафтса с участием ацетилхлорида III с замещенным индолом общей формулы IV можно осуществлять с применением реактива кислоты Льюиса, такого как, например,  $AlCl_3$  или  $Et_2AlCl$  в присутствии подходящего основания, такого как, например,  $CH_2Cl_2$  и при подходящих условиях реакции, которая, как правило, включает охлаждение, для получения 3-ацилированного индола общей формулы V. Введение фрагмента анилина в альфа положение по отношению к карбонильному фрагменту соединения общей формулы V может осуществляться в последовательности реакций, которые включает, например, бромирование V реактивом, таким как, например, трибромид фенилтриметиламмония в подходящем растворителе, таком как, например, THF, для получения соединения общей формулы VI, и последующую реакцию соединений общей формулы VI с 2-(3-амино-5-метоксифеноксид)этанолом (VII) в подходящем растворителе, таком как, например,  $CH_3CN$ , и, как правило, с применением основания, такого как, например, TEA или DIPEA, для получения соединений общей формулы (I) в виде рацемических смесей. Альтернативно, соединения общей формулы VI могут вступать в реакцию с O-защищенным анилином общей формулы VIII (PG=защитная группа) в присутствии подходящего основания, такого как, например,  $CH_3CN$  и, как правило, с применением основания, такого как, например, TEA или DIPEA для получения соединения общей формулы IX. Пригодными защитными группами являются, например, (без ограничения) трет-бутил (PG=tBu). Удаление защитной группы соединений общей формулы IX может осуществляться с помощью способов, которые знакомы специалистам в данной области и включают, например, (без ограничения) реактив, такой как, например, концентрированную хлористоводородную кислоту (для PG=tBu) для получения соединения общей формулы (I) в виде рацемических смесей. Хиральное разделение соединений общей формулы (I) можно осуществлять с помощью, например, хиральной хроматографии для получения энантиомеров A и B общей формулы (I).

## Схема 1



## Примеры

## Способы LC/MS.

Измерения в ходе высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) проводили с помощью насоса для LC, детектора на диодной матрице (DAD) или УФ-детектора и колонки, как описано в соответствующих способах. При необходимости включали дополнительные детекторы (см. приведенную ниже таблицу способов).

Поток из колонки направляли в масс-спектрометр (MS), который был оснащен источником ионизации при атмосферном давлении. В компетенции специалиста в данной области техники находится установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, минимального времени измерения и т.п.) с целью получения ионов, обеспечивающих определение номинального мономерного молекулярного веса (MW) соединения. Сбор данных проводили с помощью соответствующего программного обеспечения.

Соединения описаны по их экспериментальному времени удерживания ( $R_t$ ) и ионам. Если в таблице данных не указано иное, то указанный молекулярный ион соответствует  $[M+H]^+$  (протонированной молекуле) и/или  $[M-H]^-$  (депротонированной молекуле). В случае, если соединение не было непосредственно способно к ионизации, указывают тип аддукта (т.е.  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+HCOO]^-$  и т.д.). Для молекул со сложными изотопными распределениями (Br, Cl) описанное значение является таким значением, которое получено для наименьшей массы изотопа. Все результаты получали с экспериментальными погрешностями, которые обычно связаны с применяемым способом.

Далее в данном документе "SQD" означает одиночный квадрупольный детектор, "MSD" означает масс-селективный детектор, "RT" означает комнатную температуру, "BEH" означает мостиковый гибрид этилсилиоксан/диоксид кремния, "DAD" означает детектор на диодной матрице, "HSS" означает диоксид кремния повышенной прочности.

Коды способов LCMS (поток выражен в мл/мин; температура колонки (T) в °C; время анализа в минутах).



Код способа	Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток ----- Т колонки	Время анализа (мин.)
LC-A	Waters: Acquity® UPLC® - DAD/SQD	Waters: BEH C18 (1,7 мкм, 2,1*50 мм)	А: 10 мм CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> в 95% H <sub>2</sub> O+5% CH <sub>3</sub> CN В: CH <sub>3</sub> CN	От 95% А до 5% А за 1,3 мин., удерживание в течение 0,7 мин.	0,8 мл/мин ----- 55°C	2
LC-B	Waters: Acquity® UPLC® - DAD/SQD	Waters: HSS T3 (1,8 мкм, 2,1*100 мм)	А: 10 мм CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> в 95% H <sub>2</sub> O+5% CH <sub>3</sub> CN В: CH <sub>3</sub> CN	От 100% А до 5% А за 2,10 мин., до 0% А за 0,90 мин., до 5% А за 0,5 мин.	0,7 мл/мин ----- 55°C	3,5
LC-C	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Quattro Micro™	Waters: BEH C18 (1,7 мкм, 2,1*100 мм)	А: 95% 7 мм CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> / 5% CH <sub>3</sub> CN, В: CH <sub>3</sub> CN	От 84,2% А в течение 0,49 мин. до 10,5% А за 2,18 мин., удерживание в течение 1,94 мин., обратно до 84,2% А за 0,73 мин., удерживание в течение 0,73 мин.	0,343 мл/мин ----- 40°C	6,2
LC-D	Dionex®: Ultima® 3000® - DAD- Brucker® Esquire 6000	Sunfire® C18 (3,5 мкм, 3,0*100 мм) с защитной колонкой (3,5 мкм, 3,0*20 мм)	А: 0,1% муравьиная кислота в H <sub>2</sub> O В: CH <sub>3</sub> CN	От 50% А в течение 0,20 мин. до 10% А за 5,8 мин., удерживание в течение 4,8 мин., обратно до 50% А за 0,20 мин., удерживание в течение 3,00 мин.	1,0 мл/мин ----- 30°C	14

LC-E	Dionex®: Ultima® 3000® - DAD- Brucker® Esquire 6000	X-Bridge® C18 (3,5 мкм, 3,0*100 мм) с защитной колонкой (3,5 мкм, 3,0*20 мм)	A: 10 мМ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> в H <sub>2</sub> O с регулируе- нием pH 10 с помощью раствора аммиака B: CH <sub>3</sub> CN	От 80% А в течение 0,20 мин. до 40% А за 6,8 мин., до 10% А за 1 мин., удерживание в течение 2,8 мин., обратно до 80% А за 0,20 мин., удерживание в течение 3,00 мин.	1,0 мл/мин ----- 30°C	14
------	---	--	---	--	--------------------------------	----

#### Способы SFC-MS.

Измерения в ходе SFC проводили с применением аналитической системы хроматографии со сверхкритической подвижной фазой, укомплектованной насосом для двухкомпонентных смесей для доставки диоксида углерода (CO<sub>2</sub>) и модификатором, автоматическим дозатором, термостатом для колонок, детектором на диодной матрице, оснащенный проточной кюветой для работы под высоким давлением, удерживающим значения до 400 бар. При оснащении масс-спектрометром (MS) поток из колонки направляли в (MS). В компетенции специалиста в данной области техники находится установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, минимального времени измерения и т.п.) с целью получения ионов, обеспечивающих определение номинального молекулярного веса (MW) соединения. Сбор данных проводили с помощью соответствующего программного обеспечения.

Аналитические способы SFC-MS (скорость потока выражена в мл/мин.; температура колонки (Т) в °С; противодавление (BPR) в барах).

Код способа	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток ----- Т колонки	Время анализа ----- ВРР
SFC-A	Колонка Daicel Chiralpak® AD-H (5 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	30% В с удержанием 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-B	Колонка Daicel Chiralpak® AD-H (5 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	40% В с удержанием 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-C	Колонка Daicel Chiralpak® OJ-H (5 мкм, 250×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	40% В с удержанием 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-D	Колонка Daicel Chiralpak® OD-H (5 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	40% В с удержанием 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-E	Колонка Daicel Chiralpak® OD-H (5 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	30% В с удержанием 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-F	Колонка Daicel Chiralpak® AS3 (3,0 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: EtOH +0,2% iPrNH <sub>2</sub> +3% H <sub>2</sub> O	25% В с удержанием 6 мин., до 50% за 1 мин. с удержанием 2,5 мин.	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-G	Колонка Daicel Chiralpak® OD-H (5,0 мкм, 250×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: EtOH +0,2% iPrNH <sub>2</sub>	35% В с удержанием 4 мин., до 50% за 1 мин. с удержанием 2 мин.	5 ----- 40	7 ----- 110
SFC-H	Колонка Daicel Chiralpak® OD3 (3,0 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: EtOH +0,2% iPrNH <sub>2</sub> +3% H <sub>2</sub> O	40% В с удержанием 6 мин., до 50% за 1 мин. с удержанием 2,5 мин.	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-I	Колонка Daicel Chiralpak® AS3 (3,0 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: EtOH +0,2% iPrNH <sub>2</sub> +3% H <sub>2</sub> O	30% В с удержанием 6 мин., до 50% за 1 мин. с удержанием 2,5 мин.	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-J	Колонка Daicel Chiralpak® OD-H (5,0 мкм, 250×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: EtOH +0,2% iPrNH <sub>2</sub>	30% В с удержанием 4 мин., до 50% за 1 мин. с удержанием 2 мин.	5 ----- 40	7 ----- 110
SFC-K	Колонка Daicel Chiralpak® OD3 (3,0 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH +0,2% iPrNH <sub>2</sub> +3% H <sub>2</sub> O	35% В с удержанием 6 мин., до 50% за 1 мин. с удержанием 2,5 мин.	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110

Точки плавления

Значения представляют собой либо максимальные значения, либо диапазоны температур плавления, и их получают с экспериментальными погрешностями, которые обычно связаны с данным аналитическим способом.

DSC823e (обозначен как DSC).

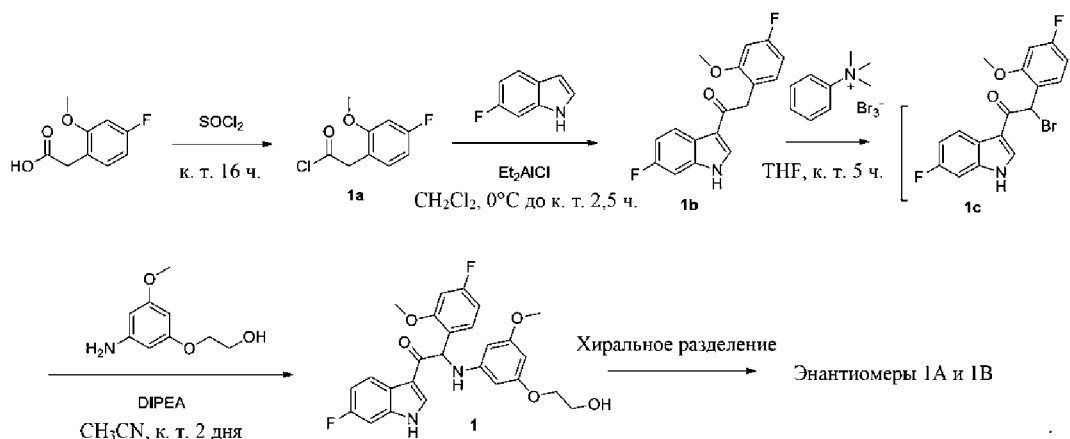
Для ряда соединений точки плавления определяли с помощью DSC823e (Mettler-Toledo). Точки плавления измеряли при градиенте температуры 10°C/мин. Максимальная температура составляла 300°C.

Углы оптического вращения.

Углы оптического вращения измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 341 с натриевой лампой и обозначали следующим образом:  $[\alpha]^T$  ( $\lambda$ , с г/100 мл, растворитель, T°C).

$[\alpha]\lambda^T = (100\alpha)/(l \cdot c)$ : где  $l$  означает длину пробег (в дм);  $c$  означает концентрацию в г/100 мл для образца при температуре  $T$  (°C) и длине волны  $\lambda$  (в нм). Если используемая длина волны света составляет 589 нм (D-линия натрия), то вместо этого можно использовать символ D. Всегда следует приводить знак направления вращения (+ или -). В случае использования данного уравнения концентрацию и растворитель всегда приводят в круглых скобках после угла вращения. Угол вращения указывают в градусах, а единицы концентрации не приводят (принято, что они представлены в г/100 мл).

Пример 1. Синтез 1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 1) и хиральное разделение на энантимеры 1A и 1B



Синтез промежуточного соединения 1a.

2-(4-Фтор-2-метоксифенил)уксусную кислоту [CAS 886498-61-9] (28,9 г, 157 ммоль) добавляли небольшими порциями к тионилхлориду (150 мл) и полученный в результате раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Растворитель концентрировали при пониженном давлении и выпаривали совместно с толуолом с получением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорида 1a (31,8 г) в виде маслянистого остатка, который применяли без дополнительной очистки на следующем этапе.

Синтез промежуточного соединения 1b.

Раствор 6-фтор-1H-индола [CAS 399-51-9] (14,2 г, 105 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (400 мл) охлаждали до 0°C в атмосфере  $\text{N}_2$ . Добавляли 1 М раствор диэтилалюминийхлорида в гексане (160 мл, 160 ммоль) в течение периода 10 мин к перемешиваемому раствору и полученную в результате смесь выдерживали при 0°C в течение 40 мин. Затем добавляли по каплям раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил) ацетилхлорида 1a (31,8 г, 160 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 мл) в течение периода 2,5 ч при поддержании внутренней температуры реакционной смеси ниже 5°C. Температуру перемешиваемой реакционной смеси поддерживали при 0°C в течение 3,5 ч. Ледяную баню удаляли и после перемешивания при комнатной температуре в течение 2,5 ч реакционную смесь снова охлаждали до 0°C и реакционную смесь гасили посредством медленного добавления раствора тетрагидрата тартрата калия-натрия (сегнетовой соли) [CAS 6100-16-9] (59,6 г, 210 ммоль) в воде (70 мл) при поддержании внутренней температуры смеси ниже 10°C. После перемешивания в течение дополнительных 30 мин при 0°C ледяную баню удаляли и полученную в результате смесь разбавляли THF (1 л). Добавляли  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (150 г) и после перемешивания в течение ночи смесь фильтровали через Dicalite®.

Осадок на фильтре промывали два раза THF (2×1 л). Объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении до остаточного объема приблизительно 50 мл. Белый осадок отфильтровывали и высушивали под вакуумом при 50°C с обеспечением 1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 1b (22,3 г) в виде белого порошка.

Синтез соединения 1 и хиральное разделение энантимеров 1A и 1B.

Перемешиваемый раствор 1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил) этанона 1b (11,0 г, 36,5 ммоль) в THF (300 мл) охлаждали до 0°C в атмосфере  $\text{N}_2$ . Раствор фенилтриметиламмонийтрибромида [CAS 4207-56-1] (13,9 г, 36,9 ммоль) в THF (100 мл) добавляли по каплям в течение периода 45 мин. Полученную в результате суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч и выпаривали при пониженном давлении до белого остатка. Этот остаток, содержащий неочищенный 2-бром-1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанон 1c, растворяли в ацетонитриле

(300 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре. После добавления 2-(3-амино-5-метоксифенокси)этанола [CAS 725237-16-1] (13,4 г, 73 ммоль) и диизопропилэтиламина (12,6 мл, 73 ммоль) смесь перемешивали при комнатной температуре в течение двух дней - до полного превращения в соединение 1. Реакционную смесь вливали в воду (1,5 мл) и экстрагировали с помощью 2-метил-THF (2×750 мл). Объединенные экстракты промывали 0,5н. HCl (800 мл), насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (200 мл) и соевым раствором (200 мл), высушивали над MgSO<sub>4</sub> и выпаривали при пониженном давлении. Маслянистый остаток очищали с помощью препаративной HPLC (неподвижная фаза: RP Urtisphere® Prep C18 ODB - 10 мкм, 30×150 мм, подвижная фаза: 0,25% раствор NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> в воде, CH<sub>3</sub>CN). Фракции, содержащие продукт, концентрировали, растворяли в метаноле и снова концентрировали с получением 1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанола (соединения 1, 9,3 г) в виде рацемической смеси.

Хиральное разделение энантиомеров соединения 1 (9,3 г) осуществляли посредством хиральной HPLC с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: AS 20 мкм (1 кг), подвижная фаза: 100% MeOH). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали с обеспечением энантиомера 1A (4,5 г) в качестве первого элюируемого продукта и энантиомера 1B (4,6 г) в качестве второго элюируемого продукта. Оба энантиомера 1A и 1B представлены в виде клейких масел. Энантиомер 1A (4,5 г) осаждали из раствора в MeOH (20 мл) посредством медленного добавления воды (11 мл). После перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре белое твердое вещество отфильтровывали, промывали небольшими количествами смесей MeOH/воды (1/1) и высушивали под вакуумом при 50°C с обеспечением энантиомера 1A (2,4 г) в виде аморфного белого порошка. Энантиомер 1B (4,6 г) отверждали посредством растирания маслянистого остатка со смесью MeOH (10 мл) и воды (15 мл) при интенсивном перемешивании в течение 25 мин. Твердые вещества отфильтровывали и затем кристаллизовали из смеси MeOH (70 мл) и воды (30 мл) при перемешивании при комнатной температуре в течение 3 ч. Белый осадок отфильтровывали и высушивали под вакуумом при 50°C с обеспечением энантиомера 1B (2,50 г) в виде аморфного белого порошка.

Соединение 1:

<sup>1</sup>H ЯМР (360 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,64 (q, J=4,9 Гц, 2H), 3,61 (s, 3H), 3,76-3,90 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 4,80 (t, J=5,3 Гц, 1H), 5,72 (t, J=2,2 Гц, 1H), 5,94 (d, J=2,2 Гц, 2H), 6,14 (d, J=8,0 Гц, 1H), 6,38 (d, J=8,1 Гц, 1H), 6,73 (td, J=8,4, 2,6 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 7,06 (ddd, J=9,7, 8,8, 2,4 Гц, 1H), 7,27 (dd, J=9,5, 2,2 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H), 8,15 (dd, J=8,8, 5,9 Гц, 1H), 8,43 (s, 1H), 12,07 (br. s, 1H).

LC/MS (способ LC-B): Время удерживания 1,86 мин, MH<sup>+</sup> 483.

Энантиомер 1A:

<sup>1</sup>H ЯМР (360 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,60 (s, 3H), 3,64 (m, J=6,60 Гц, 2H), 3,73-3,90 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 4,80 (t, J=4,94 Гц, 1H), 5,71 (br. s., 1H), 5,93 (br. s., 2H), 6,14 (d, J=7,95 Гц, 1H), 6,38 (d, J=7,97 Гц, 1H), 6,73 (t, J=8,41 Гц, 1H), 6,93 (d, J=11,24 Гц, 1H), 7,05 (t, J=9,02 Гц, 1H), 7,27 (d, J=9,58 Гц, 1H), 7,37 (t, J=7,70 Гц, 1H), 8,09-8,19 (m, 1H), 8,43 (s, 1H), 12,06 (s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,03 мин, MH<sup>+</sup> 483.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +96,9° (с 0,389, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-F): R<sub>t</sub> 1,73 мин, MH<sup>+</sup> 483, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 1B:

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,61 (s, 3H), 3,64 (t, J=5,12 Гц, 2H), 3,76-3,89 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 4,77 (br. s, 1H), 5,71 (t, J=2,01 Гц, 1H), 5,94 (d, J=2,11 Гц, 2H), 6,14 (d, J=7,97 Гц, 1H), 6,35 (d, J=8,00 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,49, 2,44 Гц, 1H), 6,92 (dd, J=11,36, 2,48 Гц, 1H), 7,05 (td, J=9,29, 2,38 Гц, 1H), 7,26 (d, J=9,49 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,58, 6,88 Гц, 1H), 8,14 (dd, J=8,77, 5,59 Гц, 1H), 8,42 (s, 1H), 12,08 (br. s., 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,03 мин, MH<sup>+</sup> 483.

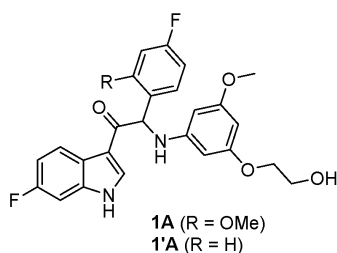
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -100,0° (с 0,478, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-F): R<sub>t</sub> 2,38 мин, MH<sup>+</sup> 483, хиральная чистота 100%.

Пример 1.1. Хиральная устойчивость энантиомера 1A при pH 7,4.

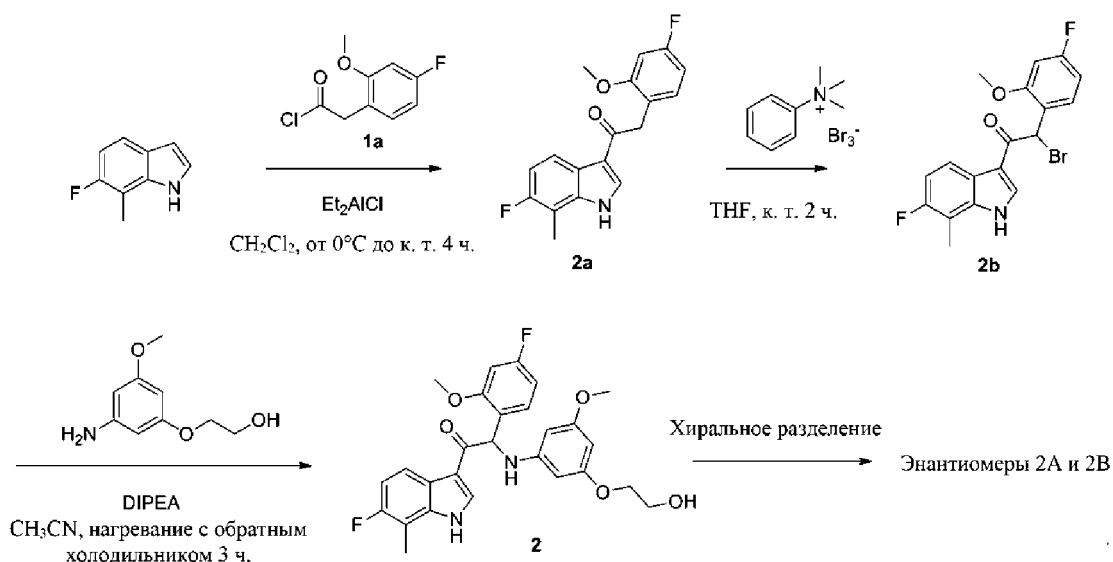
Хиральную устойчивость энантиомера 1A (R=OMe) оценивали посредством определения энантиомерного избытка (ee%) после инкубирования в течение 24 и 48 ч в буферном растворе при pH 7,4 при 40 и 60°C. Для оценки влияния метокси-заместителя энантиомера 1A (R=OMe) на устойчивость к рацемизации хиральную устойчивость энантиомера 1'A (R=H) тестировали при тех же условиях.

С этой целью получали 5 мкМ буферные (pH 7,4) растворы 1A и 1'A посредством смешивания 25 мкл 100 мкМ раствора 1A или 1'A в DMSO с 475 мкл водного буфера pH 7,4. Образцы помещали на 24 и 48 ч после инкубирования при 40 и 60°C. Аналитические образцы анализировали с помощью хиральной SFC (определение MS) и хиральную чистоту выражали в качестве энантиомерного избытка (ee% = %энантиомера A - %энантиомера B). Оба энантиомера 1A и 1'A характеризовались хиральной чистотой 100% до их инкубирования.



Соединение	Температура	ee%	
		Моменты времени отбора проб (ч.)	
		24	48
1A	40°C	100	100
	60°C	100	96
1'A	40°C	92	84
	60°C	26	9

Пример 2. Синтез 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-фтор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 2) и хиральное разделение на энантиомеры 2A и 2B



Синтез промежуточного соединения 2a.

Перемешиваемый раствор 6-фтор-7-метил-1H-индола [CAS 57817-10-4] (5,41 г, 36,2 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл) охлаждали на льду в атмосфере  $\text{N}_2$ . Добавляли по каплям 1 М раствор диэтилалюминий-хлорида в гексане (54,4 мл, 54,4 ммоль). Через 15 мин при 0°C добавляли по каплям раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорида 1a (11,0 г, 54,4 ммоль, для синтеза: см. пример 1) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 мл) при поддержании внутренней температуры ниже 5°C. Ледяную баню удаляли и полученную в результате суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь медленно вливали в охлажденный (0°C) насыщенный водный раствор  $\text{NaHCO}_3$ . Смесь фильтровали через Dicalite® и осадок на фильтре промывали THF. Объединенные фильтраты экстрагировали с помощью  $\text{EtOAc}$ , высушивали на  $\text{MgSO}_4$  и выпаривали при пониженном давлении. Остаток растирали с  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и твердые вещества отфильтровывали с получением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-фтор-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона 2a (7,47 г) в виде белого порошка.

Синтез промежуточного соединения 2b.

Перемешиваемый раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-фтор-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона 2a (7,43 г, 23,56 ммоль) в THF (100 мл) охлаждали при 0°C в атмосфере  $\text{N}_2$ . Добавляли по каплям раствор фенилтриметиламмонийтрибромида [CAS 4207-56-1] (8,96 г, 23,8 ммоль) в THF (100 мл). После добавления реакцию смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Суспензию фильтровали для удаления твердых веществ и фильтрат выпаривали при пониженном давлении. Остаток растирали с  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , твердые вещества отфильтровывали и высушивали под вакуумом с обеспечением 2-бром-

2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-фтор-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона 2b (8,95 г).

Синтез соединения 2 и хиральное разделение энантимеров 2A и 2B.

Смесь 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-фтор-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона 2b (3,30 г, 8,38 ммоль), 2-(3-амино-5-метоксифенокси)этанола [CAS 725237-16-1] (1,54 г, 8,38 ммоль) и диизопротиламина (1,44 мл, 8,38 ммоль) смешивали в CH<sub>3</sub>CN (100 мл) и смесь нагревали с применением обратного холодильника в течение 3 ч. После охлаждения до комнатной температуры растворитель выпаривали при пониженном давлении и остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: HP-Spher 25 мкм (340 г), подвижная фаза: гептан/EtOAc, градиент: от 100/0 до 0/100). Фракции, содержащие продукт, концентрировали и затем очищали с помощью препаративной HPLC (неподвижная фаза: Uptisphere® C18 ODB - 10 мкм, 200 г, 5 см, подвижная фаза: 0,25% раствор NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> в воде, CH<sub>3</sub>CN). Фракции, содержащие продукт, концентрировали, растворяли в метаноле и снова концентрировали с обеспечением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-фтор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 2, 1,4 г) в виде рацемической смеси.

Хиральное разделение энантимеров соединения 2 (1,18 г) осуществляли посредством препаративной SFC (неподвижная фаза: Chiralcel® Diacel® OD 20×250 мм, подвижная фаза: CO<sub>2</sub>, EtOH с 0,2% iPrNH<sub>2</sub>) и выпариванием фракций, содержащих продукт, при пониженном давлении. Первый элюируемый энантиомер выделяли в виде соли хлористоводородной кислоты посредством осаждения из смеси MeOH (30 мл), 1н. HCl (5 мл) и воды (130 мл). После перемешивания в течение ночи образовывался белый осадок, и его отфильтровывали и высушивали в вакууме при комнатной температуре с обеспечением 328 мг энантиомера 2A (в виде соли хлористоводородной кислоты). Второй элюируемый энантиомер отверждали посредством лиофилизации из смеси CH<sub>3</sub>CN/вода с получением 385 мг энантиомера 2B в виде аморфного порошка.

Соединение 2:

<sup>1</sup>H ЯМР (360 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,38 (d, J=1,62 Гц, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,64 (q, J=5,12 Гц, 2H), 3,76-3,89 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 4,79 (t, J=5,54 Гц, 1H), 5,71 (t, J=2,11 Гц, 1H), 5,95 (d, J=2,13 Гц, 2H), 6,16 (d, J=7,95 Гц, 1H), 6,36 (d, J=7,96 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,49, 2,47 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,37, 2,49 Гц, 1H), 7,01 (dd, J=10,29, 8,71 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,62, 6,85 Гц, 1H), 7,96 (dd, J=8,73, 5,18 Гц, 1H), 8,43 (s, 1H), 12,19 (s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,08 мин, MH<sup>+</sup> 497.

Энантиомер 2A:

<sup>1</sup>H ЯМР (360 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,38 (d, J=0,22 Гц, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,64 (t, J=5,21 Гц, 2H), 3,83 (qt, J=10,02, 5,27 Гц, 2H), 3,96 (s, 3H), 5,71 (t, J=1,46 Гц, 1H), 5,95 (d, J=2,11 Гц, 2H), 6,16 (br. s., 1H), 6,36 (br. s., 1H), 6,72 (td, J=8,55, 2,62 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,33, 2,46 Гц, 1H), 7,01 (t, J=9,49 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,64, 6,90 Гц, 1H), 7,96 (dd, J=8,73, 5,39 Гц, 1H), 8,43 (d, J=3,24 Гц, 1H), 12,19 (d, J=2,95 Гц, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,08 мин, MH<sup>+</sup> 497 [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -82,7° (с 0,5055, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-G): R<sub>t</sub> 1,69 мин, MH<sup>+</sup> 497, хиральная чистота 100%.

Анализ CHN: аналит. расч. для C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. HCl: C, 60,85, H, 5,11, N, 5,26. Найденное значение: C, 62,83; H, 5,02; N, 5,36.

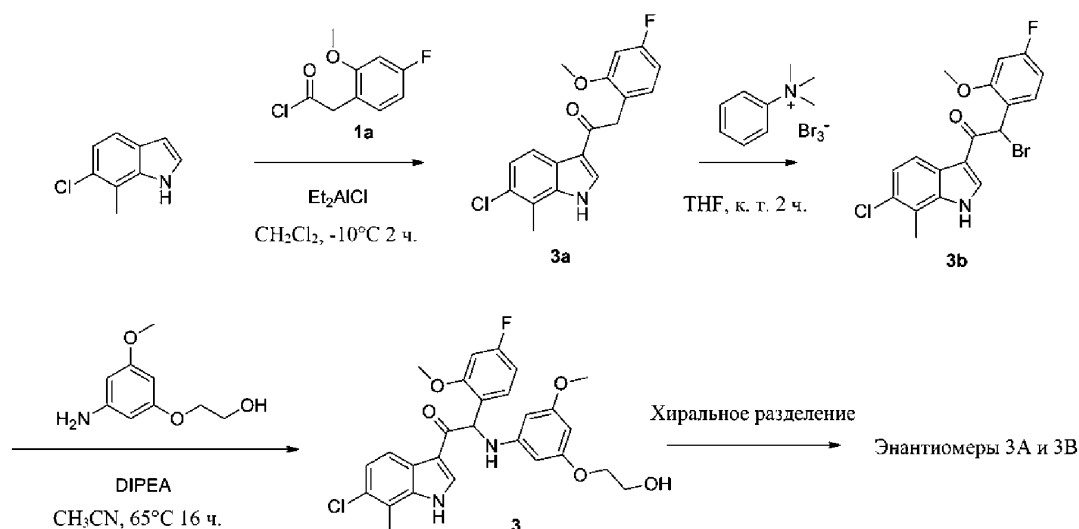
Энантиомер 2B:

<sup>1</sup>H ЯМР (360 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,38 (d, J=1,62 Гц, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,64 (q, J=5,43 Гц, 2H), 3,75-3,89 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 4,79 (t, J=5,58 Гц, 1H), 5,71 (t, J=2,11 Гц, 1H), 5,95 (d, J=2,20 Гц, 2H), 6,16 (d, J=7,97 Гц, 1H), 6,36 (d, J=8,00 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,56, 2,56 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,37, 2,49 Гц, 1H), 7,01 (dd, J=10,29, 8,72 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,68, 6,89 Гц, 1H), 7,96 (dd, J=8,75, 5,21 Гц, 1H), 8,43 (s, 1H), 12,19 (br. s., 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,09 мин, MH<sup>+</sup> 497 [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +86,7° (с 0,5075, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-G): R<sub>t</sub> 2,88 мин, MH<sup>+</sup> 497, хиральная чистота 100%.

Пример 3. Синтез 1-(6-хлор-7-метил-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 3) и хиральное разделение на энантиомеры 3А и 3В



Синтез промежуточного соединения 3а.

Перемешиваемый раствор 6-хлор-7-метил-1Н-индола [CAS 57817-09-1] (3,2 г, 19,3 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 мл) в потоке  $\text{N}_2$  охлаждали на охлаждающей бане лед- $\text{NaCl}$ . Добавляли 1 М диэтилалюминийхлорид в гексане (29 мл, 29 ммоль) в течение периода 2 мин и охлажденный раствор перемешивали при  $-10^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Добавляли по каплям раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорида 1а (5,48 г, 27,1 ммоль, синтез: см. пример 1) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 мл) в течение 30 мин при поддержании внутренней температуры ниже  $-10^\circ\text{C}$  и полученную в результате смесь перемешивали в течение дополнительных 2 ч при  $-10^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь гасили посредством медленного добавления раствора тетрагидрата тартрата калия-натрия (сегнетовой соли) [CAS 6100-16-9] (10,9 г, 38,6 ммоль) в воде (10 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. В реакционной смеси присутствовал белый осадок. Осадок выделяли посредством фильтрации, промывали водой и высушивали под вакуумом с обеспечением 1-(6-хлор-7-метил-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 3а (4200 мг) в виде серовато белого твердого вещества.

Синтез промежуточного соединения 3b.

Раствор 1-(6-хлор-7-метил-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил) этанона 3а (2000 мг, 6,03 ммоль) в THF (120 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере  $\text{N}_2$ . Раствор фенолтриметиламмонийтрибромида [CAS 4207-56-1] (2,38 г, 6,33 ммоль) в THF (35 мл) добавляли по каплям и смесь перемешивали в течение дополнительных 90 мин при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали и фильтрат концентрировали под вакуумом с обеспечением 2-бром-1-(6-хлор-7-метил-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 3b (2200 мг) в виде серовато белого порошка.

Синтез соединения 3 и хиральное разделение энантиомеров 3А и 3В.

2-Бром-1-(6-хлор-7-метил-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанон 3b (1,31 г, 2,23 ммоль) суспендировали в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (60 мл). Добавляли 2-(3-амино-5-метоксифенокси)этанол [CAS 725237-16-1] (0,6 г, 2,46 ммоль) и диизопропилэтиламин (847 мкл, 4,91 ммоль) и перемешиваемую смесь нагревали при  $65^\circ\text{C}$  в течение ночи. Смесь концентрировали в вакууме и остаток распределяли между EtOAc и водой. Органический слой отделяли, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством препаративной HPLC (неподвижная фаза: Uptisphere® C18 ODB - 10 мкм, 200 г, 5 см, подвижная фаза: 0,25% раствор  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  в воде,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) с получением 1-(6-хлор-7-метил-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 3, 590 мг) в виде рацемической смеси.

Хиральное разделение энантиомеров соединения 3 (560 мг) осуществляли посредством хирального разделения с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: AS 5 мкм, подвижная фаза: 100% MeOH, изократическое элюирование. Длина волны детектирования 308 нм, скорость потока 1 мл/мин). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали с обеспечением энантиомера 3А в качестве первого элюируемого продукта и энантиомера 3В в качестве второго элюируемого продукта. Оба энантиомера 3А и 3В представлены в виде клейких масел. Энантиомеры растворяли в смеси MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/1) и выпаривали при пониженном давлении с обеспечением энантиомера 3А (245 мг) и энантиомера 3В (263 мг) в виде аморфных порошков.

Соединение 3:

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d)  $\delta$  ppm 2,48 (s, 3H), 3,70 (s, 3H), 3,88-3,92 (m, 2H), 3,93-4,02 (m, 2H), 4,03 (s, 3H), 5,55 (br. s, 1H), 5,83 (t,  $J=2,20$  Гц, 1H), 5,89 (d,  $J=2,16$  Гц, 2H), 6,12 (s, 1H), 6,54-6,66 (m,



2H), 7,28 (d, J=7,80 Гц, 1H), 7,33 (dd, J=8,55, 6,60 Гц, 1H), 8,12-8,17 (m, 2H), 8,59 (br. s., 1H).

LC/MS (способ LC-B): Время удерживания 2,08 мин,  $MH^+$  513.

Энантиомер 3A:

$^1H$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 2,50 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,64 (q, J=5,54 Гц, 2H), 3,77-3,90 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 4,78 (t, J=5,40 Гц, 1H), 5,71 (t, J=2,12 Гц, 1H), 5,95 (d, J=2,13 Гц, 2H), 6,17 (d, J=7,96 Гц, 1H), 6,35 (d, J=7,96 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,48, 2,49 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,35, 2,50 Гц, 1H), 7,21 (d, J=8,61 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,60, 6,87 Гц, 1H), 7,98 (d, J=8,50 Гц, 1H), 8,44 (s, 1H), 12,23 (s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,12 мин,  $MH^+$  513 [ $\alpha$ ] $_D^{20}$ : +95,2° (с 0,605, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-H):  $R_t$  3,21 мин,  $MH^+$  513, хиральная чистота 100%.

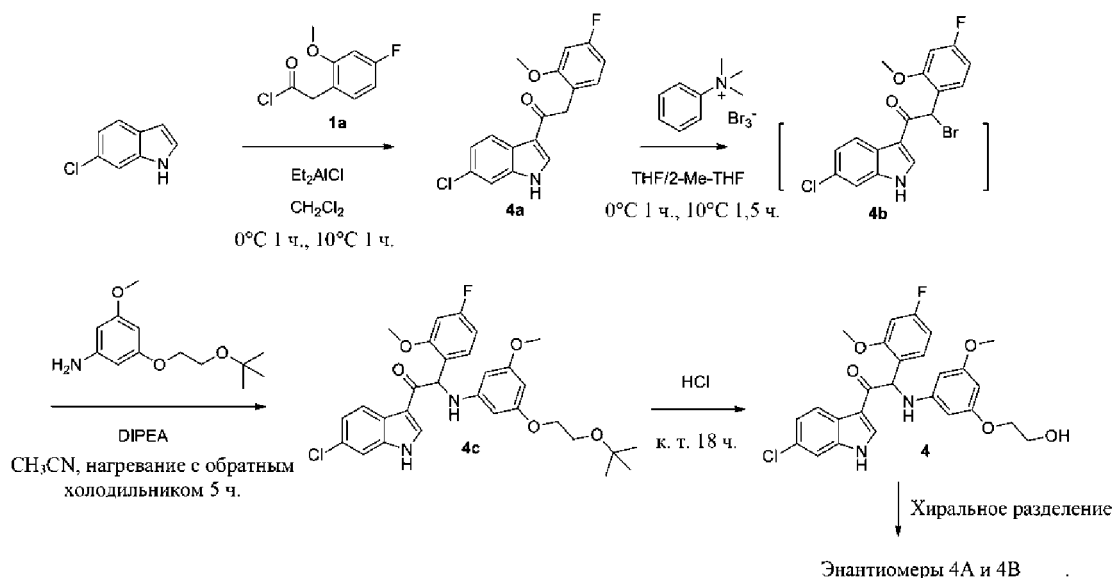
Энантиомер 3B:

$^1H$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 2,50 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,64 (q, J=5,38 Гц, 2H), 3,76-3,90 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 4,77 (t, J=5,51 Гц, 1H), 5,71 (t, J=2,12 Гц, 1H), 5,95 (d, J=2,13 Гц, 2H), 6,16 (d, J=7,96 Гц, 1H), 6,35 (d, J=7,96 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,48, 2,49 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,35, 2,49 Гц, 1H), 7,21 (d, J=8,51 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,60, 6,87 Гц, 1H), 7,98 (d, J=8,50 Гц, 1H), 8,44 (s, 1H), 12,23 (s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,12 мин,  $MH^+$  513 [ $\alpha$ ] $_D^{20}$ : -87,2° (с 0,625, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-H):  $R_t$  1,85 мин,  $MH^+$  513, хиральная чистота 100%.

Пример 4. Синтез 1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 4) и хиральное разделение на энантиомеры 4A и 4B



Синтез промежуточного соединения 4a.

Перемешиваемый раствор 6-хлор-1H-индола [CAS 17422-33-2] (2,23 г, 14,7 ммоль) в  $CH_2Cl_2$  (125 мл) в потоке  $N_2$ , охлаждали до 0°C с использованием ледяной бани. Добавляли по каплям 1 М раствор диэтилалюминийхлорида в гексане (22,1 мл, 22,1 ммоль) и смесь перемешивали в течение 10 мин при 0°C. Затем добавляли по каплям раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорида 1a (4,47 г, 22,1 ммоль, синтез: см. пример 1) в  $CH_2Cl_2$  (30 мл) в течение периода 50 мин и полученную в результате смесь выдерживали при 0°C в течение 1 ч и затем перемешивали при 10°C в течение 1 ч. После повторного охлаждения до 0°C реакционную смесь гасили посредством медленного добавления раствора тетрагидрата тартрата калия-натрия (сегнетовой соли) [CAS 6100-16-9] (8,31 г, 29,4 ммоль) в воде (9 мл) и обеспечивали нагревание смеси до комнатной температуры в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавляли посредством добавления 2-метил-ТНФ (150 мл) и перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Добавляли  $Na_2SO_4$  (30 г) и после перемешивания в течение 30 мин смесь фильтровали через Dicalite®. Осадок на фильтре промывали несколько раз 2-метил-ТНФ и объединенные фильтраты концентрировали в вакууме до остаточного объема 25 мл. После отстаивания в течение 2 ч осадок отфильтровывали и высушивали под вакуумом с обеспечением 1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 4a (2,85 г).

Синтез промежуточного соединения 4с.

Раствор 1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил) этанона 4a (1 г, 3,15 ммоль) в 2-метил-ТНФ (50 мл) перемешивали в потоке  $N_2$  и охлаждали на ледяной бане. Добавляли по каплям раствор фенилтриметиламмонийтрибромида [CAS 4207-56-1] (1,24 г, 3,31 ммоль) в ТНФ (10 мл) и 2-метил-ТНФ (10 мл) и смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем при 10°C в течение 90 мин. Затем добавляли по каплям раствор 3-(2-(трет-бутокси)этокси)-5-метоксианилина [CAS 1428973-39-0] (0,83 г, 3,46 ммоль) и диизопропилэтиламина (1,63 мл, 9,44 ммоль) в  $CH_3CN$  (40 мл) и реакционную смесь нагревали с применением обратного холодильника в течение 90 мин. Растворители выпаривали при понижен-

ном давлении. Остаток поглощали в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (30 мл) и нагревали с применением обратного холодильника в течение 5 ч. После охлаждения до комнатной температуры растворитель выпаривали под вакуумом и остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: диоксид кремния Grace Reveleris® 80 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc, градиент от 100/0 до 0/100). Целевые фракции объединяли, выпаривали и выпаривали совместно с 1,4-диоксаном с обеспечением 2-((3-(2-(трет-бутокси)этокси)-5-метоксифенил)амино)-1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 4с (1,5 г, чистота LC=71%). Неочищенный продукт использовали как таковой на следующем этапе.

Синтез соединения 4 и хиральное разделение энантиомеров 4А и 4В.

2-((3-(2-(трет-Бутокси)этокси)-5-метоксифенил)амино)-1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанон 4с (1,5 г, 1,92 ммоль) смешивали с 4 М хлористоводородной кислотой в диоксане (25 мл, 0,1 моль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Смесь дегазировали и медленно вливали в водный насыщенный раствор  $\text{NaHCO}_3$ . Продукт экстрагировали два раза с помощью 2-метил-THF и объединенные экстракты высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: диоксид кремния SnapUltra Biotage® 50 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH, градиент от 100/0/0 до 60/30/10). Целевые фракции объединяли, и выпаривали, и затем очищали посредством препаративной HPLC (неподвижная фаза: Uptisphere® C18 ODB - 10 мкм, 200 г, 5 см, подвижная фаза: 0,25% раствор  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  в воде,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали. Остаток выпаривали совместно из смеси  $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{CN}$  с обеспечением рацемического 1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 4, 500 мг) в виде масла.

Хиральное разделение соединения 4 (500 мг) проводили посредством хирального разделения с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: AS 20 мкм, подвижная фаза: 100%  $\text{MeOH}$ ). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали. Первый элюируемый продукт дополнительно очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: диоксид кремния SnapUltra Biotage®, Grace Reveleris® 12 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc, градиент от 100/0 до 0/100). Фракции, содержащие продукт, объединяли, выпаривали при пониженном давлении и затем выпаривали совместно с  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Остаток отверждали посредством лиофилизации из  $\text{CH}_3\text{CN}$ /воды с обеспечением энантиомера 4А (135 мг) в виде аморфного порошка. Второй элюируемый продукт дополнительно очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: диоксид кремния SnapUltra Biotage®, Grace Reveleris® 12 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc, градиент от 100/0 до 0/100). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали при пониженном давлении. Остаток отверждали посредством лиофилизации из  $\text{CH}_3\text{CN}$ /воды с обеспечением энантиомера 4В (160 мг) в виде аморфного порошка.

Соединение 4:

LC/MS (способ LC-B): Время удерживания 1,99 мин,  $\text{MH}^+$  499.

Энантиомер 4А:

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 3,61 (s, 3H), 3,62-3,66 (m, 2H), 3,77-3,89 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 4,76 (t,  $J=5,72$  Гц, 1H), 5,71 (t,  $J=2,12$  Гц, 1H), 5,93 (d,  $J=2,14$  Гц, 2H), 6,14 (d,  $J=7,97$  Гц, 1H), 6,35 (d,  $J=8,00$  Гц, 1H), 6,72 (td,  $J=8,49, 2,51$  Гц, 1H), 6,92 (dd,  $J=11,36, 2,52$  Гц, 1H), 7,20 (dd,  $J=8,53, 1,93$  Гц, 1H), 7,37 (dd,  $J=8,60, 6,88$  Гц, 1H), 7,52 (d,  $J=1,92$  Гц, 1H), 8,13 (d,  $J=8,51$  Гц, 1H), 8,44 (s, 1H), 12,09 (br. s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,09 мин,  $\text{MH}^+$  499  $[\alpha]_D^{20}$ : +107,4° (с 0,565, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-I):  $R_t$  1,54 мин,  $\text{MH}^+$  499, хиральная чистота 100%.

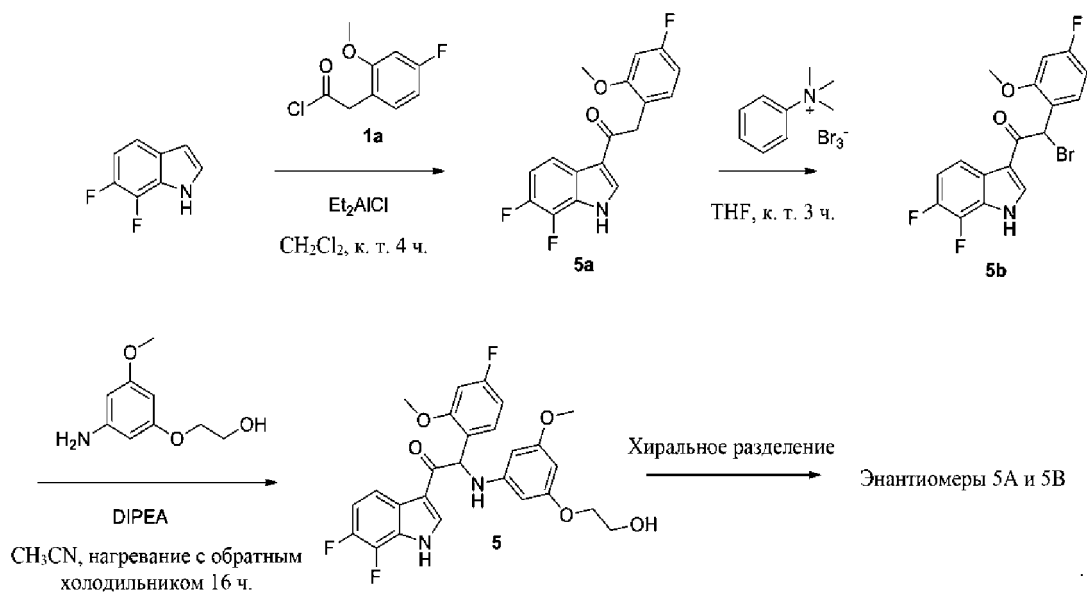
Энантиомер 4В:

$^1\text{H}$  ЯМР (360 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 3,61 (s, 3H), 3,64 (t,  $J=4,93$  Гц, 2H), 3,76-3,90 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 4,80 (br. s., 1H), 5,71 (t,  $J=2,09$  Гц, 1H), 5,93 (d,  $J=2,12$  Гц, 2H), 6,14 (d,  $J=8,03$  Гц, 1H), 6,39 (d,  $J=8,05$  Гц, 1H), 6,73 (td,  $J=8,48, 2,46$  Гц, 1H), 6,93 (dd,  $J=11,37, 2,48$  Гц, 1H), 7,21 (dd,  $J=8,52, 1,94$  Гц, 1H), 7,37 (dd,  $J=8,59, 6,88$  Гц, 1H), 7,53 (d,  $J=1,93$  Гц, 1H), 8,14 (d,  $J=8,53$  Гц, 1H), 8,46 (s, 1H), 12,12 (br. s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,08 мин,  $\text{MH}^+$  499  $[\alpha]_D^{20}$ : -102,6° (с 0,5295, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-I):  $R_t$  1,90 мин,  $\text{MH}^+$  499, хиральная чистота 100%.

Пример 5. Синтез 1-(6,7-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 5) и хиральное разделение на энантиомеры 5A и 5B



Синтез промежуточного соединения 5a.

Раствор 6,7-дифтор-1H-индола [CAS 271780-84-8] (3,0 г, 19,6 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (75 мл) перемешивали в атмосфере  $\text{N}_2$  и охлаждали на льду. Добавляли по каплям 1 М раствор диэтилалюминийхлорида в гексане (30 мл, 30 ммоль) и смесь перемешивали в течение 10 мин при  $0^\circ\text{C}$ . Затем добавляли по каплям раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорида 1a (5,0 г, 24,7 ммоль, синтез: см. пример 1) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 мл) и полученную в результате смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь медленно вливали в охлажденный ( $0^\circ\text{C}$ ) водный насыщенный раствор  $\text{NaHCO}_3$ . Смесь фильтровали через Dicalite® и осадок на фильтре промывали THF. Органический слой отделяли от объединенных фильтратов, высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Твердый остаток растирали с  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , твердые вещества отфильтровывали и высушивали в вакууме при  $50^\circ\text{C}$  с получением 1-(6,7-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 5a (4,46 г) в виде белого порошка.

Синтез промежуточного соединения 5b.

1-(6,7-Дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанон 5a (4,45 г, 13,93 ммоль) суспендировали в THF (60 мл) и охлаждали на льду в атмосфере  $\text{N}_2$ . Добавляли по каплям раствор фенилтриметиламмонийтрибромида [CAS 4207-56-1] (5,30 г, 14,1 ммоль) в THF (35 мл) и затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Осадок отфильтровывали и промывали THF. Объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении. Остаток растирали с небольшим количеством  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , отфильтровывали и высушивали под вакуумом при  $50^\circ\text{C}$  с обеспечением 2-бром-1-(6,7-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 5b (4,10 г) в виде белого порошка.

Синтез соединения 5 и хиральное разделение на энантиомеры 5A и 5B.

Смесь 2-бром-1-(6,7-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 5b (4,10 г, 10,31 ммоль), 2-(3-амино-5-метоксифенокси)этанол [CAS 725237-16-1] (1,91 г, 10,43 ммоль) и диизопропилэтиламина (1,8 мл, 10,44 ммоль) перемешивали в  $\text{CH}_3\text{CN}$  и нагревали с применением обратного холодильника в течение ночи. После охлаждения до комнатной температуры растворители выпаривали при пониженном давлении и остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: диоксид кремния 340 г HP-Spher 25 мкм, подвижная фаза:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ , градиент от 100/0 до 50/50). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали при пониженном давлении. Остаток дополнительно очищали посредством препаративной HPLC (неподвижная фаза: Uptisphere® C18 ODB - 10 мкм, 200 г, 5 см. Подвижная фаза: 0,25%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  раствор в воде, MeOH). Фракции, содержащие продукт, концентрировали, растворяли в метаноле и концентрировали снова с получением 1-(6,7-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 5, 1,62 г) в виде рацемической смеси. Небольшое количество фракции данной партии отверждали посредством лиофилизации из смеси  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{вода}$  с обеспечением соединения 5 (65 мг) в виде аморфного белого порошка. Хиральное разделение соединения 5 (1,50 г) осуществляли посредством препаративной SFC (неподвижная фаза: Chiralcel® Diacel® OD 20×250 мм, подвижная фаза:  $\text{CO}_2$ , EtOH с 0,2%  $i\text{PrNH}_2$ ). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали при пониженном давлении. Первый элюируемый продукт дополнительно очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: диоксид кремния 25 г HP-Spher 25 мкм, подвижная фаза:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ,

градиент от 100/0 до 0/100). Фракции, содержащие продукт, концентрировали до остаточного количества 2 мл. Белый осадок отфильтровывали, промывали несколько раз  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и высушивали под вакуумом при  $50^\circ\text{C}$  с обеспечением энантиомера 5A (414 мг) в виде аморфного белого порошка. Второй элюируемый продукт дополнительно очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: диоксид кремния 25 г HP-Spher 25 мкм, подвижная фаза:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , градиент от 100/0 до 0/100). Фракции, содержащие продукт, концентрировали до остаточного количества 2 мл. Белый осадок отфильтровывали, промывали несколько раз  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и высушивали под вакуумом при  $50^\circ\text{C}$  с обеспечением энантиомера 5B (437 мг) в виде аморфного белого порошка.

Соединение 5:

$^1\text{H}$  ЯМР (360 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 3,61 (s, 3H) 3,64 (q,  $J=5,36$  Гц, 2H) 3,74-3,89 (m, 2H) 3,93 (s, 3H) 4,79 (t,  $J=5,66$  Гц, 1H) 5,71 (t,  $J=2,01$  Гц, 1H) 5,94 (d,  $J=2,18$  Гц, 2H) 6,16 (d,  $J=8,06$  Гц, 1H) 6,38 (d,  $J=8,06$  Гц, 1H) 6,73 (td,  $J=8,42, 2,55$  Гц, 1H) 6,93 (dd,  $J=11,35, 2,55$  Гц, 1H) 7,18-7,27 (m, 1H) 7,37 (dd,  $J=8,43, 6,95$  Гц, 1H) 7,92 (dd,  $J=8,60, 4,92$  Гц, 1H) 8,49 (s, 1H) 12,76 (s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,07 мин,  $\text{MH}^+$  501.

Энантиомер 5A:

$^1\text{H}$  ЯМР (360 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 3,61 (s, 3H), 3,64 (q,  $J=5,63$  Гц, 2H), 3,75-3,89 (m, 2H), 3,94 (s, 3H), 4,79 (t,  $J=5,53$  Гц, 1H), 5,71 (t,  $J=2,12$  Гц, 1H), 5,95 (d,  $J=2,22$  Гц, 2H), 6,16 (d,  $J=8,21$  Гц, 1H), 6,38 (d,  $J=8,11$  Гц, 1H), 6,73 (td,  $J=8,52, 2,53$  Гц, 1H), 6,93 (dd,  $J=11,35, 2,62$  Гц, 1H), 7,19-7,27 (m, 1H), 7,37 (dd,  $J=8,55, 6,88$  Гц, 1H), 7,92 (dd,  $J=8,94, 4,36$  Гц, 1H), 8,49 (s, 1H), 12,77 (s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,07 мин,  $\text{MH}^+$  501.

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-88,3^\circ$  (с 0,506, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-J):  $R_t$  2,46 мин,  $\text{MH}^+$  501, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 5B:

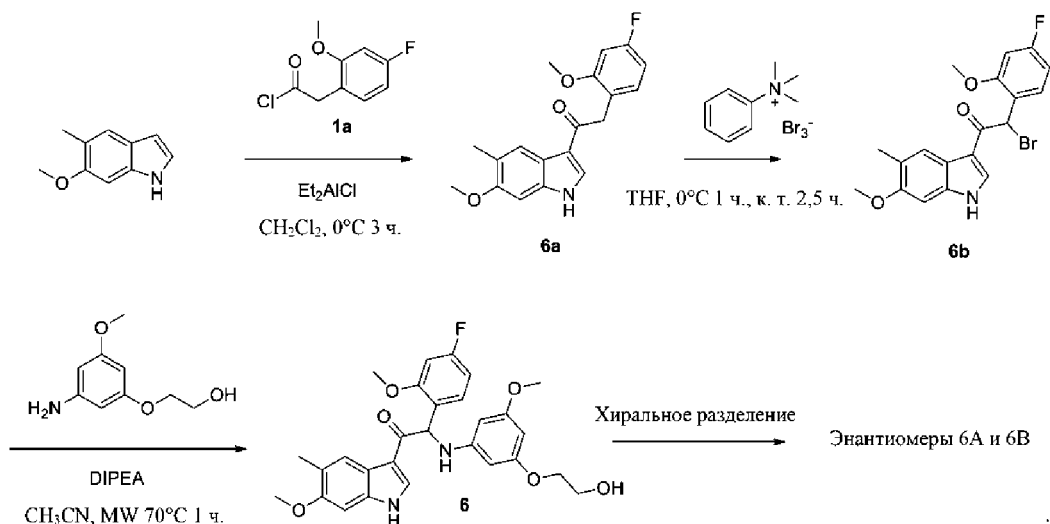
$^1\text{H}$  ЯМР (360 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 3,61 (s, 3H), 3,64 (q,  $J=5,05$  Гц, 2H), 3,76-3,89 (m, 2H), 3,94 (s, 3H), 4,79 (t,  $J=5,55$  Гц, 1H), 5,71 (t,  $J=2,16$  Гц, 1H), 5,95 (d,  $J=2,07$  Гц, 2H), 6,16 (d,  $J=8,09$  Гц, 1H), 6,38 (d,  $J=8,15$  Гц, 1H), 6,73 (td,  $J=8,43, 2,69$  Гц, 1H), 6,93 (dd,  $J=11,35, 2,67$  Гц, 1H), 7,16-7,28 (m, 1H), 7,37 (dd,  $J=8,55, 6,87$  Гц, 1H), 7,92 (dd,  $J=8,92, 4,37$  Гц, 1H), 8,49 (s, 1H), 12,77 (br. s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,07 мин,  $\text{MH}^+$  501.

$[\alpha]_D^{20}$ :  $+90,3^\circ$  (с 0,523, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-J):  $R_t$  4,27 мин,  $\text{MH}^+$  501, хиральная чистота 100%.

Пример 6. Синтез 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона (соединения 6) и хиральное разделение на энантиомеры 6A и 6B



Синтез промежуточного соединения 6a.

Добавляли по каплям 1 М диэтилалюминийхлорид в гексане (18,6 мл, 18,6 ммоль) при  $0^\circ\text{C}$  к раствору 6-метокси-5-метил-1H-индола [CAS 1071973-95-9] (2 г, 12,4 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 мл). Через 30 мин при  $0^\circ\text{C}$  медленно добавляли 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорид 1a (3,3 г, 16,3 ммоль, синтез: см. пример 1) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 мл) при  $0^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 3 ч. Добавляли ледяную воду и осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали под вакуумом с обеспечением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 6a (3,15 г).

Синтез промежуточного соединения 6b.

Добавляли по каплям при  $0^\circ\text{C}$  раствор фенилтриметиламмонийтрибромид [CAS 4207-56-1] (3,8 г, 10,1 ммоль) в THF (90 мл) к смеси 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 6a (3,15 г, 9,6 ммоль) в THF (90 мл). Смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 ч и при ком-

натной температуре в течение 2,5 ч. Осадок отфильтровывали и промывали EtOAc. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученный в результате остаток поглощали минимальным количеством CH<sub>3</sub>CN и диизопропилового эфира. Осадок отфильтровывали и высушивали под вакуумом с обеспечением 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 6b (2,8 г).

Синтез соединения 6 и хиральное разделение на энантимеры 6A и 6B.

Смесь 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 6b (1,0 г, 2,46 ммоль), 2-(3-амино-5-метоксифенокси)этанола [CAS 725237-16-1] (676 мг, 3,69 ммоль) и диизопропилэтиламина (0,64 мл, 3,69 ммоль) в CH<sub>3</sub>CN (10 мл) и THF (10 мл) нагревали при 70°C в течение 1ч с использованием микроволнового устройства Biotage® Initiator EXP 60 с выходной мощностью, варьируемой от 0 до 400 Вт (фиксированное время удерживания). Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток поглощали с помощью EtOAc. Органический слой промывали два раза 1н. HCl, промывали водой, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель концентрировали при пониженном давлении. Выполняли очистку посредством флэш-хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 40 г, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 99,5/0,5). Очищенные фракции собирали и выпаривали до сухого состояния с получением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксизетокси)-5-метоксифенил)амино)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона (соединения 6, 330 мг) в виде рацемической смеси. Перед хиральным разделением эту фракцию объединяли с другой партией соединения 6 (60 мг).

Хиральное разделение соединения 6 (390 мг) осуществляли посредством препаративной хиральной SFC (неподвижная фаза: Chiralpak® IC, 5 мкм, 250×30 мм, подвижная фаза: 70% CO<sub>2</sub>, 30% MeOH) с получением 137 мг первого элюируемого энантиомера и 146 мг второго элюируемого энантиомера. Первый элюируемый энантиомер объединяли с другой партией (фракция 1, общее количество: 246 мг). Вторым элюируемым энантиомер объединяли с другой партией (фракция 2, общее количество: 245 мг). Фракцию 1 повторно очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 12 г, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 99,5/0,5). Очищенные фракции собирали и выпаривали до сухого состояния с получением 207 мг. Соединение отверждали из Et<sub>2</sub>O/гептана и нескольких капель CH<sub>3</sub>CN с получением энантиомера 6A (173 мг) в виде аморфного порошка. Фракцию 2 повторно очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 12 г, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 99,5/0,5). Очищенные фракции собирали и выпаривали до сухого состояния с получением 204 мг. Соединение отверждали из Et<sub>2</sub>O/гептана и нескольких капель CH<sub>3</sub>CN с получением энантиомера 6B (158 мг) в виде аморфного порошка.

Соединение 6:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,20 (s, 3H) 3,60 (s, 3H) 3,64 (q, J=5,4 Гц, 2H) 3,77- 3,87 (m, 5H) 3,96 (s, 3H) 4,79 (t, J=5,5 Гц, 1H) 5,70 (t, J=2,0 Гц, 1H) 5,92 (d, J=1,6 Гц, 2H) 6,10 (d, J=7,9 Гц, 1H) 6,31 (d, J=7,9 Гц, 1H) 6,72 (td, J=8,5, 2,2 Гц, 1H) 6,89-6,95 (m, 2H) 7,32-7,38 (m, 1H) 7,89 (s, 1H) 8,22 (s, 1H) 11,74 (br. s., 1H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,89 мин, MH<sup>+</sup> 509.

Энантиомер 6A:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,20 (s, 3H), 3,55-3,68 (m, 5H), 3,74-3,91 (m, 5H), 3,96 (s, 3H), 4,78 (t, J=5,5 Гц, 1H), 5,70 (t, J=2,0 Гц, 1H), 5,92 (d, J=2,0 Гц, 2H), 6,10 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,29 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,67-6,76 (m, 1H), 6,88-6,96 (m, 2H), 7,36 (dd, J=8,5, 6,9 Гц, 1H), 7,89 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 11,73 (br. s., 1H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,88 мин, MH<sup>+</sup> 509.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +116,9° (с 0,278, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-A): R<sub>t</sub> 4,07 мин, MH<sup>+</sup> 509, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 6B:

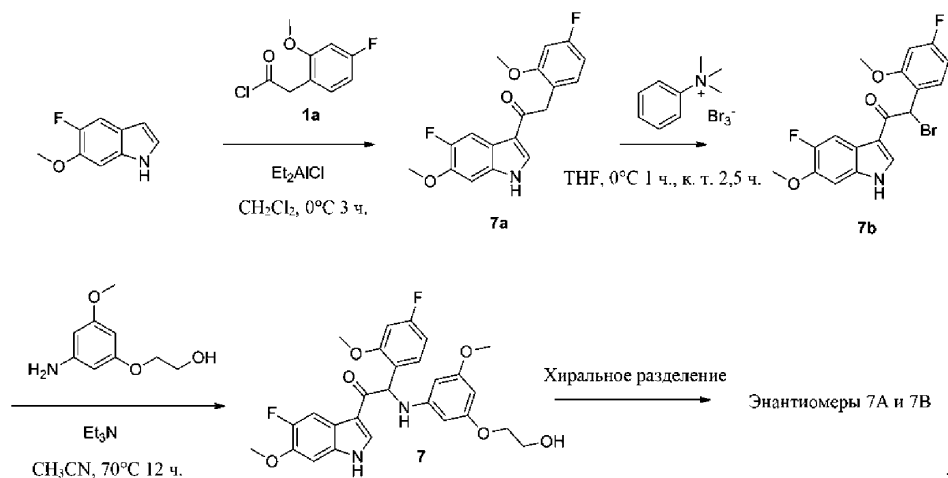
<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,20 (s, 3H), 3,55-3,67 (m, 5H), 3,75-3,90 (m, 5H), 3,96 (s, 3H), 4,78 (t, J=5,5 Гц, 1H), 5,70 (t, J=2,0 Гц, 1H), 5,92 (d, J=2,0 Гц, 2H), 6,10 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,29 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,71 (td, J=8,5, 2,4 Гц, 1H), 6,87-6,97 (m, 2H), 7,36 (dd, J=8,5, 6,9 Гц, 1H), 7,89 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 11,73 (br. s., 1H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,88 мин, MH<sup>+</sup> 509.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -118,6° (с 0,279, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-A): R<sub>t</sub> 7,13 мин, MH<sup>+</sup> 509, хиральная чистота 100%.

Пример 7. Синтез 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-6-метокси-1H-индол-3-ил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 7) и хиральное разделение на энантиомеры 7A и 7B



Синтез промежуточного соединения 7a.

Добавляли по каплям 1 М диэтилалюминийхлорид в гексане (20 мл, 20 ммоль) при 0°C к раствору 5-фтор-6-метокси-1H-индола [CAS 1211595-72-0] (2,2 г, 13,3 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 мл). Через 30 мин при 0°C медленно добавляли 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорид 1a (3,85 г, 19 ммоль, синтез: см. пример 1) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Добавляли ледяную воду и водный раствор NaHCO<sub>3</sub>. Реакционную смесь экстрагировали с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. Органический слой промывали водой, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток поглощали минимальным количеством CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Осадок отфильтровывали и высушивали с получением 2-4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-6-метокси-1H-индол-3-ил)этанона 7a (3,2 г).

Синтез промежуточного соединения 7b.

Добавляли по каплям при 0°C раствор фенилтриметиламмонийтрибромида [CAS 4207-56-1] (3,22 г, 8,56 ммоль) в THF (80 мл) к смеси 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-6-метокси-1H-индол-3-ил)этанона 7a (2,7 г, 8,15 ммоль) в THF (80 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Осадок отфильтровывали, промывали EtOAc и водой и высушивали с получением первой партии 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-6-метокси-1H-индол-3-ил)этанона 7b (1,5 г). Органический слой фильтрата отделяли, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный в результате остаток поглощали минимальным количеством CH<sub>3</sub>CN и диизопропилового эфира. Осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме с получением второй партии 7b (1,7 г).

Синтез соединения 7 и хиральное разделение на энантиомеры 7A и 7B.

Смесь 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-6-метокси-1H-индол-3-ил)этанона 7b (0,8 г, 1,95 ммоль), 2-(3-амино-5-метоксифенокси)этанол [CAS 725237-16-1] (0,39 г, 2,15 ммоль) и триэтиламина (0,54 мл, 3,9 ммоль) в THF (5 мл) и CH<sub>3</sub>CN (5 мл) перемешивали при 70°C в течение 12 ч. Остаток разбавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O. Органический слой отделяли, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенное соединение очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 40 г в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (99/1/0,1)). Фракции, содержащие соединение 7, объединяли и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток растворяли в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и промывали 1н. HCl. Органический слой отделяли, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель концентрировали при пониженном давлении. Вторую очистку осуществляли посредством обращенно-фазовой HPLC (неподвижная фаза: X-Bridge®-C18 5 мкм 30×150 мм, подвижная фаза: градиент от 60% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,5%/40% MeOH до 0% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,5%/100% MeOH) с получением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-6-метокси-1H-индол-3-ил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 7, 350 мг) в виде рацемической смеси. Энантиомеры разделяли посредством препаративной хиральной SFC (неподвижная фаза: Chiralpak® IC 5 мкм, 250×30 мм, подвижная фаза: 60% CO<sub>2</sub>, 40% MeOH) с получением 70 мг соединения 2 в виде рацемической смеси, 104 мг первого элюируемого энантиомера и 100 мг второго элюируемого энантиомера. Первый элюируемый энантиомер кристаллизовали из CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O с получением энантиомера 7A (76 мг). Второй элюируемый энантиомер кристаллизовали из CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O с получением энантиомера 7B (62 мг).

Соединение 7:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,56-3,68 (m, 5H), 3,76-3,88 (m, 5H), 3,95 (s, 3H), 4,78 (t, J=5,4 Гц, 1H), 5,70 (s, 1H), 5,92 (s, 2H), 6,11 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,35 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,4, 2,0 Гц,

1H), 6,92 (dd, J=11,0, 1,9 Гц, 1H), 7,14 (d, J=7,6 Гц, 1H), 7,36 (t, J=7,7 Гц, 1H), 7,81 (d, J=12,0 Гц, 1H), 8,33 (s, 1H), 11,93 (br. s., 1H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,74 мин, MH<sup>+</sup> 513.

Энантиомер 7A:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,59-3,67 (m, 5H), 3,77-3,88 (m, 5H), 3,95 (s, 3H), 4,78 (t, J=5,5 Гц, 1H), 5,71 (t, J=1,6 Гц, 1H), 5,92 (d, J=1,6 Гц, 2H), 6,11 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,35 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,4, 2,2 Гц, 1H), 6,92 (dd, J=11,3, 2,2 Гц, 1H), 7,14 (d, J=7,3 Гц, 1H), 7,31-7,41 (m, 1H), 7,81 (d, J=11,7 Гц, 1H), 8,33 (s, 1H), 11,71-12,11 (m, 1H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,74 мин, MH<sup>+</sup> 513.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +85,7° (с 0,28, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-B): R<sub>t</sub> 1,87 мин, MH<sup>+</sup> 513, хиральная чистота 100%.

Температура плавления: 226°C.

Энантиомер 7B:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,58-3,66 (m, 5H), 3,76-3,87 (m, 5H), 3,95 (s, 3H), 4,78 (t, J=5,5 Гц, 1H), 5,70 (t, J=1,6 Гц, 1H), 5,92 (d, J=1,6 Гц, 2H), 6,11 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,35 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,4, 2,2 Гц, 1H), 6,92 (dd, J=11,3, 2,2 Гц, 1H), 7,14 (d, J=7,3 Гц, 1H), 7,36 (t, J=7,7 Гц, 1H), 7,81 (d, J=11,7 Гц, 1H), 8,33 (s, 1H), 11,92 (br. s., 1H).

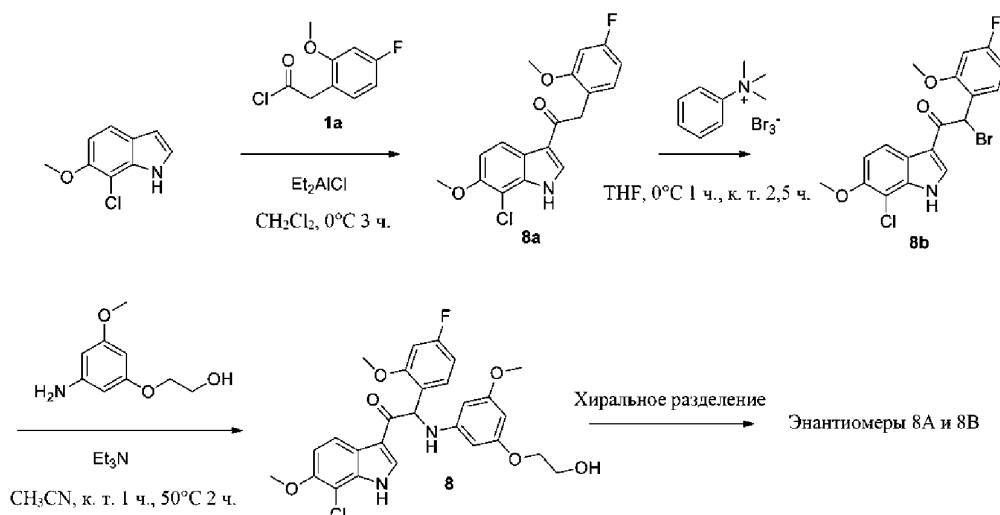
LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,74 мин, MH<sup>+</sup> 513.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -87,6° (с 0,283, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-B): R<sub>t</sub> 3,24 мин, MH<sup>+</sup> 513, хиральная чистота 100%.

Температура плавления: 226°C.

Пример 8. Синтез 1-(7-хлор-6-метокси-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 8) и хиральное разделение на энантиомеры 8A и 8B



Синтез промежуточного соединения 8a.

Добавляли по каплям 1 М диэтилалюминийхлорид в гексане (16,5 мл, 16,5 ммоль) при 0°C к раствору 7-хлор-6-метокси-1H-индола [CAS 1227604-21-8] (2 г, 11 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 мл). Через 30 мин при 0°C медленно добавляли 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорид 1a (3,3 г, 16,3 ммоль, синтез: см. пример 1) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Добавляли ледяную воду и осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали под вакуумом с получением 1-(7-хлор-6-метокси-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 8a (2,7 г).

Синтез промежуточного соединения 8b.

Добавляли по каплям при 0°C раствор фенилтриметиламмонийтрибромид [CAS 4207-56-1] (3,06 г, 8,15 ммоль) в THF (80 мл) к смеси 1-(7-хлор-6-метокси-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 8a (2,7 г, 7,76 ммоль) в THF (80 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Осадок отфильтровывали, промывали EtOAc. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, снова солюбилизировали в EtOAc и промывали водой. Органический слой отделяли, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный в результате остаток поглощали минимальным количеством CH<sub>3</sub>CN и диизопропилового эфира. Осадок отфильтровывали и высушивали под вакуумом с получением 2-бром-1-(7-хлор-6-метокси-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 8b (3,2 г).

Синтез соединения 8 и хиральное разделение на энантиомеры 8A и 8B.

Смесь 2-бром-1-(7-хлор-6-метокси-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона **8b** (2 г, 4,69 ммоль), 2-(3-амино-5-метоксифенокси)этанол [CAS 725237-16-1] (0,86 г, 4,69 ммоль) и триэтиламина (1,3 мл, 9,4 ммоль) в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (100 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем при  $50^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 80 г) в толуоле/2-пропанол/ $\text{NH}_4\text{OH}$  (90/10/0,1) с обеспечением 800 мг неочищенного соединения **8**. Часть этой партии кристаллизовали из диизопропилового эфира с получением первой партии 1-(7-хлор-6-метокси-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения **8**, 90 мг). Очистку оставшегося материала на основе неочищенного соединения **8** осуществляли посредством колоночной хроматографии (неподвижная фаза: диоксид кремния без покрытия с частицами неправильной формы 40 г, подвижная фаза: 0,3%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 97%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 3%  $\text{MeOH}$  с получением соединения **8** (500 мг) в виде рацемической смеси. Энантимеры разделяли посредством хиральной SFC (неподвижная фаза: Chiralpak® IC 5 мкм,  $250 \times 30$  мм, подвижная фаза: 55%  $\text{CO}_2$ , 45%  $\text{MeOH}$ ) с получением 184 мг первого элюируемого энантиомера и 190 мг второго элюируемого энантиомера. Первый элюируемый энантиомер кристаллизовали из гептана/диизопропилового эфира/ $\text{CH}_3\text{CN}$  с получением энантиомера **8A** (135 мг) в виде аморфного твердого вещества. Второй элюируемый энантиомер кристаллизовали из гептана/диизопропилового эфира/ $\text{CH}_3\text{CN}$  с получением энантиомера **8B** (150 мг) в виде аморфного твердого вещества.

Соединение **8**:

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 3,59-3,67 (m, 5H), 3,77-3,90 (m, 5H), 3,95 (s, 3H), 4,78 (t,  $J=5,4$  Гц, 1H), 5,71 (s, 1H), 5,94 (d,  $J=1,6$  Гц, 2H), 6,14 (d,  $J=8,2$  Гц, 1H), 6,35 (d,  $J=7,9$  Гц, 1H), 6,72 (td,  $J=8,5, 2,2$  Гц, 1H), 6,93 (dd,  $J=11,3, 2,2$  Гц, 1H), 7,10 (d,  $J=8,8$  Гц, 1H), 7,32-7,40 (m, 1H), 8,04 (d,  $J=8,8$  Гц, 1H), 8,33 (s, 1H), 12,16 (br. s., 1H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,89 мин,  $\text{MH}^+$  529.

Энантиомер **8A**:

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 3,54-3,68 (m, 5H), 3,73-3,90 (m, 5H), 3,95 (s, 3H), 4,78 (t,  $J=5,6$  Гц, 1H), 5,71 (t,  $J=2,0$  Гц, 1H), 5,94 (d,  $J=2,0$  Гц, 2H), 6,14 (d,  $J=8,1$  Гц, 1H), 6,36 (d,  $J=8,1$  Гц, 1H), 6,72 (td,  $J=8,5, 2,3$  Гц, 1H), 6,93 (dd,  $J=11,1, 2,3$  Гц, 1H), 7,10 (d,  $J=8,6$  Гц, 1H), 7,36 (dd,  $J=8,6, 7,1$  Гц, 1H), 8,04 (d,  $J=8,6$  Гц, 1H), 8,33 (s, 1H), 12,03-12,26 (m, 1H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,88 мин,  $\text{MH}^+$  529  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ :  $+84,3^\circ$  (с 0,267, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-C):  $R_t$  4,82 мин,  $\text{MH}^+$  529, хиральная чистота 100%.

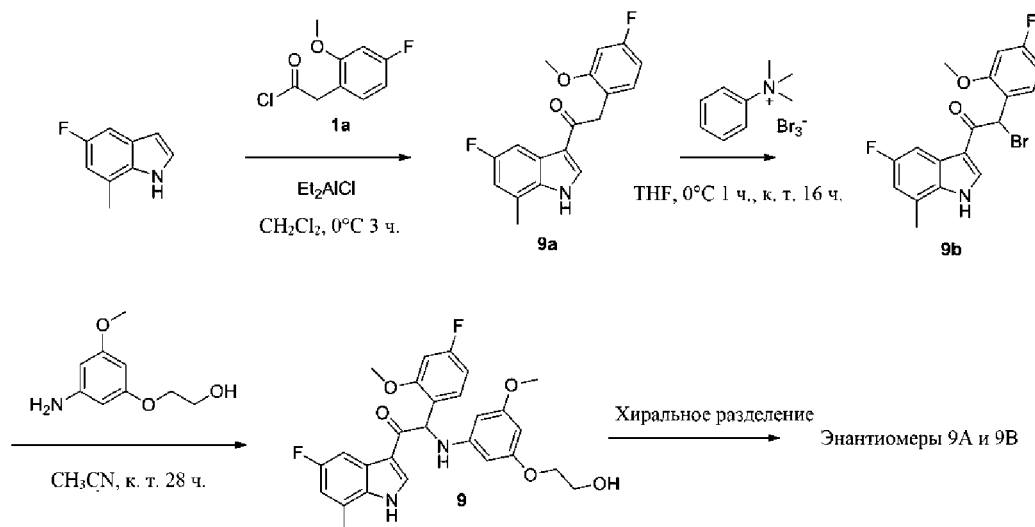
Энантиомер **8B**:

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 3,58-3,68 (m, 5H), 3,76-3,90 (m, 5H), 3,95 (s, 3H), 4,78 (t,  $J=5,6$  Гц, 1H), 5,71 (s, 1H), 5,94 (s, 2H), 6,14 (d,  $J=8,1$  Гц, 1H), 6,35 (d,  $J=8,1$  Гц, 1H), 6,72 (td,  $J=8,5, 2,3$  Гц, 1H), 6,93 (dd,  $J=11,1, 2,3$  Гц, 1H), 7,10 (d,  $J=8,6$  Гц, 1H), 7,31-7,41 (m, 1H), 8,04 (d,  $J=8,6$  Гц, 1H), 8,33 (s, 1H), 12,06-12,31 (m, 1H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,88 мин,  $\text{MH}^+$  529  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ :  $-84,7^\circ$  (с 0,268, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-C):  $R_t$  6,42 мин,  $\text{MH}^+$  529, хиральная чистота 99,36%.

Пример 9. Синтез 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения **9**) и хиральное разделение на энантимеры **9A** и **9B**



Синтез промежуточного соединения **9a**.

Добавляли по каплям 1 М диэтилалюминийхлорид в гексане (22 г, 22 ммоль) при  $0^\circ\text{C}$  к раствору 5-фтор-7-метил-1H-индола [CAS 1082041-52-8] (1,62 г, 10,9 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (45 мл). Через 30 мин при



0°C медленно добавляли раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорида 1a (3,3 г, 16,3 ммоль, синтез: см. пример 1) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Добавляли раствор сегнетовой соли (1н., 75 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Осадок отфильтровывали и распределяли между EtOAc и 1н. HCl. Органическую фазу промывали 1н. HCl и солевым раствором, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток поглощали минимальным количеством EtOAc. Осадок отфильтровывали с получением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 9a (2,4 г).

Синтез промежуточного соединения 9b.

Добавляли по каплям раствор фенилтриметиламмонийтрибромид [CAS 4207-56-1] (2,2 г, 5,85 ммоль) в THF (60 мл) при 0°C к раствору 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 9a (1,66 г, 5,26 ммоль) в THF (45 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение ночи. Осадок отфильтровывали и промывали EtOAc. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 9b (1,9 г).

Синтез соединения 9 и хиральное разделение на энантиомеры 9A и 9B.

Смесь 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 9b (0,202 г, 0,512 ммоль) и 2-(3-амино-5-метоксифеноксид)этанол [CAS 725237-16-1] (0,468 г, 2,554 ммоль) в CH<sub>3</sub>CN (2 мл) и THF (2 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 28 ч. Реакционную смесь добавляли EtOAc и промывали 1н. HCl. Органическую фазу промывали водным насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и солевым раствором, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (10 г) с использованием градиента (от 10 до 40%) EtOAc в гептане. Фракции, содержащие ожидаемое соединение, объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с EtOAc и гептаном с получением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(5-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 9, 147 мг) в виде рацемической смеси.

Хиральное разделение соединения 9 (430 мг) осуществляли посредством препаративной SFC (неподвижная фаза: Chiralcel® OD-H 5 мкм 250×20 мм, подвижная фаза: 55% CO<sub>2</sub>, 45% MeOH) с получением 198 мг первого элюируемого энантиомера и 188 мг второго элюируемого энантиомера. Первый элюируемый энантиомер кристаллизовали из CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/диизопропилового эфира с получением энантиомера 9A (138 мг). Второй элюируемый энантиомер кристаллизовали из CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/диизопропилового эфира с получением энантиомера 9B (151 мг).

Соединение 9:

<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,47 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,62-3,67 (m, 2H), 3,77-3,89 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 4,79 (t, J=5,1 Гц, 1H), 5,71(t, J=2,0 Гц, 1H), 5,94 (d, J=2,0 Гц, 2H), 6,14 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,35 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,69-6,73 (m, 1H), 6,89-6,95 (m, 2H), 7,34-7,39 (m, 1H), 7,63-7,67 (m, 1H), 8,45 (s, 1H), 12,21 (br. s., 1H).

LC/MS (способ LC-D): Время удерживания 3,9 мин, MH<sup>+</sup> 497

Энантиомер 9A:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,47 (s, 3H), 3,52-3,67 (m, 5H), 3,76-3,89 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 4,72-4,83 (m, 1H), 5,71 (br. s., 1H), 5,94 (s, 2H), 6,15 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,36 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,69-6,77 (m, 1H), 6,90-6,97 (m, 2H), 7,36 (t, J=7,9 Гц, 1H), 7,62-7,69 (m, 1H), 8,44 (s, 1H), 12,21 (br. s., 1H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,92 мин, MH<sup>+</sup> 497 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -80,0° (с 0,436, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-D): R<sub>t</sub> 2,14 мин, MH<sup>+</sup> 497, хиральная чистота 100%.

Температура плавления: 181°C.

Энантиомер 9B:

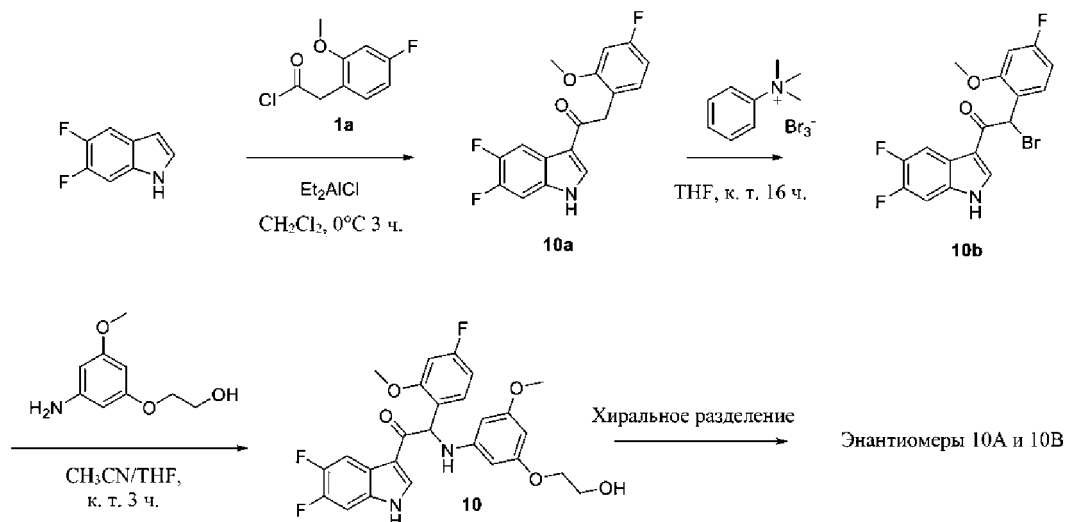
<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,47 (s, 3H), 3,53-3,68 (m, 5H), 3,74-3,88 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 4,78 (t, J=5,4 Гц, 1H), 5,66-5,73 (m, 1H), 5,94 (s, 2H), 6,15 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,36 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,0, 1,6 Гц, 1H), 6,85-6,98 (m, 2H), 7,36 (t, J=8,0 Гц, 1H), 7,65 (dd, J=9,5, 1,6 Гц, 1H), 8,44 (s, 1H), 12,04-12,43 (m, 1H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,93 мин, MH<sup>+</sup> 497 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +81,1° (с 0,388, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-D): R<sub>t</sub> 3,45 мин, MH<sup>+</sup> 497, хиральная чистота 100%.

Температура плавления: 179°C.

Пример 10. Синтез 1-(5,6-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 10) и хиральное разделение на энантиомеры 10А и 10В



Синтез промежуточного соединения 10а.

Добавляли по каплям 1 М диэтилалюминийхлорид в гексане (9,8 мл, 9,8 ммоль) при 0°C к раствору 5,6-дифтор-1H-индола [CAS 169674-01-5] (1,00 г, 6,5 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12 мл). Через 30 мин при 0°C медленно добавляли раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорида 1а (1,99 г, 9,8 ммоль, синтез: см. пример 1) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Добавляли 1 М раствор сегнетовой соли и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Образовавшиеся твердые вещества отфильтровывали и распределяли между EtOAc и 1н. HCl. Фазы разделяли. Органический слой промывали солевым раствором, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 1-(5,6-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 10а (1,26 г).

Синтез промежуточного соединения 10b.

Раствор фенилтриметиламмонийтрибромида [CAS 4207-56-1] (1,63 г, 4,34 ммоль) в THF (5 мл) добавляли по каплям при 0°C к раствору 1-(5,6-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 10а (1,26 г, 3,95 ммоль) в THF (35 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Осадок отфильтровывали и промывали EtOAc. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток поглощали минимальным количеством ацетонитрила. Осадок отфильтровывали, промывали ацетонитрилом и высушивали под вакуумом с получением 2-бром-1-(5,6-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 10b (0,758 г).

Синтез соединения 10 и хиральное разделение на энантиомеры 10А и 10В.

Смесь 2-бром-1-(5,6-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)этанона 10b (0,758 г, 1,90 ммоль) и 2-(3-амино-5-метоксифенокси)этанол [CAS 725237-16-1] (0,746 г, 4,07 ммоль) в THF (10 мл) и CH<sub>3</sub>CN (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 3 дней. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток распределяли между EtOAc и 1н. HCl. Фазы разделяли. Водную фазу экстрагировали с помощью EtOAc. Органические фазы объединяли, промывали водным насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и солевым раствором, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (15-100%) в гептане. Фракции, содержащие соединение 10, объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Вторую очистку осуществляли посредством обращенно-фазовой HPLC (неподвижная фаза: X-Bridge®-C18 5 мкм 19×100 мм, подвижная фаза: градиент от 80% муравьиной кислоты 0,1%/20% CH<sub>3</sub>CN до 10% муравьиной кислоты 0,1%/90% CH<sub>3</sub>CN) с получением 1-(5,6-дифтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 10, 499 мг) в виде рацемической смеси.

Энантиомеры соединения 10 (459 мг) разделяли посредством препаративной хиральной SFC (неподвижная фаза: Chiralcel® OD-H 5 мкм 250×30 мм, подвижная фаза: 60% CO<sub>2</sub>, 40% MeOH) с получением 208 мг первого элюируемого энантиомера и 221 мг второго элюируемого энантиомера. Первый элюируемый энантиомер отверждали из гептана с получением энантиомера 10А (168 мг). Второй элюируемый энантиомер отверждали из гептана с получением энантиомера 10В (174 мг).

Соединение 10:

<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,55-3,70 (m, 5H), 3,83 (m, 2H), 3,94 (s, 3H), 4,79 (t, J=5,5 Гц, 1H), 5,72 (s, 1H), 5,93 (d, J=1,9 Гц, 2H), 6,13 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,38 (d, J=8,3 Гц, 1H), 6,73 (td, J=8,5, 2,3 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,3, 2,3 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,5, 7,0 Гц, 1H), 7,54 (dd, J=10,7, 7,0 Гц, 1H), 8,00 (dd, J=10,9,

8,3 Гц, 1H), 8,47 (s, 1H), 12,17 (s, 1H).

LC/MS (способ LC-E): Время удерживания 8,3 мин,  $MH^+$  501.

Энантиомер 10A:

$^1H$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 12,17 (br. s., 1H), 8,47 (s, 1H), 7,99 (dd,  $J=11,0, 8,2$  Гц, 1H), 7,53 (dd,  $J=10, 6, 7,1$  Гц, 1H), 7,36 (t,  $J=7,7$  Гц, 1H), 6,92 (dd,  $J=11,3, 2,2$  Гц, 1H), 6,73 (td,  $J=8,5, 2,2$  Гц, 1H), 6,38 (d,  $J=7,9$  Гц, 1H), 6,13 (d,  $J=7,9$  Гц, 1H), 5,93 (s, 2H), 5,71 (br. s, 1H), 4,79 (t,  $J=5,5$  Гц, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,82 (m, 2H), 3,57-3,67 (m, 5H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,89 мин,  $MH^+$  501.

$[\alpha]_D^{20}$ : -86,4° (с 0,5727, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-E):  $R_t$  2,97 мин,  $MH^+$  501, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 10B:

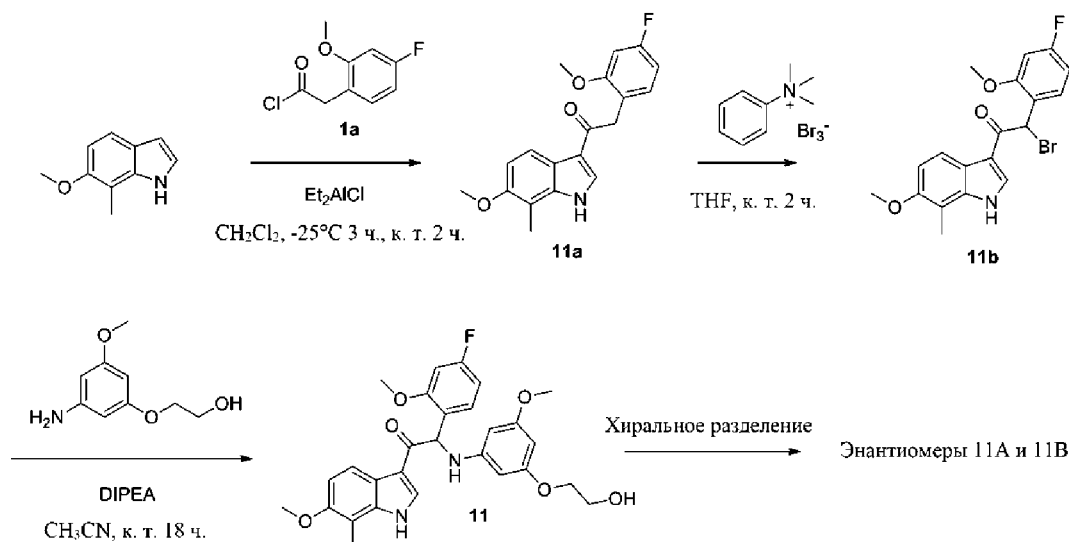
$^1H$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 12,17 (br. s., 1H), 8,47 (s, 1H), 7,99 (dd,  $J=10,9, 8,4$  Гц, 1H), 7,53 (dd,  $J=10, 6, 7,1$  Гц, 1H), 7,36 (t,  $J=7,7$  Гц, 1H), 6,92 (dd,  $J=11,3, 1,6$  Гц, 1H), 6,73 (t,  $J=7,7$  Гц, 1H), 6,38 (d,  $J=8,2$  Гц, 1H), 6,13 (d,  $J=7,9$  Гц, 1H), 5,93 (s, 2H), 5,71 (br. s, 1H), 4,79 (t,  $J=5,5$  Гц, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,77-3,88 (m, 2H), 3,58-3,67 (m, 5H).

LC/MS (способ LC-C): Время удерживания 2,89 мин,  $MH^+$  501.

$[\alpha]_D^{20}$ : +90,7° (с 0,5227, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-E):  $R_t$  4,67 мин,  $MH^+$  501, хиральная чистота 100%.

Пример 11. Синтез 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)-1-(6-метокси-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона (соединения 11) и хиральное разделение на энантиомеры 11A и 11B



Синтез промежуточного соединения 11a.

Добавляли по каплям 1 М диэтилалюминийхлорид в гексане (40,8 мл, 40,8 ммоль) при  $-25^\circ\text{C}$  к раствору 6-метокси-7-метил-1H-индола [CAS 19500-05-1] (4,39 г, 27,2 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 мл) в атмосфере  $\text{N}_2$ . После перемешивания в течение 15 мин при  $-25^\circ\text{C}$  добавляли по каплям раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорида 1a (7,72 г, 38,1 ммоль, синтез: см. пример 1) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 мл) при  $-25^\circ\text{C}$ . Перемешивание продолжали при  $-25^\circ\text{C}$  в течение 1 ч и затем обеспечивали нагревание реакционной смеси до комнатной температуры при перемешивании в течение 2 ч. Реакционную смесь вливали в ледяную воду/раствор сегнетовой соли, и, после перемешивания в течение некоторого времени, твердые вещества удаляли посредством фильтрации через Dicalite® и осадок на фильтре промывали несколько раз небольшими количествами THF. Фазы разделяли и водный слой экстрагировали с помощью THF. Объединенные органические слои промывали солевым раствором, высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Твердый остаток суспендировали в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 мл). Твердые вещества отфильтровывали, промывали небольшими количествами  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и высушивали под вакуумом при  $50^\circ\text{C}$  с получением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-метокси-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона 11a (7,5 г).

Синтез промежуточного соединения 11b.

Раствор фенилтриметиламмонийтрибромида [CAS 4207-56-1] (5,8 г, 15,5 ммоль) в THF (200 мл) добавляли по каплям при  $0^\circ\text{C}$  к раствору 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-метокси-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона 11a (4,95 г, 14,1 ммоль) в THF (200 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Осадок отфильтровывали и промывали THF. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с небольшим количеством  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Осадок отфильтровывали, промывали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и высушивали под вакуумом с получением 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-метокси-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона 11b (4,04 г).

Синтез соединения 11 и хиральное разделение на энантиомеры 11А и 11В.

Смесь 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(6-метокси-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона 11b (1434 мг, 3,78 ммоль) и 2-(3-амино-5-метоксифеноксид)этанол [CAS 725237-16-1] (1037 мг, 5,66 ммоль) и диизопропилэтиламина (976 мкл, 5,66 ммоль) в CH<sub>3</sub>CN (100 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток распределяли между CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и 0,5н. HCl. Фазы разделяли. Органический слой промывали водой, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: Biotage® SNAP Ultra 100 г, подвижная фаза: EtOAc:EtOH (3:1)/гептан, градиент от 0/100 до 60/40). Фракции, содержащие соединение 11, объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)-1-(6-метокси-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона (соединения 11, 995 мг) в виде рацемической смеси.

Хиральное разделение энантиомеров соединения 11 (995 мг) осуществляли посредством хирального разделения с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: (S,S) Whelk-O 1 (500 г), подвижная фаза: 100% EtOH, изократическое элюирование). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали с обеспечением энантиомера 11А в качестве первого элюируемого продукта и энантиомера 11В в качестве второго элюируемого продукта.

Энантиомеры 11А дополнительно очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: Biotage® SNAP Ultra 10 г, подвижная фаза CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, градиент от 100/0 до 98/2). Фракции, содержащие продукт, объединяли, растворитель выпаривали при пониженном давлении и остаток высушивали под вакуумом при 50°C с обеспечением энантиомера 11А (255 мг) в виде аморфного белого порошка. Энантиомер 11В дополнительно очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: SNAP Ultra 10 г, подвижная фаза CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, градиент от 100/0 до 98/2). Фракции, содержащие продукт, объединяли, растворитель выпаривали при пониженном давлении и остаток высушивали под вакуумом при 50°C с обеспечением энантиомера 11В (270 мг) в виде аморфного белого порошка.

Соединение 11:

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,29 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,64 (q, J=5,2 Гц, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,80-3,90 (m, 2H), 3,97 (s, 3H), 4,77 (t, J=5,4 Гц, 1H), 5,71 (t, J=2,0 Гц, 1H), 5,94 (d, J=2,0 Гц, 2H), 6,13 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,32 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,71 (td, J=8,5, 2,5 Гц, 1H), 6,92 (dd, J=11,3, 2,4 Гц, 1H), 6,94 (d, J=8,8 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,6, 6,9 Гц, 1H), 7,93 (d, J=8,9 Гц, 1H), 8,31 (d, J=2,9 Гц, 1H), 11,83 (d, J=3,1 Гц, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,10 мин, MH<sup>+</sup> 509.

Энантиомер 11А:

<sup>1</sup>H ЯМР (360 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,29 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,64 (q, J=5,4 Гц, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,80-3,89 (m, 2H), 3,97 (s, 3H), 4,79 (t, J=5,5 Гц, 1H), 5,70 (t, J=2,0 Гц, 1H), 5,94 (d, J=2,2 Гц, 2H), 6,13 (d, J=7,7 Гц, 1H), 6,34 (d, J=7,7 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,4, 2,6 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 6,94 (d, J=8,8 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H), 7,93 (d, J=8,8 Гц, 1H), 8,32 (br s, 1H), 11,85 (br s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,05 мин, MH<sup>+</sup> 509 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +98,8° (c 0,5285, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-F): R<sub>t</sub> 2,26 мин, MH<sup>+</sup> 509, хиральная чистота 100%.

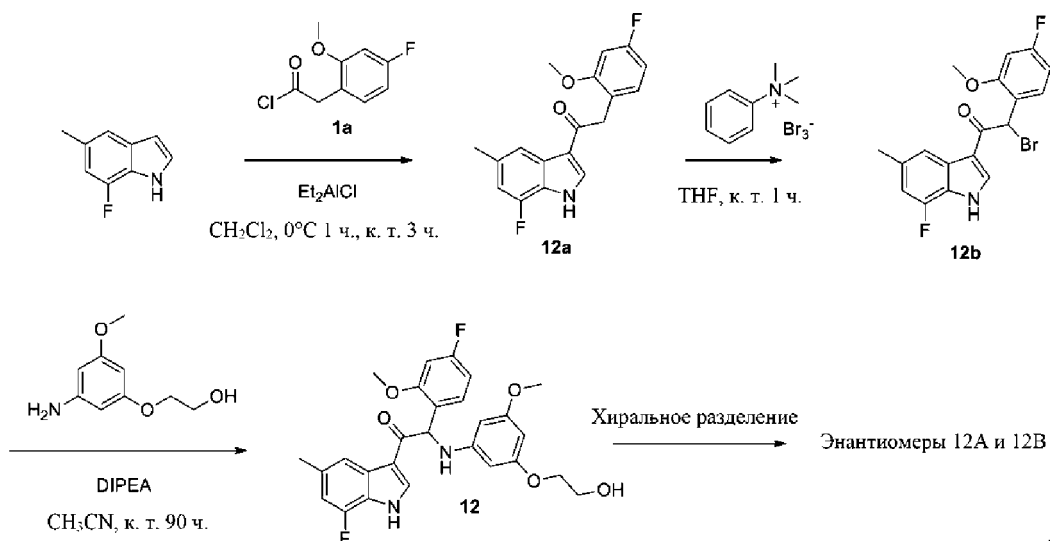
Энантиомер 11В:

<sup>1</sup>H ЯМР (360 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,29 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,64 (q, J=5,1 Гц, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,80-3,90 (m, 2H), 3,97 (s, 3H), 4,79 (t, J=5,5 Гц, 1H), 5,70 (t, J=2,0 Гц, 1H), 5,94 (d, J=2,2 Гц, 2H), 6,13 (d, J=8,1 Гц, 1H), 6,34 (d, J=8,1 Гц, 1H), 6,72 (td, J=8,4, 2,6 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,5, 2,4 Гц, 1H), 6,94 (d, J=8,8 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,8, 7,0 Гц, 1H), 7,93 (d, J=8,4 Гц, 1H), 8,32 (br s, 1H), 11,85 (br s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,05 мин, MH<sup>+</sup> 509 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -94,1° (c 0,461, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-F): R<sub>t</sub> 2,73 мин, MH<sup>+</sup> 509, хиральная чистота 100%.

Пример 12. Синтез 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(7-фтор-5-метил-1Н-индол-3-ил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 12) и хиральное разделение на энантиомеры 12А и 12В



Синтез промежуточного соединения 12а.

Добавляли по каплям 1 М диэтилалюминийхлорид в гексане (25,6 мл, 25,6 ммоль) при 0°C к раствору 7-фтор-5-метил-1Н-индола [CAS442910-91-0] (2,54 г, 17,0 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 мл) в атмосфере N<sub>2</sub>. После перемешивания в течение 30 мин при 0°C добавляли по каплям раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетилхлорида 1а (5,2 г, 25,6 ммоль, синтез: см. пример 1) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 мл) при 0°C. Перемешивание продолжали при 0°C в течение 1 ч и затем обеспечивали нагревание реакционной смеси до комнатной температуры при перемешивании в течение 3 ч. Реакционную смесь вливали в ледяную воду/раствор сегнетовой соли, и, после перемешивания в течение некоторого времени, твердые вещества удаляли посредством фильтрации через Dicalite® и осадок на фильтре промывали несколько раз небольшими количествами THF. Фазы разделяли и водный слой экстрагировали с помощью THF. Объединенные органические слои промывали солевым раствором, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Твердый остаток суспендировали в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл). Твердые вещества отфильтровывали, промывали небольшими количествами CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/гептана (1/1) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(7-фтор-5-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 12а (4,13 г).

Синтез промежуточного соединения 12b.

Раствор фенилтриметиламмонийтрибромид [CAS 4207-56-1] (5,39 г, 14,3 ммоль) в THF (150 мл) добавляли по каплям при 0°C к раствору 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(7-фтор-5-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 12а (4,11 г, 13,0 ммоль) в THF (100 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Осадок отфильтровывали и промывали THF. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с небольшим количеством CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Осадок отфильтровывали, промывали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и высушивали под вакуумом при 50°C с получением 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(7-фтор-5-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 12b (4,81 г).

Синтез соединения 12 и хиральное разделение на энантиомеры 12А и 12В.

Смесь 2-бром-2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(7-фтор-5-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 12b (1096 мг, 2,78 ммоль) и 2-(3-амино-5-метоксифенокси)этанола [CAS 725237-16-1] (764 мг, 4,17 ммоль) и диизопропилэтиламина (718 мкл, 4,17 ммоль) в CH<sub>3</sub>CN (25 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 90 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток распределяли между CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и 0,5н. HCl. Фазы разделяли. Органический слой промывали водой, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (неподвижная фаза: Biotage® SNAP Ultra 100 г, подвижная фаза: EtOAc: EtOH (3:1)/гептан, градиент от 0/100 до 50/50). Фракции, содержащие соединение 12, объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением 2-(4-фтор-2-метоксифенил)-1-(7-фтор-5-метил-1Н-индол-3-ил)-2-((3-(2-гидроксиэтокси)-5-метоксифенил)амино)этанона (соединения 12, 919 мг) в виде рацемической смеси.

Хиральное разделение энантиомеров соединения 12 (919 мг) осуществляли посредством препаративной SFC (неподвижная фаза: Chiralcel® Diacel® OD 20×250 мм, подвижная фаза: CO<sub>2</sub>, EtOH с 0,2% iPrNH<sub>2</sub>). Фракции, содержащие продукт, объединяли, выпаривали и высушивали под вакуумом при 50°C с обеспечением энантиомера 12А (307 мг) в качестве первого элюируемого продукта и энантиомера 12В (302 мг) в качестве второго элюируемого продукта. Оба энантиомера представлены в виде аморфных

белых порошков.

Соединение 12:

LC/MS (способ LC-A): Время удерживания 1,08 мин, МН<sup>+</sup> 497.

Энантиомер 12А:

<sup>1</sup>H ЯМР (360 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,39 (s, 3H), 3,62 (s, 3H), 3,65 (q, J=5,4 Гц, 2H), 3,77-3,90 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 4,80 (t, J=5,5 Гц, 1H), 5,72 (t, J=2,0 Гц, 1H), 5,95 (d, J=2,2 Гц, 2H), 6,15 (d, J=8,1 Гц, 1H), 6,35 (d, J=8,1 Гц, 1H), 6,74 (td, J=8,5, 2,4 Гц, 1H), 6,92 (dd, J=12,1, 1,1 Гц, 1H), 6,94 (dd, J=11,3, 2,2 Гц, 1H), 7,37 (dd, J=8,8, 7,0 Гц, 1H), 7,79 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 12,48 (br s, 1H).

LC/MS (способ LC-B): Время удерживания 1,98 мин, МН<sup>+</sup> 497.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -113,5° (с 0,355, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-K): R<sub>t</sub> 2,26 мин, МН<sup>+</sup> 497, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 12В:

<sup>1</sup>H ЯМР (360 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,38 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,64 (q, J=5,1 Гц, 2H), 3,77-3,89 (m, 2H), 3,94 (s, 3H), 4,79 (t, J=5,5 Гц, 1H), 5,71 (t, J=1,8 Гц, 1H), 5,94 (d, J=1,8 Гц, 2H), 6,15 (d, J=8,1 Гц, 1H), 6,34 (d, J=7,7 Гц, 1H), 6,73 (td, J=8,5, 2,4 Гц, 1H), 6,91 (br d, J=12,1 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,3, 2,6 Гц, 1H), 7,36 (dd, J=8,4, 7,0 Гц, 1H), 7,78 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 12,46 (br s, 1H).

LC/MS (способ LC-B): Время удерживания 1,98 мин, МН<sup>+</sup> 497 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +117,0° (с 0,448, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-K): R<sub>t</sub> 3,67 мин, МН<sup>+</sup> 497, хиральная чистота 100%.

Противовирусная активность соединений по настоящему изобретению.

Противовирусный анализ в отношении DENV-2.

Тестировали противовирусную активность всех соединений по настоящему изобретению против штамма DENV-2 16681, который метили усиленным зеленым флуоресцентным белком (eGFP). Среда для культивирования состоит из минимальной поддерживающей среды, дополненной 2% термически инактивированной околуплодной сывороткой теленка, 0,04% гентамицином (50 мг/мл) и 2 мМ L-глутамином. Клетки Vero, полученные из ECACC, суспендировали в среде для культивирования и добавляли по 25 мкл в 384-луночные планшеты (2500 клеток/луночка), которые уже содержали противовирусные соединения. Как правило, эти планшеты содержали 4-кратное серийное разведение, состоящее из 9 этапов разведения, тестируемого соединения в 200-кратной конечной концентрации в 100% DMSO (200 нл). Кроме того, тестировали каждую концентрацию соединения в четырех параллельных анализах (конечная концентрация варьировала в диапазоне 25-0,00038 мкМ). В результате каждый планшет содержал лунки, которые принимали за вирусные контрольные образцы (содержащие клетки и вирус при отсутствии соединения), клеточные контрольные образцы (содержащие клетки при отсутствии вируса и соединения) и контрольные образцы со средой (содержащие среду при отсутствии клеток, вируса и соединений). В случае с лунками, которые принимали за контрольный образец со средой, добавляли 25 мкл среды для культивирования взамен клеток Vero. После того, как клетки добавляли в планшеты, планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, что позволило клеткам равномерно распространиться в лунках. Далее планшеты инкубировали в полностью увлажненном инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) до следующего дня. Затем штамм DENV-2 16681, меченый eGFP, добавляли при множественности инфекции (MOI), равной 0,5. Следовательно, 15 мкл вирусной суспензии добавляли во все лунки, содержащие тестируемое соединение, и во все лунки, которые принимали за вирусный контрольный образец. Параллельно добавляли 15 мкл среды для культивирования к контрольному образцу со средой и клеточному контрольному образцу. Далее планшеты инкубировали в течение 3 дней в полностью увлажненном инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). В день считывания измеряли флуоресценцию eGFP с применением автоматизированного флуоресцентного микроскопа при 488 нм (голубой лазер). Применяя служебную систему LIMS, рассчитывали дозу ингибирования кривой отклика для каждого соединения и определяли полумаксимальную эффективную концентрацию (EC<sub>50</sub>). Следовательно, рассчитывали процент ингибирования (I) для каждой тестируемой концентрации с применением следующей формулы:  $I = 100 * (S_T - S_{CC}) / (S_{VC} - S_{CC})$ ; при этом S<sub>T</sub>, S<sub>CC</sub> и S<sub>VC</sub> представляют собой количества сигнала eGFP в тестируемом соединении, лунках клеточного контрольного образца и вирусного контрольного образца, соответственно. EC<sub>50</sub> представляет собой концентрацию соединения, при которой репликация вируса ингибируется на 50%, что измерено с помощью 50% восстановления интенсивности флуоресценции eGFP по сравнению с вирусным контрольным образцом. Рассчитывали EC<sub>50</sub> с применением линейной интерполяции (табл. 1).

Параллельно оценивали токсичность соединений в одних и тех же планшетах. После того как проводили считывание сигнала eGFP, во все лунки 384-луночных планшетов добавляли 10 мкл резазурина, красителя, регистрирующего жизнеспособность клеток. Анализ с резазурином основан на восстановлении голубого резазурина с помощью NADH, продуцирующегося клетками, в сильный флуоресцентный продукт резорурфин. Образование розового флуоресцентного резорурфина непосредственно связано с количеством жизнеспособных клеток в лунке. Планшеты инкубировали в течение дополнительных 5 ч в полностью увлажненном инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Далее планшеты измеряли на сверхчувствительном считывающем устройстве (Tecan) с применением длины волны возбуждения в пределах 530 нм. Также

определяли полумаксимальную эффективную концентрацию ( $CC_{50}$ ), определенную как концентрацию, необходимую для уменьшения превращения резазурина на 50% по сравнению с лунками клеточного контрольного образца (табл. 1). В результате определяли индекс избирательности (SI) для соединений, который рассчитывали, как указано ниже:  $SI = CC_{50} / EC_{50}$ .

Таблица 1  
 $EC_{50}$ ,  $CC_{50}$  и SI для соединений по настоящему изобретению в противовирусном анализе в отношении DENV-2

№ соединения	$EC_{50}$ (мкМ)	N	$CC_{50}$ (мкМ)	N	SI	N
1	0,0080	4	11	4	>1564	4
1A	0,0038	5	8,4	4	2100	4
1B	0,66	5	12	5	18	5
2	0,0054	4	7,0	4	1291	4
2A	0,66	5	5,4	4	8,1	4
2B	0,0022	5	5,3	4	2581	4
3	0,0021	3	6,3	4	2915	3
3A	0,0007 7	6	4,1	5	5120	5
3B	0,18	5	5,8	5	32	5
4A	0,0016	4	5,9	4	3698	4
4B	0,38	4	7,7	4	20	4
5	0,0089	4	5,2	4	586	4
5A	0,44	5	7,4	4	17	4
5B	0,0025	3 0	6,5	30	2673	29
6A	0,0027	9	7,5	8	2968	8
6B	0,29	5	9,6	5	33	5
7	0,014	4	> 9,7	4	1049	4
7A	0,0046	6	> 8,6	5	1864	5
7B	0,54	5	14	5	39	5
8	0,0039	4	6,8	4	1733	4
8A	0,0010	7	8,6	6	10020	6
8B	0,15	5	9,1	6	59	5
9	0,0094	4	7,5	4	794	4
9A	0,63	6	8,8	5	14	5
9B	0,0034	6	5,5	5	1575	5
10	0,0068	3	9,3	3	1362	3
10A	0,58	3	11	3	19	3
10B	0,0027	3	6,9	2	2565	2
11	0,0024	3	10	2	4455	2
11A	0,0008 1	3	8,9	3	10981	3
11B	0,41	3	12	3	28	3
12A	0,93	3	9,2	3	10	3
12B	0,0051	3	5,5	3	1063	3

N = количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

Количественный PCR-анализ с обратной транскриптазой (RT-qPCR) в отношении квадрилентной вакцины.

#### Протокол А.

Тестировали противовирусную активность соединений по настоящему изобретению против штамма DENV-1 TC974#666 (NCPV), штамма DENV-2 16681, штамма DENV-3H87 (NCPV) и штамма DENV-4 H241 (NCPV) и EDEN (SG/06K2270DK1/2005; номер доступа в GenBank QG398256) в анализе RT-qPCR. В связи с чем, клетки Vero инфицировали или с помощью штамма DENV-1, или -2, или -3, или -4 в присутствии или отсутствии тестируемых соединений. На 3 день после инфицирования клетки лизировали и клеточные лизаты применяли для получения кДНК как для вируса-мишени (3'UTR DENV; табл. 2), так и эталонного гена клетки ( $\beta$ -актин, табл. 2). Впоследствии, осуществляли дуплексную ПЦР в реальном времени на приборе Lightcycler480. Генерируемый уровень  $C_p$  является обратно пропорциональным по отношению к количеству экспрессируемой РНК для этих мишеней. Ингибирование репликации DENV с помощью тестируемого соединения привело к сдвигу  $C_p$  гена 3'UTR. С другой стороны, если тестируемое соединение является токсичным по отношению к клеткам, то будет наблюдаться похожий эффект и в отношении экспрессии  $\beta$ -актина. Сравнительный метод  $\Delta C_p$  применяют для вычисления  $EC_{50}$ , который основан на относительной генной экспрессии гена-мишени (3'UTR), нормализованного конститутивным

геном клетки ( $\beta$ -актин). Кроме того, определяли уровни  $CC_{50}$  на основании уровней  $C_p$ , полученных для гена "домашнего хозяйства"  $\beta$ -актина.

Таблица 2

Праймеры и зонды, применяемые для количественной RT-PCR в реальном времени

Праймер/зонд	Мишень	Последовательность <sup>a, b</sup>
F3utr258	3'-UTR DENV	5'-CGGTTAGAGGAGACCCCTC-3'
R3utr425	3'-UTR DENV	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTC-3'
F3utr343	3'-UTR DENV	<b>FAM</b> -5'-AAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCTC-3'- <b>BHQ1</b>
Factin743	$\beta$ -актин	5'-GGCCAGGTCATCACCATT-3'
Ractin876	$\beta$ -актин	5'-ATGTCCACGTCACACTTCATG-3'
Factin773	$\beta$ -актин	<b>HEX</b> -5'-TTCCGCTGCCCTGAGGCTCTC-3'- <b>BHQ1</b>

<sup>a</sup> Элементы указанных красителей (FAM, HEX) и гасителей люминесценции (BHQ1) выделены жирным и курсивом.

<sup>b</sup> Выбирали нуклеотидную последовательность праймеров и зондов из консервативной области в 3'UTR области генома вируса денге на основании выравнивания 300 нуклеотидных последовательностей четырех серотипов денге, зарегистрированных в Genbank (Gong et al., 2013, Methods Mol Biol, Chapter 16).

Среда для культивирования состояла из минимальной поддерживающей среды, дополненной 2% термически инактивированной околплодной сывороткой теленка, 0,04% гентамицином (50 мг/мл) и 2 мМ L-глутамином. Клетки Vero, полученные из ECACC, суспендировали в среде для культивирования и добавляли по 75 мкл/лунка в 96-луночные планшеты (10000 клеток/лунка), которые уже содержали противовирусные соединения. Как правило, эти планшеты содержали 4-кратное серийное разведение, состоящее из 9 этапов разведения тестируемого соединения в 200-кратной конечной концентрации в 100% DMSO (500 нл; конечная концентрация варьировала в диапазоне 25-0,00038 мкМ). Кроме того, каждый планшет содержал лунки, которые принимали за вирусные контрольные образцы (содержащие клетки и вирус при отсутствии соединения), клеточные контрольные образцы (содержащие клетки при отсутствии вируса и соединения). После размещения клеток в планшетах, планшеты инкубировали в полностью увлажненном инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) до следующего дня. Затем добавляли штамм DENV-1 TC974#666, штамм DENV-2 16681, штамм DENV-3H87 или штаммы DENV-4 H241 или EDEN. Следовательно, 25 мкл вирусной суспензии, где  $C_p \sim 22$  получали в RT-qPCR, добавляли во все лунки, содержащие тестируемое соединение, и во все лунки, которые принимали за вирусный контрольный образец. Параллельно добавляли 25 мкл среды для культивирования к клеточным контрольным образцам. Далее планшеты инкубировали в течение 3 дней в полностью увлажненном инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Через 3 дня удаляли надосадочную жидкость из лунки и дважды промывали клетки ледяным PBS (~100 мкл). Сгустки клеток в 96-луночных планшетах хранили при -80°C в течение по меньшей мере 1 дня. Далее экстрагировали РНК с применением набора для лизирования Cells-to-CT™ согласно нормам изготовителя (Applied Biosystems). Клеточные лизаты можно было хранить при -80°C или сразу же применять на этапе обратной транскрипции.

При получении на этапе обратной транскрипции получали смесь А (табл. 3А) и распределяли по 7,57 мкл/лунка в 96-луночном планшете. После добавления 5 мкл клеточных лизатов осуществляли пятиминутный этап денатурации при 75°C (табл. 3В). Позже добавляли 7,43 мкл смеси В (табл. 3С) и инициировали этап обратной транскрипции (таблица 3D) для образования кДНК.

В результате получали RT-qPCR смесь, в смесь С (табл. 4А), распределенную в 96-луночных планшетах для qPCR LightCycler, добавляли 3 мкл кДНК и осуществляли qPCR на LightCycler 480 согласно условиям в табл. 4В.

Применяя программное обеспечение LightCycler и служебную систему LIMS, рассчитали дозу ингибирования кривой отклика для каждого соединения и определяли полумаксимальную эффективную концентрацию ( $EC_{50}$ ) и полумаксимальную эффективную концентрацию ( $CC_{50}$ ) (табл. 6-9).



## Синтез кДНК с применением смеси А, денатурации, смеси В и обратной транскрипции

**Смесь А**

**А**

Пластины	8					
Образцы	828				Об. реакционной смеси (мкл)	20
Элемент смеси	Концентрация			Объем (мкл)		
	Единица измерения	Исходная	Конечная	1 образец	x образцов	
Milli-Q H <sub>2</sub> O				7,27	6019,56	
R3utr425	μM	20	0,27	0,15	124,20	
Ractin876	μM	20	0,27	0,15	124,20	
				Объем смесь/лунка (мкл)	7,57	
				Клеточные лизаты	5,00	

**В** Этап денатурации:

Этап	Температура	Время
Денатурация	75°C	5'
Удержание	4°C	удержание

**С** Смесь В

Образцы	864				
Элемент смеси	Концентрация			Объем (мкл)	
	Единица измерения	Исходная	Конечная	1 образец	x образцов
Буфер 2 Expand HIFI	X	10,00	1,00	2,00	1728,0
MgCl <sub>2</sub>	мМ	25,00	3,50	2,80	2419,2
dNTP	мМ	10,00	1,00	2,00	1728,0
Ингибитор РНК-азы	U/мкл	40,00	1,00	0,50	432,0
Expand RT	U/мкл	50,00	0,33	0,13	112,3
				Общий объем смеси (мкл)	7,43

**Д** Протокол синтеза кДНК

Этап	Температура	Время
Обратная транскрипция	42°C	30'
Денатурация	99°C	5'
Удержание	4°C	удержание

## qPCR смесь и протокол

## А Смесь С

Образцы	833			Об. реакционной смеси (мкл)	25
Элемент смеси	Концентрация			Объем (мкл)	x образцов
		Исходная	Конечная	1 образец	
H <sub>2</sub> O для PCR от Roche				7,74	6447,42
Смесь Roche 2xMM	X	2	1	12,50	10412,50
F3utr258	мкМ	20	0,3	0,38	316,54
R3utr425	мкМ	20	0,3	0,38	316,54
P3utr343	мкМ	20	0,1	0,13	108,29
Factin743	мкМ	20	0,3	0,38	316,54
Ractin876	мкМ	20	0,3	0,38	316,54
Ractin773	мкМ	20	0,1	0,13	108,29
			Объем смеси/пробирка (мкл)	22,02	
			кДНК	3,00	

## В Протокол qPCR3

Этап	Температура	Время	Скорость изменения	40 циклов
преинкуб./денат.	95°C	10 мин.	4,4	
Денатурация	95°C	10 сек.	4,4	
отжиг	58°C	1 минуты.	2,2	
Элонгация	72°C	1 сек.	4,4	
Охлаждение	40°C	10 сек.	1,5	

Количественный PCR-анализ с обратной транскриптазой (RT-qPCR) в отношении квадрилентной вакцины.

## Протокол В.

Клетки Vero ( $4 \times 10^4$ ) высевали в 96-луночные планшеты. Через день среду для культивирования клеток заменяли 100 мкл среды для количественного определения, содержащей 2x, 3x или 5x серийное разведение соединения (концентрация варьировала в диапазонах 50-0,00038 мкг/мл, 50-0,0076 мкг/мл и 50-0,00013 мкг/мл соответственно) и 100 мкл разведения вируса денге, где Ct~20 получали в RT-qPCR. После 2-часового инкубационного периода 3 раза промывали клеточный монослой средой для количественного определения с удалением остаточного не адсорбированного вируса и дополнительно инкубировали в течение или 4 дней (DENV-2 NGC-Tongalike), или 7 дней (эталонный штамм DENV-1 Djibouti D1/Н/ИМТССА/98/606, штамм DENV-3Н87, штамм DENV-4 Н241') в присутствии ингибитора. Собирали надосадочную жидкость и определяли РНК нагрузку с помощью количественной RT-PCR в реальном времени. 50% эффективную концентрацию (EC<sub>50</sub>), которую определяют как концентрацию соединения, которая необходима для ингибирования репликации РНК на 50%, определяли с применением логарифмической интерполяции (табл. 7 и 8).

РНК выделяли из 100 мкл надосадочной жидкости с помощью набора NucleoSpin 96 Virus (Filter Service, Дюрен, Германия), как описано производителем. Последовательности праймеров TaqMan (DENV-For, DENV-Rev; таблица 5) и зондов TaqMan (DENV-Probe табл. 5) выбирали из неструктурного гена 3 (NS3) или NS5 соответствующих флавивирусов с применением программного обеспечения Primer Express (версия 2.0; Applied Biosystems, Ленник, Бельгия). Зонд TaqMan флуоресцентно метили с помощью 6-карбоксихлорофлуоресцеина (FAM) на 5'-конце в качестве указанного красителя и с малой бороздой связывающего вещества (MGB) на 3'-конце в качестве гасителя люминесценции (табл. 5). Проводили одноэтапную количественную RT-PCR в общем объеме 25 мкл с содержанием 13,9375 мкл H<sub>2</sub>O, 6,25 мкл мастер-микса (Eurogentec, Серен, Бельгия), 0,375 мкл прямого праймера, 0,375 мкл обратного праймера,

1 мкл зонда, 0,0625 мкл обратной транскриптазы (Eurogentec) и 3 мкл образца. Проводили RT-PCR с применением ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Бренчбург, Нью-Джерси, США) и с применением следующих условий: 30 мин при 48°C и 10 мин при 95°C, после 40 циклов из 15 с при 95°C и 1 мин при 60°C. Данные анализировали с применением программного обеспечения ABI PRISM 7500 SDS (версия 1.3.1; Applied Biosystems). Для полного количественного анализа составляли стандартные кривые с применением 10-кратного разведения приготовленной матрицы с известными концентрациями.

Таблица 5  
 Праймеры и зонды, применяемые для количественной RT-PCR  
 в реальном времени

Праймер/зонд	Последовательность (5' → 3') <sup>a</sup>	Источник <sup>b</sup>	Мишень
DENV-For	TCGGAGCCGGAGTTTACAAA (SEQ ID N.7)	DENV 2 NGC	NS3
DENV-Rev	TCTTAACGTCCGCCCATGAT (SEQ ID N.8)		
Зонд DENV	<b>FAM</b> -ATTCCACACAATGTGGCAT- <b>MGB</b> (SEQ ID N.9)		
DenS	GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT (SEQ ID N.10)	DENV-1, -3, -4	NS5
DenAS1-3	CATTCCATTTTCTGGCGTTC (SEQ ID N.11)	DENV-1, -3	
DenAS4	CAATCCATCTTGGCGGCTC (SEQ ID N.12)	DENV-4	
Зонд DEN_1-3	<b>FAM</b> -CAGCATCATTCAGGCACAG- <b>MGB</b> (SEQ ID N.13)	DENV-1, -3	
Зонд DEN_4	<b>FAM</b> -CAACATCAATCCAGGCACAG- <b>MGB</b> (SEQ ID N.14)	DENV-4	

<sup>a</sup> Элементы указанного красителя (FAM) и гасителя люминесценции (MGB/TAMRA) выделены жирным и курсивом.

<sup>b</sup> Нуклеотидную последовательность праймеров и зондов в геноме выводили из нуклеотидной последовательности DENV 2 NGC (№ доступа в GenBank M29095; Irie et al., 1989), серотипа 1 вируса денге штамма Djibouti D1/H/IMTSSA/98/606 (№ доступа в Genbank AF298808), серотипа 3 вируса денге эталонного штамма H87 (с93130), серотипа 4 вируса денге штамма H241 (нет доступных последовательностей).

Цитотоксический анализ (протокол В).

Оценивали потенциальные цитотоксические эффекты соединений в неинфицированных клетках Vero. Клетки высевали при  $4 \times 10^4$  клеток/лунка в 96-луночный планшет при двух-, трех- или пятикратных серийных разведениях (в диапазоне 50-0,0038 мкг/мл, 50-0,0076 мкг/мл и 50-0,0013 мкг/мл соответственно) соединения и инкубировали в течение от 4 до 7 дней. Отбирали среду для культивирования и 100 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий/феназинметосульфата (MTS/PMS; Promega, Лейден, Нидерланды) в PBS добавляли в каждую лунку. После 2-часового инкубационного периода при 37°C определяли плотность клеток при 498 нм. Рассчитывали цитотоксическую активность с применением следующей формулы: % жизнеспособных клеток =  $100 \times (OD_{\text{Compound}}/OD_{\text{CC}})$ , где  $OD_{\text{Compound}}$  и  $OD_{\text{CC}}$  соответствуют оптической плотности при 498 нм неинфицированных культур клеток, обработанных с помощью соединения, и неинфицированных необработанных культур клеток соответственно. 50% цитотоксическую концентрацию (т.е. концентрацию, которая уменьшает общее количество клеток до 50%;  $CC_{50}$ ) рассчитывали с применением линейной интерполяции (табл. 7 и 8).

Таблица 6  
 EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> и SI для соединений против серотипа 1  
 в анализах RT-qPCR

Протокол А						
RT-qPCR серотипа 1 TC974#666						
№ соединения	EC50 (мкМ)	N	CC50 (мкМ)	N	SI	N
1A	0,018	6	8,7	5	447	5
2B	0,013	3	3,6	3	261	3
3A	0,016	3	4,1	3	224	3
4A	0,020	3	5,9	3	280	3
5B	0,027	3	6,3	3	224	3
6A	0,016	3	5,4	3	327	3
7A	0,029	3	3,8	3	129	3
8A	0,032	3	10	3	291	3
9B	0,019	3	3,8	3	175	3
10B	0,016	3	3,8	3	261	3
11A	0,020	3	6,3	2	307	2
12B	0,020	3	5,0	3	230	3
Протокол В						
RT-qPCR серотипа 1 Djibouti						
№ соединения	EC50 (мкМ)	N	CC50 (мкМ)	N	SI	N
1A	0,040	3	13	5	333	2
2B	0,041	3	9,2	6	265	3
3A	0,045	3	7,6	6	144	2
4A	0,027	3	9,7	6	325	2
5B	0,065	3	12	7	172	3
6A	0,021	3	9,7	9	341	3
7A	0,055	3	16	5	308	2
8A	0,049	3	9,6	8	206	3
9B	0,042	3	8,8	6	263	3
10B	0,052	2	7,3	5	141	2
11A	0,023	2	11	5	534	2
12B	0,096	3	9,4	8	97	3

N = количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

Таблица 7  
 EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> и SI для соединений против серотипа 2  
 в анализах RT-qPCR

Протокол А						
RT-qPCR серотипа 2 16681						
№ соединения	EC50 (мкМ)	N	CC50 (мкМ)	N	SI	N
1A	0,0032	6	12	6	4043	6
2B	0,0023	3	4,9	3	1700	3
3A	0,00079	4	4,2	4	5745	4
4A	0,0016	3	13	3	7510	3
5B	0,0036	3	3,6	3	1087	3
6A	0,0017	6	4,1	6	2535	6
7A	0,0034	4	4,3	4	1316	4
8A	0,00090	4	10	4	11745	4
9B	0,0032	4	3,7	4	1180	4
10B	0,0032	3	6,5	3	1818	3
11A	0,00084	5	7,2	6	9329	5
12B	0,0081	3	4,7	3	520	3

Протокол В						
RT-qPCR серотипа 2 NGC-Tongalike						
№ соединения	EC50 (мкМ)	N	CC50 (мкМ)	N	SI	N
1A	0,0010	3	13	3	11200	1
2B	0,00081	3	15	3	18500	3
3A	<0,00028	5	13	4	46900	4
4A	<0,00029	3	18	3	109414	1
5B	0,00044	3	11	3	30000	1
6A	<0,00035	5	17	3	39200	3
7A	0,0016	3	18	3	9980	1
8A	<0,00024	4	NA		NA	
9B	0,00080	2	14	2	17500	2
10B	0,0016	3	11	3	6750	3
11A	0,00068	3	12	3	17600	1
12B	0,0017	3	14	3	8070	3

N = количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

NA - не подтверждено.

Таблица 8

EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> и SI для соединений против серотипа 3  
в анализах RT-qPCR

Протокол А						
RT-qPCR серотипа 3 Н87						
№ соединения	EC50 (мкМ)	N	CC50 (мкМ)	N	SI	N
1A	0,12	6	4,4	5	38	5
2B	0,11	3	> 2,5	1	> 32	1
3A	0,088	3	2,2	2	23	2
4A	0,14	3	3,6	3	22	3
5B	0,19	3	3,4	3	20	3
6A	0,13	3	3,1	2	27	2
7A	0,19	3	3,9	2	24	2
8A	0,20	3	5,8	2	41	2
9B	0,19	3	> 2,5	1	> 12	1
10B	0,13	3	2,3	3	18	3
11A	0,085	3	3,7	3	44	3
12B	0,27	3	2,8	3	11	3

Протокол В						
RT-qPCR серотипа 3 Н87						
№ соединения	EC50 (мкМ)	N	CC50 (мкМ)	N	SI	N
1A	0,053	3	13	5	207	3
2B	0,042	3	9,2	6	188	1
3A	0,032	4	7,6	6	232	4
4A	0,016	3	9,7	6	443	3
5B	0,050	3	12	7	212	3
6A	0,020	5	9,7	9	484	4
7A	0,041	3	16	5	339	3
8A	0,029	5	9,6	8	324	5
9B	0,066	3	8,8	6	109	1
10B	<0,022	3	7,3	5	>337	3
11A	0,040	3	11	5	261	3
12B	0,077	4	9,4	8	133	4

N = количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

Таблица 9  
 EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> и SI для соединений против серотипа 4  
 в анализах RT-qPCR

Протокол А						
RT-qPCR серотипа 4 H241						
№ соединения	EC50 (мкМ)	N	CC50 (мкМ)	N	SI	N
1A	0,48	6	9,0	7	16	6
2B	0,32	3	3,7	3	11	3
3A	0,24	5	2,8	4	12	4
4A	0,40	4	7,0	4	17	4
5B	0,45	3	2,5	3	5	3
6A	0,20	6	2,8	6	15	6
7A	0,47	4	2,4	3	4	3
8A	0,52	4	6,6	3	15	3
9B	0,39	4	2,9	4	7	4
10B	0,39	3	4,5	2	7	2
11A	0,35	5	5,1	4	15	4
12B	0,29	3	5,0	3	20	3

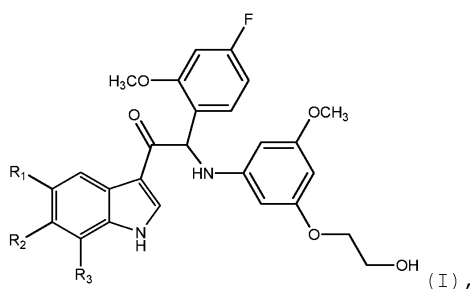
  

Протокол А						
RT-qPCR серотипа 4 EDEN						
№ соединения	EC50 (мкМ)	N	CC50 (мкМ)	N	SI	N
1A	0,012	6	12	6	1066	6
2B	0,011	4	4,9	4	416	4
3A	0,016	3	4,1	3	261	3
4A	0,016	4	6,7	4	422	4
5B	0,024	4	5,6	4	223	4
6A	0,013	4	6,6	4	506	4
7A	0,023	4	4,5	4	184	4
8A	0,021	4	6,8	4	311	4
9B	0,020	4	4,9	4	236	4
10B	0,020	4	6,0	4	284	4
11A	0,015	5	4,8	3	235	3
12B	0,017	3	3,8	3	219	3

N = количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

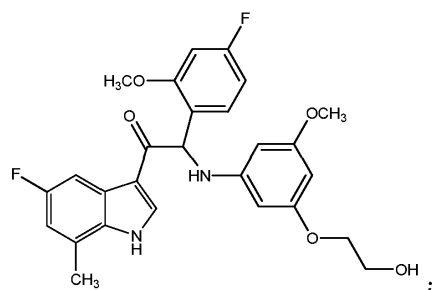
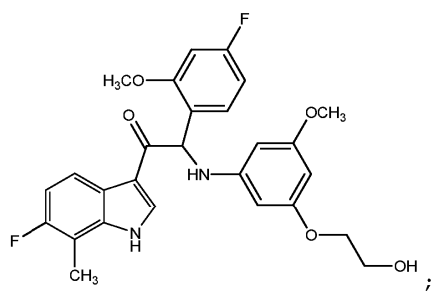
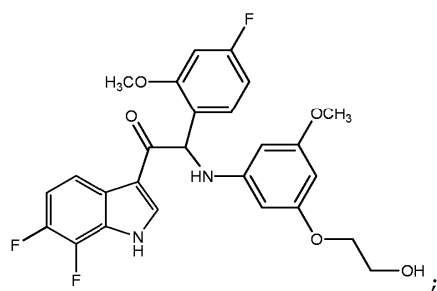
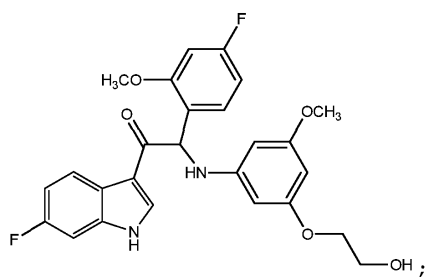
### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### 1. Соединение формулы (I)

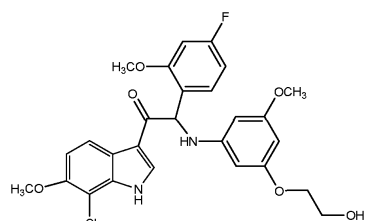
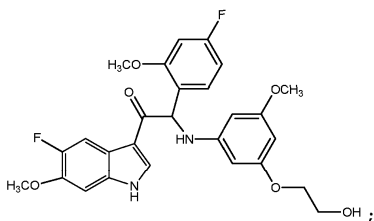
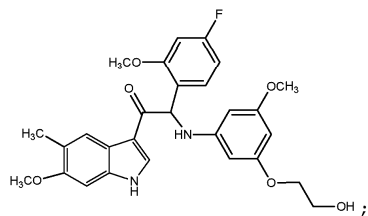
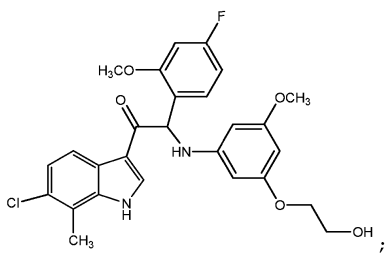


или его фармацевтически приемлемая соль, где указанное соединение выбрано из группы, где R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой F и R<sub>3</sub> представляет собой H, F или CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой F или CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> представляет собой OCH<sub>3</sub> и R<sub>3</sub> представляет собой H; R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой Cl и R<sub>3</sub> представляет собой H или CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой F, R<sub>2</sub> представляет собой H и R<sub>3</sub> представляет собой CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой OCH<sub>3</sub> и R<sub>3</sub> представляет собой Cl; R<sub>1</sub> представляет собой F, R<sub>2</sub> представляет собой F и R<sub>3</sub> представляет собой H; R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой OCH<sub>3</sub> и R<sub>3</sub> представляет собой CH<sub>3</sub> или R<sub>1</sub> представляет собой CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> представляет собой H и R<sub>3</sub> представляет собой F.

2. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, где указанное соединение выбрано из группы:

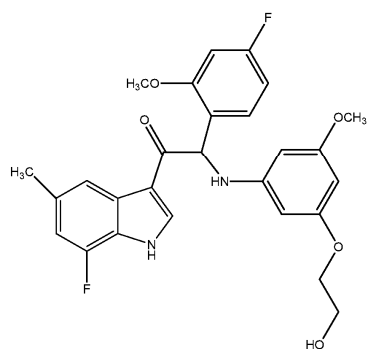
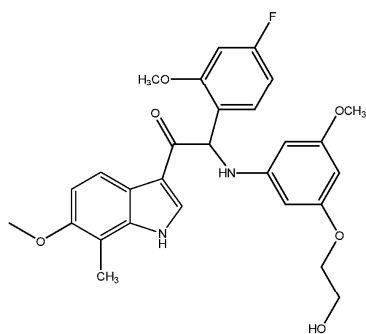
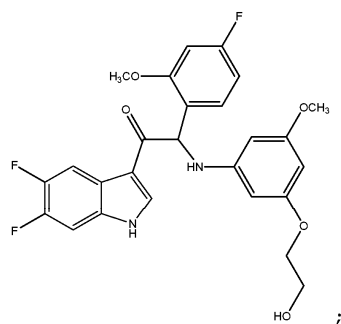
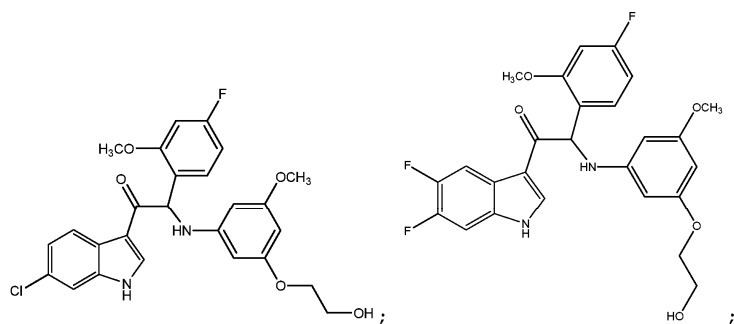


033845



ИЛИ



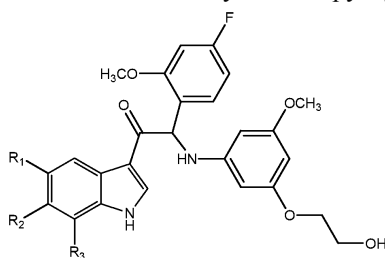


ИЛИ

3. Фармацевтическая композиция для лечения денге, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль по п.1 или 2 вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

4. Применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 в качестве лекарственного препарата для лечения денге.

5. Применение соединения, представленного следующей структурной формулой (I):



или его фармацевтически приемлемой соли, где указанное соединение выбрано из группы, где  $R_1$  представляет собой H,  $R_2$  представляет собой F и  $R_3$  представляет собой H, F или  $CH_3$ ;  $R_1$  представляет собой F или  $CH_3$ ,  $R_2$  представляет собой  $OCH_3$  и  $R_3$  представляет собой H;  $R_1$  представляет собой H,  $R_2$  представляет собой Cl и  $R_3$  представляет собой H или  $CH_3$ ;  $R_1$  представляет собой F,  $R_2$  представляет собой H и  $R_3$  представляет собой  $CH_3$ ;  $R_1$  представляет собой H,  $R_2$  представляет собой  $OCH_3$  и  $R_3$  представляет собой Cl;  $R_1$  представляет собой F,  $R_2$  представляет собой F и  $R_3$  представляет собой H;  $R_1$  представляет собой H,  $R_2$  представляет собой  $OCH_3$  и  $R_3$  представляет собой  $CH_3$  или  $R_1$  представляет собой  $CH_3$ ,  $R_2$  представляет собой H и  $R_3$  представляет собой F, для ингибирования репликации вируса(ов) денге в биологическом образце или у пациента.

