

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035679**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.24

(51) Int. Cl. **C07D 209/12** (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890723

(22) Дата подачи заявки
2016.09.15

(54) **ПРОИЗВОДНЫЕ МОНО- ИЛИ ДИЗАМЕЩЕННЫХ ИНДОЛОВ В КАЧЕСТВЕ
ИНГИБИТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСОВ ДЕНГЕ**

(31) **15185522.8; 16163465.4**

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

(32) **2015.09.16; 2016.04.01**

(33) **EP**

(43) **2018.08.31**

(86) **PCT/EP2016/071852**

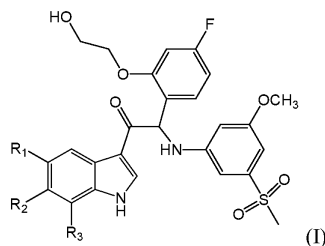
(87) **WO 2017/046258 2017.03.23**

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

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

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

(57) Изобретение относится к производным моно- или дизамещенных индолов, способам предупреждения или лечения вирусных инфекций, вызванных вирусом денге, путем применения этих соединений, а также относится к этим соединениям для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно для применения в качестве лекарственного средства для лечения или предупреждения вирусных инфекций, вызванных вирусом денге. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям или комбинированным препаратам на основе соединений, к композициям или средствам для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно для предупреждения или лечения вирусных инфекций, вызванных вирусом денге.

**B1****035679****035679****B1**

Настоящее изобретение относится к производным моно- или дизамещенных индолов, способам предупреждения или лечения вирусных инфекций, вызванных вирусом денге путем применения этих соединений, а также относится к этим соединениям для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно для применения в качестве лекарственного средства для лечения или предупреждения вирусных инфекций, вызванных вирусом денге. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям или комбинированным препаратам на основе соединений, к композициям или средствам для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно для предупреждения или лечения вирусных инфекций, вызванных вирусом денге.

Предпосылки изобретения

Флавивирусы, которые переносятся комарами или клещами, являются причиной опасных для жизни инфекций у человека, таких как энцефалит и геморрагическая лихорадка. Известны четыре различных, но тесно связанных серотипа флавивируса, вызывающего денге, так называемые DENV1, -2, -3 и -4. Денге эндемична для большинства тропических и субтропических регионов всего мира, преимущественно для городских и полугородских районов. Согласно Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2,5 миллиарда людей, из которых 1 миллиард детей, подвержены риску инфицирования DENV (ВОЗ, 2002). По оценкам ежегодно во всем мире регистрируют от 50 до 100 миллионов случаев вспышек лихорадки денге [DF], полмиллиона случаев заболевания денге в тяжелой форме (т.е. геморрагической лихорадкой денге [DHF] и синдромом шока при денге [DSS]) и более чем 20000 смертей. DHF стала основной причиной госпитализации и смерти среди детей в эндемических регионах. В целом денге является наиболее распространенной причиной заболевания, вызванного арбовирусами. Из-за недавних крупных вспышек 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. Не только число случаев денге увеличивается по мере распространения заболевания в новых районах, но и вспышки демонстрируют тенденцию к более тяжелому течению.

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

Выздоровление от инфекции, вызванной одним серотипом, обеспечивает пожизненный иммунитет против данного серотипа, однако придает лишь частичную и временную защиту против последующей инфекции, вызванной одним из трех других серотипов. При последующем инфицировании другим серотипом уже существующие гетерологичные антитела образуют комплексы с вновь инфицирующим серотипом вируса денге, однако не нейтрализуют патоген. Вместо этого, как предполагают, облегчается попадание вируса в клетки, что приводит к неконтролируемой репликации вируса и повышению пиковых титров вируса. Как при первичной, так и при вторичной инфекции более высокие титры вируса ассоциированы с заболеванием денге в более тяжелой форме. Одной из причин того, что дети более подвержены заболеванию денге в тяжелой форме, чем взрослые, может быть тот факт, что материнские антитела могут легко передаваться младенцам при грудном вскармливании.

В местах распространения двух или более серотипов, которые циркулируют одновременно, также называемых регионами с повышенной эндемичностью, риск заболевания денге в тяжелой 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 возникновения геморрагической лихорадки денге (DHF) или синдрома шока при денге.

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

Недавно (декабрь 2015 года), вакцина против вируса денге, полученная Sanofi Pasteur, была впервые одобрена в Мексике. Вакцина также была одобрена в Бразилии, на Филиппинах и в Сальвадоре. Экспертиза и тестирование продолжаются в других странах, где денге является приоритетом общественного здравоохранения. Тем не менее, вакцина оставляет широкие возможности для улучшения в связи с ограниченной эффективностью, особенно против DENV-1 и -2, низкой эффективностью у субъектов, ранее не подвергавшихся воздействию флавивирусов, и слишком длительной схемой приема средства.

Несмотря на эти недостатки, вакцина является революционным продуктом в эндемических условиях, поскольку она будет предоставлять защиту большей части населения, но, вероятно, не младенцам, которые больше всех страдают от денге. Кроме того, схема приема средства и очень ограниченная эффективность у субъектов, ранее не подвергавшихся воздействию флавивирусов, делает ее непригодной и,

по-видимому, нецелесообразной/неэкономичной для путешественников из эндемических районов в районы, эндемические по денге. Упомянутые выше недостатки вакцин против вируса денге являются причиной того, почему существует потребность в противовирусном средстве для доконтактной профилактики денге.

Более того, в настоящее время отсутствуют специфические противовирусные лекарственные средства для лечения или предупреждения инфекции, вызванной вирусом лихорадки денге. Очевидно, что все еще существует большая неудовлетворенная медицинская потребность в терапевтических средствах для предупреждения или лечения вирусных инфекций у животных, более конкретно у человека, а конкретнее вирусных инфекций, вызванных флавивирусами, конкретнее вирусом денге. Крайне необходимыми являются соединения с подходящей противовирусной эффективностью, 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 фармакодинамическими свойствами.

Итак, в настоящем изобретении предусмотрены соединения, являющиеся производными моно- или дизамещенных индолов, которые проявляют высокоэффективную активность в отношении всех четырех (4) серотипов вируса денге. Также соединения в соответствии с настоящим изобретением обладают подходящим фармакокинетическим профилем и, неожиданно, данные конкретные соединения проявляют улучшенную хиральную стабильность.

Краткое описание изобретения

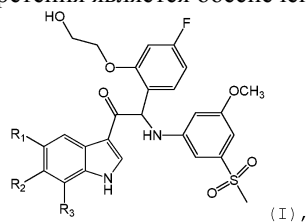
Настоящее изобретение основано на неожиданном обнаружении того, что по меньшей мере одна из вышеупомянутых проблем может быть решена с помощью представленных соединений по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении предусмотрены соединения, которые, как было показано, обладают эффективной противовирусной активностью в отношении всех четырех (4) серотипов, известных на сегодняшний день. Кроме того, в настоящем изобретении продемонстрировано, что эти соединения эффективно ингибируют пролиферацию вируса денге (DENV). Следовательно, эти соединения составляют применимый класс высокоэффективных соединений, которые можно применять в лечении и/или предупреждении вирусных инфекций у животных, млекопитающих и людей, более конкретно для лечения и/или предупреждения инфекций, вызванных вирусами денге.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению таких соединений в качестве лекарственных средств и к их применению для изготовления лекарственного средства для лечения и/или предупреждения вирусных инфекций, вызванных вирусами, принадлежащими к семейству вирусов денге, у животных или млекопитающих, конкретнее у человека. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям для лечения вирусной инфекции, вызванной вирусом денге, содержащим их в эффективном количестве.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или предупреждения вирусных инфекций, вызванных вирусом денге, у человека посредством введения эффективного количества одного или нескольких таких соединений или их фармацевтически приемлемых солей необязательно в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами, например, с другим противовирусным средством, нуждающемуся в этом пациенту.

Одним аспектом настоящего изобретения является обеспечение соединений формулы (I)



их стереоизомерной формы или фармацевтически приемлемой соли;

при этом указанное соединение выбрано из группы, где

R_1 представляет собой H, R_2 представляет собой F или Cl, а R_3 представляет собой H или CH_3 ;

R_1 представляет собой F, R_2 представляет собой F, а R_3 представляет собой H;

R_1 представляет собой CH_3 , R_2 представляет собой OCH_3 , а R_3 представляет собой H;

R_1 представляет собой CH_3 , R_2 представляет собой F, а R_3 представляет собой H;

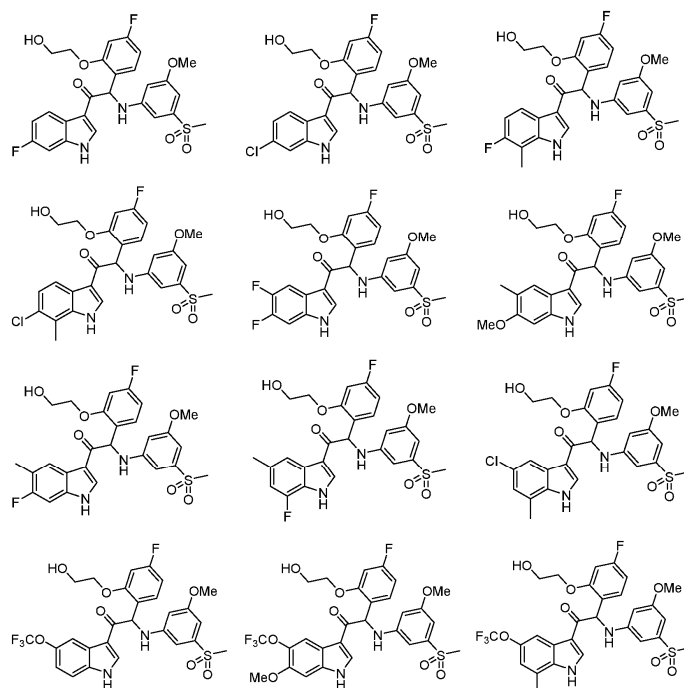
R_1 представляет собой CH_3 , R_2 представляет собой H, а R_3 представляет собой F;

R_1 представляет собой Cl, R_2 представляет собой H, а R_3 представляет собой CH_3 ;

R_1 представляет собой OCF_3 , R_2 представляет собой H или OCH_3 , а R_3 представляет собой H, и

R_1 представляет собой OCF_3 , R_2 представляет собой H, а R_3 представляет собой CH_3 .

В частности, соединения по настоящему изобретению или их стереоизомерная форма или фармацевтически приемлемая соль выбраны из следующей группы:



Частью настоящего изобретения также является фармацевтическая композиция для лечения вирусной инфекции, вызванной вирусом денге, содержащая соединение формулы (I) или его стереоизомерную форму или фармацевтически приемлемую соль вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

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

Термин "наполнитель" используется в данном документе для описания любого ингредиента, отличного от соединения(соединений) по настоящему изобретению. Выбор наполнителя в большей степени зависит от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние наполнителя на растворимость и стабильность, а также природы лекарственной формы.

Для целей введения соединения по настоящему изобретению или любая их подгруппа могут быть составлены в различные фармацевтические формы. 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. Эти фармацевтические композиции целесообразны в виде единичной лекарственной формы, подходящей, например, для перорального или ректального введения. Например, при получении композиций в виде лекарственной формы для перорального применения может использоваться любая из общепринятых фармацевтических сред, такая как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п., в случае жидких препаратов для перорального применения, таких как суспензии, сиропы, настойки, эмульсии и растворы; или твердых носителей, таких как крахмала, сахара, каолин, разбавители, смазывающие средства, связующие средства, разрыхлители и т.п., в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Благодаря своей простоте введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные единичные лекарственные формы для перорального применения, в случае которых, разумеется, используются твердые фармацевтические носители. Также включены препараты в твердой форме, которые можно преобразовать 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, используемая в данном документе, обозначает физически дискретные единицы, подходящие в качестве единичных доз, при этом каждая единица содержит предварительно заданное 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 в данном документе ниже. 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 оказаться целесообразным вводить требуемую дозу в виде двух, трех, четырех или более частей дозы с соответствующими интервалами на протяжении суток. Указанные части дозы могут быть составлены 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 применяемого соединения формулы (I), конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, подлежащего лечению, возраста, веса и общего физического состояния конкретного пациента, а также другого медикаментозного лечения, которое может получать индивидуум, что хорошо известно специалистам в данной области. Кроме того, очевидно, что эффективное количество может быть снижено или увеличено в зависимости от ответа на предлагаемое лечение субъекта и/или в зависимости от оценки врача, назначающего соединения по настоящему изобретению. Таким образом, вышеупомянутые диапазоны эффективного количества являются лишь рекомендациями и не предназначены для ограничения в той или иной мере объема или применения настоящего изобретения.

Подразумевается, что настоящее изобретение также включает любые изотопы атомов, присутствующие в соединениях по настоящему изобретению. Например, изотопы водорода включают тритий и дейтерий, а изотопы углерода включают C-13 и C-14.

Данные соединения, применяемые в настоящем изобретении, также могут существовать в своей стереохимически изомерной форме, охватывая все возможные соединения, составленные из тех же атомов, связанных с помощью такой же последовательности связей, однако имеющие разные пространственные структуры, которые не являются взаимозаменяемыми. Если не упомянуто или не указано иное, то химическое обозначение соединений охватывает смесь всех возможных стереохимически изомерных форм, которыми могут обладать указанные соединения.

Указанная смесь может содержать все диастереомеры и/или энантиомеры с основной молекулярной структурой указанного соединения. Подразумевается, что все стереохимически изомерные формы соединений, применяемых в настоящем изобретении либо в чистом виде, либо в смеси друг с другом, включены в объем настоящего изобретения, в том числе любые рацемические смеси или рацематы.

Чистые стереоизомерные формы упомянутых в данном документе соединений и промежуточных соединений определяются как изомеры, по сути не содержащие других энантиомерных или диастереомерных форм с той же основной молекулярной структурой указанных соединений или промежуточных соединений. В частности, термин 'стереоизомерно чистый' относится к соединениям или промежуточным соединениям, характеризующимся стереоизомерным избытком, составляющим по меньшей мере 80% (т.е. не менее 90% одного изомера и не более 10% других возможных изомеров), вплоть до стереоизомерного избытка 100% (т.е. 100% одного изомера и отсутствие другого), более конкретно, к соединениям или промежуточным соединениям, характеризующимся стереоизомерным избытком, составляющим от 90 до 100%, еще более конкретно, характеризующимся стереоизомерным избытком, составляющим от 94 до 100%, и наиболее конкретно, характеризующимся стереоизомерным избытком, составляющим от 97 до 100%. Термины 'энантиомерно чистый' и 'диастереомерно чистый' следует понимать аналогично, но в таком случае в отношении соответственно энантиомерного избытка и диастереомерного избытка обсуждаемой смеси.

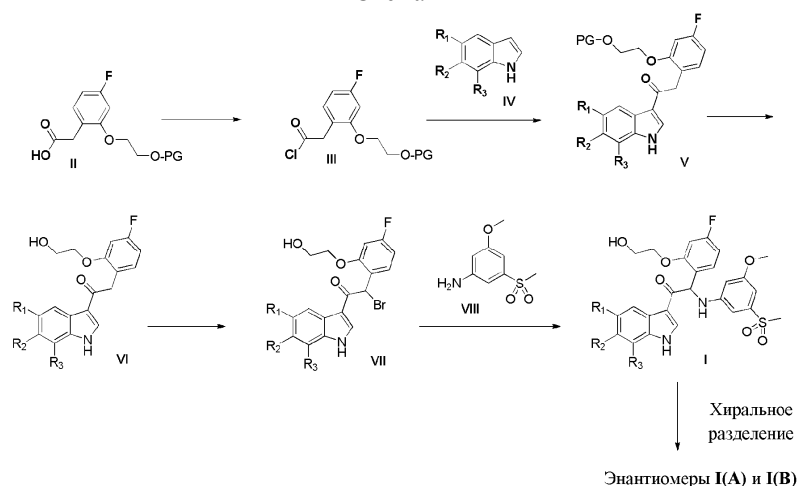
Чистые стереоизомерные формы соединений и промежуточных соединений, применяемые в настоящем изобретении, можно получить за счет применения процедур, известных из уровня техники. Например, энантиомеры можно отделять друг от друга с помощью селективной кристаллизации их диастереомерных солей с оптически активными кислотами или основаниями. Их примерами являются винная кислота, дибензоилвинная кислота, дитолоуилвинная кислота и камфорсульфоновая кислота. В качестве альтернативы энантиомеры можно разделять с помощью хроматографических методик с применением хиральных неподвижных фаз. Указанные чистые стереохимически изомерные формы также можно получить из соответствующих чистых стереохимически изомерных форм соответствующих исходных веществ при условии, что реакция протекает стереоспецифически. Предпочтительно, если требуется определенный стереоизомер, то указанное соединение будет синтезировано с помощью стереоспецифических способов получения. В данных способах преимущественно будут применяться энантиомерно чистые исходные материалы.

Общие подходы синтеза

Синтез соединений общей формулы I можно осуществлять, как изложено на схеме 1. Производное 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)уксусной кислоты общей формулы II, содержащее O-защитную группу PG гидроксильной функциональной группы (PG может представлять собой, например, O-бензильную защитную группу), можно превращать в соответствующее производное хлорангидрида общей формулы III с применением реактива для хлорирования, такого как, например, оксалилхлорид или тионилхлорид. Реакцию Фриделя-Крафтса хлорангидрида общей формулы III с замещенным индолом

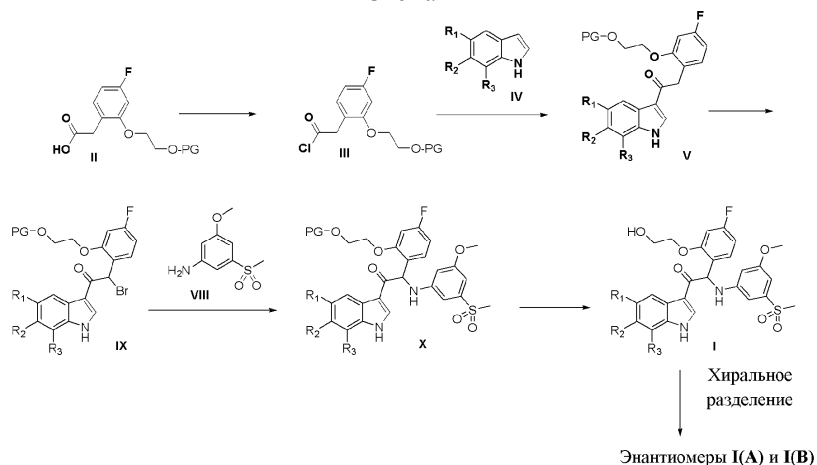
общей формулы IV можно осуществлять с применением реактива, представляющего собой кислоту Льюиса, например, такого как Et_2AlCl , в подходящем растворителе, таком как, например, CH_2Cl_2 , и в подходящих условиях реакции, которые, как правило, включают охлаждение, с получением 3-ацилированного индола общей формулы V. Удаление защитной группы PG из соединений общей формулы V можно осуществлять посредством, например, восстановительного гидрогенолиза (PG=бензил) в подходящем растворителе, таком как, например, EtOAc , с получением соединений общей формулы VI. Введение анилинового фрагмента в альфа-положение по отношению к карбонильному фрагменту соединения общей формулы VI можно осуществлять с помощью последовательности реакций, которая включает, например, бромирование VI реактивом, например, таким как трибромид фенилтриметиламмония, в подходящем растворителе, таком как, например, THF, с получением соединений общей формулы VII и последующее осуществление реакции соединений общей формулы VII с 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилином (VIII) в подходящем растворителе, таком как, например, CH_3CN , и необязательно с применением основания, такого как, например, TEA или DIPEA, с получением соединений общей формулы I в виде рацемических смесей. Хиральное разделение соединений общей формулы I можно осуществлять с помощью, например, хиральной хроматографии с получением энантимеров A и B общей формулы I.

Схема 1



В качестве альтернативы превращение промежуточных соединений общей формулы V в соединения общей формулы I также можно осуществлять с помощью последовательности реакций, изложенной на схеме 2: бромирование в альфа-положении карбонильной функциональной группы промежуточных соединений общей формулы V с помощью подходящего реактива для бромирования, такого как, например, трибромид фенилтриметиламмония, в подходящем растворителе, таком как, например, THF, обеспечивает получение соединений общей формулы IX. Последующее осуществление реакции соединений общей формулы IX с 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилином (VIII) в подходящем растворителе, таком как, например, CH_3CN , и необязательно с применением основания, такого как, например, TEA или DIPEA, обеспечивает получение соединений общей формулы X. После удаления O-защитной группы (PG) из соединений общей формулы X посредством, например, восстановительного гидрогенолиза (PG=бензил) в подходящем растворителе, таком как, например, EtOAc или MeOH , получают соединения общей формулы I в виде рацемических смесей. Хиральное разделение соединений общей формулы I можно осуществлять с помощью, например, хиральной хроматографии с получением энантимеров A и B общей формулы I.

Схема 2



Примеры

Способы LC/MS.

Измерения в ходе осуществления 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 (МС), который был оснащен источником ионизации при атмосферном давлении. В компетенции специалиста в данной области находится установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, времени выдержки и т. п.) с целью получения ионов, позволяющих определить номинальную моноизотопную молекулярную массу (MW) соединения. Сбор и обработку данных проводили с помощью соответствующего программного обеспечения.

Соединения описывали с помощью их значений экспериментального времени удерживания (R_t) и ионов. Если не указано иное, то в таблице данных указанных молекулярный ион соответствует $[M+H]^+$ (протонированная молекула) и/или $[M-H]^-$ (депротонированная молекула). В случае, если соединение не было напрямую способно к ионизации, указывают тип аддукта (т.е. $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ и т.д.). Для молекул со сложными изотопными распределениями (Br, Cl) сообщаемое значение является значением, которое получено для наименьшей массы изотопа. Все результаты получали с экспериментальными погрешностями, которые обычно ассоциированы с применяемым способом.

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

Условное обозначение способов LC/MS (скорость потока, выраженная в мл/мин; температура колонки (Т) в °С; время анализа в минутах).

Условное обозначение способа	Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток Т колонки	Время анализа (мин.)
LC-A	Waters: Acquity® UPLC® DAD-SQD	Waters: ВЕН C18 (1,7 мкм, 2,1×50 мм)	А: 10 мм CH ₃ COONH ₄ 95% H ₂ O+ 5% CH ₃ CN В: CH ₃ CN	От 95% А до 5% А за 1,3 мин., удерживан ие 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 ₃ COONH ₄ 95% H ₂ O+5% CH ₃ CN В: CH ₃ CN	От 100% А до 5% А за 2,10 мин., до 0% А за 0,90	0,7 мл/мин 55°C	3,5

				мин, до 5% А за 0,5 мин.		
LC-C	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Quattro Micro™	Waters: BEH C18 (1,7 МКМ, 2,1×100 мм)	A: 95% CH ₃ COONH ₄ 7 мм/5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	От 84,2% А в течение 0,49 мин до 10,5% А за 2,16 мин, удерживан ие в течение 1,94 мин, снова до 84,2% А за 0,73 мин, удерживан ие в течение 0,73 мин.	0,343 мл/мин ----- 40°C	6,2
LC-D	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Acquity® TQ- детектор	Waters: BEH C18 (1,7 МКМ, 2,1×50 мм)	A: 10 мм CH ₃ COONH ₄ , pH 10 B: CH ₃ CN	От 80% А до 40% А за 3,4 мин, до 10% А за 0,6 мин, удерживан ие в течение 1 мин.	0,5 мл/мин ----- 40°C	5
LC-E	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Acquity® TQ- детектор	Waters: BEH C18 (1,7 МКМ, 2,1×50 мм)	A: 10 мм CH ₃ COONH ₄ , pH 10 B: CH ₃ CN	От 50% А до 10% А за 3,5 мин, удерживан ие в течение 1,5 мин.	0,5 мл/мин ----- 40°C	5
LC-F	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Acquity® TQ- детектор	Waters: HSS C18 (1,8 МКМ, 2,1×50 мм)	A: 0,1% муравьиная кислота в H ₂ O B: CH ₃ CN	От 50% А до 10% А за 3,5 мин, удерживан ие в течение 1,5 мин.	0,5 мл/мин ----- 40°C	5
LC-G	Waters: Acquity® H-Class - DAD и SQD2™	Waters: BEH C18 (1,7 МКМ, 2,1×100 мм)	A: 95% CH ₃ COONH ₄ 7 мм/5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	От 84,2% А/15,8% В до 10,5% А за 2,16 мин, удерживан ие в течение 1,96 мин, снова до 84,2% А/15,8% В за 0,73 мин, удерживан ие в течение 0,49 мин.	0,343 мл/мин ----- 40°C	6,1

Способы SFC/MS.

Измерения в ходе SFC проводили с применением аналитической системы сверхкритической флюидной хроматографии (SFC), укомплектованной насосом для двухкомпонентных смесей для доставки диоксида углерода (CO₂) и модификатора, автоматическим дозатором, термостатом для колонок, детектором на диодной матрице, оснащенный проточной кюветой для работы под высоким давлением, выдерживающей значения до 400 бар. При оснащении масс-спектрометром (MS) поток из колонки направлялся в (MS). В компетенции специалиста в данной области находится установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, времени выдержки и т. п.) с целью получения ионов, позволяющих определить номинальную моноизотопную молекулярную массу (MW) соединения. Сбор и обработку данных проводили с помощью соответствующего программного обеспечения.

Аналитические способы SFC-MS (скорость потока выражена в мл/мин; температура колонки (T) в °C; время анализа в минутах, противодавление (BPR) в барах).

Условное обозначение способа	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток ----- T колонки	Время анализа ----- BPR
SFC-A	Колонка Daicel Chiralpak® IA (5 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO ₂ B: MeOH	50% В, удерживание 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-B	Колонка Daicel Chiralpak® IC (5 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO ₂ B: MeOH +0,3% iPrNH ₂	30% В, удерживание 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-C	Колонка Daicel Chiralcel® OD-H (5 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO ₂ B: EtOH +0,3% iPrNH ₂	30% В, удерживание 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- - 100
SFC-D	Колонка Daicel Chiralpak® AS3 (3,0 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO ₂ B: EtOH +0,2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O	25% В, удерживание 6 мин, до 50% за 1 мин, удерживание 2,5 мин.	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-E	Колонка Daicel Chiralpak® AS3 (3,0 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO ₂ B: EtOH +0,2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O	10% - 50% В за 6 мин, удерживание 3,5 мин.	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-F	Колонка Daicel Chiralpak® AD-H (5 мкм, 140×4,6 мм)	A: CO ₂ B: iPrOH +0,3% iPrNH ₂	30% В, удерживание 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100

Значения температуры плавления.

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

DSC823e (обозначен как DSC).

Для ряда соединений значения температуры плавления определяли с помощью DSC823e (Mettler-Toledo). Значения температуры плавления измеряли при градиенте температуры, составляющем 10°C/минута. Максимальная температура составляла 300°C.

Углы оптического вращения.

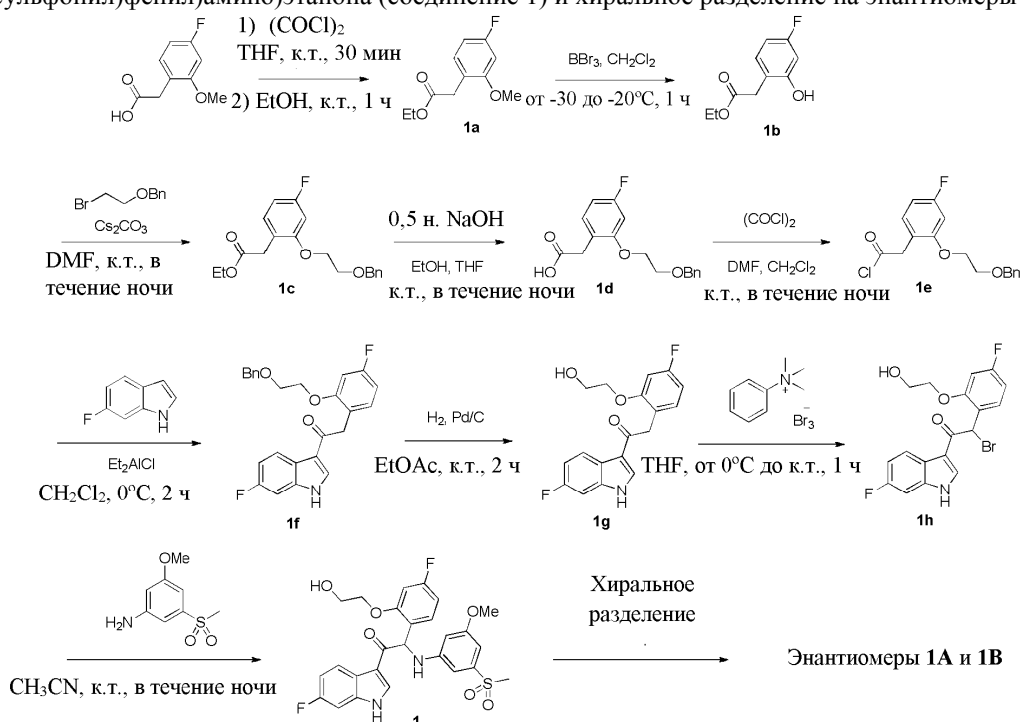
Углы оптического вращения измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 341 с натриевой лампой и обозначали следующим образом:

$[\alpha]^{\circ}(\lambda, c \text{ в г/100 мл, растворитель, } T \text{ в }^{\circ}\text{C}),$

$[\alpha]_{\lambda}^T = (100\alpha)/(l \times c),$

где l представляет собой длину пути в дм, а c представляет собой концентрацию в г/100 мл для образца при температуре T ($^{\circ}\text{C}$) и длине волны λ (в нм). Если используемая длина волны света составляет 589 нм (D-линия натрия), то вместо нее может применяться символ D. Всегда должен приводиться знак направления вращения (+ или -). При применении данного уравнения концентрация и растворитель всегда приводятся в круглых скобках после угла вращения. Угол вращения указан в градусах, а единицы концентрации не приведены (считается, что они представлены в г/100 мл).

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



Синтез промежуточного соединения 1a.

Раствор 2-(4-фтор-2-метоксифенил)уксусной кислоты [CAS 886498-61-9] (2,15 г, 11,7 ммоль) в сухом THF (40 мл) охлаждали при 0°C . Добавляли оксалилхлорид (2,04 мл, 23,4 ммоль) и две капли DMF. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток растворяли в этаноле (40 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 5% до 50%) в гептане с получением этил-2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетата 1a (2,40 г) в виде масла.

Синтез промежуточного соединения 1b.

К раствору этил-2-(4-фтор-2-метоксифенил)ацетата 1a (2,40 г, 11,3 ммоль) в CH_2Cl_2 (110 мл), охлажденному при -30°C , по каплям добавляли 1 M раствор BBr_3 в CH_2Cl_2 (22,6 мл, 22,6 ммоль) при поддержании температуры ниже -20°C . Реакционную смесь перемешивали при -30°C в течение 1 ч перед гашением с помощью метанола. pH доводили до 8 посредством добавления водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Фазы разделяли. Водную фазу экстрагировали дихлорметаном. Органические фазы объединяли, высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента этилацетата (от 5% до 50%) в гептане с получением этил-2-(4-фтор-2-гидроксифенил)ацетата 1b (2,10 г) в виде масла.

Синтез промежуточного соединения 1c.

К смеси этил-2-(4-фтор-2-гидроксифенил)ацетата 1b [CAS 1261751-44-3] (1,24 г, 6,26 ммоль) и карбоната цезия (4,08 г, 12,5 ммоль) в DMF (20 мл) добавляли бензил-2-бромэтиловый эфир [CAS 1462-37-9]

(1,61 г, 7,51 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли H₂O и реакционную смесь экстрагировали с помощью EtOAc. Органическую фазу высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента CH₂Cl₂ (от 15 до 100%) в гептане с получением этил-2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетата 1c (1,55 г).

Синтез промежуточного соединения 1d.

К раствору этил 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетата 1c (1,55 г, 4,66 ммоль) в смеси EtOH (45 мл) и THF (22 мл) добавляли 0,5 н. NaOH (28 мл, 14,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь частично концентрировали при пониженном давлении для удаления органических растворителей. Остаток подкисляли с помощью 1 н. HCl до pH 2-3 и экстрагировали с помощью EtOAc. Органическую фазу высушивали над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)уксусной кислоты 1d (1,41 г).

Синтез промежуточного соединения 1e.

К раствору 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)уксусной кислоты 1d (1,41 г, 4,63 ммоль) в сухом CH₂Cl₂ (20 мл), охлажденном при 0°C, добавляли оксалилхлорид (0,811 мл, 9,27 ммоль) и DMF (2 капли). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорида 1e (1,50 г), который применяли на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез промежуточного соединения 1f.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (4,72 мл, 4,72 ммоль) добавляли по каплям при 0°C к раствору 6-фтор-1H-индола [CAS 399-51-9] (0,42 г, 3,11 ммоль) в CH₂Cl₂ (6 мл). После перемешивания в течение 30 мин при 0°C медленно добавляли раствор 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорида 1e (1,50 г, 4,66 ммоль) в дихлорметане (6 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч. Добавляли 1 М раствор сегнетовой соли. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и экстрагировали дважды с помощью EtOAc.

Органические фазы объединяли, промывали солевым раствором, высушивали над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 2% до 40%) в гептане. С помощью дополнительной очистки посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 0% до 10%) в CH₂Cl₂ получали 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)этанол 1f (0,88 г).

Синтез промежуточного соединения 1g.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-фтор-1H-индол-3-ил) этанола 1f (0,88 г, 2,09 ммоль) и 10% палладия на угле (0,088 г) в EtOAc (90 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч в атмосфере H₂. Реакционную смесь фильтровали через слой Celite® и осадок на фильтре промывали с помощью CH₂Cl₂ и MeOH. Объединенные фильтраты концентрировали при пониженном давлении. Остаток отверждали посредством растирания с CH₂Cl₂. Твердые вещества отфильтровывали и высушивали под вакуумом с получением 1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 1g (0,59 г).

Синтез промежуточного соединения 1h.

Раствор трибромида фенилтриметиламмония [CAS 4207-5 6-1] (0,70 г, 1,86 ммоль) в THF (10 мл) добавляли по каплям при 0°C к раствору 1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 1g (0,56 г, 1,69 ммоль) в THF (15 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин и при комнатной температуре в течение 1 ч. Осадок отфильтровывали и промывали с помощью EtOAc. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 2-бром-1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 1h (0,69 г), который применяли без дополнительной очистки на следующей стадии.

Синтез соединения 1 и хиральное разделение на энантимеры 1A и 1B.

Смесь 2-бром-1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 1h (0,69 г, 1,69 ммоль) и 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилина [CAS 62606-02-4] (1,02 г, 5,07 ммоль) в CH₃CN (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc и промывали с помощью 1н. HCl. Органический слой промывали водным насыщенным раствором NaHCO₃, H₂O и солевым раствором, высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 15 до 70%) в CH₂Cl₂. Фракции, содержащие требуемое соединение, объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Остаток перекристаллизовывали из смеси EtOAc, Et₂O и гептана с получением первой партии 1-(6-фтор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 1, 0,47 г) в виде рацемической смеси. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и остаток перекристаллизовывали из смеси EtOAc, Et₂O и гептана с получением второй партии соединения 1 (0,11 г) в виде

рацемической смеси.

Хиральное разделение энантимеров соединения 1 (620 мг) осуществляли посредством хирального разделения с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: Chiralpak® AD 1000A 20 мкм (Daicel) (600 г), подвижная фаза: EtOH/MeOH (1/1). Фракции продукта объединяли и выпаривали при пониженном давлении с получением энантиомера 1А в качестве первого элюированного продукта и энантиомера 1В в качестве второго элюированного продукта. Оба энантиомера растворяли в смеси воды (5 мл)+MeOH (20 мл). Растворитель частично выпаривали при пониженном давлении (водяная баня при 40°C) до остаточного количества, составляющего приблизительно 5 мл. Полученные суспензии разбавляли водой (10-15 мл) и интенсивно перемешивали в течение 2 дней. Твердые вещества отделяли посредством фильтрации и высушивали под вакуумом при комнатной температуре с получением энантиомера 1А (227 мг) и энантиомера 1В (251 мг) в виде белых порошков.

Соединение 1.

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,87-4,10 (m, 2H) 4,17 (m, 2H) 5,30 (br. s., 1H) 6,36 (d, J=7,8 Гц, 1H) 6,57 (t, J=1,6 Гц, 1H) 6,65 (s, 1H) 6,72 (td, J=8,5, 2,5 Гц, 1H) 6,92-6,96 (m, 2H) 7,03-7,10 (m, 2H) 7,24 (dd, J=9,6, 2,3 Гц, 1H) 7,38 (dd, J=8,6, 6,9 Гц, 1H) 8,16 (dd, J=8,8, 5,6 Гц, 1H) 8,68 (s, 1H) 12,16 (br. s., 1H). LC/MS (Способ LC-D): R_t 3,43 мин, MH⁺ 531.

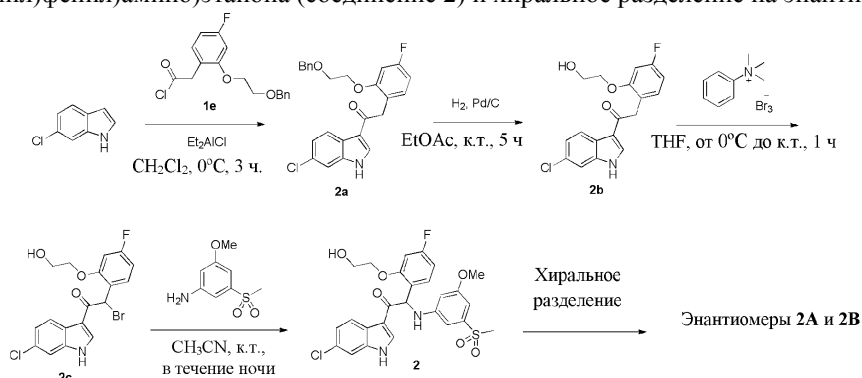
Энантиомер 1А.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,89-4,07 (m, 2H) 4,18 (t, J=4,7 Гц, 2H) 5,30 (br t, J=5,7 Гц, 1H) 6,35 (d, J=7,8 Гц, 1H) 6,55-6,59 (m, 1H) 6,62-6,67 (m, 1H) 6,71 (br td, J=8,4, 2,6 Гц, 1H) 6,91-6,97 (m, 2H) 7,01-7,09 (m, 2H) 7,24 (dd, J=9,6, 2,4 Гц, 1H) 7,38 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H) 8,15 (dd, J=8,9, 5,5 Гц, 1H) 8,68 (s, 1H) 12,16 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-B): R_t 1,91 мин, MH⁺ 531. [α]_D²⁰: +118, 6° (с 0,4335, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-D): R_t 1,68 мин, MH⁺ 531, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 1В.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,71 (s, 3H) 3,89-4,06 (m, 2H) 4,17 (br t, J=4,8 Гц, 2H) 5,30 (br t, J=5,2 Гц, 1H) 6,35 (d, J=7,7 Гц, 1H) 6,55-6,59 (m, 1H) 6,62-6,67 (m, 1H) 6,71 (br td, J=8,4, 2,7 Гц, 1H) 6,90-6,97 (m, 2H) 7,02-7,10 (m, 2H) 7,23 (dd, J=9,6, 2,5 Гц, 1H) 7,37 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H) 8,15 (dd, J=8,8, 5,5 Гц, 1H) 8,68 (s, 1H) 12,15 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-B): R_t 1,91 мин, MH⁺ 531. [α]_D²⁰: -115,4° (с 0,3985, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-D): R_t 2,20 мин, MH⁺ 531, хиральная чистота 100%.

Пример 2. Синтез 1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 2) и хиральное разделение на энантиомеры 2А и 2В.



Синтез промежуточного соединения 2а.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (13,1 мл, 13,1 ммоль) добавляли по каплям при 0°C к раствору 6-хлор-1H-индола [CAS 17422-33-2] (1,33 г, 8,76 ммоль) в CH₂Cl₂ (20 мл). Через 30 мин при 0°C медленно добавляли раствор 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорида 1e (4,24 г, 13,1 ммоль, синтез: см. пример 1) в CH₂Cl₂ (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Добавляли 1 М раствор сегнетовой соли. Через 30 мин при комнатной температуре, реакционную смесь разбавляли с помощью CH₂Cl₂ и промывали с помощью бн. HCl. Фазы разделяли. Органическую фазу промывали солевым раствором, фильтровали через фильтр для разделения фаз и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 10 до 80%) в гептане. Фракции, содержащие требуемый продукт, объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством осаждения из смеси EtOAc и гептана с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)этанона 2а (2,39 г).

Синтез промежуточного соединения 2b.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)этанона 2а (2,05 г, 4,68 ммоль) и 10% палладия на угле (0,20 г) в EtOAc (30 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч в атмосфере H₂. Реакционную смесь фильтровали через диатомовую землю и промывали с помощью THF. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с EtOAc. Осадок отфильтровывали с получением 1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона

2b (1,41 г).

Синтез промежуточного соединения 2с.

Раствор трибромиды фенилтриметиламмония [CAS 4207-56-1] (1,83 г, 4,87 ммоль) в THF (15 мл) добавляли по каплям при 0°C к раствору 1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси) фенил)этанона 2b (1,54 г, 4,43 ммоль) в THF (30 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Осадок отфильтровывали и промывали с помощью THF. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 2-бром-1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси) фенил)этанона 2с (1,89 г), который применяли на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез соединения 2 и хиральное разделение на энантиомеры 2А и 2В.

Смесь 2-бром-1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 2с (1,89 г, 4,43 ммоль) и 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилина [CAS 62606-02-4] (2,67 г, 13,3 ммоль) в CH₃CN (45 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток распределяли между EtOAc и 1n. HCl. Фазы разделяли. Органическую фазу промывали водным насыщенным раствором NaHCO₃ и соевым раствором, высушивали над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 40% до 100%) в гептане. Фракции, содержащие требуемый продукт, объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали со смесью Et₂O и CH₂Cl₂. Осадок отфильтровывали и очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента MeOH (от 1% до 10%) в CH₂Cl₂ с получением 1-(6-хлор-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 2, 1,05 г) в виде рацемической смеси.

Энантиомеры соединения 2 (1,01 г) разделяли посредством хиральной SFC (неподвижная фаза: Chiralpak® IA 5 мкм 20×250 мм, подвижная фаза: 50% CO₂, 50% MeOH) с получением 460 мг первого элюированного энантиомера и 424 мг второго элюированного энантиомера. Две фракции снова очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 12 г, CH₂Cl₂/MeOH 99,5/0,5). Чистые фракции объединяли и выпаривали до сухого состояния. Остатки отверждали посредством растирания со смесью Et₂O и диизопропилового эфира. Твердые вещества отфильтровывали и высушивали с получением 353 мг первого элюированного энантиомера и 363 мг второго элюированного энантиомера. Первый элюированный энантиомер дополнительно очищали посредством ахиральной SFC (неподвижная фаза: DEAP (диэтиламинопропил) 5 мкм 150×21,2 мм, подвижная фаза: 60% CO₂, 40% EtOH (+ 0,3% iPrNH₂)). Чистые фракции объединяли и выпаривали до сухого состояния и затем отверждали посредством растирания с MeOH/водой. Осадок отфильтровывали, промывали диизопропиловым эфиром и высушивали с получением энантиомера 2А (269 мг). Второй элюированный энантиомер дополнительно очищали посредством ахиральной SFC (неподвижная фаза: DEAP 5 мкм 150×21,2 мм, подвижная фаза: 60% CO₂, 40% EtOH (+ 0,3% iPrNH₂)). Чистые фракции объединяли и выпаривали до сухого состояния и затем отверждали посредством растирания с MeOH/водой. Осадок отфильтровывали, промывали диизопропиловым эфиром и высушивали с получением энантиомера 2В (261 мг).

Соединение 2.

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,10 (s, 3H) 3,74 (s, 3H) 3,86-4,12 (m, 2H) 4,20 (m, 2H) 5,32 (br s., 1H) 6,38 (d, J=7,7 Гц, 1H) 6,59 (s, 1H) 6,67 (s, 1H) 6,74 (td, J=8,4, 2,2 Гц, 1H) 6,91-7,00 (m, 2H) 7,08 (d, J=7,7 Гц, 1H) 7,24 (dd, J=8,5, 1,7 Гц, 1H) 7,39 (t, J=7,7 Гц, 1H) 7,52 (d, J=1,5 Гц, 1H) 8,18 (d, J=8,5 Гц, 1H) 8,72 (s, 1H) 12,24 (br s., 1H). LC/MS (Способ LC-F): R_t 1,25 мин, MH⁺ 547.

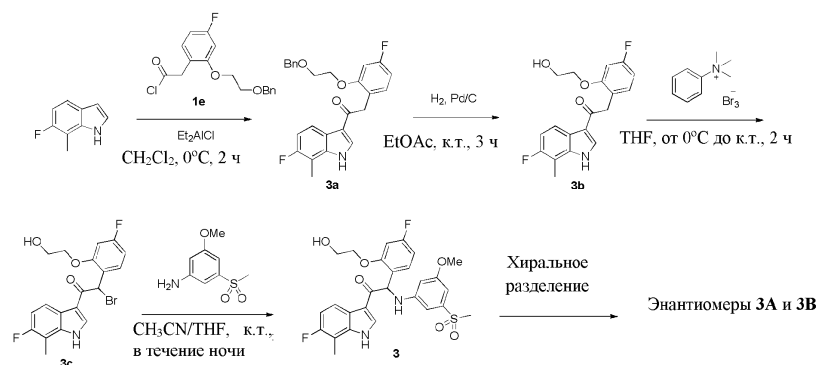
Энантиомер 2А.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,89-4,07 (m, 2H) 4,18 (br t, J=4,3 Гц, 2H) 5,31 (br s, 1H) 6,36 (d, J=7,9 Гц, 1H) 6,57 (s, 1H) 6,65 (br s, 1H) 6,72 (td, J=8,4, 2,0 Гц, 1H) 6,90-6,98 (m, 2H) 7,06 (br d, J=7,9 Гц, 1H) 7,22 (dd, J=8,5, 1,6 Гц, 1H) 7,37 (t, J=7,7 Гц, 1H) 7,50 (d, J=1,3 Гц, 1H) 8,16 (d, J=8,5 Гц, 1H) 8,70 (s, 1H) 12,21 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-C): R_t 2,94 мин, MH⁺ 547. [α]_D²⁰: +127, 6° (с 0,25, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-A): R_t 2,02 мин, MH⁺ 547, хиральная чистота 98,22%. Температура плавления: 118°C.

Энантиомер 2В.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,89-4,07 (m, 2H) 4,15-4,20 (m, 2H) 5,31 (br s, 1H) 6,36 (d, J=7,6 Гц, 1H) 6,57 (s, 1H) 6,65 (br s, 1H) 6,72 (td, J=8,4, 2,0 Гц, 1H) 6,89-6,99 (m, 2H) 7,06 (br d, J=7,6 Гц, 1H) 7,22 (dd, J=8,5, 1,3 Гц, 1H) 7,37 (t, J=7,7 Гц, 1H) 7,50 (d, J=1,3 Гц, 1H) 8,16 (d, J=8,5 Гц, 1H) 8,70 (s, 1H) 12,21 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-C): R_t 2,94 мин, MH⁺ 547. [α]_D²⁰: -125,6° (с 0,2555, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-A): R_t 2,40 мин, MH⁺ 547, хиральная чистота 100%. Температура плавления: 117°C.

Пример 3. Синтез 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 3) и хиральное разделение на энантиомеры 3А и 3В.



Синтез промежуточного соединения 3а.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (13,2 мл, 13,2 ммоль) добавляли по каплям при 0°C к раствору 6-фтор-7-метил-1Н-индола [CAS 57817-10-4] (1,3 г, 8,71 ммоль) в CH₂Cl₂ (17 мл). Через 30 мин при 0°C медленно добавляли раствор 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорида 1е (4,22 г, 13,1 ммоль, синтез: см. пример 1) в дихлорметане (17 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч. Добавляли 1 М раствор сегнетовой соли. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и экстрагировали дважды с помощью EtOAc. Органические фазы объединяли, промывали солевым раствором, высушивали над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток поглощали минимальным количеством CH₂Cl₂. Осадок отфильтровывали, промывали с помощью CH₂Cl₂ и высушивали под вакуумом с получением первой партии 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 3а (1,2 г). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 5 до 50%) в гептане. Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с CH₃CN. Твердые вещества отфильтровывали, промывали с помощью CH₂Cl₂ и высушивали под вакуумом с получением второй партии 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 3а (0,88 г). Фильтрат частично концентрировали. Образованное твердое вещество отфильтровывали, промывали с помощью CH₂Cl₂ и высушивали под вакуумом с получением третьей партии 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 3а (0,17 г).

Синтез промежуточного соединения 3b.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил) этанона 3а (1,95 г, 4,48 ммоль) и 10% палладия на угле (0,2 г) в EtOAc (120 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч в атмосфере H₂. Реакционную смесь фильтровали через слой Celite®. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток поглощали минимальным количеством CH₂Cl₂. Осадок отфильтровывали и высушивали под вакуумом с получением 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 3b (1,27 г).

Синтез промежуточного соединения 3с.

Раствор трибромида фенилтриметиламмония [CAS 4207-56-1] (1,77 г, 4,71 ммоль) в THF (28 мл) по каплям добавляли при 0°C к раствору 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил) этанона 3b (1,48 г, 4,29 ммоль) в THF (40 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин и при комнатной температуре в течение 2 ч. Осадок отфильтровывали и промывали с помощью EtOAc. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 2-бром-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 3с (1,82 г), который применяли на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез соединения 3 и хиральное разделение на энантиомеры 3А и 3В.

Смесь 2-бром-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)этанона 3с (1,16 г, 2,63 ммоль) и 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилина [CAS 62606-02-4] (1,59 г, 7,90 ммоль) в CH₃CN (6 мл) и THF (6 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc и промывали с помощью 1н. HCl. Фазы разделяли.

Органическую фазу промывали с помощью 1н. HCl, водного насыщенного раствора NaHCO₃, H₂O и солевого раствора, высушивали над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 15% до 100%) в CH₂Cl₂. Фракции, содержащие требуемое соединение, объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Остаток поглощали минимальным количеством CH₂Cl₂. Осадок отфильтровывали и высушивали под вакуумом с получением первой партии 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-7-метил-1Н-индол-3-ил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 3, 0,73 г) в виде рацемической смеси. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с CH₂Cl₂ и CH₃CN. Твердые вещества отфильтровывали и высушивали при пониженном давлении с получением второй партии соединения 3 (0,23 г) в виде рацемической смеси. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на сили-

кагеле с использованием градиента EtOAc (от 15% до 100%) в CH_2Cl_2 . Фракции, содержащие соединение 3, объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с CH_2Cl_2 . Твердые вещества отфильтровывали и высушивали при пониженном давлении с получением третьей партии соединения 3 (0,20 г) в виде рацемической смеси.

Хиральное разделение энантимеров соединения 3 (1,15 г) осуществляли посредством хирального разделения с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: AS 2 0 мкм, подвижная фаза: 100% MeOH). Фракции продукта объединяли и выпаривали с получением энантиомера 3А в качестве первого элюированного продукта и энантиомера 3В в качестве второго элюированного продукта. Энантиомер 3А очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 40 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH, градиент от 100/0/0 до 40/45/15). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали, и выпаривали совместно с MeOH. Пенистый остаток перемешивали в H_2O (8 мл) и по каплям добавляли MeOH (2,5 мл). После перемешивания в течение 15 мин осадок отфильтровывали, промывали с помощью $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 3/1 (4 × 1,5 мл) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением энантиомера 3А (0,341 г). Энантиомер 3В очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 40 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH, градиент от 100/0/0 до 40/45/15). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали. Маслянистый остаток перемешивали в H_2O (8 мл) и по каплям добавляли MeOH (17,5 мл). После перемешивания в течение 15 минут осадок отфильтровывали, промывали с помощью MeOH/ H_2O 1/1 (4 × 1,5 мл) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением энантиомера 3В (0,266 г).

Соединение 3.

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 2,39 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,90-4,11 (m, 2H) 4,17 (m, 2H) 5,32 (br. s., 1H) 6,39 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 6,57 (s, 1H) 6,66 (s, 1H) 6,71 (td, $J=8,5, 2,3$ Гц, 1H) 6,89-7,10 (m, 4H) 7,37 (t, $J=7,1$ Гц, 1H) 7,99 (dd, $J=8,7, 5,5$ Гц, 1H) 8,63 (s, 1H) 12,22 (br. s., 1H). LC/MS (Способ LC-E): R_t 1,07 мин, MH^+ 545.

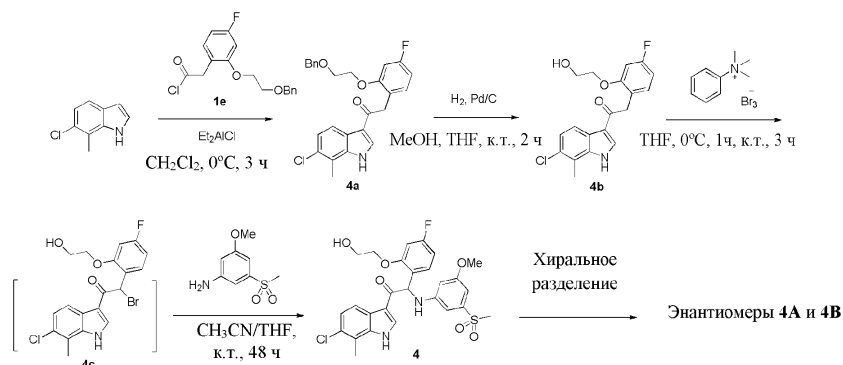
Энантиомер 3А.

^1H ЯМР (360 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 2,35-2,43 (m, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,89-4,10 (m, 2H) 4,17 (t, $J=4,8$ Гц, 2H) 5,32 (t, $J=5,7$ Гц, 1H) 6,39 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 6,56-6,58 (m, 1H) 6,65-6,68 (m, 1H) 6,71 (td, $J=8,5, 2,4$ Гц, 1H) 6,91-6,98 (m, 2H) 6,98-7,07 (m, 2H) 7,37 (dd, $J=8,6, 6,8$ Гц, 1H) 7,99 (dd, $J=8,7, 5,2$ Гц, 1H) 8,63 (d, $J=3,2$ Гц, 1H) 12,22 (d, $J=3,2$ Гц, 1H). LC/MS (Способ LC-A): R_t 1,08 мин, MH^+ 545. $[\alpha]_D^{20}$: +110,0° (с 0,46, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 3,30 мин, MH^+ 545, хиральная чистота 100%. Температура плавления: 212°C.

Энантиомер 3В.

^1H ЯМР (360 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 2,35-2,42 (m, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,90-4,10 (m, 2H) 4,18 (t, $J=4,8$ Гц, 2H) 5,32 (t, $J=5,7$ Гц, 1H) 6,39 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 6,55-6,59 (m, 1H) 6,66-6,68 (m, 1H) 6,71 (td, $J=8,5, 2,4$ Гц, 1H) 6,91-6,97 (m, 2H) 6,98-7,07 (m, 2H) 7,37 (dd, $J=8,6, 6,8$ Гц, 1H) 7,99 (dd, $J=8,7, 5,2$ Гц, 1H) 8,64 (d, $J=3,2$ Гц, 1H) 12,22 (d, $J=3,2$ Гц, 1H). LC/MS (Способ LC-A): R_t 1,08 мин, MH^+ 545. $[\alpha]_D^{20}$: -107,3° (с 0,4985, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 3,74 мин, MH^+ 545, хиральная чистота 100%. Температура плавления: 214°C.

Пример 4. Синтез 1-(6-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 4) и хиральное разделение на энантиомеры 4А и 4В.



Синтез промежуточного соединения 4а.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (13,5 мл, 13,5 ммоль) добавляли по каплям при 0°C к раствору 6-хлор-7-метил-1H-индола [CAS 57817-09-1] (1,49 г, 9 ммоль) в CH_2Cl_2 (70 мл). Через 30 мин при 0°C медленно добавляли 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил) ацетилхлорид 1e (8,5 г, 26,3 ммоль) в CH_2Cl_2 (20 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Добавляли ледяную воду и реакционную смесь экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 . Органический слой высушивали над MgSO_4 , фильтровали и растворитель выпаривали под вакуумом. Неочищенный продукт очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 120 г, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 99,5/0,5). Чистые фрак-

ции объединяли и выпаривали до сухого состояния с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона 4a (1,86 г).

Синтез промежуточного соединения 4b.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил) этанона 4a (1,76 г, 3,9 ммоль) в CH₃OH (40 мл) и THF (40 мл) гидрировали при атмосферном давлении H₂ в течение 2 ч с Pd/C (10%) (170 мг, 0,16 ммоль) в качестве катализатора. Смесь фильтровали через слой Celite® и промывали с помощью EtOAc/THF 70/30. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток отверждали посредством растирания с CH₃CN/диизопропиловым эфиром. Осадок отфильтровывали и высушивали с получением 1-(6-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 4b в виде белого порошка (800 мг).

Синтез соединения 4 и хиральное разделение энантимеров 4A и 4B.

В потоке N₂ при 0°C раствор трибромида фенилтриметиламмония [CAS 4207-56-1] (0,89 г, 2,38 ммоль) в THF (40 мл) добавляли по каплям к раствору 1-(6-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 4b (0,86 г, 2,38 ммоль) в THF (20 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч, охлаждающую баню убирали и перемешивание продолжали при комнатной температуре в течение 3 ч. По каплям добавляли 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилин [CAS 62606-02-4] (1,43 г, 7,13 ммоль) в CH₃CN (20 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток поглощали с помощью EtOAc и промывали с помощью 1 н. HCl (дважды), высушивали над MgSO₄, фильтровали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт кристаллизовали из CH₃CN/диизопропилового эфира с получением 1-(6-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 4, 1,07 г) в виде рацемической смеси.

Энантимеры соединения 4 (837 мг) разделяли посредством хиральной SFC (неподвижная фаза: Chiralcel® OD-H 5 мкм 250×30 мм, подвижная фаза: 60% CO₂, 40% EtOH (+ 0,3% iPrNH₂)) с получением 326 мг первого элюированного энантиомера и 350 мг второго элюированного энантиомера. Первый элюированный энантиомер отверждали посредством растирания с CH₃CN/диизопропиловым эфиром. Осадок отфильтровывали и высушивали с получением 298 мг энантиомера 4A. Второй элюированный энантиомер кристаллизовали из CH₃CN/диизопропилового эфира. Осадок отфильтровывали и высушивали с получением 267 мг энантиомера 4B.

Соединение 4.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,09 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,92-4,08 (m, 2H) 4,13-4,21 (m, 2H) 5,32 (br s, 1H) 6,40 (d, J=7,6 Гц, 1H) 6,57 (s, 1H) 6,67 (br s, 1H) 6,71 (td, J=8,4, 2,0 Гц, 1H) 6,92-6,98 (m, 2H) 7,05 (br d, J=7,6 Гц, 1H) 7,23 (d, J=8,5 Гц, 1H) 7,37 (t, J=7,7 Гц, 1H) 8,00 (d, J=8,5 Гц, 1H) 8,64 (s, 1H) 12,28 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-C): R_t 3,07 мин, MH⁺ 561.

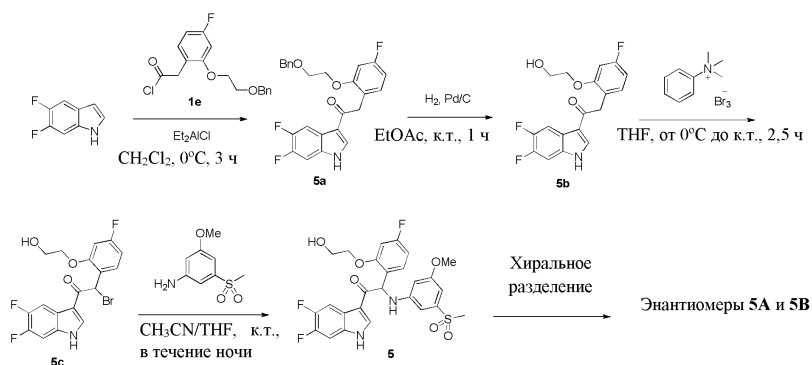
Энантиомер 4A.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,91-4,07 (m, 2H) 4,17 (t, J=4,6 Гц, 2H) 5,31 (br s, 1H) 6,39 (d, J=7,9 Гц, 1H) 6,57 (t, J=1,7 Гц, 1H) 6,66 (br s, 1H) 6,71 (td, J=8,5, 2,5 Гц, 1H) 6,91-6,98 (m, 2H) 7,04 (d, J=7,6 Гц, 1H) 7,22 (d, J=8,5 Гц, 1H) 7,37 (dd, J=8,5, 6,9 Гц, 1H) 8,00 (d, J=8,5 Гц, 1H) 8,64 (s, 1H) 12,28 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-C): R_t 3,07 мин, MH⁺ 561 [α]_D²⁰: -110,2° (с 0,256, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-B): R_t 3,52 мин, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 4B.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,92-4,07 (m, 2H) 4,17 (t, J=4,6 Гц, 2H) 5,32 (br s, 1H) 6,39 (d, J=7,6 Гц, 1H) 6,57 (t, J=1,7 Гц, 1H) 6,66 (s, 1H) 6,71 (td, J=8,4, 2,4 Гц, 1H) 6,91-6,97 (m, 2H) 7,04 (d, J=7,9 Гц, 1H) 7,22 (d, J=8,5 Гц, 1H) 7,37 (dd, J=8,8, 6,9 Гц, 1H) 8,00 (d, J=8,5 Гц, 1H) 8,64 (s, 1H) 12,19 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-C): R_t 3,07 мин, MH⁺ 561. [α]_D²⁰: +112,8° (с 0,257, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-B): R_t 4,69 мин, хиральная чистота 100%. Температура плавления: 162°C.

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



Синтез промежуточного соединения 5а.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (9,5 мл, 9,50 ммоль) добавляли по каплям при 0°C к раствору 5,6-дифтор-1Н-индола [CAS 169674-01-5] (0,73 г, 4,73 ммоль) в CH₂Cl₂ (20 мл). Через 30 мин при 0°C медленно добавляли раствор 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорида 1е (2,29 г, 7,10 ммоль, синтез: см. пример 1) в дихлорметане (12 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Добавляли 1 М раствор сегнетовой соли. После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 ч реакционную смесь подкисляли с помощью 1 н. HCl и экстрагировали дважды с помощью EtOAc. Органические фазы объединяли, промывали солевым раствором, высушивали над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 0% до 50%) в гептане с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(5,6-дифтор-1Н-индол-3-ил)этанона 5а (0,66 г).

Синтез промежуточного соединения 5b.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(5,6-дифтор-1Н-индол-3-ил)этанона 5а (0,66 г, 1,50 ммоль) и 10% палладия на угле (0,07 г) в EtOAc (15 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч в атмосфере H₂. Реакционную смесь фильтровали через Celite®. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 30% до 85%) в гептане с получением 1-(5,6-дифтор-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 5b (0,28 г).

Синтез промежуточного соединения 5с.

Раствор трибромид фенилтриметиламмония [CAS 4207-56-1] (0,93 г, 2,47 ммоль) в THF (10 мл) добавляли по каплям при 0°C к раствору 1-(5,6-дифтор-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)-фенил)этанона 5b (0,79 г, 2,29 ммоль) в THF (15 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин и при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Осадок отфильтровывали и промывали с помощью EtOAc. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 2-бром-1-(5,6-дифтор-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 5с (0,98 г), который применяли на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез соединения 5 и хиральное разделение на энантиомеры 5А и 5В.

Смесь 2-бром-1-(5,6-дифтор-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 5с (0,98 г, 2,28 ммоль) и 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилина [CAS 62606-02-4] (1,36 г, 6,78 ммоль) в CH₃CN (6 мл) и THF (6 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток распределяли между EtOAc и 1н. HCl. Фазы разделяли. Водную фазу экстрагировали дважды с помощью EtOAc. Органические фазы объединяли, промывали солевым раствором, высушивали над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc (от 15% до 70%) в CH₂Cl₂. Фракции, содержащие требуемое соединение, объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с EtOAc. Твердые вещества отфильтровывали и высушивали под вакуумом с получением 1-(5,6-дифтор-1Н-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 5, 0,53 г) в виде рацемической смеси.

Хиральное разделение энантиомеров соединения 5 (482 мг) осуществляли посредством хирального разделения с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: AS 20 мкм, подвижная фаза: 100% MeOH). Фракции продукта объединяли и выпаривали при пониженном давлении с получением энантиомера 5А в качестве первого элюированного продукта и энантиомера 5В в качестве второго элюированного продукта. Энантиомер 5А очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 12 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH, градиент от 100/0/0 до 40/45/15). Фракции, содержащие продукт, объединяли, выпаривали при пониженном давлении и выпаривали совместно с CH₃CN. Остаток лиофилизировали из смеси CH₃CN (3 мл) и воды (3 мл) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением энантиомера 5А (0,147 г). Энантиомер 5В очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 12 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH, градиент от 100/0/0 до 40/45/15). Фракции, содержащие продукт, объединяли, выпаривали при пониженном давлении и выпаривали совместно с CH₃CN. Остаток лиофилизировали из смеси CH₃CN (3 мл) и воды (3 мл) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением энантиомера 5В (0,107 г).

Соединение 5.

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,89-4,09 (m, 2H) 4,18 (m, 2H) 5,30 (t, J=5,3 Гц, 1H) 6,36 (d, J=7,8 Гц, 1H) 6,58 (s, 1H) 6,65 (s, 1H) 6,71 (td, J=8,5, 2,3 Гц, 1H) 6,90-6,99 (m, 2H) 7,07 (d, J=7,8 Гц, 1H) 7,37 (t, J=7,1 Гц, 1H) 7,50 (dd, J=10,7, 7,0 Гц, 1H) 8,01 (dd, J=11,2, 8,2 Гц, 1H) 8,72 (s, 1H) 12,29 (br. s., 1H). LC/MS (Способ LC-F): R_t 1,10 мин, MH⁺ 549.

Энантиомер 5А.

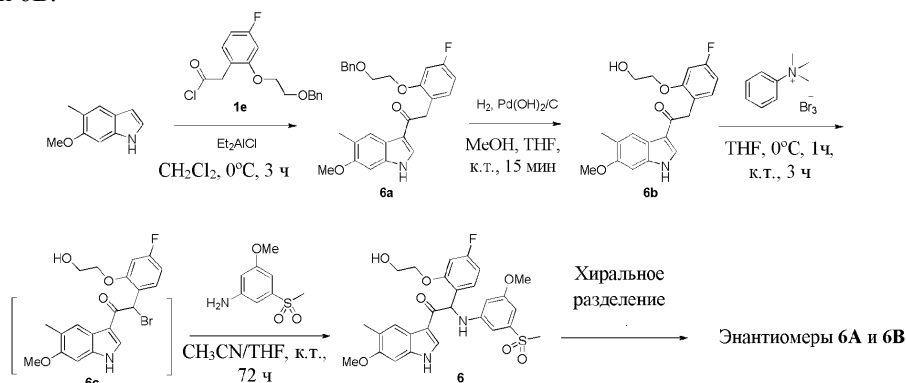
¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,86-4,07 (m, 2H) 4,17 (t, J=4,8 Гц, 2H) 5,30 (t, J=5,5 Гц, 1H) 6,35 (d, J=7,8 Гц, 1H) 6,57 (t, J=1,9 Гц, 1H) 6,63-6,67 (m, 1H) 6,72 (td, J=8,5, 2,4 Гц,

1H) 6,91-6,97 (m, 2H) 7,07 (d, J=7,8 Гц, 1H) 7,37 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H) 7,50 (dd, J=10,7, 7,0 Гц, 1H) 8,01 (dd, J=11,1, 8,1 Гц, 1H) 8,72 (s, 1H) 12,29 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-A): R_t 1,03 мин, МН⁺ 549. [α]_D²⁰: +122,7° (с 0,49, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 3,28 мин, МН⁺ 549, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 5В.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,86-4,07 (m, 2H) 4,18 (br t, J=4,8 Гц, 2H) 5,30 (t, J=5,5 Гц, 1H) 6,36 (d, J=7,8 Гц, 1H) 6,58 (t, J=1,8 Гц, 1H) 6,63-6,67 (m, 1H) 6,73 (td, J=8,5, 2,5 Гц, 1H) 6,91-6,97 (m, 2H) 7,07 (d, J=7,8 Гц, 1H) 7,38 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H) 7,50 (dd, J=10,7, 6,9 Гц, 1H) 8,02 (dd, J=11,1, 8,1 Гц, 1H) 8,72 (s, 1H) 12,29 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-A): R_t 1,04 мин, МН⁺ 549. [α]_D²⁰: -123,3° (с 0,48, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 3,74 мин, МН⁺ 549, хиральная чистота 100%.

Пример 6. Синтез 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона (соединение 6) и хиральное разделение на энантиомеры 6А и 6В.



Синтез промежуточного соединения 6а.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (35,8 мл, 35,8 ммоль) добавляли по каплям при 0°C к раствору 6-метокси-5-метил-1H-индола [CAS 1071973-95-9] (3,85 г, 23,9 ммоль) в CH₂Cl₂ (50 мл). Через 30 мин при 0°C медленно добавляли 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорид 1e (8,5 г, 26,3 ммоль) в CH₂Cl₂ (50 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Добавляли ледяную воду и реакционную смесь экстрагировали с помощью CH₂Cl₂/CH₃OH 90/10. Органический слой промывали насыщенным раствором сегнетовой соли и затем соевым раствором, высушивали над MgSO₄, фильтровали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток поглощали с помощью минимального количества CH₂Cl₂, осадок отфильтровывали и высушивали с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 6а (6,6 г).

Синтез промежуточного соединения 6b.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 6а (5,2 г, 11,6 ммоль) в CH₃OH (200 мл) и THF (100 мл) гидрировали при атмосферном давлении H₂ в течение 15 мин с 20% Pd(OH)₂/C (2,45 г, 3,49 ммоль). Смесь фильтровали через слой Celite® и промывали с помощью EtOAc/THF 70/30. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Соединение растирали с Et₂O, осадок отфильтровывали и высушивали с получением 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 6b в виде белого порошка (2,54 г).

Синтез соединения 6 и хиральное разделение энантиомеров 6А и 6В.

В потоке N₂ при 0°C раствор трибромида фенилтриметиламмония [CAS 4207-56-1] (2,4 г, 6,38 ммоль) в THF (15 мл) добавляли по каплям к раствору 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 6b (2,28 г, 6,38 ммоль) в THF (100 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч, охлаждающую баню убирали и перемешивание продолжали при комнатной температуре в течение 3 ч. По каплям добавляли 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилин [CAS 62606-02-4] (3,85 г, 19,1 ммоль) в CH₃CN (45 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 72 ч. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток поглощали с помощью EtOAc и промывали с помощью 1н. HCl (дважды), высушивали над MgSO₄, фильтровали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный остаток (4 г) объединяли с другой фракцией (1 г) и очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 120 г, CH₂Cl₂/CH₃OH 99/1). Чистые фракции объединяли и выпаривали до сухого состояния с получением 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(6-метокси-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона (соединение 6, 1,3 г) в виде рацемической смеси.

Энантиомеры соединения 6 (1,55 г) разделяли посредством хиральной SFC (неподвижная фаза: Chiralcel® OD-H 5 мкм 250×30 мм, подвижная фаза: 60% CO₂, 40% EtOH (+ 0,3% iPrNH₂)) с получением 590 мг первого элюированного энантиомера и 613 мг второго элюированного энантиомера. Первый элюированный энантиомер кристаллизовали из Et₂O. Осадок отфильтровывали и высушивали с получением 529 мг энантиомера 6А. Второй элюированный энантиомер кристаллизовали из Et₂O. Осадок отфильтровывали и высушивали с получением 517 мг энантиомера 6В.

Соединение 6.

^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 2,21 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,71 (s, 3H) 3,79 (s, 3H) 3,90-3,97 (m, 1H) 3,98-4,06 (m, 1H) 4,17 (t, $J=4,6$ Гц, 2H) 5,29 (br t, $J=4,9$ Гц, 1H) 6,31 (d, $J=7,6$ Гц, 1H) 6,56 (t, $J=1,7$ Гц, 1H) 6,64 (s, 1H) 6,71 (td, $J=8,4, 2,4$ Гц, 1H) 6,89 (s, 1H) 6,91-6,95 (m, 2H) 6,99 (d, $J=7,9$ Гц, 1H) 7,37 (dd, $J=8,5, 6,9$ Гц, 1H) 7,91 (s, 1H) 8,48 (s, 1H) 11,82 (s, 1H). LC/MS (Способ LC-G): R_t 2,67 мин, MH^+ 557.

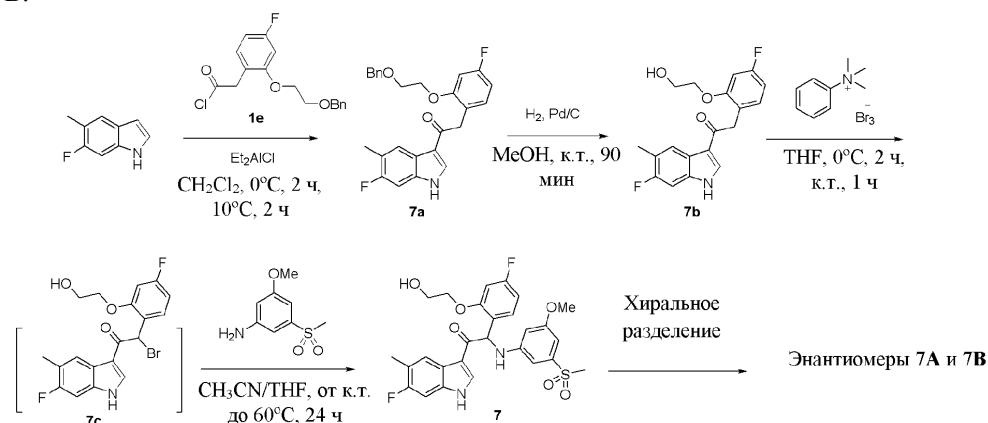
Энантиомер 6А.

^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 2,21 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,71 (s, 3H) 3,79 (s, 3H) 3,94 (dq, $J=8,2, 4,1$ Гц, 1H) 4,03 (dq, $J=11,7, 5,6$ Гц, 1H) 4,17 (t, $J=4,6$ Гц, 2H) 5,29 (t, $J=5,5$ Гц, 1H) 6,32 (d, $J=7,9$ Гц, 1H) 6,56 (m, 1H) 6,64 (br s, 1H) 6,71 (td, $J=8,5, 2,2$ Гц, 1H) 6,89 (s, 1H) 6,91-6,96 (m, 2H) 6,99 (d, $J=7,9$ Гц, 1H) 7,37 (dd, $J=8,5, 6,9$ Гц, 1H) 7,91 (s, 1H) 8,48 (s, 1H) 11,82 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-C): R_t 2,87 мин, MH^+ 557. $[\alpha]_D^{20}$: +125,5° (с 0,2527, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-C): R_t 2,52 мин, MH^+ 557, хиральная чистота 100%. Температура плавления: 232°C.

Энантиомер 6В.

^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 2,21 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,71 (s, 3H) 3,79 (s, 3H) 3,90-3,97 (m, 1H) 3,99-4,07 (m, 1H) 4,17 (t, $J=4,6$ Гц, 2H) 5,29 (br s, 1H) 6,32 (d, $J=7,9$ Гц, 1H) 6,56 (m, 1H) 6,64 (br s, 1H) 6,71 (td, $J=8,4, 2,4$ Гц, 1H) 6,89 (s, 1H) 6,91-6,96 (m, 2H) 6,99 (d, $J=7,6$ Гц, 1H) 7,37 (dd, $J=8,4, 7,1$ Гц, 1H) 7,91 (s, 1H) 8,48 (s, 1H) 11,82 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-C): R_t 2,87 мин, MH^+ 557. $[\alpha]_D^{20}$: -127,1° (с 0,2455, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-C): R_t 4,14 мин, MH^+ 557, хиральная чистота 100%. Температура плавления: 235°C.

Пример 7. Синтез 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 7) и хиральное разделение на энантиомеры 7А и 7В.



Синтез промежуточного соединения 7а.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (25,1 мл, 25,1 ммоль) добавляли по каплям при 0°C и в потоке N_2 к раствору 6-фтор-5-метил-1H-индола [CAS 162100-95-0] (2,5 г, 16,8 ммоль) в CH_2Cl_2 (135 мл). Через 10 мин при 0°C раствор 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорида 1e (8,11 г, 25,1 ммоль) в CH_2Cl_2 (50 мл) добавляли по каплям при 0°C в течение периода 45 мин, при этом температуру реакции поддерживали ниже 5°C . Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч и при 10°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и по каплям добавляли раствор сегнетовой соли [6100-16-9] (9,46 г, 33,5 ммоль) в воде (10 мл). После добавления реакцию перемешивали при 0°C в течение 10 минут и затем обеспечивали нагревание до комнатной температуры. Добавляли THF (150 мл) и Na_2SO_4 (40 г) и смесь перемешивали в течение 18 ч. Смесь фильтровали через Dicalite® и промывали большим количеством THF . Объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении и выпаривали совместно с толуолом. Остаток кристаллизовали из CH_3CN (10 мл), отфильтровывали, промывали с помощью CH_3CN (2×) и высушивали под вакуумом при 40°C с получением первой фракции 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 7а (1,86 г). Фильтрат выпаривали при пониженном давлении. Остаток (7,7 г) очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 120 г, подвижная фаза: гептан/ EtOAc , градиент от 100/0 до 0/100). Фракции, содержащие продукт, объединяли и оставляли в открытом резервуаре для обеспечения выпаривания растворителя и кристаллизации продукта. Осадок выделяли посредством фильтрации, промывали 3х с помощью гептана/ EtOAc (1/1) и высушивали под вакуумом при 40°C с получением второй (1,51 г) и третьей (0,75 г) фракции промежуточного соединения 7а.

Синтез промежуточного соединения 7б.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 7а (1,86 г, 4,27 ммоль) в метаноле (80 мл) гидрировали при атмосферном давлении H_2 в течение 90 мин с 10% Pd/C (0,5 г). Смесь фильтровали через слой Dicalite® и промывали с помощью MeOH . Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Твердый остаток перемешивали в диизопропиловом эфире (10

мл). Осадок отфильтровывали, промывали с помощью DIPE (4× 1,5 мл) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 7b (330 мг).

Синтез соединения 7 и хиральное разделение энантимеров 7A и 7B.

В потоке N₂ при 0°C раствор трибромида фенилтриметиламмония [CAS 4207-56-1] (447 мг, 1,24 ммоль) в THF (25 мл) добавляли по каплям к раствору 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 7b (390 мг, 1,13 ммоль) в THF (25 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч и при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь, содержащую неочищенный 2-бром-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)этанон 7с, смешивали с раствором 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилина [CAS 62606-02-4] (579 мг, 2,88 ммоль) и диизопропилэтиламина (165 мкл, 0,96 ммоль) в CH₃CN (100 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи в атмосфере N₂. Температуру реакции постепенно увеличивали до 50°C в течение 4 ч и до 60°C в течение 24 ч. Растворители выпаривали при пониженном давлении. Остаток растворяли в DCM (100 мл) и промывали с помощью 1 н. HCl (100 мл). Органический слой промывали водой (100 мл), высушивали над MgSO₄, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 120 г, элюент: EtOAc/EtOH (3:1)/гептан, градиент от 0/100 до 50/50). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали при пониженном давлении. Твердый остаток кристаллизовали из MeOH/воды. Осадок выделяли посредством фильтрации, промывали с помощью MeOH/воды 1/1 (4 мл) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением рацемического 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(6-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 7, 205 мг).

Хиральное разделение энантимеров соединения 7 осуществляли посредством препаративной SFC (неподвижная фаза: Chiralpak® Diacel AS 20×250 мм, подвижная фаза: CO₂, EtOH+0,4% iPrNH₂). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали с получением энантиомера 7A в качестве первого элюированного продукта и энантиомера 7B в качестве второго элюированного продукта. Оба энантиомера перемешивали в MeOH/воде 1/1 (10 мл) и перемешивали в течение 1 ч. Твердые вещества отфильтровывали и высушивали под вакуумом при 40°C с получением энантиомера 7A (8 мг) и энантиомера 7B (32 мг) в виде белых порошков.

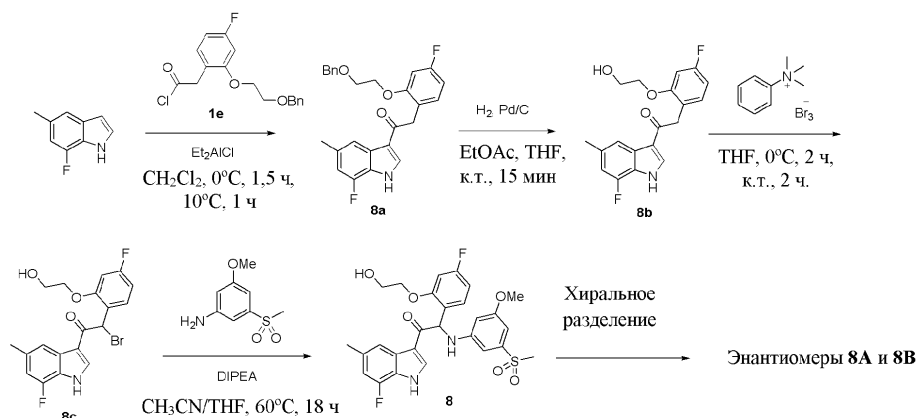
Энантиомер 7A.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 2,30 (d, J=1,1 Гц, 3H) 3,07 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,89-4,07 (m, 2H) 4,18 (t, J=4,5 Гц, 2H) 5,28 (br s, 1H) 6,33 (d, J=7,7 Гц, 1H) 6,57 (t, J=1,7 Гц, 1H) 6,64 (t, J=2,3 Гц, 1H) 6,71 (td, J=8,5, 2,4 Гц, 1H) 6,89-6,96 (m, 2H) 6,99 (d, J=7,9 Гц, 1H) 7,19 (d, J=10,1 Гц, 1H) 7,37 (dd, J=8,6, 7,0 Гц, 1H) 8,03 (d, J=7,7 Гц, 1H) 8,61 (s, 1H) 11,89 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-B): R_t 1,95 мин, MH⁺ 545. [α]_D²⁰: +141,4° (с 0,43, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 3,36 мин, MH⁺ 545, хиральная чистота 98,9%.

Энантиомер 7B.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 2,30 (d, J=1,3 Гц, 3H) 3,07 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,88-4,05 (m, 2H) 4,18 (t, J=4,6 Гц, 2H) 5,34 (br s, 1H) 6,32 (d, J=7,7 Гц, 1H) 6,56 (t, J=1,8 Гц, 1H) 6,64 (t, J=2,1 Гц, 1H) 6,70 (td, J=8,4, 2,3 Гц, 1H) 6,89-6,95 (m, 2H) 6,98 (d, J=7,7 Гц, 1H) 7,19 (d, J=10,1 Гц, 1H) 7,37 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H) 8,02 (d, J=7,7 Гц, 1H) 8,62 (s, 1H). LC/MS (Способ LC-B): R_t 1,95 мин, MH⁺ 545. [α]_D²⁰: -144,7° (с 0,465, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 3,77 мин, MH⁺ 545, хиральная чистота 100%.

Пример 8. Синтез 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(7-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 8) и хиральное разделение на энантиомеры 8A и 8B.



Синтез промежуточного соединения 8a.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (18,6 мл, 18,6 ммоль) добавляли по каплям при 0°C и в потоке N₂ к раствору 7-фтор-5-метил-1H-индола [CAS 442910-91-0] (1,85 г, 12,4 ммоль) в CH₂Cl₂ (100 мл).

Через 5 мин при 0°C раствор 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорида 1e (6,0 г, 18,6 ммоль) в CH₂Cl₂ (35 мл) добавляли по каплям при 0°C в течение периода 50 мин, при этом температуру реакции поддерживали ниже 6°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 90 мин и при 10°C в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и по каплям добавляли раствор сегнетовой соли [6100-16-9] (7,0 г, 24,8 моль) в воде (7,5 мл). После добавления реакцию перемешивали при 0°C в течение 10 минут и затем обеспечивали нагревание до комнатной температуры. Добавляли THF (125 мл) и Na₂SO₄ (30 г) и смесь перемешивали в течение 18 ч. Смесь фильтровали через Dicalite®, промывали большим количеством THF и объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении. Остаток перемешивали в CH₃CN (7,5 мл) при 40°C в течение 1 ч. Осадок отфильтровывали, промывали с помощью CH₃CN (2×) и высушивали под вакуумом при 40°C с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(7-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 8a (два выхода: 0,55 г и 1,86 г).

Синтез промежуточного соединения 8b.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(7-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил) этанона 8a (2,4 г, 5,51 ммоль) в EtOAc (80 мл) и THF (10 мл) гидрировали при атмосферном давлении H₂ в течение 15 мин с 10% Pd/C (0,5 г). Смесь фильтровали через слой Dicalite® и осадок на фильтре промывали с помощью EtOAc и THF. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Твердый остаток перемешивали в диизопропиловом эфире/диэтиловом эфире 1/1 (30 мл). Осадок отфильтровывали, промывали с помощью DIPE/Et₂O 1/1 (3×) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(7-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 8b (1,47 г).

Синтез промежуточного соединения 8c.

Раствор 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(7-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил) этанона 8b (1,47 г, 4,26 ммоль) в THF (40 мл) охлаждали до 0°C в потоке N₂. Трибромид фенилтриметиламмония [CAS 4207-5 6-1] (1,68 г, 4,47 ммоль) добавляли порциями и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч и при комнатной температуре в течение 2 ч. Осадок отфильтровывали, промывали с помощью THF и объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении с получением 2-бром-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(7-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)этанона 8c (1,81 г), который применяли без дополнительной очистки на следующей стадии.

Синтез соединения 8 и хиральное разделение энантиомеров 8A и 8B.

2-Бром-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(7-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)этанон 8c (1,81 г, 4,26 ммоль), 3-метокси-5-(метилсульфонил)аин (1,47 мл, нилин [CAS 62606-02-4] (1,71 г, 8,51 ммоль) и диизопропилэтиламин (8,51 ммоль) растворяли в CH₃CN (60 мл) и THF (40 мл) и реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение 18 ч в атмосфере N₂. Обеспечивали достижение реакционной смесью комнатной температуры и выливали ее в воду (400 мл). Продукт экстрагировали с помощью Et₂O (2×). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, высушивали над MgSO₄, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Остаток (3,4 г) очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 80 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH, градиент от 100/0/0 до 40/45/15). Требуемые фракции объединяли и выпаривали при пониженном давлении. Продукт дополнительно очищали посредством препаративной HPLC (неподвижная фаза: Urtisphere® C18 ODB - 10 мкм, 200 г, 5 см, подвижная фаза: 0,25% раствор NH₄HCO₃ в воде, CH₃CN). Требуемые фракции объединяли и органические летучие вещества выпаривали очень медленно в роторном испарителе при пониженном давлении (температура бани 40°C), обеспечивая осаждение продукта. Твердые вещества отфильтровывали, промывали водой (4×) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением рацемического 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(7-фтор-5-метил-1H-индол-3-ил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 8, 1,26 г).

Хиральное разделение энантиомеров соединения 8 осуществляли посредством хирального разделения с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: AS 20 мкм, подвижная фаза: 100% метанол). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали с получением энантиомера 8A в качестве первого элюированного продукта и энантиомера 8B в качестве второго элюированного продукта. Оба остатка перемешивали в воде (3 мл) и MeOH (2 мл), отфильтровывали, промывали (3×) с помощью MeOH/воды (1/2) и высушивали под вакуумом при 45°C с получением энантиомера 8A (416 мг) и энантиомера 8B (399 мг).

Соединение 8.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 2,39 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,90-4,03 (m, 2H) 4,16 (t, J=4,7 Гц, 2H) 5,22 (t, J=5,6 Гц, 1H) 6,37 (d, J=7,7 Гц, 1H) 6,57 (t, J=1,8 Гц, 1H) 6,65 (t, J=2,3 Гц, 1H) 6,71 (td, J=8,5, 2,4 Гц, 1H) 6,87-6,96 (m, 3H) 6,99 (d, J=7,7 Гц, 1H) 7,38 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H) 7,80 (br s, 1H) 8,60 (s, 1H) 12,50 (s, 1H). LC/MS (Способ LC-B): R_t 1,97 мин, MН⁺ 545.

Энантиомер 8A.

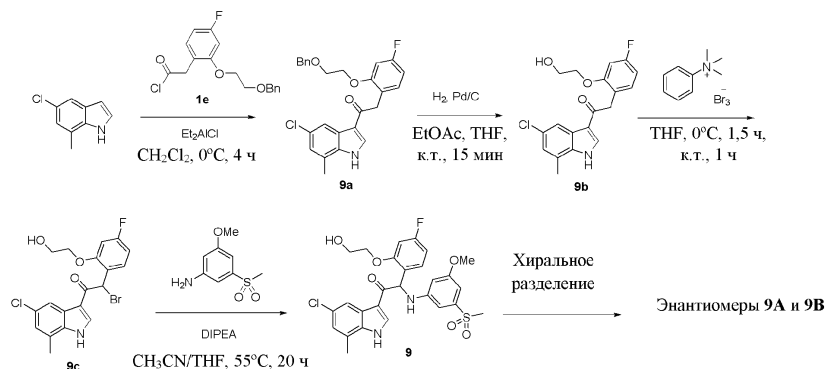
¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 2,39 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,89-4,03 (m, 2H) 4,16 (t, J=4,6 Гц, 2H) 5,22 (t, J=5,5 Гц, 1H) 6,37 (d, J=7,9 Гц, 1H) 6,57 (t, J=1,9 Гц, 1H) 6,65 (t, J=2,3 Гц, 1H) 6,71 (td, J=8,5, 2,4 Гц, 1H) 6,87-6,96 (m, 3H) 6,99 (d, J=7,9 Гц, 1H) 7,38 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H) 7,80 (s, 1H) 8,60 (s, 1H) 12,50 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-A) : R_t 1,05 мин, MН⁺ 545 [α]_D²⁰: +146,7° (с 0,54, DMF). Хи-

ральная SFC (Способ SFC-E): R_t 3,18 мин, MH^+ 545, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 8B.

1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$) δ ppm 2,39 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,89-4,03 (m, 2H) 4,16 (t, $J=4,6$ Гц, 2H) 5,22 (br t, $J=5,3$ Гц, 1H) 6,36 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 6,57 (t, $J=1,8$ Гц, 1H) 6,65 (t, $J=2,1$ Гц, 1H) 6,71 (td, $J=8,5, 2,4$ Гц, 1H) 6,86-6,96 (m, 3H) 6,99 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 7,37 (dd, $J=8,6, 6,8$ Гц, 1H) 7,80 (s, 1H) 8,60 (s, 1H) 12,50 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-A): R_t 1,05 мин, MH^+ 545. $[\alpha]_D^{20}$: -144,5° (с 0,53, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 3,59 мин, MH^+ 545, хиральная чистота 99,3%.

Пример 9. Синтез 1-(5-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 9) и хиральное разделение на энантиомеры 9A и 9B.



Синтез промежуточного соединения 9a.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (28,1 мл, 28,1 ммоль) добавляли по каплям при 0°C и в потоке N_2 к раствору 5-хлор-7-метил-1H-индола [CAS 15936-77-3] (3,1 г, 18,7 ммоль) в CH_2Cl_2 (175 мл). После перемешивания в течение 15 мин при 0°C раствор 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорида 1e (9,06 г, 28,1 ммоль) в CH_2Cl_2 (75 мл) добавляли по каплям при 0°C в течение периода 75 мин, при этом температуру реакции поддерживали ниже 4°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 4 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и по каплям добавляли раствор сегнетовой соли [6100-16-9] (10,6 г, 37,4 ммоль) в воде (11 мл). После добавления реакцию перемешивали при 0°C в течение 10 минут и затем обеспечивали нагревание до комнатной температуры. Добавляли THF (200 мл) и Na_2SO_4 (45 г) и смесь перемешивали в течение 18 ч. Смесь фильтровали через Dicalite®, промывали большим количеством THF и объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении. Остаток перемешивали в CH_3CN (15 мл) при 40°C. Осадок отфильтровывали, промывали с помощью CH_3CN (2×) и высушивали под вакуумом при 40°C с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(5-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)этанона 9a (4,0 г).

Синтез промежуточного соединения 9b.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(5-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил) этанона 9a (4,0 г, 8,85 ммоль) в EtOAc (80 мл) и THF (50 мл) гидрировали при атмосферном давлении H_2 в течение 15 мин с 10% Pd/C (0,5 г). Смесь фильтровали через слой Dicalite® и осадок на фильтре промывали с помощью THF. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Твердый остаток перемешивали в диизопропиловом эфире/диэтиловом эфире 1/1 (40 мл). Осадок отфильтровывали, промывали с помощью DIPE/ Et_2O 1/1 (3×) и высушивали под вакуумом при 45°C с получением 1-(5-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 9b (2,88 г).

Синтез промежуточного соединения 9c.

Раствор 1-(5-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси) фенил) этанона 9b (1,5 г, 4,15 ммоль) в THF (40 мл) охлаждали до 0°C в потоке N_2 . Трибромид фенилтриметиламмония [CAS 4207-56-1] (1,64 г, 4,35 ммоль) добавляли порциями и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 90 мин и при комнатной температуре в течение 1 ч. Осадок отфильтровывали, промывали с помощью THF (3×) и объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении с получением 2-бром-1-(5-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанона 9c (1,83 г), который применяли без дополнительной очистки на следующей стадии.

Синтез соединения 9 и хиральное разделение энантиомеров 9A и 9B.

2-Бром-1-(5-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)этанон 9c (1,83 г, 4,15 ммоль), 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилин [CAS 62606-02-4] (1,67 г, 8,29 ммоль) и диизопропиламин (1,43 мл, 8,29 ммоль) растворяли в CH_3CN (60 мл) и THF (40 мл) и реакционную смесь перемешивали при 55°C в течение 20 ч в атмосфере N_2 . Обеспечивали достижение реакционной смесью комнатной температуры и выливали ее в воду (400 мл). Продукт экстрагировали с помощью Et_2O (2×). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, высушивали над $MgSO_4$, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Остаток перемешивали в CH_2Cl_2 (7,5 мл). Твердые вещества отфильтровывали, промывали (2×) с помощью CH_2Cl_2 и высушивали под вакуумом при 45°C с получением

рацемического 1-(5-хлор-7-метил-1H-индол-3-ил)-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)этанона (соединение 9, 1,08 г).

Хиральное разделение энантиомеров соединения 9 осуществляли посредством хирального разделения с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: AS 20 мкм, подвижная фаза: 100% метанол). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали с получением энантиомера 9А в качестве первого элюированного продукта и энантиомера 9В в качестве второго элюированного продукта. Оба энантиомера кристаллизовали из CH_2Cl_2 (4 мл), отфильтровывали, промывали (3×) с помощью CH_2Cl_2 и высушивали под вакуумом при 45°C с обеспечением энантиомера 9А (256 мг) и энантиомера 9В (183 мг).

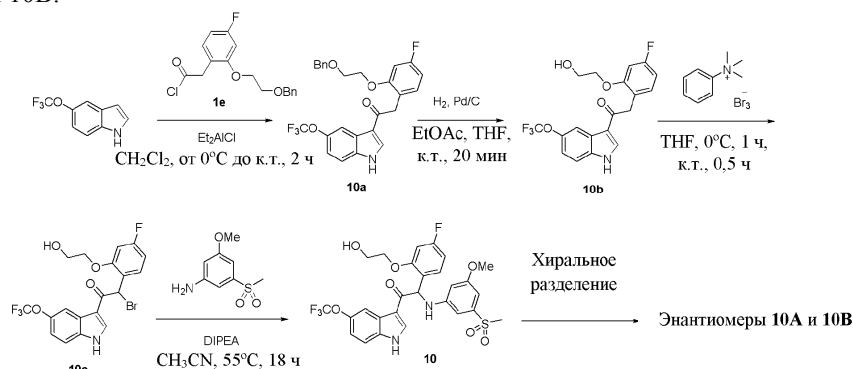
Энантиомер 9А.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 2,47 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,90-4,07 (m, 2H) 4,18 (t, $J=4,6$ Гц, 2H) 5,28 (t, $J=5,7$ Гц, 1H) 6,38 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 6,58 (t, $J=1,8$ Гц, 1H) 6,67 (t, $J=2,2$ Гц, 1H) 6,71 (td, $J=8,5, 2,4$ Гц, 1H) 6,89-6,97 (m, 2H) 7,01 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 7,07 (d, $J=1,1$ Гц, 1H) 7,37 (dd, $J=8,6, 6,8$ Гц, 1H) 7,99 (d, $J=1,8$ Гц, 1H) 8,64 (s, 1H) 12,29 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-B): R_t 2,06 мин, MH^+ 561 $[\alpha]_D^{20}$: +145,3° (с 0,45, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 3,63 мин, MH^+ 561, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 9В.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 2,47 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,90-4,07 (m, 2H) 4,17 (t, $J=4,7$ Гц, 2H) 5,28 (t, $J=5,7$ Гц, 1H) 6,38 (d, $J=7,9$ Гц, 1H) 6,57 (t, $J=1,8$ Гц, 1H) 6,66 (t, $J=2,1$ Гц, 1H) 6,71 (td, $J=8,5, 2,4$ Гц, 1H) 6,90-6,97 (m, 2H) 7,01 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 7,06-7,09 (m, 1H) 7,37 (dd, $J=8,6, 7,0$ Гц, 1H) 7,99 (d, $J=1,8$ Гц, 1H) 8,64 (d, $J=3,3$ Гц, 1H) 12,29 (d, $J=2,9$ Гц, 1H). LC/MS (Способ LC-A): R_t 1,13 мин, MH^+ 561. $[\alpha]_D^{20}$: -144,6° (с 0,605, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 4,14 мин, MH^+ 561, хиральная чистота 100%.

Пример 10. Синтез 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона (соединение 10) и хиральное разделение на энантиомеры 10А и 10В.



Синтез промежуточного соединения 10а.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (18,6 мл, 18,6 ммоль) добавляли по каплям при 0°C и в потоке N_2 к раствору 5-(трифторметокси)-1H-индола [CAS 262593-63-5] (2,5 г, 12,4 ммоль) в CH_2Cl_2 (150 мл). После перемешивания в течение 15 мин при 0°C раствор 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорида 1e (6,02 г, 18,6 ммоль) в CH_2Cl_2 (100 мл) добавляли по каплям при 0°C, при этом температуру реакции поддерживали ниже 7°C.

Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1,5 ч и при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и по каплям добавляли раствор сегнетовой соли [6100-16-9] (7,02 г, 24,9 ммоль) в воде (7 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин и затем обеспечивали нагревание до комнатной температуры. Добавляли THF (150 мл) и Na_2SO_4 (25 г) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. Смесь фильтровали через Dicalite®. Осадок на фильтре промывали с помощью THF (4×150 мл) и объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении и выпаривали совместно с CH_3CN . Остаточное масло отверждали посредством отстаивания в течение ночи. Продукт перемешивали в CH_3CN (5 мл). Осадок отфильтровывали, промывали с помощью CH_3CN (3×1 мл) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением первой фракции 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 10а (1,3 г). Объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении. Остаток (7 г) очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Biotage® SNAP Ultra с силикагелем 100 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH, градиент от 100/0/0 до 40/45/15). Требуемые фракции объединяли, выпаривали при пониженном давлении и выпаривали совместно с CH_3CN и толуолом. Оставшееся масло растирали со смесью толуола/гептана 1/1 (30 мл). Твердые вещества отфильтровывали, промывали 2×толуолом/гептаном 1/1 и высушивали под вакуумом при 50°C с получением второй фракции промежуточного соединения 10а (1,97 г).

Синтез промежуточного соединения 10b.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 10а (1,97 г, 4,04 ммоль) в EtOAc (75 мл) и THF (10 мл) гидрировали при комнатной температуре при атмо-

сферном давлении H_2 в течение 20 мин с 10% Pd/C (0,5 г). Смесь фильтровали через слой Dicalite® и промывали с помощью THF. Объединенные фильтраты концентрировали при пониженном давлении. Твердый остаток перемешивали в CH_2Cl_2 (3,5 мл). Осадок отфильтровывали, промывали с помощью CH_2Cl_2 (3×1 мл) и высушивали под вакуумом при 45°C с получением 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 10b (1,49 г).

Синтез промежуточного соединения 10c.

Раствор 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 10b (1,49 г, 3,75 ммоль) в THF (60 мл) охлаждали до 0°C в потоке N_2 . Добавляли трибромид фенилтриметиламмония [CAS 4207-56-1] (1,48 г, 3,94 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 30 мин. Осадок отфильтровывали, промывали с помощью THF (2×) и объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении с получением 2-бром-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 10c (1,79 г), который применяли без дополнительной очистки на следующей стадии.

Синтез соединения 10 и хиральное разделение энантиомеров 10A и 10B.

2-Бром-2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанон 10c (1,79 г, 3,76 ммоль), 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилин [CAS 62606-02-4] (3,41 г, 17,0 ммоль) и диизопропилэтиламин (2,92 мл, 17,0 ммоль) растворяли в CH_3CN (90 мл) и реакционную смесь перемешивали при 55°C в течение 18 ч в атмосфере N_2 . Твердую фракцию удаляли посредством фильтрации, промывали с помощью THF (2×) и отбрасывали (непрореагировавший исходный материал 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилин). К объединенным фильтратам добавляли воду и продукт экстрагировали с помощью Et_2O . Объединенные органические слои промывали солевым раствором, высушивали над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 80 г, подвижная фаза: EtAc:EtOH(3:1)/гептан, градиент от 0/100 до 40/60). Фракции продукта объединяли и выпаривали при пониженном давлении. Остаток дополнительно очищали посредством препаративной HPLC (неподвижная фаза: RP XBridge® Prep C18 OBD - 10 мкм, 50×150 мм, подвижная фаза: 0,25% раствор NH_4HCO_3 в воде, CH_3CN). Фракции, содержащие продукт, объединяли, выпаривали при пониженном давлении и выпаривали совместно с MeOH с получением рацемического 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона (соединение 10, 861 мг).

Хиральное разделение энантиомеров соединения 10 (810 мг) осуществляли посредством хирального разделения с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: Whelk-01 (R, R), подвижная фаза: 80% гептана, 20% этанола). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали с получением энантиомера 10A в качестве первого элюированного продукта и энантиомера 10B в качестве второго элюированного продукта. Оба энантиомера дополнительно очищали посредством колоночной хроматографии (картридж Grace Reveleris® с силикагелем 12 г, элюент: EtAc:EtOH(3:1)/гептан, градиент от 0/100 до 40/60). Фракции продукта объединяли, выпаривали при пониженном давлении и выпаривали совместно с MeOH. Остатки отверждали посредством осаждения из смеси растворителей MeOH и воды, отфильтровывали и высушивали при 50°C под вакуумом с получением энантиомера 10A (119 мг) и энантиомера 10B (78 мг).

Энантиомер 10A.

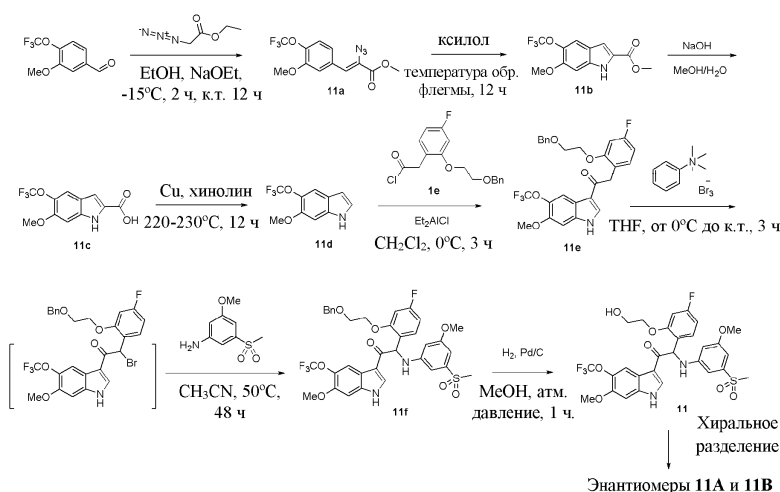
^1H ЯМР (360 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,85-4,08 (m, 2H) 4,14-4,21 (m, 2H) 5,32 (t, $J=5,5$ Гц, 1H) 6,37 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 6,57 (t, $J=1,8$ Гц, 1H) 6,64 (br s, 1H) 6,69-6,78 (m, 1H) 6,90-6,99 (m, 2H) 7,08 (d, $J=7,3$ Гц, 1H) 7,21 (br d, $J=9,1$ Гц, 1H) 7,38 (dd, $J=8,8, 7,0$ Гц, 1H) 7,56 (d, $J=8,4$ Гц, 1H) 8,07 (d, $J=1,5$ Гц, 1H) 8,78 (s, 1H) 12,37 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-A) : R_t 1,11 мин, MH^+ 597 [α] $_D^{20}$: -112,2° (с 0,565, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 2,95 мин, MH^+ 597, хиральная чистота 99,8%.

Энантиомер 10B.

^1H ЯМР (360 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,88-4,07 (m, 2H) 4,14-4,21 (m, 2H) 5,32 (t, $J=5,5$ Гц, 1H) 6,37 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 6,56-6,59 (m, 1H) 6,65 (t, $J=2,2$ Гц, 1H) 6,73 (td, $J=8,4, 2,6$ Гц, 1H) 6,91-6,98 (m, 2H) 7,08 (d, $J=7,7$ Гц, 1H) 7,21 (dd, $J=9,0, 2,0$ Гц, 1H) 7,38 (dd, $J=8,8, 7,0$ Гц, 1H) 7,56 (d, $J=8,8$ Гц, 1H) 8,08 (d, $J=1,5$ Гц, 1H) 8,78 (s, 1H) 12,38 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-A): R_t 1,11 мин, MH^+ 597. [α] $_D^{20}$: +112,1° (с 0,527, DMF).

Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 2,65 мин, MH^+ 597, хиральная чистота 98,2%.

Пример 11. Синтез 2-(4-хлор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона (соединение 11) и хиральное разделение на энантиомеры 11A и 11B



Синтез промежуточного соединения 11а.

К охлажденному (-15°C) раствору 3-метокси-4-(трифторметокси)бенальдегида [CAS 853771-90-1] (50 г, 230 ммоль) и этилазидоацетата (89 г, 690 ммоль) в EtOH (400 мл) добавляли по каплям в течение периода 2 ч раствор NaOEt (0,69 моль, полученный из 15,9 г Na и 700 мл EtOH). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После охлаждения на ледяной бане реакцию гасили насыщенным раствором NH₄Cl (1,2 л) и перемешивали в течение 10 мин. Осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали с получением (Z)-этил-2-азидо-3-(3-метокси-4-(трифторметокси)фенил)акрилата 11а (32 г) в виде желтоватого твердого вещества.

Синтез промежуточного соединения 11b.

Раствор (Z)-этил-2-азидо-3-(3-метокси-4-(трифторметокси)фенил)акрилата 11а (3 г, 10 ммоль) в ксилоле (40 мл) нагревали до температуры образования флегмы в течение ночи. После охлаждения до комнатной температуры растворитель выпаривали до сухого состояния. Остаток растирали с гексаном (50 мл) и осадок отфильтровывали с получением метил-6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индол-2-карбоксилата 11b (выход: 1,4-1,6 г) в виде желтого твердого вещества.

Синтез промежуточного соединения 11с.

NaOH (7 г, 175 ммоль) добавляли к смеси метил-6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индол-2-карбоксилата 11b (25 г, 87 ммоль) в MeOH/H₂O (2/1, 300 мл) и смесь нагревали до температуры образования флегмы с получением прозрачного раствора. После охлаждения до комнатной температуры большую часть метанола удаляли при пониженном давлении и оставшийся водный раствор подкисляли с помощью конц. HCl до pH 3-4. Продукт экстрагировали с помощью EtOAc (2×250 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, высушивали и выпаривали при пониженном давлении с получением 6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индол-2-карбоновой кислоты 11с (22,7 г) в виде серого твердого вещества.

Синтез промежуточного соединения 11d.

Суспензию 6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индол-2-карбоновой кислоты 11с (7,5 г, 27 ммоль) и Cu (1,22 г, 0,7 экв.) в хинолине (150 мл) нагревали до 220-230°C в инертной атмосфере в течение 12 ч. После охлаждения до комнатной температуры смесь разбавляли метил-трет-бутиловым эфиром (MTBE, 400 мл) и промывали насыщенным водным раствором NaHSO₄ (2× 500 мл). Органический слой высушивали над MgSO₄, фильтровали через небольшой слой силикагеля и выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с получением 6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индола 11d (3,75 г) в виде желтого твердого вещества.

Синтез промежуточного соединения 11е.

1 M хлорид диэтилалюминия в гексане (7,8 мл, 7,8 ммоль) добавляли по каплям при 0°C к раствору 6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индола (1,2 г, 5,19 ммоль) в CH₂Cl₂ (25 мл). Через 30 мин при 0°C по каплям добавляли 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)ацетилхлорид 1e (1,94 г, 6,0 ммоль) в CH₂Cl₂ (25 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Реакционную смесь осторожно гасили при 0°C льдом и затем водой. Слои разделяли и водный слой экстрагировали с помощью CH₂Cl₂. Объединенные органические слои высушивали над MgSO₄, фильтровали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 80 г, элюент: CH₂Cl₂). Чистые фракции объединяли и выпаривали до сухого состояния с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил) этанона 11e (1,6 г). Синтез промежуточного соединения 11f в потоке N₂ при 0°C раствор трибромида триметилфениламмония (1,1 г, 2,9 ммоль) в THF (40 мл) добавляли по каплям к раствору 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 11e (1,5 г, 2,9 ммоль) в THF (40 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч, охлаждающую баню убирали и перемешивание про-

должали при комнатной температуре в течение 3 ч. Добавляли 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилин [CAS 62606-02-04] (1,75 г, 8,7 ммоль) в CH₃CN (40 мл) и полученную смесь перемешивали в течение 48 ч при 50°C. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток поглощали с помощью EtOAc, промывали водой, 1н. HCl (3×) и затем водой. Органический слой высушивали над MgSO₄, фильтровали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 80 г, элюент: CH₂Cl₂). Чистые фракции объединяли и выпаривали до сухого состояния с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 11f (1 г).

Синтез соединения 11 и хиральное разделение на энантиомеры 11A и 11B.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 11f (1 г, 1,39 ммоль) в CH₃OH (30 мл) гидрировали при атмосферном давлении H₂ в течение 1 ч с применением Pd/C 10% (300 мг, 0,28 ммоль) в качестве катализатора. Реакционную смесь разбавляли с помощью CH₂Cl₂ и фильтровали через слой Celite®. Фильтрат выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (15-40 мкм, 40 г, элюент: CH₂Cl₂/CH₃OH 99/1). Вторую очистку осуществляли посредством обращенно-фазовой HPLC (неподвижная фаза: XBridge® - C18 10 мкм, 30×150 мм, подвижная фаза: градиент от 50% NH₄HCO₃ (0,2%)/50% MeOH до 0% NH₄HCO₃ (0,2%)/100% MeOH). Чистые фракции объединяли и выпаривали до сухого состояния с получением, после отверждения в диизопропиловом эфире, 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(6-метокси-5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона (соединение 11, 170 мг) в виде рацемической смеси. Энантиомеры соединения 11 (150 мг) разделяли посредством хиральной SFC (неподвижная фаза: Chiralpak® AD-H 5 мкм 250×20 мм, подвижная фаза: 70% CO₂, 30% iPrOH (+ 0,3% iPrNH₂)) с получением 67 мг первого элюированного энантиомера и 70 мг второго элюированного энантиомера. Первый элюированный энантиомер отверждали из диизопропилового эфира/петролейного эфира с получением 58 мг энантиомера 11A. Второй элюированный энантиомер отверждали из диизопропилового эфира/петролейного эфира с получением 58 мг энантиомера 11B.

Соединение 11.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,07 (s, 3H) 3,71 (s, 3H) 3,86 (s, 3H) 3,88-4,06 (m, 2H) 4,17 (t, J=4,5 Гц, 2H) 5,26 (br s, 1H) 6,33 (d, J=8,1 Гц, 1H) 6,57 (d, J=1,5 Гц, 1H) 6,63 (s, 1H) 6,72 (td, J=8,6, 2,5 Гц, 1H) 6,89-6,97 (m, 2H) 7,01 (d, J=7,6 Гц, 1H) 7,17 (s, 1H) 7,38 (dd, J=8,6, 7,1 Гц, 1H) 8,03 (d, J=1,0 Гц, 1H) 8,61 (s, 1H) 12,14 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-C): R_t 2,99 мин, MH⁺ 627.

Соединение 11A.

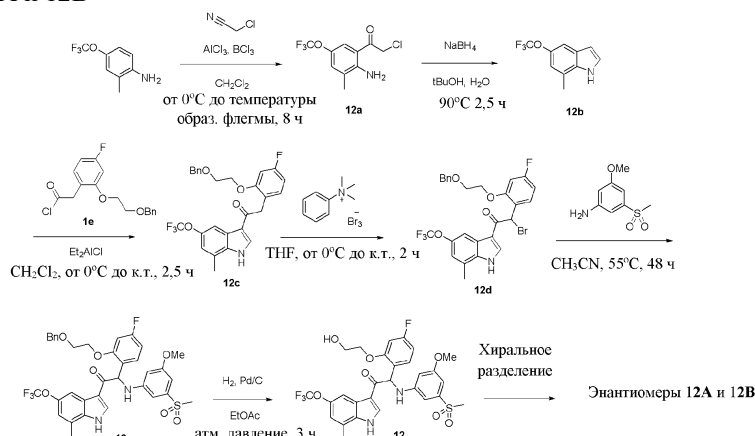
¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,87 (s, 3H) 3,89-4,08 (m, 2H) 4,16-4,19 (m, 2H) 5,30 (br s, 1H) 6,34 (d, J=7,6 Гц, 1H) 6,57 (s, 1H) 6,63 (br s, 1H) 6,72 (td, J=8,4, 1,9 Гц, 1H) 6,90-6,98 (m, 2H) 7,05 (br d, J=7,9 Гц, 1H) 7,17 (s, 1H) 7,38 (t, J=7,7 Гц, 1H) 8,04 (s, 1H) 8,63 (s, 1H) 12,14 (br s, 1H) LC/MS (Способ LC-C): R_t 2,99 мин, MH⁺ 627. [α]_D²⁰: -90,3° (с 0,29, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-F): R_t 2,31 мин, MH⁺ 627, хиральная чистота 100%.

Соединение 11B.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,87 (s, 3H) 3,89-4,08 (m, 2H) 4,14-4,20 (m, 2H) 5,30 (br s, 1H) 6,34 (d, J=7,6 Гц, 1H) 6,57 (s, 1H) 6,63 (br s, 1H) 6,72 (td, J=8,4, 2,0 Гц, 1H) 6,90-6,99 (m, 2H) 7,05 (d, J=7,6 Гц, 1H) 7,17 (s, 1H) 7,38 (t, J=7,6 Гц, 1H) 8,04 (s, 1H) 8,63 (s, 1H) 12,10 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-C): R_t 2,99 мин, MH⁺ 627. [α]_D²⁰: +95,4° (с 0,26, DMF).

Хиральная SFC (Способ SFC-F): R_t 3,29 мин, MH⁺ 627, хиральная чистота 100%.

Пример 12. Синтез 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(7-метил-5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона (соединение 12) и хиральное разделение на энантиомеры 12A и 12B



Смесь 1 М хлорида бора(III) в CH_2Cl_2 (25,5 мл, 25,5 ммоль) и хлорида алюминия(III) (3,40 г, 25,5 ммоль) разбавляли с помощью CH_2Cl_2 (20 мл) и охлаждали на ледяной бане в атмосфере N_2 . Добавляли по каплям раствор 2-метил-4-(трифторметокси)анилина [CAS 86256-59-9] (4,88 г, 25,5 ммоль) и хлорацетонитрила (3,24 мл, 51,0 ммоль) в CH_2Cl_2 (7,5 мл). После окончания добавления водяную баню убирали и смесь нагревали до температуры образования флегмы в течение 8 ч. Смесь снова охлаждали до 0°C с применением ледяной бани. Добавляли по каплям 2н. HCl (75 мл), что вызывало сильное осаждение. Полученную суспензию нагревали до температуры образования флегмы в течение 90 мин и охлаждали до комнатной температуры. Твердые вещества удаляли посредством фильтрации. Осадок на фильтре промывали с помощью CH_2Cl_2 (4×). Фильтраты объединяли и фазы разделяли. Органический слой отделяли, промывали водным раствором NaHCO_3 , высушивали над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Biotage® SNAP Ultra с силикагелем 100 г, подвижная фаза: гептан/ CH_2Cl_2 , градиент от 100/0 до 0/100). Требуемые фракции объединяли и концентрировали до остаточного объема, составляющего 30 мл. Осадок отфильтровывали, промывали гептаном и CH_2Cl_2 и высушивали под вакуумом при 50°C с получением 1-(2-амино-3-метил-5-(трифторметокси)фенил)-2-хлорэтанона 12а (1,37 г). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Твердый остаток перемешивали в смеси гептана (20 мл) и диизопропилового эфира (3 мл), отфильтровывали, промывали гептаном (3×) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением второй фракции 12а (0,24 г).

Синтез промежуточного соединения 12b.

Борогидрид натрия (326 мг, 8,61 ммоль) добавляли в перемешиваемый раствор 1-(2-амино-3-метил-5-(трифторметокси)фенил)-2-хлорэтанона 12а (1,92 г, 7,17 ммоль) в трет-бутаноле (50 мл) и воде (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин и при 90°C в течение 2,5 ч. Добавляли воду (50 мл) и продукт экстрагировали с помощью диэтилового эфира (2×). Объединенные органические слои промывали соевым раствором, высушивали над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Biotage® SNAP Ultra с силикагелем 25 г, подвижная фаза: гептан/ EtOAc , градиент от 100/0 до 20/80). Требуемые фракции объединяли, концентрировали при пониженном давлении, выпаривали совместно с гептаном и высушивали под вакуумом при 50°C с получением 7-метил-5-(трифторметокси)-1Н-индола 12b (1,2 г).

Синтез промежуточного соединения 12с.

1 М хлорид диэтилалюминия в гексане (16,5 мл, 16,5 ммоль) добавляли по каплям при 0°C к раствору 7-метил-5-(трифторметокси)-1Н-индола 12b (2,36 г, 11,0 ммоль) в CH_2Cl_2 (150 мл). После перемешивания в течение 25 мин при 0°C добавляли по каплям раствор 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил) ацетилхлорида 1е (5,3 г, 16,4 ммоль) в CH_2Cl_2 (75 мл), при этом температуру реакции поддерживали ниже 5°C . Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и по каплям добавляли раствор сегнетовой соли (6,20 г, 22,0 ммоль) в воде (6 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C . Удаляли водяную баню и обеспечивали достижение смеси комнатной температуры. Добавляли THF (200 мл) и Na_2SO_4 (25 г) и смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали через Dicalite® и осадок на фильтре промывали с помощью THF (4×150 мл). Фильтраты объединяли и выпаривали при пониженном давлении. Твердый остаток перемешивали в смеси растворителей DIPE (25 мл) и EtOAc (2 мл). Твердые вещества отфильтровывали, промывали с помощью DIPE (3×) и высушивали при 50°C под вакуумом с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(7-метил-5-(трифторметокси)-1Н-индол-3-ил)этанона 12с (4,3 г).

Синтез промежуточного соединения 12d.

В потоке N_2 при 0°C трибромид фенилтриметиламмония (3,39 г, 9,0 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-1-(7-метил-5-(трифторметокси)-1Н-индол-3-ил) этанона 12с (4,3 г, 8,6 ммоль) в THF (40 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 2 ч. Твердые вещества удаляли посредством фильтрации и фильтр промывали с помощью THF (2×). Объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-2-бром-1-(7-метил-5-(трифторметокси)-1Н-индол-3-ил) этанона 12d (6,9 г), который применяли без дополнительной очистки на следующей стадии.

Синтез промежуточного соединения 12е.

В атмосфере N_2 смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-2-бром-1-(7-метил-5-(трифторметокси)-1Н-индол-3-ил)этанона 12d (6,73 г, 11,6 ммоль), 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилина [CAS 62606-02-04] (4,67 г, 23,2 ммоль) и диизопропилэтиламина (4,00 мл, 23,2 ммоль) в CH_3CN (90 мл) перемешивали в течение 48 ч при 55°C . Добавляли воду (125 мл) и продукт экстрагировали с помощью Et_2O (2×). Объединенные органические слои промывали соевым раствором, высушивали над MgSO_4 , фильтровали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток перемешивали в CH_2Cl_2 , что приводило к осаждению непрореагировавшего исходного материала 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилина. Твердые вещества удаляли посредством фильтрации и фильтрат выпаривали при пониженном дав-

лении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 80 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH, градиент от 100/0/0 до 40/45/15). Чистые фракции продукта объединяли и выпаривали до сухого состояния с получением 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(7-метил-5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанола 12e (4,37 г).

Синтез соединения 12 и хиральное разделение на энантиомеры 12A и 12B.

Смесь 2-(2-(2-(бензилокси)этокси)-4-фторфенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(7-метил-5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанола 12e (4,37 г, 5,11 ммоль) в EtOAc гидрировали при комнатной температуре при атмосферном давлении H₂ в течение 3 ч с применением Pd/C 10% (500 мг) в качестве катализатора. Реакционную смесь фильтровали через слой Dicalite® и осадок на фильтре промывали большим количеством THF. Летучие вещества выпаривали при пониженном давлении. Остаток перемешивали в CH₂Cl₂/EtOAc (90/10) в течение 30 мин. Твердые вещества отфильтровывали и высушивали под вакуумом при 50°C в течение ночи с получением рацемического 2-(4-фтор-2-(2-гидроксиэтокси)фенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(7-метил-5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанола (соединение 12, 2,02 г, чистота согласно LC/MS: 95%). Фракцию соединения 12 (505 мг) дополнительно очищали посредством препаративной HPLC (неподвижная фаза: RP XBridge® Prep C18 OBD - 10 мкм, 30×150 мм, подвижная фаза: 0,25% раствор NH₄HCO₃ в воде, MeOH). Фракции продукта объединяли, выпаривали при пониженном давлении и выпаривали совместно с MeOH. Остаток отверждали из раствора MeOH посредством медленного добавления воды. Осадок отфильтровывали и высушивали при 50°C под вакуумом с получением чистого соединения 12 (300 мг).

Энантиомеры соединения 12 (1569 мг) разделяли посредством хиральной SFC (неподвижная фаза: Daicel Chiralpak® IA; подвижная фаза: изократическая смесь из 75% CO₂, 20% дихлорметана+0,2% изопрпиламина, 5% метанола+0,2% изопрпиламина). Фракции продукта объединяли и выпаривали при пониженном давлении. Первый элюированный энантиомер дополнительно очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 40 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH, градиент от 100/0/0 до 40/45/15). Требуемые фракции объединяли и концентрировали до остаточного объема, составляющего ~15 мл. Смесь оставляли отстаиваться в течение 30 мин. Твердые вещества отфильтровывали, промывали 3× гептаном/EtOAc 4/1 и высушивали под вакуумом при 45°C с получением энантиомера 12A (324 мг). Второй элюированный энантиомер дополнительно очищали посредством флэш-хроматографии (неподвижная фаза: картридж Grace Reveleris® с силикагелем 40 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH, градиент от 100/0/0 до 40/45/15). Требуемые фракции объединяли и концентрировали до остаточного объема, составляющего ~10 мл. Смесь оставляли отстаиваться в течение 18 ч. Твердые вещества отфильтровывали, промывали 3× гептаном/EtOAc 4/1 и высушивали под вакуумом при 50°C с получением энантиомера 12B (295 мг).

Соединение 12.

¹H ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 2,52 (s, 3H) 3,06 (s, 3H) 3,74 (s, 3H) 3,93-4,05 (m, 2H) 4,19 (t, J=4,8 Гц, 2H) 5,07 (br t, J=5,3 Гц, 1H) 6,37 (d, J=7,8 Гц, 1H) 6,59 (t, J=1,8 Гц, 1H) 6,65 (t, J=2,1 Гц, 1H) 6,70 (td, J=8,4, 2,4 Гц, 1H) 6,89 (d, J=7,8 Гц, 1H) 6,90-6,95 (m, 2H) 7,01 (br s, 1H) 7,40 (dd, J=8,7, 6,9 Гц, 1H) 7,93 (br s, 1H) 8,63 (s, 1H) 12,10-12,32 (m, 1H). LC/MS (Способ LC-A) : R_t 1,17 мин, MH⁺ 611.

Соединение 12A.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 2,51 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,73 (s, 3H) 3,91-4,08 (m, 2H) 4,18 (t, J=4,6 Гц, 2H) 5,29 (t, J=5,7 Гц, 1H) 6,40 (d, J=7,7 Гц, 1H) 6,58 (t, J=1,9 Гц, 1H) 6,66 (t, J=2,3 Гц, 1H) 6,72 (td, J=8,5, 2,4 Гц, 1H) 6,91-6,98 (m, 2H) 7,00-7,06 (m, 2H) 7,38 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H) 7,92 (br s, 1H) 8,70 (d, J=3,3 Гц, 1H) 12,37 (d, J=2,9 Гц, 1H). LC/MS (Способ LC-A): R_t 1,16 мин, MH⁺ 611 [α]_D²⁰: +77,9° (с 0,425, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E) : R_t 2,65 мин, MH⁺ 611, хиральная чистота 91,1%.

Соединение 12B.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 2,51 (s, 3H) 3,08 (s, 3H) 3,72 (s, 3H) 3,90-4,07 (m, 2H) 4,18 (t, J=4,6 Гц, 2H) 5,29 (t, J=5,7 Гц, 1H) 6,40 (d, J=7,7 Гц, 1H) 6,58 (t, J=1,9 Гц, 1H) 6,66 (t, J=2,1 Гц, 1H) 6,72 (td, J=8,5, 2,4 Гц, 1H) 6,89-6,98 (m, 2H) 6,99-7,08 (m, 2H) 7,38 (dd, J=8,6, 6,8 Гц, 1H) 7,92 (br s, 1H) 8,70 (s, 1H) 12,37 (br s, 1H). LC/MS (Способ LC-A): R_t 1,15 мин, MH⁺ 611 [α]_D²⁰: -81,4° (с 0,435, DMF). Хиральная SFC (Способ SFC-E): R_t 3,01 мин, MH⁺ 611, хиральная чистота 92,5%.

Противовирусная активность соединений по настоящему изобретению

Анализ противовирусной активности в отношении DENV-2.

Противовирусную активность всех соединений по настоящему изобретению тестировали в отношении штамма DENV-2 16681, который метили усиленным зеленым флуоресцентным белком (eGFP). Среда для культивирования состояла из минимальной поддерживающей среды, дополненной 2% термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 0,04% гентамицина (50 мг/мл) и 2 мМ L-глутамина. 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 5-кратные серийные разбавления из 9 стадий разбавления тестируемого соединения при 200-кратной конечной концентрации в 100% DMSO (200 нл). Кроме

того, каждую концентрацию соединения тестировали в четырех параллельных анализах (конечный диапазон концентраций: 25-0,000064 мкМ или 2,5-0,0000064 мкМ для наиболее активных соединений). Наконец, каждый планшет содержал лунки, которые предназначались для контролей с вирусом (содержащих клетки и вирус в отсутствие соединения), контролей с клетками (содержащих клетки в отсутствие вируса и соединения) и контролей со средой (содержащих среду в отсутствие клеток, вируса и соединения). В лунки, которые предназначались для контролей со средой, добавляли 25 мкл среды для культивирования вместо клеток Vero. После того, как клетки были добавлены в планшеты, планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, что позволяло клеткам равномерно распределиться в лунках. Далее планшеты инкубировали в термостате с полностью увлажненной атмосферой (37°C, 5% CO₂) до следующего дня. Затем DENV-2 штамма 16681, меченого eGFP, добавляли из расчета множественности инфекции (MOI), составляющей 0,5. Таким образом, по 15 мкл вирусной суспензии добавляли во все лунки, содержащие тестируемое соединение, и во все лунки, которые предназначались для контроля с вирусом. Параллельно добавляли по 15 мкл среды для культивирования к контролям со средой и контролям с клетками. Далее планшеты инкубировали в течение 3 дней в термостате с полностью увлажненной атмосферой (37°C, 5% CO₂). В день проведения считывания флуоресценцию eGFP измеряли с применением автоматизированного флуоресцентного микроскопа при 488 нм (голубой лазер). Применяя внутрилабораторную систему LIMS, для каждого соединения рассчитывали кривые зависимости ингибирования от дозы и определяли полумаксимальную эффективную концентрацию (EC₅₀). Таким образом, для каждой тестируемой концентрации рассчитывали процент ингибирования (I) с применением следующей формулы: $I=100*(S_T-S_{CC})/(S_{VC}-S_{CC})$; где S_T, S_{CC} и S_{VC} представляют собой уровень сигнала eGFP в лунках с тестируемыми соединениями, контролем с клетками и контролем с вирусом соответственно. EC₅₀ представляет собой концентрацию соединения, при которой репликация вируса ингибируется на 50%, что измерено по 50% снижению интенсивности флуоресценции eGFP по сравнению с контролем с вирусом. EC₅₀ рассчитывали с применением линейной интерполяции (табл. 1).

Одновременно в тех же планшетах оценивали токсичность соединений. После завершения считывания сигнала eGFP во все лунки 384-луночных планшетов добавляли по 40 мкл ATPlite, красителя, показывающего жизнеспособность клеток. ATP присутствует во всех метаболически активных клетках, и когда клетки подвергаются некрозу или апоптозу, его уровень очень резко снижается. Система анализа ATPlite основана на выработке света, вызванной реакцией ATP с добавленной люциферазой и D-люциферинном. Планшеты инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем планшеты измеряли на ViewLux. Также определяли полумаксимальную цитотоксическую концентрацию (CC₅₀), что соответствует концентрации, требуемой для снижения люминесцентного сигнала на 50% по сравнению с лунками контроля с клетками. Наконец, определяли индекс селективности (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 анализе противовирусной активности в отношении DENV-2

№ соединения	EC_{50} (мкМ)	N	CC_{50} (мкМ)	N	SI	N
1	0,0018	4	7,6	5	3520	4
1A	0,00078	2	8,6	2	9210	2
1B	0,085	4	13	4	149	4
2	0,00081	4	6,2	4	7600	4
2A	0,00032	6	4,9	6	16800	6
2B	0,021	4	12	4	589	4
3	0,0012	4	5,1	4	4360	4
3A	0,00040	6	4,0	6	8380	6
3B	0,029	4	11	4	366	4
4	0,00037	4	3,5	5	8960	4
4A	0,011	4	11	4	1020	4
4B	0,00020	4	3,8	4	>16800	4
5	0,0010	4	6,9	4	6760	4
5A	0,00051	5	3,4	5	6320	5
5B	0,016	4	11	4	670	4
6	0,0014	4	5,8	5	4220	4
6A	0,00047	5	5,6	5	8410	5
6B	0,16	4	13	4	80	4
7A	0,00054	3	3,1	4	6080	3
7B	0,036	3	8,0	3	224	3
8	0,0023	3	6,9	3	3050	3
8A	0,0011	3	3,4	3	3620	3
8B	0,048	3	8,2	3	170	3
9A	0,00039	4	3,2	7	6210	4
9B	0,051	3	13	3	253	3
10A	0,020	3	12	3	597	3
10B	0,00012	3	2,6	3	21200	3
11	0,00048	3	9,0	4	18400	3
11A	0,019	3	12	3	613	3
11B	0,00020	5	2,4	6	24900	5
12	0,00022	4	3,7	4	16900	3
12A	0,000099	3	2,2	3	22100	3
12B	0,0012	3	9,9	3	8540	3

Анализ с применением количественной ПЦР с обратной транскриптазой (RT-qPCR) в отношении четырех серотипов: протокол А.

Противовирусную активность соединений по настоящему изобретению тестировали в отношении DENV-1 штамма TC974#666 (NCPV), DENV-2 штамма 16681, DENV-3 штамма H87 (NCPV) и DENV-4 штамма H241 (NCPV) и EDEN (SG/06K2270DK1/2005; номер доступа в GenBank QG398256) с применением анализа RT-qPCR. В связи с этим, клетки Vero инфицировали одним из DENV-1, или -2, или -3, или -4, в присутствии или в отсутствие тестируемых соединений. В день 3 после инфицирования клетки лизировали и клеточные лизаты использовали для получения кДНК как вируса-мишени (3'UTR DENV; табл. 2), так и эталонного гена клетки (β -актин, табл. 2). Затем осуществляли дуплексную ПЦР в режиме реального времени на приборе Lightcycler480. Получаемое значение C_p обратно пропорционально уровню экспрессии РНК этих мишеней. Ингибирование репликации DENV под действием тестируемого соединения приводит к сдвигу C_p для гена 3'UTR. С другой стороны, если тестируемое соединение является токсичным в отношении клеток, то аналогичный эффект будет наблюдаться и в отношении экспрессии β -актина. Для расчета EC_{50} применяют сравнительный способ ААС C_p , который основан на относительной генной экспрессии гена-мишени (3'UTR), нормализованной по конститутивному гену клетки (β -актину). Кроме того, определяли значения CC_{50} на основании значений C_p , полученных для конститутивного гена β -актина.

Таблица 2. Праймеры и зонды, применяемые для количественной RT-PCR в режиме реального времени

Праймер/зонд	Мишень	Последовательность ^{a, b}
F3utr258	DENV 3'-UTR	5'-CGGTTAGAGGAGACCCCTC-3'
R3utr425	DENV 3'-UTR	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTC-3'
P3utr343	DENV 3'-UTR	FAM -5'-AAGGACTAG- ZEN - AGGTTAGAGGAGACCCCTC-3'- IABkFQ
Factin743	β -актин	5'-GGCCAGGTCATCACCATT-3'
Ractin876	β -актин	5'-ATGTCCACGTCACACTTCATG-3'
Pactin773	β -актин	HEX -5'-TCCGCTGC- ZEN - CCTGAGGCTCTC-3'- IABkFQ

^a Элементы, представляющие собой репортерные красители (FAM, HEX) и гасители люминесценции (ZEN и IABkFQ), выделены жирным и курсивом.

^b Нуклеотидную последовательность праймеров и зондов выбирали из консервативного участка в 3'UTR-участке генома вируса денге, исходя из выравнивания 300 нуклеотидных последовательностей четырех серотипов вируса денге, депонированных в Genbank (Gong et al., 2013, Methods Mol Biol, глава 16).

Среда для культивирования состояла из минимальной поддерживающей среды, дополненной 2% термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 0,04% гентамицина (50 мг/мл) и 2 мМ L-глутамин. 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 5-кратные серийные разбавления из 9 стадий разбавления тестируемого соединения при 200-кратной конечной концентрации в 100% DMSO (500 нл; конечный диапазон концентраций: 25-0,000064 мкМ или 2,5-0,000064 мкМ для наиболее активных соединений). Кроме того, каждый планшет содержал лунки, которые предназначались для контролей с вирусом (содержащих клетки и вирус в отсутствие соединения) и контролей с клетками (содержащих клетки в отсутствие вируса и соединения). После добавления в планшеты клеток планшеты инкубировали в термостате с полностью увлажненной атмосферой (37°C, 5% CO₂) до следующего дня. Серотипы 1, 2, 3 и 4 вируса денге разбавляли с целью получения в анализе Ср, составляющего ~22-24. Таким образом, 25 мкл вирусной суспензии добавляли во все лунки, содержащие тестируемое соединение, и во все лунки, которые предназначались для контроля с вирусом. Одновременно в контроли с клетками добавляли по 25 мкл среды для культивирования. Далее планшеты инкубировали в течение 3 дней в термостате с полностью увлажненной атмосферой (37°C, 5% CO₂). Через 3 дня надосадочную жидкость удаляли из лунок и клетки дважды промывали ледяным PBS (~100 мкл). Клеточные осадки хранили в 96-луночных планшетах при -80°C в течение по меньшей мере 1 дня. Далее экстрагировали РНК с применением набора для лизирования Cells-to-CT™ согласно инструкциям производителя (Life Technologies). Клеточные лизаты можно хранить при -80°C или сразу же применять на стадии обратной транскрипции.

При подготовке к стадии обратной транскрипции готовили смесь А (табл. 3А) и распределяли ее по 7,57 мкл/лунка в 96-луночный планшет. После добавления 5 мкл клеточных лизатов осуществляли пятиминутную стадию денатурации при 75°C (табл. 3В). После этого добавляли 7,43 мкл смеси В (табл. 3С) и инициировали стадию обратной транскрипции (табл. 3D) для получения кДНК.

Наконец готовили смесь С (табл. 4А), смесь для RT-qPCR, и ее распределяли по 22,02 мкл/лунка в 96-луночных планшетах для qPCR LightCycler, в которые добавляли по 3 мкл кДНК, и qPCR осуществляли на LightCycler 480 согласно условиям из табл. 4В.

Применяя программное обеспечение LightCycler и внутрилабораторную систему LIMS, для каждого соединения рассчитывали кривые зависимости эффекта от дозы и определяли полумаксимальную эффективную концентрацию (EC₅₀) и полумаксимальную цитотоксическую концентрацию (CC₅₀) (табл. 5-8).

Таблица 3. Синтез кДНК с применением смеси А, денатурации, смеси В и обратной транскрипции

А

Планшеты	8				
Образцы	828			Объем реакционн ой смеси (мкл)	20
Элемент смеси	Концентрация			Объем (мкл) на	
	Единица измерения	Исходна я	Конеч ная	1 образец	х образц ов
					ов
Milli-Q H ₂ O				7,27	6019,56
R3utr425	мкМ	20	0,27	0,15	124,20
Ractin876	мкМ	20	0,27	0,15	124,20
		Объем смеси/лунка (мкл)		7,57	
		Клеточные лизаты		5,00	

Стадия денатурации

В

Стадия	Температура	Время
Денатурация	75°C	5'
Удержание	4°C	удержан ие

Смесь В

С

Образцы	864				
Элемент смеси	Концентрация			Объем (мкл) на	
	Единица измерения	Исходна я	Конеч ная	1 образ ец	х образц ов
Буфер 2 Expand HF1	X	10,00	1,00	2,00	1728,0
MgCl ₂	мМ	25,00	3,50	2,80	2419,2
dNTP	мМ	10,00	1,00	2,00	1728,0
Ингибитор РНКазаы	Ед/мкл	40,00	1,00	0,50	432,0
Expand RT	Ед/мкл	50,00	0,33	0,13	112,3
		Общий объем смеси (мкл)		7,43	

Протокол синтеза кДНК

Д

Стадия	Температура	Время
Обратная транскрипция	42°C	30'
Денатурация	99°C	5'
Удержание	4°C	удержан ие

Таблица 4. Смесь и протокол qPCR. Смесь С

А

Образцы	833			Объем реакционно й смеси (мкл)	25
Элемент смеси	Концентрация			Объем (мкл) на	
	Единица измерения	Исходная	Конечная	1 образец	х образцо в
Н ₂ О для ПЦР 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

Протокол qPCR3

В

Стадия	Температ ура	Врем я	Скорость изменения	
Предварительная инкубация/денатурация	95°C	10 м ин	4,4	
Денатурация	95°C	10 с	4,4	40 цикл ов
Отжиг	58°C	1 мин	2,2	
Элонгация	72°C	1 с	4,4	
Охлаждение	40°C	10 с	1,5	

Таблица 5. EC₅₀, CC₅₀ и SI для соединений в отношении серотипа 1 в анализах с применением RT-qPCR

№ соединения	Протокол А					
	RT-qPCR серотипа 1 TC974#666					
	EC ₅₀ (мкМ)	N	CC ₅₀ (мкМ)	N	SI	N
1A	0,0085	3	6,4	3	755	3
2A	0,0028	4	4,8	3	1960	3
3A	0,0033	4	>2,5	3	>1180	3
4B	0,0033	3	>2,5	3	>836	3
5A	0,0041	4	>2,5	4	>862	4
6A	0,0035	6	4,8	5	1140	5
7A	0,0013	3	>2,4	4	>2220	3
8A	0,0023	3	>2,5	3	>1410	3
9A	0,0014	3	>2,5	3	>3350	3
10B	0,00020	3	>2,5	3	>21400	3
11B	0,00060	3	>2,5	3	>5380	3
12A	0,00020	3	>1,0	3	>6740	3

N=количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

Таблица 6. EC₅₀, CC₅₀ и SI для соединений в отношении серотипа 2 в анализах с применением RT-qPCR

Протокол А						
RT-qPCR серотипа 2 16681						
№ соединения	EC ₅₀ (мкМ)	N	CC ₅₀ (мкМ)	N	SI	N
1A	0,0011	3	6,6	3	5790	3
2A	0,00040	5	5,1	6	11100	5
3A	0,00043	5	>2,4	5	>5560	5
4B	0,00021	4	3,8	5	>12700	4
5A	0,00071	5	3,9	5	5370	5
6A	0,00084	6	5,2	7	6320	6
7A	0,00077	4	3,2	3	5870	3
8A	0,0014	4	3,5	4	2160	4
9A	0,00061	4	>2,4	4	>4010	4
10B	0,000057	3	>2,5	3	>100553	3
11B	0,00014	4	>2,5	4	>43200	4
12A	0,000075	3	>1,0	3	>20500	3

N=количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

Таблица 7. EC₅₀, CC₅₀ и SI для соединений в отношении серотипа 3 в анализах с применением RT-qPCR

Протокол А						
RT-qPCR серотипа 3 H87						
№ соединения	EC ₅₀ (мкМ)	N	CC ₅₀ (мкМ)	N	SI	N
1A	0,068	3	5,8	2	94	2
2A	0,048	4	4,0	3	64	3
3A	0,045	4	>2,5	2	>80	2
4B	0,055	3	>2,5	2	>76	2
5A	0,061	4	>2,0	3	>36	3
6A	0,043	6	1,5	3	37	3
7A	0,020	3	2,2	2	126	2
8A	0,036	3	>2,5	3	>75	3
9A	0,016	3	>2,5	3	>206	3
10B	0,0021	3	>2,5	3	>1630	3
11B	0,0073	3	>2,5	3	>502	3
12A	0,0032	3	>1,0	3	>463	3

N=количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

Таблица 8. EC₅₀, CC₅₀ и SI для соединений в отношении серотипа 4 в анализах с применением RT-qPCR

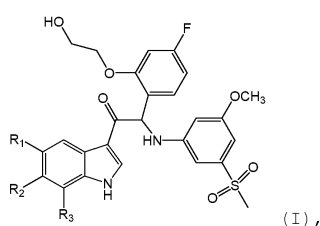
Протокол А						
RT-qPCR серотипа 4 H241						
№ соединения	EC ₅₀ (мкМ)	N	CC ₅₀ (мкМ)	N	SI	N
1A	0,29	4	3,0	2	9,7	2
2A	0,17	6	3,3	5	19	5
3A	0,19	5	2,9	3	15	3
4B	0,14	5	2,1	4	15	4
5A	0,18	5	2,6	5	>18	5
6A	0,11	5	3,3	3	28	3
7A	0,12	4	1,9	3	17	3
8A	0,22	3	1,1	3	4,9	3
9A	0,11	4	>2,2	3	>22	3
10B	0,012	3	1,8	3	89	3
11B	0,034	3	>2,5	3	>102	3
12A	0,014	3	0,69	2	47	2

Протокол А						
RT-qPCR серотипа 4 EDEN						
№ соединения	EC ₅₀ (мкМ)	N	CC ₅₀ (мкМ)	N	SI	N
1A	0,0036	1	5,0	1	1386	1
2A	0,0023	4	2,8	4	1178	4
3A	0,0051	4	> 2,5	3	> 1194	3
4B	0,0032	3	> 2,5	3	> 1231	3
5A	0,0037	4	> 2,5	4	> 1250	4
6A	0,0034	5	3,7	4	1048	4

N=количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



его стереоизомерная форма или фармацевтически приемлемая соль, при этом указанное соединение выбрано из группы, где

R₁ представляет собой H, R₂ представляет собой F или Cl, а R₃ представляет собой H или CH₃;

R₁ представляет собой F, R₂ представляет собой F, а R₃ представляет собой H;

R₁ представляет собой CH₃, R₂ представляет собой OCH₃, а R₃ представляет собой H;

R₁ представляет собой CH₃, R₂ представляет собой F, а R₃ представляет собой H;

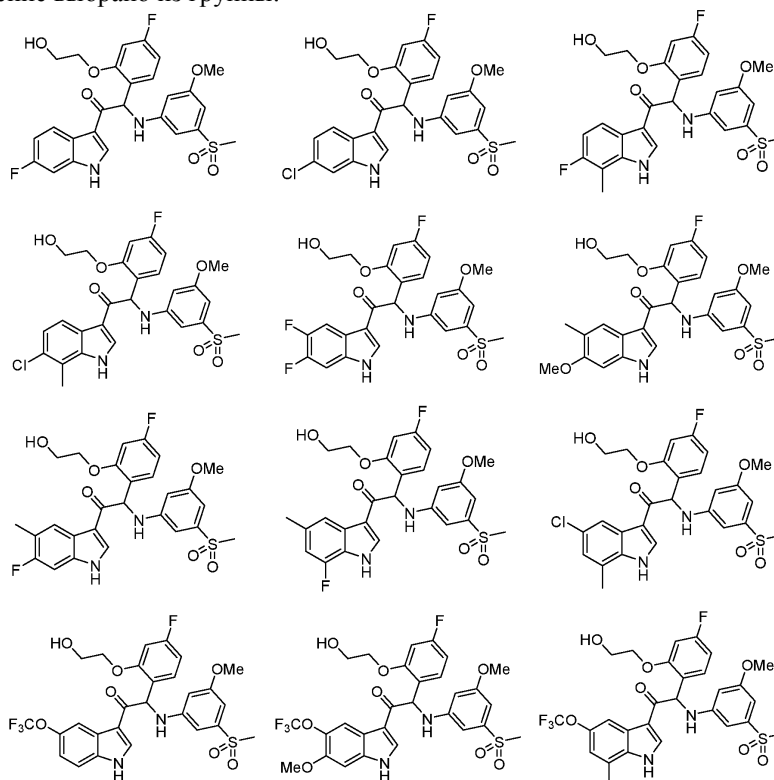
R₁ представляет собой CH₃, R₂ представляет собой H, а R₃ представляет собой F;

R₁ представляет собой Cl, R₂ представляет собой H, а R₃ представляет собой CH₃;

R₁ представляет собой OCF₃, R₂ представляет собой H или OCH₃, а R₃ представляет собой H, и

R₁ представляет собой OCF₃, R₂ представляет собой H, а R₃ представляет собой CH₃.

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



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

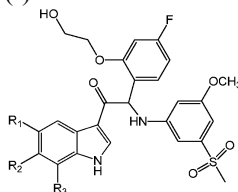
4. Лекарственное средство для лечения вирусной инфекции, вызванной вирусом денге, включающее соединение формулы (I) или его стереоизомерную форму или фармацевтически приемлемую соль по п.1.

5. Лекарственное средство для лечения вирусной инфекции, вызванной вирусом денге, содержащее фармацевтическую композицию по п.3.

6. Применение соединения формулы (I) или его стереоизомерной формы или фармацевтически приемлемой соли по п.1 для лечения вирусной инфекции, вызванной вирусом денге.

7. Применение фармацевтической композиции по п.3 для лечения вирусной инфекции, вызванной вирусом денге.

8. Применение соединения формулы (I)



его стереоизомерной формы или фармацевтически приемлемой соли;

при этом указанное соединение выбрано из группы, где

R_1 представляет собой H, R_2 представляет собой F или Cl, а R_3 представляет собой H или CH_3 ;

R_1 представляет собой F, R_2 представляет собой F, а R_3 представляет собой H;

R_1 представляет собой CH_3 , R_2 представляет собой OCH_3 , а R_3 представляет собой H;

R_1 представляет собой CH_3 , R_2 представляет собой F, а R_3 представляет собой H;

R_1 представляет собой CH_3 , R_2 представляет собой H, а R_3 представляет собой F;

R_1 представляет собой Cl, R_2 представляет собой H, а R_3 представляет собой CH_3 ;

R_1 представляет собой OCF_3 , R_2 представляет собой H или OCH_3 , а R_3 представляет собой H, и

R_1 представляет собой OCF_3 , R_2 представляет собой H и R_3 представляет собой CH_3 ,

для ингибирования репликации вируса(вирусов) денге в биологическом образце или у пациента.

9. Применение по п.8, дополнительно включающее совместное введение дополнительного противовирусного средства.

