



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201630879 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：104132008

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 09 月 30 日

(51)Int. Cl.：

C07D209/04 (2006.01)

C07D209/30 (2006.01)

C07D209/32 (2006.01)

A61K31/404 (2006.01)

A61P31/12 (2006.01)

(30)優先權：2014/10/01

歐洲專利局

14187374.5

2015/03/16

歐洲專利局

15159164.1

(71)申請人：健生醫藥公司(美國) JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (US)

美國

天主教魯汶大學(比利時) KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (BE)

比利時

(72)發明人：凱斯特林 巴特 KESTELEYN, BART RUDOLF ROMANIE (BE)；邦凡蒂 尚法蘭
寇斯 BONFANTI, JEAN-FRANCOIS (FR)；瓊克斯 提姆 JONCKERS, TIM HUGO
MARIA (BE)；雷柏森 皮耶 RABOISSON, PIERRE JEAN-MARIE BERNARD
(FR)；巴迪奧 朵洛西 BARDIOT, DOROTHEE ALICE MARIE-EVE (FR)；馬其
安得 亞爾諾 MARCHAND, ARNAUD DIDIER M (FR)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：0 共 75 頁

(54)名稱

作為登革熱病毒複製抑制劑之單-或二-取代的吲哚衍生物

MONO- OR DI-SUBSTITUTED INDOLE DERIVATIVES AS DENGUE VIRAL REPLICATION
INHIBITORS

(57)摘要

本發明涉及單取代或二取代吲哚衍生物、藉由使用所述化合物預防或治療登革熱病毒感染之方法，並且還涉及所述化合物用作藥物，更佳的是用作治療或預防登革熱病毒感染之藥物。此外，本發明涉及這些化合物之藥物組成物或組合製劑，涉及用作藥物、更佳的是用於預防或治療登革熱病毒感染之組成物或製劑。本發明還涉及用於製備這些化合物之方法。

The present invention concerns mono- or di-substituted indole derivatives, methods to prevent or treat dengue viral infections by using said compounds and also relates to said compounds for use as a medicine, more preferably for use as a medicine to treat or prevent dengue viral infections.

The present invention furthermore relates to pharmaceutical compositions or combination preparations of the compounds, to the compositions or preparations for use as a medicine, more preferably for the prevention or treatment of dengue viral infections. The invention also relates to processes for preparation of the compounds.

201630879

發明摘要

※ 申請案號：104132008

※ 申請日：104.9.30

※ IPC 分類：

C07D $\frac{209}{4}$, $\frac{209}{30}$, $\frac{209}{32}$ (2006.01)A61K $\frac{31}{404}$ (2006.01)A61P $\frac{31}{12}$ (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

作為登革熱病毒複製抑制劑之單-或二-取代的吲哚衍生物

MONO- OR DI-SUBSTITUTED INDOLE DERIVATIVES ASDENGUE

VIRAL REPLICATION INHIBITORS

【中文】

本發明涉及單取代或二取代吲哚衍生物、藉由使用所述化合物預防或治療登革熱病毒感染之方法，並且還涉及所述化合物用作藥物，更佳的是用作治療或預防登革熱病毒感染之藥物。此外，本發明涉及這些化合物之藥物組成物或組合製劑，涉及用作藥物、更佳的是用於預防或治療登革熱病毒感染之組成物或製劑。本發明還涉及用於製備這些化合物之方法。

【英文】

The present invention concerns mono- or di-substituted indole derivatives, methods to prevent or treat dengue viral infections by using said compounds and also relates to said compounds for use as a medicine, more preferably for use as a medicine to treat or prevent dengue viral infections.

The present invention furthermore relates to pharmaceutical compositions or combination preparations of the compounds, to the compositions or preparations for use as a medicine, more preferably for the prevention or treatment of dengue viral infections. The invention also relates to processes for preparation of the compounds.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 無 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

作為登革熱病毒複製抑制劑之單-或二-取代的吲哚衍生物

MONO- OR DI-SUBSTITUTED INDOLE DERIVATIVES ASDENGUE
VIRAL REPLICATION INHIBITORS

【技術領域】

【0001】 本發明涉及單取代或二取代吲哚化合物、藉由使用所述化合物預防或治療登革熱病毒感染之方法，並且還涉及所述化合物用作藥物，更佳的是用作治療或預防登革熱病毒感染之藥物。此外，本發明涉及這些化合物之藥物組成物或組合製劑，涉及用作藥物、更佳的是用於預防或治療登革熱病毒感染之組成物或製劑。本發明還涉及用於製備這些化合物之方法。

【先前技術】

【0002】 藉由蚊子或蜱傳播的黃病毒在人中引起危及生命的感染，如腦炎和出血熱。已知黃病毒登革熱的四種不同的但密切相關的血清型，所謂的DENV-1、-2、-3和-4。登革熱係在全世界大多數熱帶和亞熱帶地區地方性的，主要在城市和半城市地區。根據世界衛生組織(WHO)，25億人(其中10億兒童)處於DENV感染的風險(WHO，2002)。估計每年在世界範圍內發生5000萬至1億登革熱[DF]病例、50萬嚴重登革熱疾病(即登革出血熱[DHF]和登革休克綜合症[DSS])病例以及超過20,000例死亡。DHF已經成為流行地區中兒童之中住院和死亡的一主要原因。總而言之，登革熱代表蟲媒病毒(arboviral)疾病的最常見原因。由於在位於拉丁美洲、東南亞和西太平洋的國家(包括巴西、波多黎各、委內瑞拉、柬埔寨、印尼、越南、

泰國) 中的最近大暴發，登革熱病例的數量已經在過去幾年急劇上升。隨著疾病傳播至新的區域，不僅登革熱病例的數量在增加，而且暴發傾向於更嚴重。

【0003】 為了預防和/或控制與登革病毒感染相關之疾病，目前僅有的可用方法係滅蚊策略以便控制載體。雖然正在針對登革熱的疫苗開發中取得進展，但是遇到許多困難。這些困難包括被稱為抗體依賴性增強作用（ADE）的現象的存在。從一種血清型感染中恢復提供針對該血清型的終身免疫，但是僅賦予針對其他三種血清型中的一種的隨後感染的部分和短暫保護。在感染另一種血清型之後，預先存在的異源抗體與新感染的登革病毒血清型形成複合物，但是不中和病原體。相反，據信促進病毒進入細胞，從而導致不受控制的病毒複製和更高的峰病毒滴度。在原發感染和繼發感染兩者中，更高的病毒滴度與更嚴重的登革熱疾病相關。因為母體抗體能夠容易地藉由母乳餵養傳遞至嬰兒，所以這可能是兒童比成年人更多受嚴重登革熱疾病影響的原因之一。

【0004】 在具有兩種或更多種血清型同時流通的區域(還被稱為超流行地區)，嚴重登革熱疾病的風險顯著更高，這係由於經歷繼發性、更嚴重感染的風險增加。此外，在超流行性的情況下，更強毒株出現的概率增加，這進而增加登革出血熱（DHF）或登革休克綜合症之概率。

【0005】 攜帶登革熱的蚊子，包括埃及伊蚊（*Aedes aegypti*）和白紋伊蚊（*Aedes albopictus*）（虎斑蚊（tiger mosquito））在地球上向北方移動。根據美國（US）疾病控制與預防中心（CDC），兩種蚊子當前在德克薩斯州南部普遍存在。攜帶登革熱的蚊子向北傳播不限於美國，而且也已在歐洲觀察到。

【0006】 儘管在過去30年做出較大努力，但當前不存在可用于保護人

免受登革病毒疾病之疫苗。主要問題係開發以相同程度提供針對所有四種血清型的保護的一疫苗（四價疫苗）。此外，當前不可獲得用於治療或預防登革熱病毒感染的特異性抗病毒藥物。顯然，對於用於預防或治療動物中（更具體地人中）的病毒感染並且尤其是針對由黃病毒（更具體地登革病毒）引起的病毒感染的治療劑仍然存在巨大未滿足的醫學需求。高度需要具有良好抗病毒效力、無副作用或低水平的副作用、針對多種登革熱病毒血清型之廣譜活性、低毒性和/或良好藥代動力學或藥效動力學特性之化合物。

【0007】 本發明現在提供化合物單取代或二取代吡啶衍生物，這些化合物顯示針對所有四種（4）登革熱病毒血清型的高效活性。此外，根據本發明的這些化合物具有良好藥代動力學特徵，並且出人意料地這些特異性化合物顯示改進的手性穩定性。

【發明內容】

【0008】 本發明係基於上文提到的問題中的至少一個可以藉由本發明之當前化合物來解決的出人意料的發現。

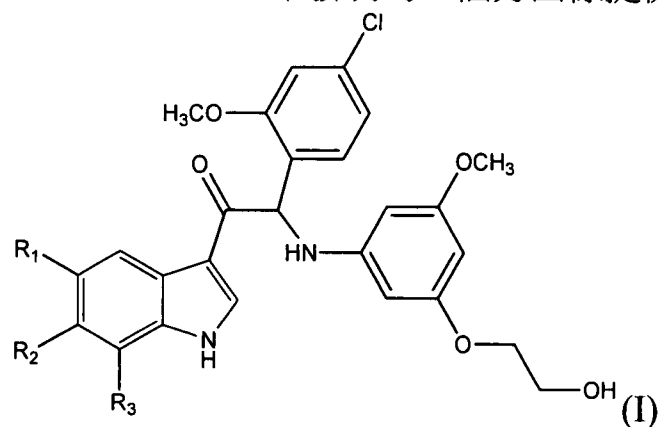
【0009】 本發明提供化合物，這些化合物已顯示具有針對當前已知的所有四種（4）血清型的有效抗病毒活性。此外，本發明證明這些化合物有效地抑制登革熱病毒（DENV）之增殖。因此，這些化合物構成可用於治療和/或預防動物、哺乳動物和人中的病毒感染，更具體地用於治療和/或預防登革熱病毒感染的一類有用的有效化合物。

【0010】 此外，本發明涉及這類化合物作為藥物之用途，並且涉及其用於製造用以治療和/或預防動物或哺乳動物（更具體地人）中之病毒感染，特別是被屬於登革熱病毒家族的病毒感染的藥劑之用途。本發明還涉及用於製備所有這類化合物的方法，並且涉及包含有效量的這些化合物之藥物

組成物。

【0011】 本發明還涉及藉由向有需要的患者給予有效量的一種或多種這類化合物或其藥學上可接受之鹽可隨意地與一種或多種其他藥物（像另一種抗病毒劑）的組合來治療或預防人中的登革熱病毒感染之方法。

【0012】 本發明的一個方面係提供具有式(I)之化合物



其立體異構形式、藥學上可接受之鹽、溶劑合物或多晶型物（polymorph），該化合物包含單取代或二取代吲哚基團；所述化合物選自下組，其中：

R₁係H，R₂係F並且R₃係H、F或CH₃；

R₁係F或CH₃，R₂係OCH₃並且R₃係H；

R₁係F，R₂係H並且R₃係CH₃；

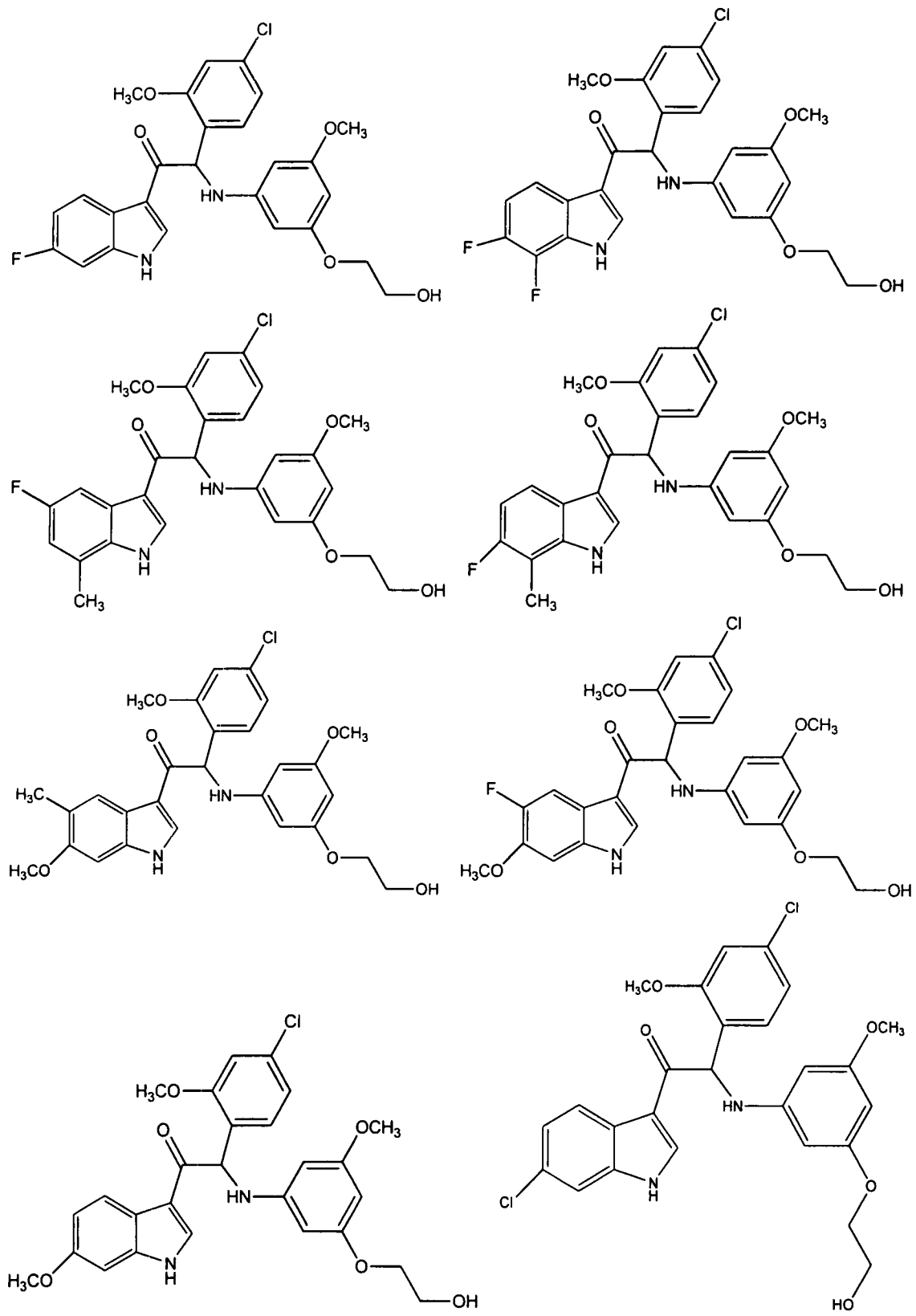
R₁係H，R₂係OCH₃並且R₃係H，

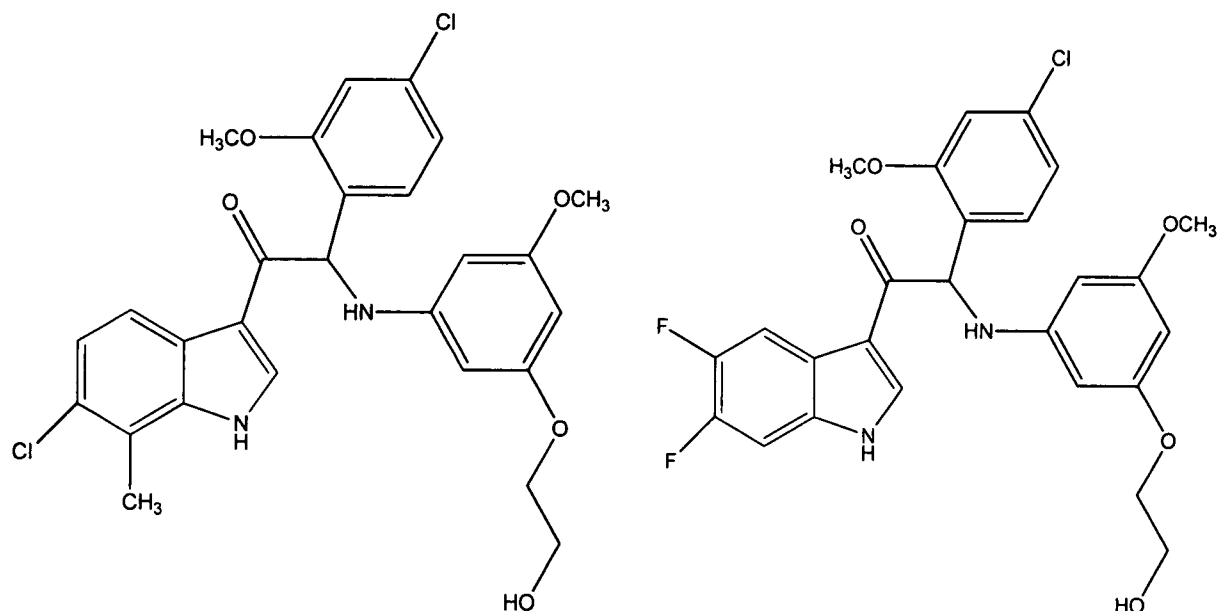
R₁係H，R₂係Cl並且R₃係H或CH₃；

R₁係F，R₂係F並且R₃係H或

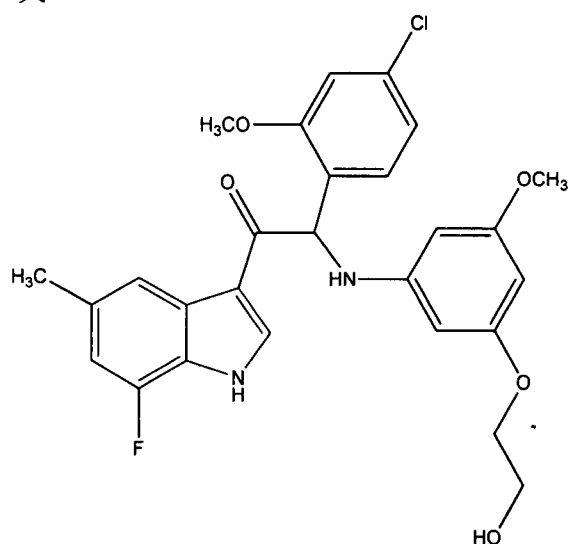
R₁係CH₃，R₂係H並且R₃係F。

【0013】 具體地說，本發明之化合物或其立體異構形式、其藥學上可接受之鹽、溶劑合物或多晶型物選自下組：





或



【0014】 本發明的一部分還是一藥物組成物，該藥物組成物包含一具有式(I)之化合物或其立體異構形式、藥學上可接受之鹽、溶劑合物或多晶型物，連同一種或多種藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載體。

【0015】 具有式(I)之化合物的藥學上可接受之鹽包括其酸加成鹽以及鹼鹽。合適的酸加成鹽係從形成無毒鹽的酸形成。合適的鹼鹽係從形成無毒鹽的鹼形成。

【0016】 本發明之化合物還可以按非溶劑合的和溶劑合的形式存在。術語“溶劑合物”在此用以描述包含本發明的化合物以及一種或多種藥學上可接受的溶劑分子（例如，乙醇）的一分子複合物。

【0017】 術語“多晶型物”係指本發明的化合物以多於一種的形式或晶體結構存在的能力。

【0018】 可以將本發明之化合物以晶態的或非晶態的產物給予。可以藉由如沈澱、結晶、冷凍乾燥、噴霧乾燥或蒸發乾燥的方法獲得例如呈固體塞、粉劑或膜的這些化合物。它們可以單獨給予或與一種或多種本發明之其他化合物組合給予或與一種或多種其他藥物組合給予。通常，它們將作為與一種或多種藥學上可接受之賦形劑相締合的一配製物給予。術語“賦形劑”在此用以描述除本發明的一種或多種化合物之外的任何成分。賦形劑的選擇大體上取決於如具體給予模式、賦形劑對溶解性和穩定性的影響以及劑型的性質等因素。

【0019】 本發明之化合物或其任何亞群可以被配製成用於給予目的不同藥物形式。作為適當的組成物，可以引用所有通常用於全身給予藥物之組成物。為了製備本發明的藥物組成物，將作為活性成分的一有效量的具體化合物（可隨意地呈加成鹽形式）與一藥學上可接受之載體組合在緊密混合物中，該載體取決於用於給予所希望的製劑的形式可以採用多種形式。令人希望地，這些藥物組成物處於適合於例如口服或經直腸給予的單位劑型。例如，在製備處於口服劑型的組成物中，可使用任何常見藥物介質，在口服液體製劑（例如懸浮液、糖漿劑、酏劑、乳液以及溶液）的情況下，例如像水，二醇類、油類、醇類以及類似物；或在粉劑、丸劑、膠囊和片劑的情況下，固體載體如澱粉、糖、白陶土、稀釋劑、潤滑劑、粘合劑、崩解劑等。因為其容易給予，片劑和膠囊劑代表最有利的口服單位劑型，在該情況下顯然使用固體藥物載體。還包括在使用之前不久可以被轉變為液體形式的固體形式製劑。

【0020】 為了便於給予和劑量的均一性，將上述藥物組成物配製成單

位劑型係特別有利的。如在此所用的單位劑型係指適合作為單位劑量的物理離散單位，各單位含有預定量的活性成分，該預定量的活性成分經計算與所需藥物載體相締合而產生所希望的治療效果。此類單位劑型的實例係片劑（包括刻痕或包衣的片劑）、膠囊劑、丸劑、粉末包（powder packet）、糯米紙囊劑（wafer）、栓劑、可注射溶液或懸浮液以及類似劑型，及其分離的多劑量形式（multiples）。

【0021】 在感染性疾病治療領域中的普通技術人員將能夠從下文所呈現的測試結果來確定有效量。通常認為有效日用量將為從0.01 mg/kg至50 mg/kg體重，更佳的是從0.1 mg/kg至10 mg/kg體重。可以適當地將所需劑量在全天天中以適當的時間間隔作為兩個、三個、四個或更多個子劑量給予。所述子劑量可以被配製成單位劑型，例如每一單位劑型包含1至1000 mg、且特別是5至200 mg的活性成分。

【0022】 如熟習該項技術者所熟知的，給予的精確劑量和頻率取決於所使用的具有式(I)的具體化合物、正在被治療的具體病狀、正在被治療的病狀的嚴重性、具體患者的年齡、體重和總體身體狀況、以及個體可能服用的其他藥物。此外，顯然該有效量可以降低或增加，這取決於所治療的受試者的反應和/或取決於對本發明的這些化合物開處方的醫師的評估。因此以上所提及的有效量的範圍僅僅是指導而不是旨在以任何程度限制本發明之範圍或用途。

【0023】 本揭露還旨在包括存在于本發明之化合物中的原子的任何同位素。例如，氫的同位素包括氕和氘，並且碳的同位素包括C-13和C-14。

【0024】 用於本發明中的這些化合物還可以其立體化學異構形式存在，從而定義由相同鍵序列鍵合的相同原子組成但具有不同三維結構的不可互換的所有可能的化合物。除非另外提及或指明，化合物之化學命名涵

蓋所述化合物可以具有的所有可能的立體化學異構形式之混合物。

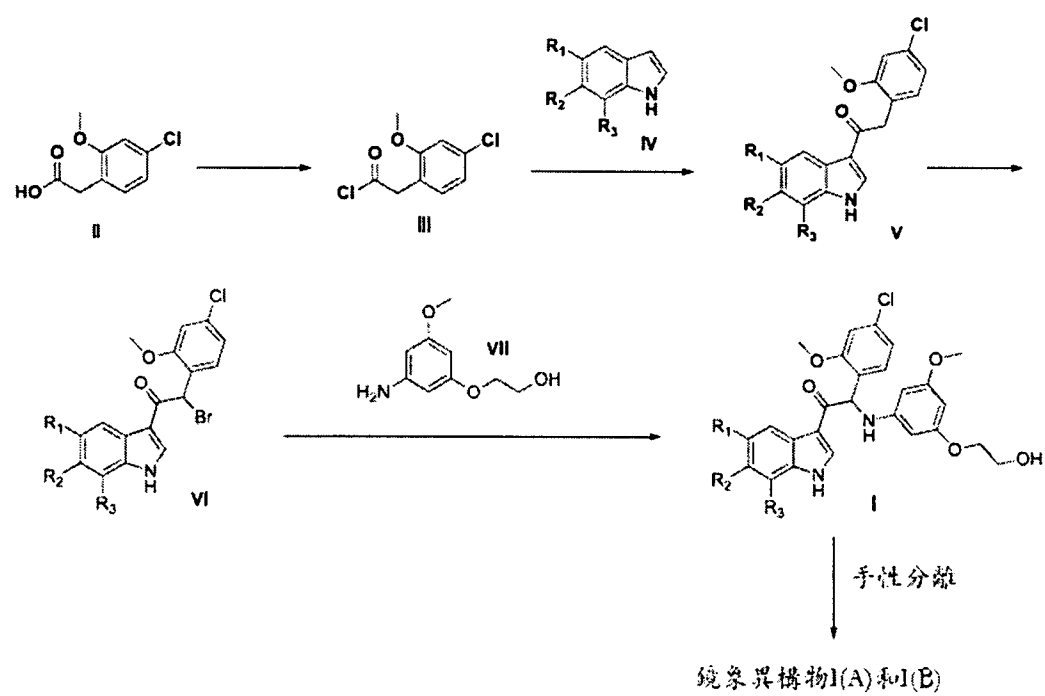
【0025】 所述混合物可以包含所述化合物的基本分子結構的所有非鏡像異構物和/或鏡像異構物。用於本發明中的處於純形式的或彼此混合的化合物的所有立體化學異構形式旨在被涵蓋于本發明之範圍內，包括任何外消旋混合物或外消旋體。

【0026】 在此提到的化合物和中間體的純的立體異構形式被定義為基本上不具有所述化合物或中間體的相同基本分子結構的其他鏡像異構或非鏡像異構形式的異構物。具體地說，術語‘立體異構純’涉及具有至少80%立體異構過量（即，最少90%的一種異構物和最大10%的其他可能的異構物）到100%立體異構過量（即，100%的一種異構物並且沒有其他異構物）的化合物或中間體，更具體地具有90%至100%立體異構過量、甚至更具體地具有94%至100%立體異構過量並且最具體地具有97%至100%立體異構過量的化合物或中間體。應當以類似的方式理解術語‘鏡像異構純’和‘非鏡像異構純’，但是討論中的分別是關於混合物中的鏡像異構過量以及非鏡像異構過量。

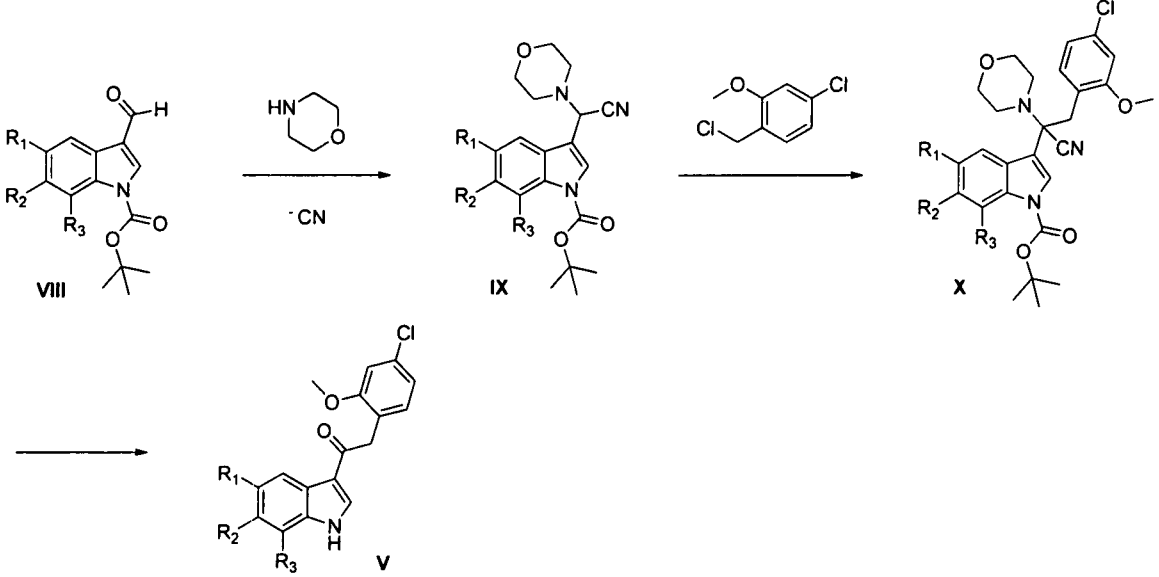
【0027】 可以藉由領域已知的程序的應用來獲得用於本發明中的化合物和中間體的純的立體異構形式。例如，鏡像異構物可以藉由用光學活性酸或鹼使它們的非鏡像異構鹽進行選擇性結晶而得以彼此分離。它們的實例係酒石酸、二苯甲醯基酒石酸、二甲苯甲醯基酒石酸以及樟腦磺酸。可替代地，可以藉由使用手性固定相的層析技術分離鏡像異構物。所述純立體化學異構形式還可以衍生自適當起始材料的相對應的純立體化學異構形式，其條件係反應立體特異性地發生。較佳的是，如果一具體的立體異構物係所希望的，那麼所述化合物將藉由立體專一的製備方法得以合成。這些方法將有利地使用鏡像異構物純之起始材料。

通用合成方法

【0028】 具有通式I之化合物之合成可如方案1中所概述來進行：可以用氯化試劑例如像亞硫醯氯將2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙酸（II）轉化成相對應的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙醯氯（III）。可以使用路易士酸（Lewis acid）試劑（例如像AlCl₃或Et₂AlCl）在一適合的溶劑例如像CH₂Cl₂中並且在典型地涉及冷卻的適合反應條件下進行醯氯III與具有通式IV之取代吲哚的弗裡德爾-克拉夫茨（Friedel-Crafts）反應以提供具有通式V之3-醯化吲哚。在具有通式V之化合物的羰基部分的α位置中引入苯胺部分可以藉由一反應順序來完成，該反應順序涉及例如在一適合的溶劑（例如像THF）中用一試劑（例如像苯基三甲基三溴化銨）溴化V以提供具有通式VI之化合物，以及具有通式VI之化合物與2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇（VII）在一適合的溶劑（例如像CH₃CN）中的隨後反應，並且通常使用鹼（例如像TEA或DIPEA）以提供作為外消旋混合物的具有通式I之化合物。具有通式I之化合物的手性分離可以藉由例如手性層析來進行以提供具有通式I之鏡像異構物A和B。



【0029】 作為一替代方法，具有通式V之中間體還可以如方案2中所概述來製備：可以藉由在試劑例如像氰化鈉和亞硫酸氫鈉存在下並且在一適合的溶劑例如像水與水可混合有機溶劑（例如像二噁咻）的一種混合物中與咪啉反應來將具有通式VIII之*N*-Boc-保護的取代吲哚-3-甲醛轉化成具有通式IX之中間體的相應斯特雷克爾（Strecker）類型。用4-氯-2-甲氧基-苄基氯烷基化具有通式IX之化合物可以在鹼例如像六甲基二矽氮烷鉀存在下並且在一適合的溶劑例如像DMF中進行以便提供具有通式X之化合物。使具有通式X之化合物經受一適合的水性酸性水解條件（例如像在高溫下用鹽酸水溶液處理）提供具有通式V之中間體。



方案2

【圖式簡單說明】

【0030】 無

【實施方式】

實例

LC/MS 方法

【0031】 使用LC泵、二極體陣列（DAD）或UV檢測器以及如在對應的方法中所指定的柱進行高效液相層析（HPLC）測量。如果必要的話，包

括另外的檢測器（參見以下方法表格）。

【0032】 將來自柱的流帶至配置有大氣壓離子源的質譜儀（MS）。設置調諧參數（例如掃描範圍、停留時間等）以便獲得允許鑒別化合物的標稱單一同位素分子量（MW）的離子在技術人員的知識內。使用適當的軟體進行資料獲取。

【0033】 藉由其實驗保留時間（ R_t ）和離子描述化合物。如果未在資料表中不同地指定，那麼所報導的分子離子對應于 $[M+H]^+$ （質子化的分子）和/或 $[M-H]$ （去質子的分子）。在該化合物不是直接可電離的情況下，指定加合物之類型（即 $[M+NH_4]^+$ 、 $[M+HCOO]^-$ 等）。對於具有多種同位素模式的分子（Br、Cl）來說，所報導的值係針對最低同位素質量獲得的值。獲得的所有結果具有通常與所使用的方法相關的實驗不確定性。

【0034】 下文中，“SQD”意指單四極檢測器，“MSD”質量選擇性檢測器，“RT”室溫，“BEH”橋連乙基矽氧烷/二氧化矽雜化體，“DAD”二極體陣列檢測器，“HSS”高強度二氧化矽。

【0035】 LC/MS方法代碼（以mL/分鐘來表示流量；以°C表示柱溫度（T）；以分鐘來表示執行時間）

方法代碼	儀器	柱	流動相	梯度	流量 ----- 柱溫度	執行時間 (分鐘)
LC-A	沃特斯：Acquity® UPLC® -DAD-SQD	沃特斯：BEH C18 (1.7 μm, 2.1 × 50 mm)	A：10 mM CH ₃ COONH ₄ 於 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 中 B：CH ₃ CN	1.3 分鐘後從 95% A 至 5% A，保持 0.7 分鐘。	0.8 mL/分鐘 ----- 55°C	2
LC-B	沃特斯：Acquity® UPLC® -DAD-SQD	沃特斯：HSS T3 (1.8 μm, 2.1 × 100 mm)	A：10 mM CH ₃ COONH ₄ 於 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN 中	2.10 分鐘後從 100% A 至 5% A，0.90 分鐘後至 0% A，	0.7 mL/分鐘 ----- 55°C	3.5



方法代碼	儀器	柱	流動相	梯度	流量 ----- 柱溫度	執行時間 (分鐘)
			B : CH ₃ CN	0.5 分鐘後至 5% A		
LC-C	沃特斯 : Acquity® UPLC® - DAD-Quattro Micro™	沃特斯:BEH C18 (1.7 µm , 2.1 × 100 mm)	A : 95% CH ₃ COONH ₄ 7 mM/5% CH ₃ CN , B : CH ₃ CN	84.2% A 持續 0.49 分鐘 , 2.18 分鐘後至 10.5% A , 保 持 1.94 分 鐘 , 0.73 分鐘 後回到 84.2% A , 保持 0.73 分鐘。	0.343 mL/ 分 鐘 ----- 40°C	6.2
LC-D	沃特斯 : Acquity® UPLC® - DAD-TQD	沃特斯:HSS C18 (1.8 µm , 2.1 × 50 mm)	A : 0.1%甲酸 於 H ₂ O 中 B : CH ₃ CN	3.5 分 鐘 後 50% A 至 10% , 保持 1.5 分鐘。	0.5 mL/ 分鐘 ----- 40°C	5

SFC-MS方法

【0036】 使用一分析型超臨界流體層析（SFC）系統來進行SFC測量，該系統由以下構成：用於遞送二氧化碳（CO2）和改性劑的二元泵、自動進樣器、柱烘箱、配備有經得起400巴的高壓流動池的二極體陣列檢測器。如果配置有個質譜儀（MS），來自該柱的流被引至該（MS）。設置調諧參數（例如掃描範圍、停留時間等）以便獲得允許鑒別化合物的標稱單一同位素分子量（MW）的離子在技術人員的知識內。使用適當的軟體進行資料獲取。

【0037】 分析型SFC-MS方法（以mL/分鐘來表示流量；以°C表示柱溫度（T）；以分鐘表示執行時間，以巴表示背壓（BPR）。

方法代碼	柱	流動相	梯度	流量 ----- 柱溫度	執行時間 ----- BPR
SFC-A	大 賽 璐 (Daicel)	A : CO ₂	30% B 保持 7 分鐘 ,	3	7

	Chiralpak® AD-H柱(5 μm , 150 × 4.6 mm)	B : MeOH		----- 35	----- 100
SFC-B	大 賽 璐 (Daicel) Chiralpak® AD-H柱(5 μm , 150 × 4.6 mm)	A : CO ₂ B : MeOH	40% B 保持 7 分鐘 ,	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-C	大 賽 璐 Chiralcel® OJ-H 柱 (5 μm , 250 × 4.6 mm)	A : CO ₂ B : MeOH	40% B 保持 7 分鐘 ,	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-D	大 賽 璐 Chiralcel®OD-H 柱 (5 μm , 150 × 4.6 mm)	A : CO ₂ B : MeOH	40% B 保持 7 分鐘 ,	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-E	WHELK-O1 (S , S) 250*4.6 mm 5 μm Regis	A : CO ₂ B : MeOH	60% B 保持 7 分鐘 ,	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-F	大 賽 璐 Chiralpak® AS3 柱 (3.0 μm , 150 × 4.6 mm)	A : CO ₂ B : EtOH +0.2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O	25% B 保持 6 分鐘 , 1 分鐘後到 50% , 保持 2.5 分鐘	2.5 ----- 40	9.5 ----- 110
SFC-G	大 賽 璐 Chiralpak® AS3 柱 (3.0 μm , 150 × 4.6 mm)	A : CO ₂ B : EtOH +0.2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O	30% B 保持 6 分鐘 , 1 分鐘後到 50% , 保持 2.5 分鐘	2.5 ----- 40	9.5 ----- 110

熔點

【0038】 值係峰值抑或熔融範圍，並且所獲得的值具有通常與這個分析方法相關的實驗不確定性。

DSC823e (指示為DSC)

【0039】 對於多種化合物，熔點係用DSC823e（梅特勒-托利多（Mettler-Toledo））來確定的。使用10°C/分鐘的溫度梯度來測量熔點。最高溫度係300°C。

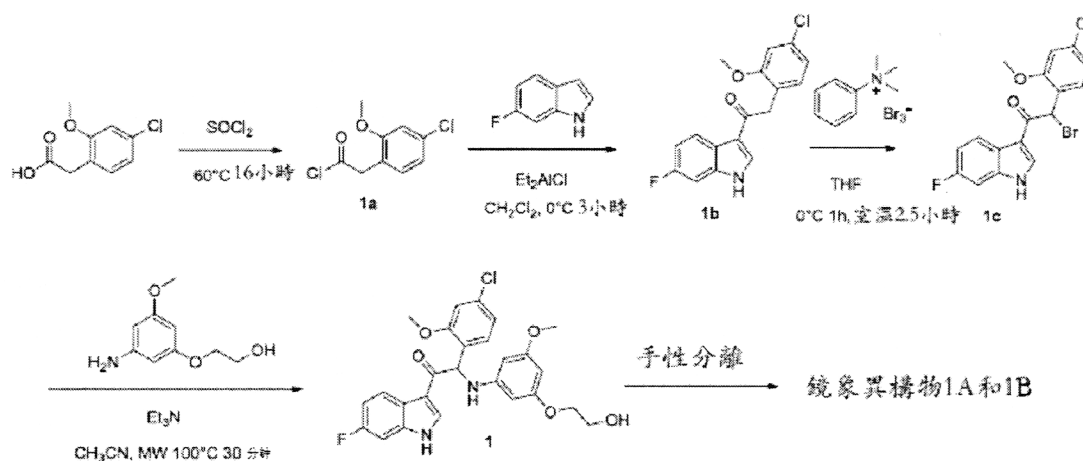
旋光度：

【0040】 在鉑金埃爾默（Perkin-Elmer）341旋光計上用鈉燈測量旋光度並且記錄如下：[α]^o（λ，c g/100 ml，溶劑，T°C）。



【0041】 $[\alpha]_{\lambda}^T = (100\alpha)/(l \times c)$ ：其中 l 係以dm計的路徑長度並且 c 係針對在溫度 T (°C) 和波長 λ (以nm計) 下的樣品的以g/100 ml計的濃度。如果所使用的光波長係589 nm (鈉D線)，那麼可以改為使用符號D。始終應給出旋轉符號 (+或-)。當使用這一等式時，常常在旋轉後的括弧中提供濃度和溶劑。使用度報導旋轉並且濃度不帶單位的給出 (將其假定為g/100 ml)。

【0042】 實例 1：2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氟-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮 (化合物**1**) 之合成以及手性分離成鏡像異構物**1A**和**1B**。



中間體**1a**之合成：

【0043】 將2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙酸[CAS 170737-95-8] (5.8 g, 28.9 mmol) 以小部分添加至亞硫酰氯 (50 mL) 並且將所得溶液在 60°C 下攪拌過夜。將溶劑在減壓下濃縮並且與甲苯共蒸發以得到呈油狀殘餘物的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙酰氯**1a** (6.5 g)，其不經進一步純化用於下一步驟。

中間體**1b**之合成：

【0044】 在0°C下將於己烷（37.1 mL，37.14 mmol）中的二乙基氯化鋁1M逐滴添加至6-氟-1*H*-吡啶[CAS 399-51-9]（3.34 g，24.76 mmol）於CH₂Cl₂（100 mL）中的溶液中。在0°C下30分鐘之後，在0°C下緩慢添加2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙醯氯**1a**（6.3 g，28.76 mmol）於CH₂Cl₂（100 mL）中的溶液。將反應在0°C下攪拌3小時。添加冰水並且濾出沈澱物，用水和少量CH₂Cl₂洗滌。將固體在70°C下在真空下乾燥過夜以得到2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氟-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**1b**（4.9 g）。

中間體**1c**之合成：

【0045】 在0°C下，將苯基三甲基三溴化鉍[CAS 4207-56-1]（5.8 g，15.4 mmol）於THF（65 mL）中的溶液逐滴添加至2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氟-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**1b**（4.9 g，15.4 mmol）於THF（60 mL）中的混合物中。將混合物在0°C下攪拌1小時，並且在室溫下攪拌2.5小時。將沈澱物濾出並且用EtOAc洗滌。在減壓下濃縮濾液。將殘餘物用EtOAc吸收，並且用水洗滌。沈澱物出現在有機層中並且將該沈澱物濾出且乾燥以提供第一批2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氟-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**1c**（4.6 g）。將有機層分離，經MgSO₄乾燥，過濾並且在減壓下蒸發溶劑。將殘餘物從EtOAc中結晶，將沈澱物濾出，用Et₂O洗滌且在真空下乾燥以提供第二部分的2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氟-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**1c**（1.6 g）。

化合物**1**之合成以及手性分離成鏡像異構物**1A**和**1B**：

【0046】 將在密封管中的2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氟-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**1c**（2.1 g，5.3 mmol）、2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS

725237-16-1](924 mg, 5.05 mmol)和三乙胺(1.47 mL, 10.6 mmol)於CH₃CN (16 mL)中的混合物使用具有從0至400 W範圍內的功率輸出(固定保持時間)的微波Biotage® Initiator EXP 60在100°C下加熱30分鐘。將反應用CH₂Cl₂稀釋並且將有機層用水洗滌,經MgSO₄乾燥,過濾並且在減壓下濃縮溶劑。使用50/50至0/100的庚烷/EtOAc梯度藉由在矽膠上快速層析(15-40 µm, 80 g)來純化殘餘物。收集純級分並且濃縮以得到1.1 g的化合物**1**。將此級分與另一批0.93 g的化合物**1**合併並且隨後經由非手性SFC(固定相:CYANO 6 µm 150 × 21.2 mm, 流動相:75% CO₂, 25% MeOH)純化以提供作為外消旋混合物的2-(4-氯-2-甲氧基-苯基)-1-(6-氟-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)-乙酮(化合物**1**, 1.36 g)。

【0047】 經由手性SFC(固定相:Chiralcel®OJ 20 × 250 mm, 流動相:60% CO₂, 40% MeOH)分離化合物**1**(1.36 g)之鏡像異構物,從而產生611 mg的第一洗脫鏡像異構物和586 mg的第二洗脫鏡像異構物。將該第一洗脫鏡像異構物用CH₃CN/二異丙基醚/庚烷吸收。濾出沈澱物並且乾燥以得到呈一種無定形粉末的鏡像異構物**1A**(496 mg)。將該第二洗脫鏡像異構物用CH₃CN/二異丙基醚/庚烷吸收。濾出沈澱物並且乾燥以得到呈無定形粉末的鏡像異構物**1B**(458 mg)。

化合物**1**：

【0048】 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (q, *J*=5.3 Hz, 2 H) 3.77 - 3.88 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.78 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=1.9 Hz, 2 H) 6.15 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.40 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 7.02 - 7.08 (m, 1 H) 7.09 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.27 (dd, *J*=9.6, 2.4 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 8.13 (dd, *J*=8.8, 5.7 Hz,

1 H) 8.43 (s, 1 H) 11.96 - 12.17 (m, 1 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 2.95分鐘, MH^+ 499

鏡像異構物1A :

【0049】 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.57 - 3.68 (m, 5 H)
3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.73 - 4.87 (m, 1 H) 5.71 (t, $J=1.9$ Hz, 1 H)
5.91 - 5.96 (m, 2 H) 6.15 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.39 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.96 (dd,
 $J=8.2, 1.9$ Hz, 1 H) 7.01 - 7.11 (m, 2 H) 7.27 (dd, $J=9.6, 2.4$ Hz, 1 H) 7.36 (d,
 $J=8.2$ Hz, 1 H) 8.13 (dd, $J=9.6, 5.7$ Hz, 1 H) 8.43 (s, 1 H) 11.45 - 12.31 (m, 1 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 2.95, MH^+ 499

$[\alpha]_D^{20}$: +112.1° (c 0.281, DMF)

手性SFC (方法SFC-C) : R_t 3.17分鐘, MH^+ 499, 手性純度100%。

鏡像異構物1B :

【0050】 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.57 - 3.67 (m, 5 H)
3.74 - 3.90 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.78 (br. s., 1 H) 5.70 - 5.74 (m, 1 H) 5.93 (s, 2
H) 6.15 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.40 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.96 (dd, $J=8.2, 1.9$ Hz, 1 H)
7.02 - 7.08 (m, 1 H) 7.09 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 7.27 (dd, $J=9.6, 2.4$ Hz, 1 H) 7.36
(d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 8.13 (dd, $J=9.6, 5.5$ Hz, 1 H) 8.43 (s, 1 H) 11.63 - 12.47 (m, 1
H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 2.95, MH^+ 499

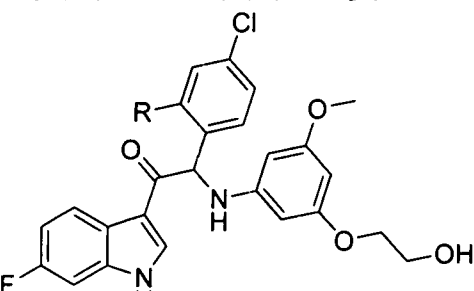
$[\alpha]_D^{20}$: -113.9° (c 0.28, DMF)

手性SFC (方法SFC-C) : R_t 4.12分鐘, MH^+ 499, 手性純度100%。

實例1.1：在pH 7.4下鏡像異構物**1A**的手性穩定性

【0051】 藉由在pH 7.4下在40°C和60°C下在緩衝溶液中培養24小時和48小時之後測定鏡像異構過量（ee%）來評價鏡像異構物**1A**（R = OMe）的手性穩定性。為了評定鏡像異構物**1A**（R = OMe）的甲氧基取代基對針對外消旋化的穩定性的影響，在相同條件下測試鏡像異構物**1'A**（R = H）的手性穩定性。

【0052】 為此，藉由將25 μL的**1A**或**1'A**於DMSO中的100 μM溶液與475 μL水性緩衝液（pH 7.4）混合來製備**1A**和**1'A**的5 μM緩衝（pH = 7.4）溶液。在40°C和60°C下培養之後24小時和48小時取得樣品。將分析樣品藉由手性SFC（MS檢測）進行分析並且將手性純度表示為鏡像異構過量（ee% = %鏡像異構物A - %鏡像異構物B）。鏡像異構物**1A**和**1'A**兩者在其培養之前具有100%的手性純度。

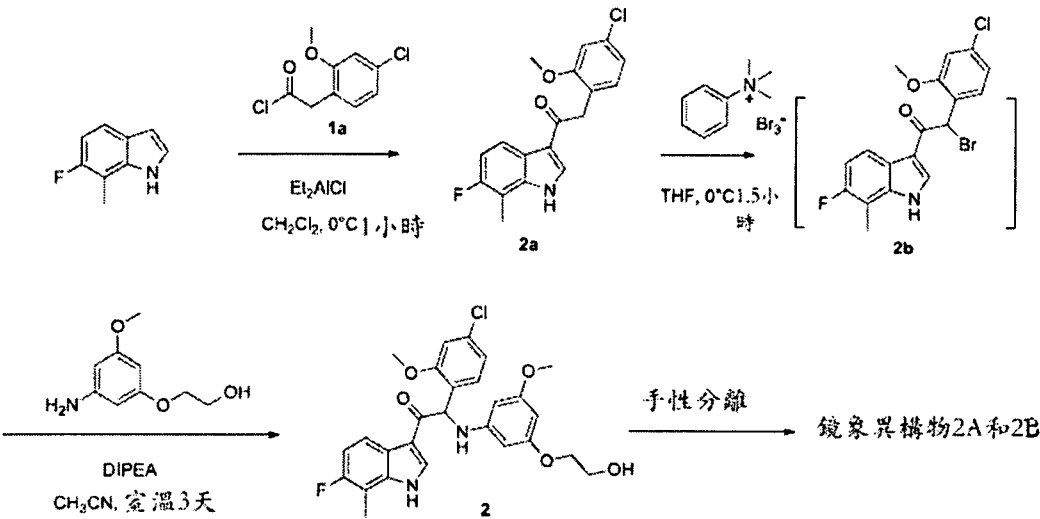


1A (R = OMe)
1'A (R = H)

化合物	溫度	ee%	
		取樣時間點（小時）	
		24	48
1A	40°C	100	100
	60°C	99	96
1'A	40°C	69	41
	60°C	0	0

【0053】 實例2：2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氟-7-甲基-1*H*-吡啶-3-

基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮(化合物**2**)之合成以及手性分離成鏡像異構物**2A**和**2B**。



中間體**2a**的合成：

【0054】 將6-氟-7-甲基-1*H*-吡啶[CAS 57817-10-4] (1.10 g, 7.37 mmol) 於 CH_2Cl_2 (40 mL) 中的溶液在 N_2 -流下在冰浴上冷卻。在15分鐘內逐滴添加於己烷 (10 mL, 10 mmol) 中的二乙基氯化鋁1M。在 0°C 下另外攪拌15分鐘之後，在 0°C 下在75分鐘內添加2-(4-氯-2-甲氧基-苯基)乙醯氯**1a** (2.06 g, 9.42 mmol, 合成：參見實例1) 於 CH_2Cl_2 (35 mL) 中的溶液。將反應在 0°C 下攪拌1小時並且隨後藉由緩慢添加四水合酒石酸鉀鈉 (羅謝耳鹽) [CAS 6100-16-9] (4.24 g, 15 mmol) 于水 (10 mL) 中的溶液來淬滅，同時將混合物的內部溫度保持在 10°C 以下。除去冰浴，添加2-甲基-THF (160 mL) 和 Na_2SO_4 (60 g) 並且將所得混合物在室溫下攪拌過夜。將混合物經dicalite®過濾並且用幾部分的THF洗滌濾餅。將合併的濾液在減壓下蒸發並且將殘餘物用少量的 CH_2Cl_2 研磨。將固體藉由過濾分離且在真空下乾燥以得到呈白色粉末的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氟-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-乙

酮**2a** (1.9 g)。

化合物**2**之合成以及手性分離成鏡像異構物**2A**和**2B**：

【0055】 將2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氟-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-乙酮**2a** (1.9 g, 5.73 mmol) 於乾燥THF (60 mL) 中的溶液在N₂-流下在冰浴上冷卻。在0°C下，在1小時的時間段內逐滴添加苯基三甲基三溴化銨[CAS 4207-56-1] (2.3 g, 5.91 mmol) 於THF (50 mL) 中的溶液並且將該混合物在0°C下攪拌另外1.5小時。將反應混合物在減壓下濃縮並且將含有粗溴化中間體**2b**的殘餘物溶解於CH₃CN (100 mL) 中。添加2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1] (2.11 g, 11.5 mmol) 和二異丙基-乙胺 (2 mL, 11.6 mmol) 並且將反應混合物在室溫下攪拌3天。添加水 (350 mL) 並且將反應產物用2-甲基-THF (3 × 100 mL) 萃取。將合併的有機層用0.5 M HCl (200 mL) 和水 (3 × 300 mL) 洗滌，經MgSO₄乾燥並且在減壓下蒸發。將殘餘物 (2.48 g) 藉由柱層析 (固定相：二氧化矽40 g, HP-Spher® 40 µm；流動相：庚烷/EtOAc梯度100/0至0/100) 純化。將含有反應產物的級分合併，並且在減壓下蒸發。將殘餘物用少量的EtOAc/庚烷 (1/1) 之混合物研磨，將固體濾出並且在真空下乾燥以提供作為外消旋混合物之2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氟-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮 (化合物**2**, 1.38 g)。

【0056】 經由製備型SFC (固定相：Chiralpak® Diacel AS 20 × 250 mm，流動相：CO₂，具有0.4% *i*PrNH₂的EtOH) 分離化合物**2** (1.38 g) 的鏡像異構物。將第一洗脫鏡像異構物溶解於MeOH (50 mL) 與水 (20 mL) 的混合物中並且將該混合物在減壓 (200毫巴，水浴40°C) 下蒸發至20 mL的殘餘體積。將所得懸浮液用20 mL水稀釋且在室溫下攪拌3小時。將白色固

體濾出，用水洗滌並且在真空下在室溫下乾燥以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**2A**（631 mg）。將第二洗脫鏡像異構物溶解於MeOH（50 mL）與水（20 mL）的混合物中並且將該混合物在減壓（200毫巴，水浴40°C）下蒸發至20 mL的殘餘體積。將所得懸浮液用20 mL水稀釋且在室溫下攪拌3小時。將白色固體濾出，用水洗滌並且在真空下在室溫下乾燥以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**2B**（625 mg）。

化合物2：

【0057】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.37 (br s, 3 H) 3.60 (s, 3 H) 3.63 (q, $J=5.2$ Hz, 2 H) 3.76 - 3.89 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.76 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 5.71 (t, $J=2.1$ Hz, 1 H) 5.94 (d, $J=2.2$ Hz, 2 H) 6.16 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.36 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.95 (dd, $J=8.4, 2.0$ Hz, 1 H) 7.00 (dd, $J=10.1, 8.8$ Hz, 1 H) 7.08 (d, $J=2.0$ Hz, 1 H) 7.35 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 7.95 (dd, $J=8.7, 5.2$ Hz, 1 H) 8.41 (s, 1 H) 12.17 (br s, 1 H)

LC/MS（方法LC-A）： R_t 1.19分鐘， MH^+ 513

鏡像異構物**2A**：

【0058】 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.67 (m, 2 H) 3.82 (ddt, $J=15.4, 10.2, 5.1, 5.1$ Hz, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.81 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 5.71 (br t, $J=1.8$ Hz, 1 H) 5.95 (d, $J=1.5$ Hz, 2 H) 6.17 (br d, $J=8.4$ Hz, 1 H) 6.40 (br d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.96 (dd, $J=8.4, 1.8$ Hz, 1 H) 7.02 (br dd, $J=10.1, 9.0$ Hz, 1 H) 7.10 (d, $J=1.8$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 7.96 (dd, $J=8.6, 5.3$ Hz, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 12.22 (br s, 1 H)

LC/MS（方法LC-A）： R_t 1.20， MH^+ 513

$[\alpha]_D^{20}$: +83.3° (c 0.36 , DMF)

手性SFC (方法SFC-F) : R_t 2.05分鐘, MH^+ 513, 手性純度100%

鏡像異構物2B :

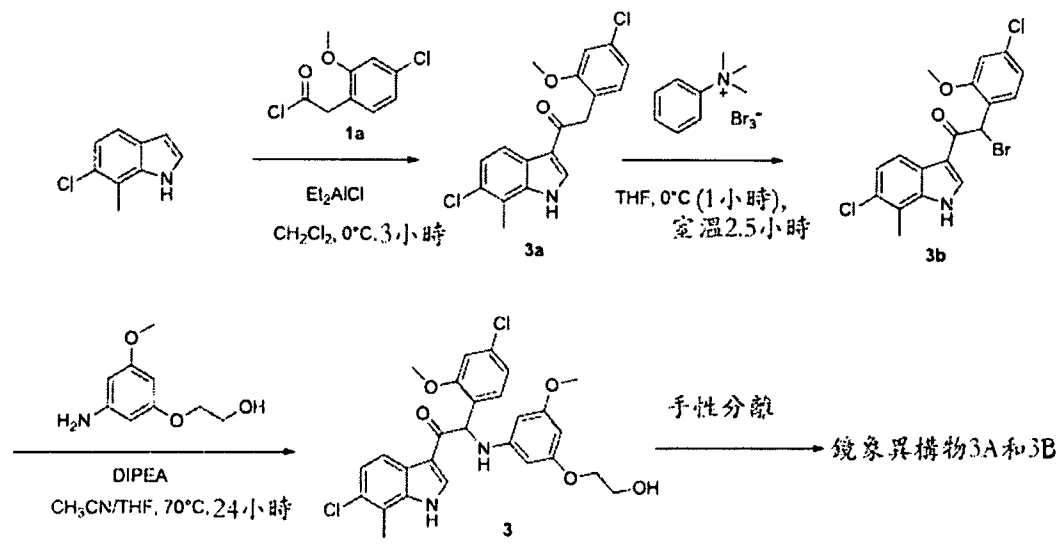
【0059】 1H NMR (360 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.67 (m, 2 H) 3.83 (qt, $J=10.2, 5.1$ Hz, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.80 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 5.71 (br t, $J=2.2$ Hz, 1 H) 5.95 (d, $J=1.8$ Hz, 2 H) 6.17 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.40 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.96 (dd, $J=8.4, 1.8$ Hz, 1 H) 7.02 (dd, $J=10.2, 8.8$ Hz, 1 H) 7.10 (d, $J=1.8$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 7.96 (dd, $J=8.6, 5.3$ Hz, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 12.21 (br s, 1 H)

LC/MS (方法LC-A) : R_t 1.20, MH^+ 513

$[\alpha]_D^{20}$: -81.9° (c 0.515 , DMF)

手性SFC (方法SFC-F) : R_t 3.28分鐘, MH^+ 513, 手性純度100%

【0060】 實例3 : 2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氯-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮 (化合物3) 之合成以及手性分離成鏡像異構物3A和3B。



中間體3a之合成：

【0061】 在0°C下將於己烷（18.1 mL，18.1 mmol）中的二乙基氯化鋁1M逐滴添加至6-氯-7-甲基-1*H*-吡啶[CAS 57817-09-1]（2 g，12.08 mmol）於CH₂Cl₂（60 mL）中的溶液中。在0°C下30分鐘之後，在0°C下緩慢添加2-(4-氯-2-甲氧基-苯基)乙醯氯**1a**（3.21 g，14.66 mmol，合成：參見實例1）於CH₂Cl₂（60 mL）中的溶液。將反應在0°C下攪拌3小時。添加冰水並且將沈澱物濾出且用水洗滌。將固體在真空下乾燥以得到2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氯-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**3a**（3.2 g）。

中間體3b之合成：

【0062】 在0°C下，將苯基三甲基三溴化銨[CAS 4207-56-1]（3.63 g，9.65 mmol）於THF（85 mL）中的溶液逐滴添加至2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氯-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**3a**（3.2 g，9.2 mmol）於THF（85 mL）中的溶液中。將混合物在0°C下攪拌1小時，並且在室溫下攪拌2.5小時。將沈澱物濾出並且用EtOAc洗滌。在減壓下濃縮濾液。將殘餘物用最少的CH₃CN/二異丙基醚吸收。將沈澱物濾出並且在真空下乾燥以得到2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氯-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-乙酮**3b**（4.1 g）。

化合物3之合成以及手性分離成鏡像異構物3A和3B：

【0063】 將2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氯-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**3b**（3.1 g，7.26 mmol）、2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1]（1.33 g，7.26 mmol）和二異丙基乙胺（1.9 mL，10.9 mmol）於CH₃CN/THF（1/1）（120 mL）中的混合物在70°C下攪拌24小時。在減壓下濃縮混合物。將殘餘物用CH₂Cl₂稀釋並且用1N HCl 洗滌。將有機層分

離，經MgSO₄乾燥，過濾並且在減壓下蒸發溶劑。藉由在矽膠上柱層析(15-40 μm，80 g於CH₂Cl₂/MeOH (99.5/0.5) 中) 來純化殘餘物。收集純級分並且在減壓下蒸發(2.3 g)。從Et₂O/CH₃CN中結晶少量以提供作為外消旋體的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-氯-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮(化合物**3**)的分析樣品。

【0064】 經由製備型手性SFC(固定相：(S, S) Whelk-O 15 μm 250 × 21.1 mm，流動相：45% CO₂，55% EtOH (+ 2% CH₂Cl₂)) 分離化合物**3** (2.2 g) 之鏡像異構物以得到1.11 g的第一洗脫鏡像異構物和1.07 g的第二洗脫鏡像異構物。將第一洗脫鏡像異構物從CH₃CN/Et₂O/庚烷中固化以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**3A** (461 mg)。將第二洗脫鏡像異構物從CH₃CN/Et₂O/庚烷中固化以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**3B** (872 mg)。

化合物**3**：

【0065】 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12.26 (d, *J*=2.8 Hz, 1 H) 8.46 (d, *J*=3.2 Hz, 1 H) 7.97 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.22 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 6.40 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.18 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 5.95 (d, *J*=2.2 Hz, 2 H) 5.71 (t, *J*=2.2 Hz, 1 H) 4.79 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 3.96 (s, 3 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.58 - 3.67 (m, 5 H)

LC/MS (方法LC-C)：R_t 3.28分鐘，MH⁺ 529

熔點：220°C

鏡像異構物**3A**：

【0066】 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 12.26 (br. s., 1 H) 8.46 (s, 1 H) 7.97 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.21 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 7.10 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 6.96 (dd, $J=8.2, 1.9$ Hz, 1 H) 6.40 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.18 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 5.95 (d, $J=2.2$ Hz, 2 H) 5.71 (t, $J=2.0$ Hz, 1 H) 4.79 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 3.97 (s, 3 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.59 - 3.67 (m, 5 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 3.27分鐘, MH^+ 529

$[\alpha]_D^{20}$: +88.8° (c 0.2691, DMF)

手性SFC (方法SFC-E) : R_t 3.40分鐘, MH^+ 529, 手性純度100%。

鏡像異構物3B :

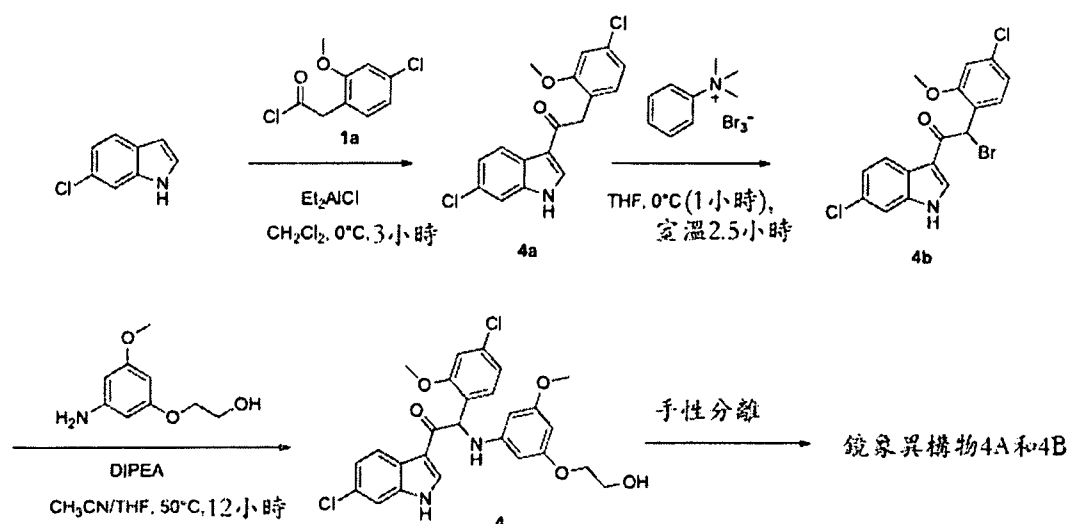
【0067】 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 12.26 (br. s., 1 H) 8.45 (s, 1 H) 7.97 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 7.21 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 6.96 (dd, $J=8.2, 1.9$ Hz, 1 H) 6.40 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.18 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 5.95 (d, $J=2.2$ Hz, 2 H) 5.71 (t, $J=2.0$ Hz, 1 H) 4.79 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 3.97 (s, 3 H) 3.76 - 3.90 (m, 2 H) 3.60-3.66 (m, 5 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 3.27分鐘, MH^+ 529

$[\alpha]_D^{20}$: -87.4° (c 0.2564, DMF)

手性SFC (方法SFC-E) : R_t 4.19分鐘, MH^+ 529, 手性純度100%。

【0068】 實例4 : 1-(6-氯-1*H*-吡啶-3-基)-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮(化合物4)之合成以及手性分離成鏡像異構物4A和4B。



中間體4a之合成：

【0069】 在 0°C 下將於己烷 (19.8 mL, 19.8 mmol) 中的二乙基氯化鋁1M逐滴添加至6-氯-1*H*-吡啶[CAS 17422-33-2] (2 g, 13.2 mmol) 於 CH_2Cl_2 (45 mL) 中的溶液中。在 0°C 下30分鐘之後，在 0°C 下緩慢添加2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-乙醯氯**1a** (3.36 g, 15.3 mmol, 合成：參見實例1) 於 CH_2Cl_2 (45 mL) 中的溶液。將反應在 0°C 下攪拌3小時。添加冰水並且濾出沈澱物，用水和最少 CH_2Cl_2 洗滌。將固體在真空下乾燥以得到1-(6-氯-1*H*-吡啶-3-基)-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙酮**4a** (2.68 g)。

中間體4b之合成：

【0070】 在 0°C 下，將苯基三甲基三溴化銨[CAS 4207-56-1] (3.165 g, 8.4 mmol) 於THF (50 mL) 中的溶液逐滴添加至1-(6-氯-1*H*-吡啶-3-基)-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙酮**4a** (2.68 g, 8 mmol) 於THF (50 mL) 中的溶液中。將混合物在 0°C 下攪拌1小時，並且在室溫下攪拌2.5小時。將沈澱物濾出並且用EtOAc洗滌。在減壓下濃縮濾液。將殘餘物溶解於EtOAc中，並且用水洗滌。沈澱物出現並且將固體濾出且在真空下乾燥以得到2-溴

-1-(6-氯-1*H*-吡啶-3-基)-2-(4-氯-2-甲氧基-苯基)乙酮**4b** (2.75 g)。

化合物**4**之合成以及手性分離成鏡像異構物**4A**和**4B**：

【0071】 將2-溴-1-(6-氯-1*H*-吡啶-3-基)-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-乙酮**4b** (2.3 g, 5.6 mmol)、2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1] (1.53 g, 8.4 mmol)和二異丙基乙胺 (2.4 mL, 13.9 mmol) 於CH₃CN/THF (1/1) (140 mL) 中的混合物在50°C下攪拌12小時。在減壓下濃縮混合物。將殘餘物用EtOAc稀釋，用1N HCl洗滌，且然後用水洗滌。將有機層經MgSO₄乾燥，過濾並在減壓下蒸發溶劑。藉由在矽膠上柱層析 (15-40 μm, 80 g 於CH₂Cl₂/MeOH (99.5/0.5) 中) 來純化粗化合物。收集純級分並且在減壓下蒸發。從Et₂O/CH₃CN中結晶少量以得到作為外消旋混合物的1-(6-氯-1*H*-吡啶-3-基)-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-2-((3-(2-羥基-乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮 (化合物**4**) 的分析樣品。將剩餘量的化合物**4** (2.1 g) 經由製備型LC (固定相：不規則的裸二氧化矽150 g, 流動相：甲苯/iPrOH 95/5) 進一步純化。

【0072】 經由製備型手性SFC (固定相：Chiralpak® IC 5 μm 250 × 30 mm, 流動相：60% CO₂, 40% MeOH) 分離化合物**4** (1.9 g) 的鏡像異構物以得到870 mg的第一洗脫鏡像異構物和870 mg的第二洗脫鏡像異構物。藉由在矽膠上快速層析 (15-40 μm, 24 g 於CH₂Cl₂/MeOH (99.5/0.5) 中) 再次純化兩種鏡像異構物。將第一洗脫鏡像異構物 (800 mg) 從CH₃CN/Et₂O中固化以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**4A** (693 mg)。將第二洗脫鏡像異構物從CH₃CN/Et₂O中固化以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**4B** (619 mg)。

化合物4：

【0073】 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.64 (t, $J=5.0$ Hz, 2 H) 3.75 - 3.88 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.38 - 5.09 (m, 1 H) 5.71 (t, $J=1.9$ Hz, 1 H) 5.93 (d, $J=2.2$ Hz, 2 H) 6.13 - 6.18 (m, 1 H) 6.35 - 6.46 (m, 1 H) 6.97 (dd, $J=8.4, 1.9$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=2.2$ Hz, 1 H) 7.21 (dd, $J=8.5, 1.9$ Hz, 1 H) 7.35 (d, $J=8.4$ Hz, 1 H) 7.53 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 8.13 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 8.46 (d, $J=2.8$ Hz, 1 H) 12.13 (d, $J=2.8$ Hz, 1 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 3.11分鐘, MH^+ 515

熔點 : 154°C

鏡像異構物4A：

【0074】 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.64 (q, $J=5.0$ Hz, 2 H) 3.74 - 3.88 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.79 (t, $J=5.0$ Hz, 1 H) 5.71 (t, $J=2.0$ Hz, 1 H) 5.93 (d, $J=2.0$ Hz, 2 H) 6.15 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.41 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.97 (dd, $J=8.2, 1.9$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 7.21 (dd, $J=8.5, 1.9$ Hz, 1 H) 7.35 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.53 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 8.13 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 8.46 (s, 1 H) 12.12 (br. s., 1 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 3.13分鐘, MH^+ 515

$[\alpha]_D^{20}$: $+111.6^\circ$ (c 0.284, DMF)

手性SFC (方法SFC-A) : R_t 3.68分鐘, MH^+ 515, 手性純度100%。

鏡像異構物4B：

【0075】 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.68 (m, 2 H) 3.76 - 3.89 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.74 - 4.83 (m, 1 H) 5.72 (t, $J=2.0$

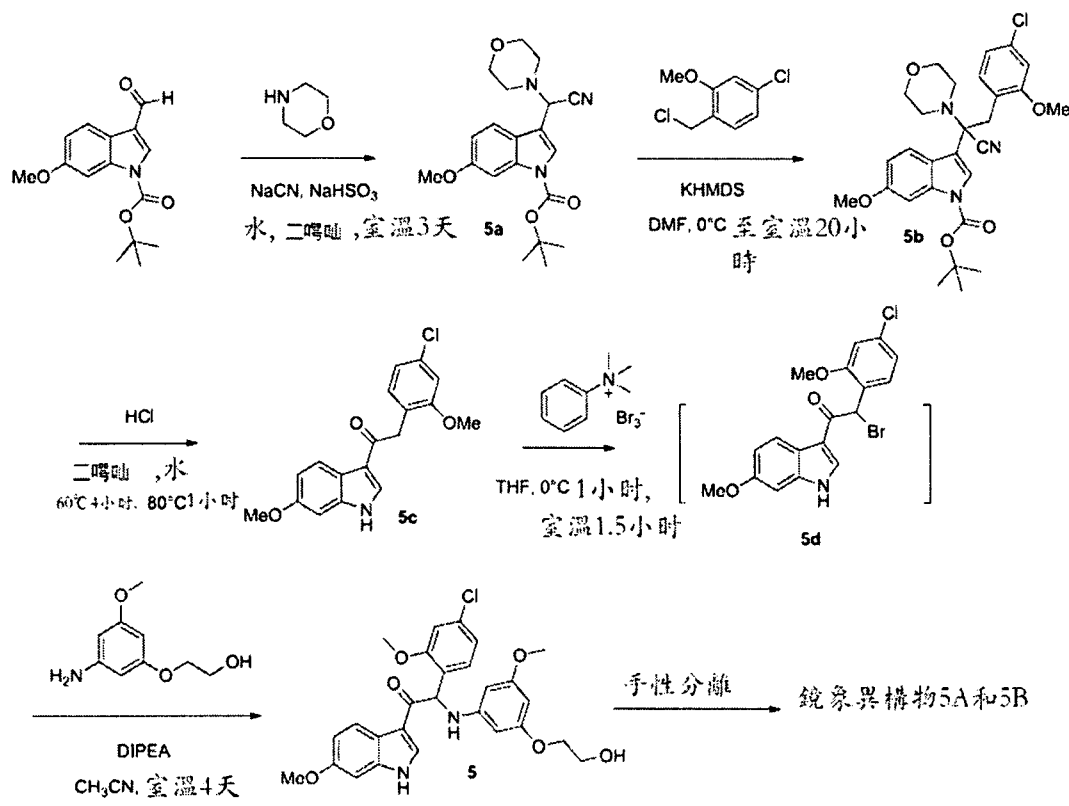
Hz, 1 H) 5.93 (d, $J=2.0$ Hz, 2 H) 6.15 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.42 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.97 (dd, $J=8.2, 1.9$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 7.21 (dd, $J=8.5, 1.9$ Hz, 1 H) 7.35 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.53 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 8.13 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 8.46 (s, 1 H) 12.13 (br. s., 1 H)

LC/MS（方法LC-C）： R_t 3.14分鐘， MH^+ 515

$[\alpha]_D^{20}$ ：-113.9° (c 0.288，DMF)

手性SFC（方法SFC-A）： R_t 5.04分鐘， MH^+ 515，手性純度100%。

【0076】 實例5：2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)-1-(6-甲氧基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮（化合物**5**）之合成以及手性分離成鏡像異構物**5A**和**5B**。



中間體**5a**之合成：



【0077】 將NaHSO₃ (5.7 g, 54.5 mmol) 于水 (45 mL) 中的溶液添加至3-甲醯基-6-甲氧基-1*H*-吡啶-1-甲酸三級丁酯 [CAS 847448-73-1] (10 g, 36.3 mmol) 於二噁呋 (45 mL) 中的攪拌溶液中。在15分鐘之後，添加咪啉 (4.8 mL, 54.5 mmol) 並且35分鐘之後，添加氰化鈉 (NaCN) (1.96 g, 40 mmol)。將所得懸浮液在室溫下攪拌3天，直到反應完成。將產物濾出並且用二噁呋/水 (3 × 35 mL) 的1/1混合物洗滌且隨後用水 (3 × 45 mL) 洗滌並且在真空下在60°C下乾燥。將固體在Et₂O (125 mL) 中攪拌，濾出，用Et₂O (3x) 洗滌並且在真空下在50°C下乾燥以提供3-(氰基(咪啉代)甲基)-6-甲氧基-1*H*-吡啶-1-甲酸三級丁酯**5a** (12.3 g)。

中間體**5b**之合成：

【0078】 將3-(氰基(咪啉代)甲基)-6-甲氧基-1*H*-吡啶-1-甲酸三級丁酯**5a** (6.0 g, 16.2 mmol) 於乾燥DMF (80 mL) 中的混合物在N₂-氣氛下攪拌，同時在冰浴上冷卻。在10分鐘內逐滴添加KHMDs 0.5 M於甲苯 (35.5 mL, 17.8 mmol) 中的溶液。在攪拌另外10分鐘之後，添加4-氯-1-(氯甲基)-2-甲氧基苯[CAS 101079-84-9] (3.09 g, 16.2 mmol) 並且將所得混合物在室溫下攪拌20小時。將反應混合物倒入冷水 (400 mL) 中並且將產物用Et₂O (2x) 萃取。將合併的有機層用鹽水洗滌，經MgSO₄乾燥，在減壓下蒸發並且與二甲苯共蒸發。藉由快速層析 (固定相：Biotage® Grace Reveleris二氧化矽 120 g, 流動相：庚烷/EtOAc梯度100/0至20/80) 來純化殘餘物。將所希望的級分合併，在減壓下蒸發並且與二噁呋共蒸發以得到3-(2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-氰基-1-咪啉代乙基)-6-甲氧基-1*H*-吡啶-1-甲酸三級丁酯**5b** (7.75 g)。

中間體**5c**之合成：

【0079】 向3-(2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-氰基-1-咪啉代乙基)-6-甲氧基-1*H*-吡啶-1-甲酸三級丁酯**5b** (7.75 g, 14.7 mmol) 於二噁咄 (40 mL) 和水 (20 mL) 中的攪拌懸浮液中添加HCl 6M於異丙醇 (36.8 mL, 220 mmol) 中的溶液。將所得混合物在60°C下攪拌4小時並且隨後在80°C下攪拌1小時。在冷卻至室溫之後，將混合物靜置20小時以便允許反應產物的結晶。將產物濾出，用*i*PrOH/H₂O/二噁咄 (2 × 15 mL) 的1/1/1混合物洗滌並且在50°C下在真空下乾燥以得到2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-甲氧基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**5c** (3.67 g)。

化合物5之合成以及手性分離成鏡像異構物5A和5B：

【0080】 將2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-甲氧基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**5c** (2.35 g, 7.13 mmol) 於THF (100 mL) 中的攪拌混合物在N₂-氣氛下在冰浴上冷卻。添加苯基三甲基三溴化銨[CAS 4207-56-1] (2.81 g, 7.48 mmol) 並且將反應混合物在0°C下攪拌1小時，並且隨後在室溫下攪拌1.5小時。添加2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1] (2.61 g, 14.3 mmol)、二異丙基乙胺 (2.46 mL, 14.3 mmol) 和CH₃CN (100 mL) 並且將反應混合物在室溫下攪拌18小時且在55°C下攪拌2小時。將反應混合物在減壓下濃縮至原始體積的50%。添加2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1] (1 g) 和二異丙基乙胺 (1.5 mL) 並且將反應混合物在室溫下攪拌65小時。將反應混合物倒入水 (400 mL) 中並且將產物用2-MeTHF (2x) 萃取。將合併的有機層用鹽水洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾並且在減壓下蒸發。藉由快速層析 (固定相：Biotage® Grace Reveleris二氧化矽120 g，流動相：庚烷/EtOAc/EtOH梯度100/0/0至50/37/13) 來純化殘餘物 (7 g)。將所希望的級分合並且在減壓下蒸發。藉由製備型HPLC (固定相：Uptisphere®

C18 ODB –10 μm , 200 g , 5 cm , 流動相：在水中的0.25% NH_4HCO_3 溶液， CH_3CN ）進一步純化殘餘物（5.8 g）。將產物級分合並且在減壓下蒸發。將殘餘物溶解於 MeOH （20 mL）中並且靜置以便結晶4小時。將固體濾出，用 MeOH （3 $\times$ 5 mL）洗滌並且在真空下在50°C下乾燥以提供作為外消旋混合物的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基-苯基)胺基)-1-(6-甲氧基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮（化合物**5**，2.06 g）。

【0081】 經由正相手性分離（固定相：AD-H，流動相：50%甲醇，50%乙醇）進行化合物**5**（2 g）的手性分離。將產物級分合並且在減壓下蒸發。藉由添加水（3 mL）從 MeOH （13 mL）的攪拌溶液中結晶第一洗脫鏡像異構物。在攪拌過夜之後，將固體濾出，用 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ （4 $\times$ 3 mL）的3/1混合物洗滌且在真空下在50°C下乾燥以提供鏡像異構物**5A**（476 mg）。藉由添加水（3 mL）從 MeOH （13 mL）的攪拌溶液中結晶第二洗脫鏡像異構物。在攪拌過夜之後，將固體濾出，用 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ （4 $\times$ 3 mL）的3/1混合物洗滌且在真空下在50°C下乾燥以提供鏡像異構物**5B**（362 mg）。

化合物**5**：

【0082】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.65 (q, $J=5.3$ Hz, 2 H) 3.77 (s, 3 H) 3.78 - 3.90 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t, $J=5.6$ Hz, 1 H) 5.71 (t, $J=2.1$ Hz, 1 H) 5.93 (d, $J=2.2$ Hz, 2 H) 6.13 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.36 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.83 (dd, $J=8.7, 2.3$ Hz, 1 H) 6.92 - 7.00 (m, 2 H) 7.09 (d, $J=2.0$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.4$ Hz, 1 H) 8.01 (d, $J=8.6$ Hz, 1 H) 8.29 (d, $J=2.9$ Hz, 1 H) 11.81 (br d, $J=2.2$ Hz, 1 H)

LC/MS（方法LC-B）： R_t 1.93， MH^+ 511

鏡像異構物5A：

【0083】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (q, $J=5.4$ Hz, 2 H) 3.77 (s, 3 H) 3.78 - 3.90 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 5.71 (t, $J=2.0$ Hz, 1 H) 5.93 (d, $J=2.0$ Hz, 2 H) 6.13 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.36 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.83 (dd, $J=8.7, 2.3$ Hz, 1 H) 6.92 - 6.99 (m, 2 H) 7.09 (d, $J=2.0$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.4$ Hz, 1 H) 8.01 (d, $J=8.8$ Hz, 1 H) 8.29 (d, $J=3.1$ Hz, 1 H) 11.81 (br d, $J=2.4$ Hz, 1 H)

LC/MS (方法LC-A) : R_t 1.08, MH^+ 511

$[\alpha]_D^{20}$: +109.3° (c 0.61, DMF)

手性SFC (方法SFC-G) : R_t 1.78分鐘, MH^+ 511, 手性純度100%

鏡像異構物5B：

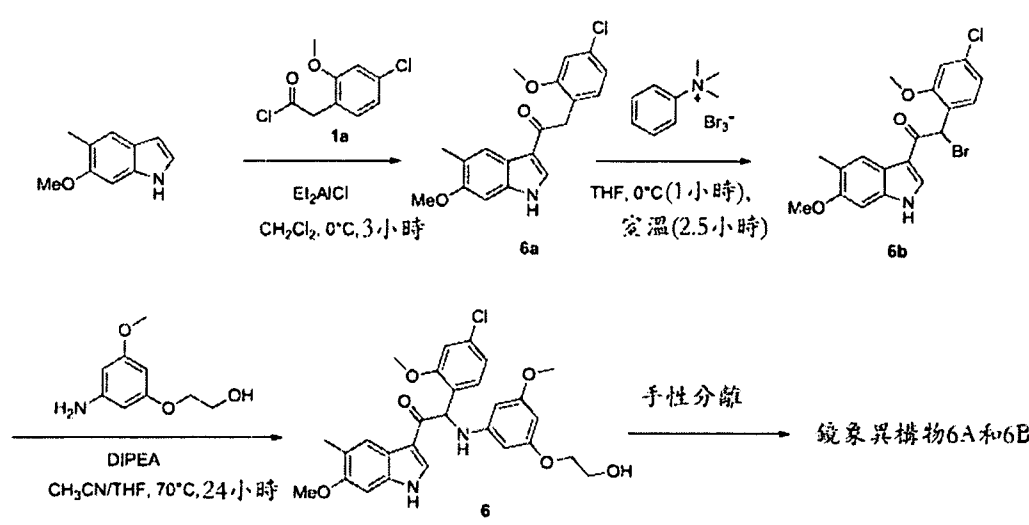
【0084】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (q, $J=5.2$ Hz, 2 H) 3.77 (s, 3 H) 3.78 - 3.89 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t, $J=5.6$ Hz, 1 H) 5.71 (t, $J=2.1$ Hz, 1 H) 5.93 (d, $J=2.0$ Hz, 2 H) 6.12 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.35 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.82 (dd, $J=8.7, 2.3$ Hz, 1 H) 6.91 - 7.01 (m, 2 H) 7.09 (d, $J=2.0$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 8.01 (d, $J=8.6$ Hz, 1 H)

LC/MS (方法LC-A) : R_t 1.08, MH^+ 511

$[\alpha]_D^{20}$: -108.9° (c 0.52, DMF)

手性SFC (方法SFC-G) : R_t 2.19分鐘, MH^+ 511, 手性純度100%

【0085】 實例6：2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮 (化合物6) 之合成以及手性分離成鏡像異構物6A和6B。



中間體6a之合成：

【0086】 在 0°C 下將於己烷（13.5 mL，13.5 mmol）中的二乙基氯化鋁1M逐滴添加至6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶[CAS 1071973-95-9]（1.45 g，9 mmol）於 CH_2Cl_2 （45 mL）中的溶液中。在 0°C 下30分鐘之後，在 0°C 下緩慢添加2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙醯氯**1a**（2.4 g，10.9 mmol，合成：參見實例1）於 CH_2Cl_2 （45 mL）中的溶液。將反應在 0°C 下攪拌3小時。添加冰水並且將沈澱物濾出且用水洗滌。將固體在真空下乾燥以得到2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**6a**（2.1 g）。

中間體6b之合成：

【0087】 在 0°C 下，將苯基三甲基三溴化銨[CAS 4207-56-1]（2.4 g，6.4 mmol）於THF（65 mL）中的溶液逐滴添加至2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**6a**（2.1 g，6.1 mmol）於THF（60 mL）中的混合物中。將混合物在 0°C 下攪拌1小時，並且在室溫下攪拌2.5小時。將沈澱物濾出並且用EtOAc洗滌。在減壓下濃縮濾液。將殘餘物用最少的二異丙基醚吸收。將沈澱物濾出並且在真空下乾燥以得到2-溴-2-(4-氯-2-甲氧

基苯基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮 **6b** (2.36 g)。

化合物**6**之合成以及手性分離成鏡像異構物**6A**和**6B**：

【0088】 將2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**6b** (1.35 g, 3.2 mmol)、2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1] (0.585 g, 3.2 mmol)和二異丙基乙胺 (0.83 mL, 4.8 mmol) 於CH₃CN/THF (1/1) (80 mL) 中的混合物在70°C下攪拌24小時。在減壓下濃縮混合物。將殘餘物用CH₂Cl₂稀釋，用1N HCl和水洗滌。將有機層分離，經MgSO₄乾燥，過濾並且在減壓下蒸發溶劑。藉由在矽膠上柱層析(15-40 μm, 80 g於CH₂Cl₂/MeOH (99.5/0.5) 中)來純化粗化合物。從Et₂O/CH₃CN中結晶少量以得到作為一種外消旋混合物的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-乙酮 (化合物**3**)的分析樣品。將剩餘量的粗化合物**3**與另一批混合(總量1.19 g)並且經由製備型LC (固定相：不規則的裸二氧化矽 150 g, 流動相：CH₂Cl₂/MeOH (98/2)，並且然後甲苯/*i*PrOH (95/5)進一步純化兩次。

【0089】 經由製備型手性SFC (固定相：Chiralpak® IC 5 μm 250 × 30 mm, 流動相：50% CO₂, 50% MeOH)分離化合物**3** (950 mg)的鏡像異構物以得到485 mg的第一洗脫鏡像異構物和480 mg的第二洗脫鏡像異構物。將第一洗脫鏡像異構物從CH₃CN/Et₂O中固化以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**6A** (406 mg)。將第二洗脫鏡像異構物從CH₃CN/Et₂O中固化以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**6B** (436 mg)。

化合物**6**：

【0090】 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.21 (s, 3 H) 3.61 (s, 3

H) 3.62 - 3.68 (m, 2 H) 3.74 - 3.90 (m, 5 H) 3.97 (s, 3 H) 4.76 (t, $J=4.8$ Hz, 1 H)
 5.68 - 5.74 (m, 1 H) 5.93 (d, $J=1.5$ Hz, 2 H) 6.11 (d, $J=7.6$ Hz, 1 H) 6.31 (d,
 $J=7.6$ Hz, 1 H) 6.92 (s, 1 H) 6.95 (dd, $J=8.3, 1.8$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=1.8$ Hz, 1
 H) 7.35 (d, $J=8.3$ Hz, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.22 (s, 1 H) 11.73 (br. s., 1 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 3.02分鐘, MH^+ 525

鏡像異構物6A :

【0091】 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.20 (s, 3 H) 3.60 (s, 3
 H) 3.64 (q, $J=5.3$ Hz, 2 H) 3.75 - 3.88 (m, 5 H) 3.97 (s, 3 H) 4.78 (t, $J=5.3$ Hz, 1
 H) 5.70 (t, $J=2.0$ Hz, 1 H) 5.92 (d, $J=2.0$ Hz, 2 H) 6.11 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.33
 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.92 (s, 1 H) 6.95 (dd, $J=8.2, 1.9$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=1.9$ Hz,
 1 H) 7.35 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.88 (s, 1 H) 8.23 (s, 1 H) 11.75 (br. s., 1 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 3.04分鐘, MH^+ 525

$[\alpha]_D^{20}$: +116.8° (c 0.4536, DMF)

手性SFC (方法SFC-B) : R_t 2.40分鐘, MH^+ 525, 手性純度100%。

鏡像異構物6B :

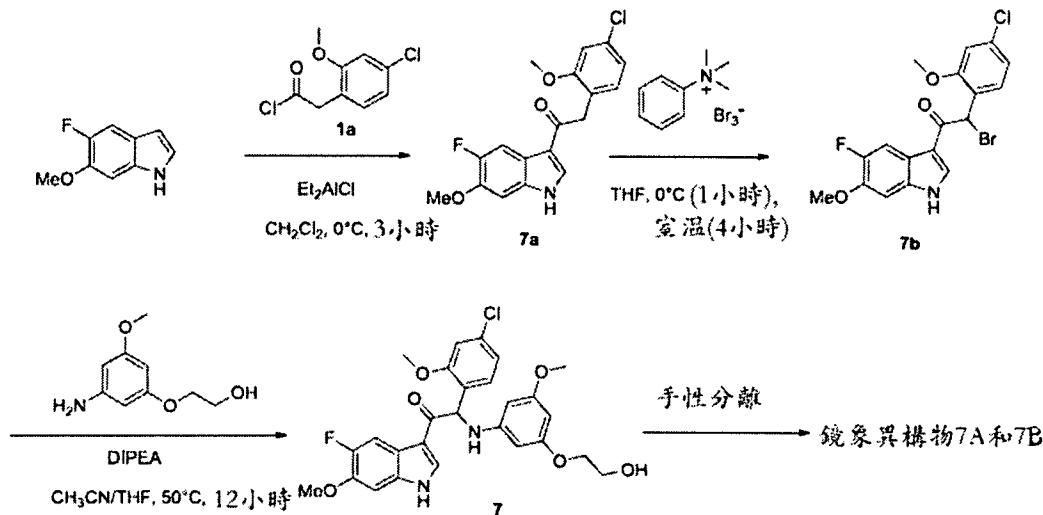
【0092】 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.20 (s, 3 H) 3.60 (s, 3
 H) 3.64 (q, $J=5.4$ Hz, 2 H) 3.77 - 3.88 (m, 5 H) 3.97 (s, 3 H) 4.78 (t, $J=5.4$ Hz, 1
 H) 5.70 (t, $J=2.0$ Hz, 1 H) 5.92 (d, $J=2.0$ Hz, 2 H) 6.11 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.33
 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.92 (s, 1 H) 6.95 (dd, $J=8.2, 1.9$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=1.9$ Hz,
 1 H) 7.35 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.88 (s, 1 H) 8.23 (s, 1 H) 11.75 (br. s., 1 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 3.04分鐘, MH^+ 525

$[\alpha]_D^{20}$: -121.9° (c 0.3855, DMF)

手性SFC（方法SFC-B）： R_t 3.75分鐘， MH^+ 525，手性純度99.86%。

【0093】 實例7：2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-6-甲氧基-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮（化合物**7**）之合成以及手性分離成鏡像異構物**7A**和**7B**。



中間體**7a**之合成：

【0094】 在0°C下將於己烷（15.7 mL，15.7 mmol）中的二乙基氯化鋁1M逐滴添加至5-氟-6-甲氧基-1*H*-吡啶[CAS 1211595-72-0]（2 g，12.1 mmol）於CH₂Cl₂（50 mL）中的溶液中。在0°C下30分鐘之後，在0°C下緩慢添加2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙氯1a（3.2 g，14.6 mmol，合成：參見實例1）於CH₂Cl₂（50 mL）中的溶液。將反應在0°C下攪拌3小時。添加冰水並且濾出沈澱物，用水和最少CH₂Cl₂洗滌。將固體在真空下乾燥以得到2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-6-甲氧基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**7a**（2.82 g）。

中間體**7b**之合成：

【0095】 在0°C下，將苯基三甲基三溴化銨[CAS 4207-56-1]（3.5 g，

8.1 mmol) 於THF (20 mL) 中的溶液逐滴添加至2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-6-甲氧基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**7a** (2.82 g, 8.1 mmol) 於THF (46 mL) 中的溶液中。將混合物在0°C下攪拌1小時，並且在室溫下攪拌4小時。將沈澱物濾出並且用EtOAc洗滌。在減壓下濃縮濾液。將殘餘物溶解於EtOAc中，用水洗滌。將有機相經MgSO₄乾燥，過濾並且在減壓下蒸發溶劑。將殘餘物用最少的EtOAc吸收。將沈澱物濾出並且在真空下乾燥以得到2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-6-甲氧基-1*H*-吡啶-3-基)-乙酮 **7b** (2.5 g)。

化合物**7**之合成以及手性分離成鏡像異構物**7A**和**7B**：

【0096】 將2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-6-甲氧基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**7b** (2.4 g, 5.6 mmol)、2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1] (1.5 g, 8.2 mmol) 和二異丙基乙胺 (1.45 mL, 8.4 mmol) 於CH₃CN/THF (1/1) (48 mL) 中的混合物在50°C下攪拌12小時。在減壓下濃縮混合物。將殘餘物用EtOAc稀釋，用1N HCl和水洗滌。將有機層分離，經MgSO₄乾燥，過濾並且在減壓下蒸發溶劑。藉由在矽膠上柱層析 (15-40 μm, 80 g於CH₂Cl₂/MeOH (99.5/0.5) 中) 來純化殘餘物。收集純級分並且在減壓下蒸發。從Et₂O/CH₃CN中固化少量以得到作為外消旋混合物的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-6-甲氧基-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮 (化合物**7**) 的分析樣品。

【0097】 經由製備型手性SFC (固定相：Chiralpak® IC 5 μm 250 × 30 mm, 流動相：55% CO₂, 45% MeOH) 分離化合物**7** (1.6 g) 的鏡像異構物以得到680 mg的第一洗脫鏡像異構物和720 mg的第二洗脫鏡像異構物。將第一洗脫鏡像異構物從CH₃CN/Et₂O中固化以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**7A** (603 mg)。將第二洗脫鏡像異構物從CH₃CN/Et₂O中固化以得到

呈無定形白色粉末的鏡像異構物**7B** (505 mg)。

化合物**7**：

【0098】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.62 - 3.67 (m, 2 H) 3.74 - 3.88 (m, 5 H) 3.96 (s, 3 H) 4.77 (t, $J=5.3$ Hz, 1 H) 5.66 - 5.75 (m, 1 H) 5.92 (d, $J=1.8$ Hz, 2 H) 6.12 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.37 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.96 (dd, $J=8.1, 1.8$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=1.8$ Hz, 1 H) 7.14 (d, $J=7.6$ Hz, 1 H) 7.35 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 7.81 (d, $J=11.6$ Hz, 1 H) 8.33 (s, 1 H) 11.94 (br. s., 1 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 2.90分鐘, MH^+ 529

鏡像異構物**7A**：

【0099】 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.64 (q, $J=5.5$ Hz, 2 H) 3.76 - 3.88 (m, 5 H) 3.96 (s, 3 H) 4.79 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 5.71 (t, $J=1.9$ Hz, 1 H) 5.92 (d, $J=1.9$ Hz, 2 H) 6.12 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.39 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.96 (dd, $J=8.2, 2.0$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 7.14 (d, $J=7.6$ Hz, 1 H) 7.35 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.81 (d, $J=11.7$ Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 11.95 (br. s., 1 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 2.90分鐘, MH^+ 529

$[\alpha]_D^{20}$: +86.2° (c 0.232, DMF)

手性SFC (方法SFC-B) : R_t 2.28分鐘, MH^+ 529, 手性純度100%。

鏡像異構物**7B**：

【0100】 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.64 (q, $J=5.5$ Hz, 2 H) 3.76 - 3.88 (m, 5 H) 3.96 (s, 3 H) 4.79 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 5.71 (t,

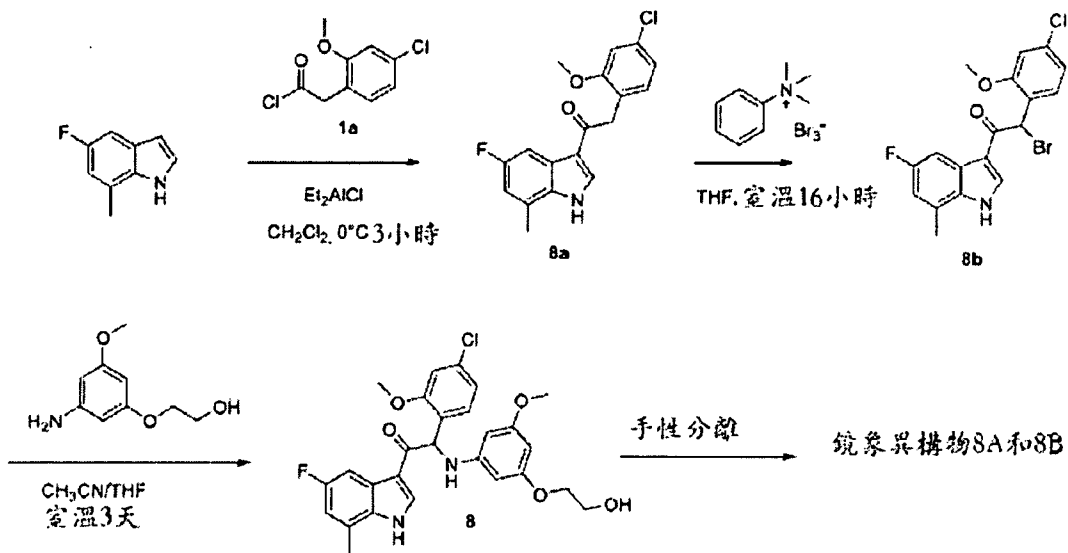
$J=1.9$ Hz, 1 H) 5.92 (d, $J=1.9$ Hz, 2 H) 6.12 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.39 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.96 (dd, $J=8.2, 1.9$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 7.14 (d, $J=7.6$ Hz, 1 H) 7.35 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.81 (d, $J=12.0$ Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 11.95 (br. s., 1 H)

LC/MS（方法LC-C）： R_t 2.90分鐘， MH^+ 529

$[\alpha]_D^{20}$ ：-88.7°（c 0.3，DMF）

手性SFC（方法SFC-B）： R_t 4.04分鐘， MH^+ 529，手性純度100%。

【0101】 實例8：2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮（化合物**8**）之合成以及手性分離成鏡像異構物**8A**和**8B**。



中間體**8a**之合成：

【0102】 在0°C下將於己烷（15.0 mL，15.0 mmol）中的二乙基氯化鋁1M逐滴添加至5-氟-7-甲基-1*H*-吡啶[CAS 1082041-52-8]（1.49 g，10.0 mmol）於 CH_2Cl_2 （20 mL）中的溶液中。在0°C下30分鐘之後，在0°C下緩

慢添加2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙醯氯**1a** (3.28 g, 15.0 mmol, 合成：參見實例1) 於CH₂Cl₂ (10 mL) 中的溶液。將反應在0°C下攪拌3小時。添加1M羅謝耳鹽溶液並且將反應混合物在室溫下攪拌30分鐘。將所形成的固體濾出並且分配在EtOAc與1N HCl之間。分離各相。用EtOAc萃取水層。將有機相合併，用鹽水洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮以得到2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**8a** (2.03 g)。

中間體**8b**之合成：

【0103】 在0°C下，將苯基三甲基三溴化銨[CAS 4207-56-1] (2.53 g, 6.72 mmol) 於THF (10 mL) 中的溶液逐滴添加至2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**8a** (2.03 g, 6.11 mmol) 於THF (50 mL) 中的溶液中。將該反應混合物在室溫下攪拌過夜。將沈澱物濾出並且用EtOAc洗滌。在減壓下濃縮濾液。將殘餘物用最少的乙腈吸收。將沈澱物濾出，用乙腈洗滌並且在真空下乾燥以得到2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**8b** (2.00 g)。

化合物**8**之合成以及手性分離成鏡像異構物**8A**和**8B**：

【0104】 將2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**8b** (1.70 g, 4.14 mmol) 和2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1] (2.28 g, 12.4 mmol) 於THF (10 mL) 和CH₃CN (10 mL) 中的混合物在室溫下攪拌3天。在減壓下濃縮反應混合物。將殘餘物分配於EtOAc與1N HCl之間。分離各相。將有機相用1N HCl洗滌兩次，用飽和NaHCO₃水溶液和鹽水洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾並且在減壓下濃縮。將殘餘物用最少量的乙腈吸收。將沈澱物濾出並且在真空下乾燥以得到作為外

消旋混合物的2-(4-氟-2-甲氧基苯基)-1-(5-氟-7-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮 (化合物**8**, 1.23 g)。

【0105】 經由正相手性分離 (固定相: Daicel Chiralpak® OD-H, 流動相: 80%庚烷, 20%乙醇) 分離化合物**8** (1.17 g) 的鏡像異構物。藉由快速層析 (固定相: Biotage® Grace Reveleris 二氧化矽 12 g, 流動相: 庚烷/EtOAc/EtOH 梯度 100/0/0 至 40/45/15) 來進一步純化第一洗脫產物。將純級分合並且蒸發。將產物從 MeOH (4 mL) 與水 (1 mL) 的混合物中結晶過夜, 濾出, 用 MeOH (3x) 洗滌並且在真空下在 50°C 下乾燥以提供鏡像異構物**8A** (37 mg)。藉由快速層析 (固定相: Biotage® Grace Reveleris 二氧化矽 12 g, 流動相: 庚烷/EtOAc/EtOH 梯度 100/0/0 至 40/45/15) 來進一步純化第二洗脫產物。將純級分合並且蒸發。將產物從 MeOH 與 H₂O 的混合物中結晶, 濾出, 用 MeOH 洗滌並且在真空下在 50°C 下乾燥以提供鏡像異構物**8B** (177 mg)。

化合物**8**：

【0106】 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.48 (s, 3 H) 3.56 - 3.71 (m, 5 H) 3.74 - 3.92 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.72 (s, 1 H) 5.95 (d, *J*=1.9 Hz, 2 H) 6.17 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.40 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 6.87 - 7.01 (m, 2 H) 7.10 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 7.65 (dd, *J*=9.8, 2.3 Hz, 1 H) 8.46 (s, 1 H) 12.22 (br. s., 1 H)

LC/MS (方法 LC-D) : R_t 1.52 分鐘, MH⁺ 513

鏡像異構物**8A**：

【0107】 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (q,

$J=5.2$ Hz, 2 H) 3.77 (s, 3 H) 3.78 - 3.89 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t, $J=5.6$ Hz, 1 H) 5.71 (t, $J=2.1$ Hz, 1 H) 5.93 (d, $J=2.0$ Hz, 2 H) 6.12 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.35 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.82 (dd, $J=8.7, 2.3$ Hz, 1 H) 6.91 - 7.01 (m, 2 H) 7.09 (d, $J=2.0$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 8.01 (d, $J=8.6$ Hz, 1 H) 8.29 (d, $J=2.9$ Hz, 1 H) 11.81 (br d, $J=2.4$ Hz, 1 H)

LC/MS (方法LC-A) : R_t 1.12分鐘, MH^+ 513

$[\alpha]_D^{20}$: -83.8° (c 0.4725, DMF)

手性SFC (方法SFC-G) : R_t 2.32分鐘, MH^+ 513, 手性純度100%。

鏡像異構物8B :

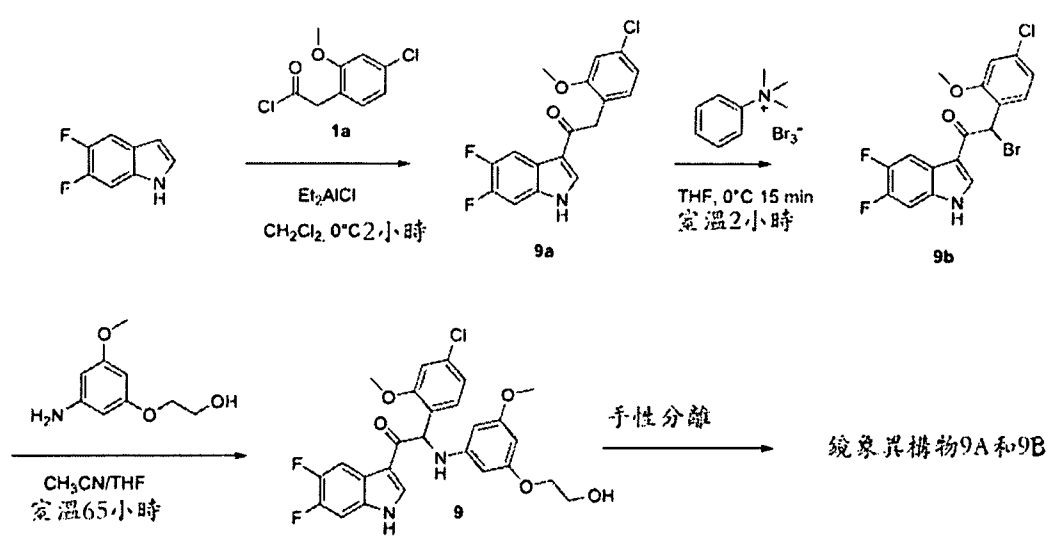
【0108】 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.47 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.65 (q, $J=5.2$ Hz, 2 H) 3.77 - 3.90 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t, $J=5.6$ Hz, 1 H) 5.72 (t, $J=2.1$ Hz, 1 H) 5.95 (d, $J=2.0$ Hz, 2 H) 6.16 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.37 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.92 (dd, $J=10.1, 2.0$ Hz, 1 H) 6.96 (dd, $J=8.3, 1.9$ Hz, 1 H) 7.10 (d, $J=1.8$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.4$ Hz, 1 H) 7.65 (dd, $J=9.7, 2.4$ Hz, 1 H) 8.45 (d, $J=3.5$ Hz, 1 H) 12.20 (br d, $J=2.9$ Hz, 1 H)

LC/MS (方法LC-A) : R_t 1.14分鐘, MH^+ 513

$[\alpha]_D^{20}$: $+86.6^\circ$ (c 0.4805, DMF)

手性SFC (方法SFC-G) : R_t 1.44分鐘, MH^+ 513, 手性純度100%。

【0109】 實例9 : 2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5,6-二氟-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮 (化合物9) 之合成以及手性分離成鏡像異構物9A和9B。



中間體9a之合成：

【0110】 在0°C下將於己烷（14.9 mL，14.9 mmol）中的二乙基氯化鋁1M逐滴添加至5,6-二氟-1*H*-吡啶[CAS 169674-01-5]（1.50 g，9.8 mmol）於CH₂Cl₂（20 mL）中的溶液中。在0°C下30分鐘之後，在0°C下緩慢添加2-(4-氯-2-甲氧基-苯基)乙醯氯**1a**（3.22 g，14.7 mmol，合成：參見實例1）於CH₂Cl₂（20 mL）中的溶液。將反應在0°C下攪拌2小時。添加1M羅謝耳鹽溶液並且將反應混合物在室溫下劇烈攪拌2小時。將沈澱物濾出並且分配在EtOAc與1N HCl之間。分離各相。將水層用EtOAc萃取兩次。將有機相合併，經MgSO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。將殘餘物用最少的乙腈吸收。將沈澱物濾出並且在真空下乾燥以得到2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5,6-二氟-1*H*-吡啶-3-基)-乙酮 **9a**（2.73 g）。

中間體9b之合成：

【0111】 在0°C下，將苯基三甲基三溴化銨[CAS 4207-56-1]（3.36 g，8.94 mmol）於THF（50 mL）中的溶液逐滴添加至2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5,6-二氟-1*H*-吡啶-3-基)-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-乙酮**9a**（2.73 g，8.13 mmol）於THF（80 mL）中的溶液中。將反應混合物在0°C下攪拌15分鐘並

且在室溫下攪拌2小時。將沈澱物濾出並且用EtOAc洗滌。在減壓下濃縮濾液。將殘餘物用最少的乙腈吸收。將沈澱物濾出並且在真空下乾燥以得到2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5,6-二氟-1*H*-吡啶-3-基)乙酮 **9b** (3.00 g)。

化合物9之合成以及手性分離成鏡像異構物9A和9B：

【0112】 將2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5,6-二氟-1*H*-吡啶-3-基)-乙酮 **9b** (1.80 g, 4.34 mmol) 和2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1] (2.39 g, 13.0 mmol) 於THF (9 mL) 和CH₃CN (9 mL) 中的混合物在室溫下攪拌65小時。添加1N HCl並且將反應混合物用EtOAc萃取。分離各相。將有機相用1N HCl洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾並且在減壓下濃縮。使用於二氯甲烷中的EtOAc (15%至70%) 的梯度藉由在矽膠上快速層析來純化殘餘物。合併純級分並且在減壓下濃縮以得到作為外消旋混合物的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(5,6-二氟-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)-乙酮 (化合物**9**, 1.20 g)。將不純的級分合並且使用於二氯甲烷中的乙酸乙酯 (15%至70%) 的梯度藉由在矽膠上快速層析純化以得到作為外消旋混合物的第二批的化合物**9** (0.290 g)。

【0113】 經由正相手性分離 (固定相：Daicel Chiralpak® OD-H，流動相：80%庚烷，20%乙醇) 分離化合物**9** (1.4 g) 的鏡像異構物。藉由快速層析 (固定相：Biotage® Grace Reveleris二氧化矽12 g，流動相：從100/0至90/10的CH₂Cl₂/MeOH梯度) 來進一步純化第一洗脫產物。將純級分合併，蒸發並且與MeOH共蒸發。將殘餘物從CH₃CN (4.5 mL) 與水 (2.5 mL) 的溶劑混合物中凍乾並且在真空下在45°C下乾燥以提供鏡像異構物**9A** (409 mg)。藉由快速層析 (固定相：Biotage® Grace Reveleris二氧化矽12 g，流動相：從100/0至90/10的CH₂Cl₂/MeOH梯度) 來進一步純化第二洗脫產物。

將純級分合併，蒸發並且與MeOH共蒸發。將殘餘物從CH₃CN (5 mL) 與水 (3 mL) 的溶劑混合物中凍乾並且在真空下在45°C下乾燥以提供鏡像異構物**9B** (388 mg)。

化合物**9**：

【0114】 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.70 (m, 2 H) 3.75 - 3.90 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.72 (t, *J*= 2.1 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 6.15 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.42 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.2, 2.2 Hz, 1 H) 7.10 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 7.54 (dd, *J*=10.8, 7.0 Hz, 1 H) 7.99 (dd, *J*=11.2, 8.2 Hz, 1 H) 8.48 (s, 1 H) 12.19 (br. s., 1 H)

LC/MS (方法LC-D) : R_t 1.44分鐘, MH⁺ 517

鏡像異構物**9A**：

【0115】 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (q, *J*=5.2 Hz, 2 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.77 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.72 (t, *J*=2.1 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.14 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.39 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.53 (dd, *J*=10.8, 7.0 Hz, 1 H) 7.99 (dd, *J*=11.2, 8.1 Hz, 1 H) 8.47 (s, 1 H) 12.16 (br s, 1 H)

LC/MS (方法LC-A) : R_t 1.15分鐘, MH⁺ 517

[α]_D²⁰ : -98.9° (c 0.445, DMF)

手性SFC (方法SFC-G) : R_t 1.92分鐘, MH⁺ 517, 手性純度100%。

鏡像異構物9B：

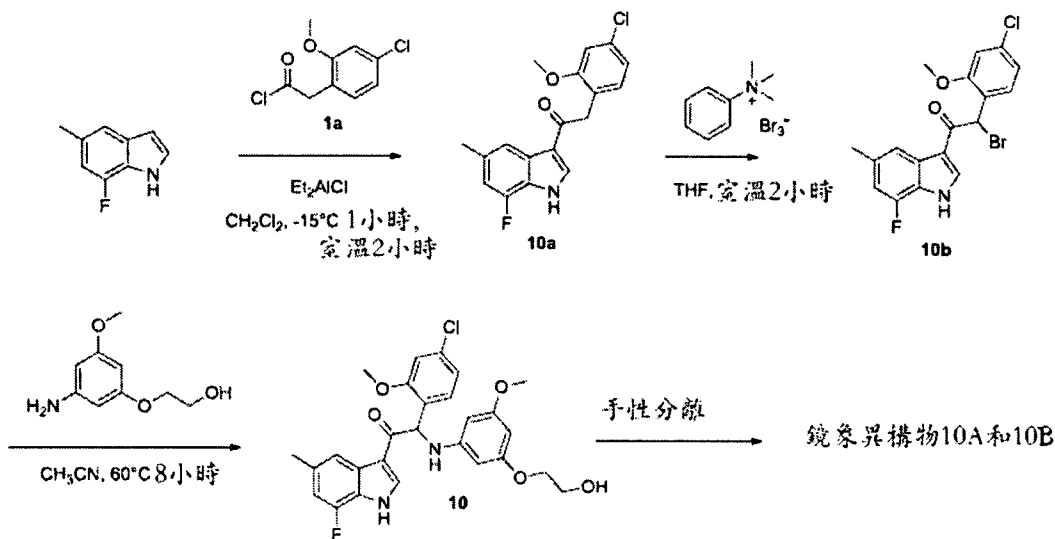
【0116】 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (q, *J*=5.2 Hz, 2 H) 3.75 - 3.91 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.77 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.72 (t, *J*=2.1 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.2 Hz, 2 H) 6.14 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.39 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.1, 2.0 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.53 (dd, *J*=10.8, 7.0 Hz, 1 H) 7.99 (dd, *J*=11.1, 8.3 Hz, 1 H) 8.47 (s, 1 H) 12.16 (br s, 1 H)

LC/MS（方法LC-A）：R_t 1.15分鐘，MH⁺ 517

[α]_D²⁰：+98.9° (c 0.555，DMF)

手性SFC（方法SFC-G）：R_t 1.36分鐘，MH⁺ 517，手性純度100%。

【0117】 實例10：2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(7-氟-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮（化合物**10**）之合成以及手性分離成鏡像異構物**10A**和**10B**。



中間體**10a**之合成：

【0118】 在N₂-流下在-15°C下將於己烷（16 mL，16 mmol）中的二乙基氯化鋁1M逐滴添加至7-氟-5-甲基-1*H*-吡啶[CAS 442910-91-0]（1.59 g，

10.7 mmol) 於 CH_2Cl_2 (150 mL) 中的溶液中。在 -15°C 下 15 分鐘之後，在 -15°C 下緩慢添加 2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙醯氯 **1a** (3.27 g, 14.9 mmol, 合成：參見實例 1) 於 CH_2Cl_2 (50 mL) 中的溶液。將反應在 -15°C 下攪拌 1 小時，並且在室溫下攪拌 2 小時。將反應混合物倒入攪拌的冰/羅謝耳鹽混合物中。將固體藉由經短 dicalite® 墊過濾從反應混合物中除去，並且將濾餅用 THF 沖洗幾次。分離各層並且用 THF 萃取水層。將合併的有機層用鹽水、水洗滌，在 MgSO_4 上乾燥，過濾並且在減壓下蒸發。將固體殘餘物懸浮於 CH_2Cl_2 (10 mL) 中。將固體濾出，用少量 CH_2Cl_2 洗滌並且在 50°C 下在真空下乾燥以得到 2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(7-氟-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮 **10a** (2.22 g)。

中間體 **10b** 之合成：

【0119】 在 0°C 下，將苯基三甲基三溴化銨 [CAS 4207-56-1] (2.77 g, 7.36 mmol) 於 THF (50 mL) 中的溶液逐滴添加至 2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(7-氟-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮 **10a** (2.22 g, 6.7 mmol) 於 THF (150 mL) 中的溶液中。將反應混合物在室溫下攪拌 2 小時。將沈澱物濾出並且用 THF 洗滌。在減壓下濃縮濾液。將殘餘物用最少的 CH_2Cl_2 吸收。將沈澱物濾出，用 CH_2Cl_2 (2x) 洗滌並且在真空下在 50°C 下乾燥以得到 2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(7-氟-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮 **10b** (2.55 g)。

化合物 **10** 之合成以及手性分離成鏡像異構物 **10A** 和 **10B**：

【0120】 將 2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(7-氟-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮 **10b** (2 g, 4.87 mmol)、2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇 [CAS 725237-16-1] (1.6 g, 7.3 mmol) 和二異丙基乙胺 (1.26 mL, 7.3 mmol) 於 CH_3CN (100 mL) 中的混合物在室溫下攪拌 20 小時，在 60°C 下攪拌 8 小時並

且在室溫下再次攪拌16小時。在減壓下蒸發溶劑。將殘餘物溶解於CH₂Cl₂ (50 mL) 中，用0.5 M HCl (50 mL) 和水 (50 mL) 洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾並且蒸發。藉由柱層析(固定相：Biotage® Grace Reveleris二氧化矽120 g，流動相：從0/100至60/40的EtOAc/庚烷梯度)來純化殘餘物。將含有產物的級分合併，蒸發並且在真空下在50°C下乾燥以得到作為白色固體的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(7-氟-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮(化合物**10**，1.3 g)。

【0121】 經由正相手性分離(固定相：AD-H，流動相：70%乙醇，30% 甲醇)分離化合物**10** (1.3 g) 的鏡像異構物以提供637 mg的第一洗脫鏡像異構物和628 mg的第二洗脫鏡像異構物。將第一洗脫產物從一種MeOH/水混合物中結晶。將固體濾出並且用一種MeOH/水 (1/1) 混合物洗滌以提供呈白色無定形粉末的鏡像異構物**10A** (302 mg)。藉由快速層析(固定相：Biotage® Grace Reveleris二氧化矽40 g，流動相：從0/100至2/98的MeOH/CH₂Cl₂梯度)來進一步純化第二洗脫產物。將含有產物的級分合並且蒸發以提供呈白色無定形粉末的鏡像異構物**10B** (335 mg)。

化合物**10**：

【0122】 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.67 (m, 2 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.77 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.72 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 5.94 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.15 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.34 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.90 (d, *J*=12.1 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.1, 2.0 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 7.77 (s, 1 H) 8.38 (s, 1 H) 12.46 (br s, 1 H)

LC/MS (方法LC-A) : R_t 1.16分鐘，MH⁺ 513

鏡像異構物10A：

【0123】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.62 (s, 3 H) 3.66 (br t, $J=4.8$ Hz, 2 H) 3.77 - 3.92 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.78 (br s, 1 H) 5.73 (s, 1 H) 5.96 (s, 2 H) 6.17 (br d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.35 (br d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.91 (d, $J=12.1$ Hz, 1 H) 6.97 (dd, $J=8.3, 1.4$ Hz, 1 H) 7.10 (d, $J=1.5$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.4$ Hz, 1 H) 7.79 (s, 1 H) 8.39 (s, 1 H) 12.47 (br s, 1 H)

LC/MS (方法LC-A) : R_t 1.15分鐘, MH^+ 513

$[\alpha]_D^{20}$: +132.3° (c 0.505, DMF)

手性SFC (方法SFC-F) : R_t 2.13分鐘, MH^+ 513, 手性純度100%

鏡像異構物10B：

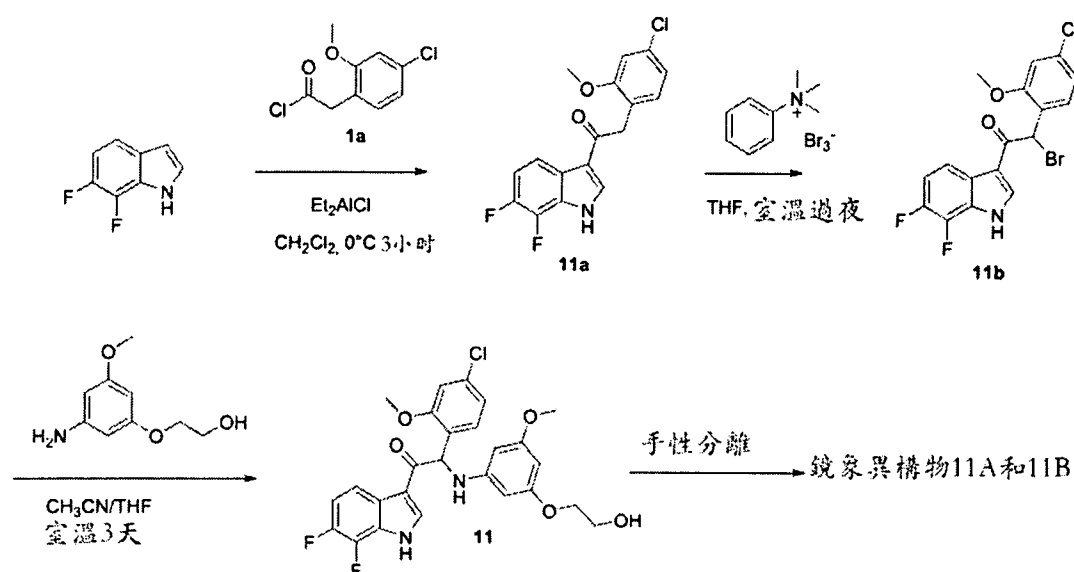
【0124】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.63 - 3.68 (m, 2 H) 3.77 - 3.92 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.77 (br t, $J=5.7$ Hz, 1 H) 5.72 (t, $J=2.0$ Hz, 1 H) 5.95 (d, $J=2.0$ Hz, 2 H) 6.16 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.35 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 6.91 (d, $J=12.1$ Hz, 1 H) 6.97 (dd, $J=8.4, 2.0$ Hz, 1 H) 7.09 (d, $J=2.0$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.4$ Hz, 1 H) 7.78 (s, 1 H) 8.39 (s, 1 H) 12.46 (br s, 1 H)

LC/MS (方法LC-A) : R_t 1.15分鐘, MH^+ 513

$[\alpha]_D^{20}$: -144.1° (c 0.4975, DMF)

手性SFC (方法SFC-F) : R_t 3.13分鐘, MH^+ 513, 手性純度100%

【0125】 實例11：2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6,7-二氟-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮 (化合物**11**) 之合成以及手性分離成鏡像異構物**11A**和**11B**。



中間體**11a**之合成：

【0126】 在 0°C 下將於己烷 (15.0 mL, 15.0 mmol) 中的二乙基氯化鋁1M逐滴添加至6,7-二氟-1*H*-吡啶[CAS 271780-84-8] (1.53 g, 10.0 mmol) 於 CH_2Cl_2 (20 mL) 中的溶液中。在 0°C 下30分鐘之後，在 0°C 下緩慢添加2-(4-氯-2-甲氧基-苯基)乙醯氯**1a** (3.28 g, 15.0 mmol, 合成：參見實例1) 於 CH_2Cl_2 (10 mL) 中的溶液。將反應在 0°C 下攪拌3小時。添加1M羅謝耳鹽溶液並且將反應混合物在室溫下攪拌30分鐘。將固體濾出並且分配在EtOAc與1N HCl之間。分離各相。用EtOAc萃取水層。將有機相合併，用鹽水洗滌，經 MgSO_4 乾燥，過濾且在減壓下濃縮以得到2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6,7-二氟-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**11a** (2.36 g)。

中間體**11b**之合成：

【0127】 在 0°C 下，將苯基三甲基三溴化銨[CAS 4207-56-1] (2.90 g, 7.02 mmol) 於THF (10 mL) 中的溶液逐滴添加至2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6,7-二氟-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**11a** (2.36 g, 7.02 mmol) 於THF (50 mL) 中的溶液中。將該反應混合物在室溫下攪拌過夜。將沈澱物濾出並且用EtOAc洗滌。將濾液在減壓下進行濃縮。將殘餘物用最少的乙腈吸收。將沈

澱物濾出，用乙腈洗滌並且在真空下乾燥以得到2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6,7-二氟-1*H*-吡啶-3-基)-乙酮**11b** (2.34 g)。

化合物**11**之合成以及手性分離成鏡像異構物**11A**和**11B**：

【0128】 將2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6,7-二氟-1*H*-吡啶-3-基)-乙酮 **11b** (1.70 g, 4.14 mmol) 和2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1] (2.25 g, 12.3 mmol) 於THF (10 mL) 和CH₃CN (10 mL) 中的混合物在室溫下攪拌3天。在減壓下濃縮反應混合物。將殘餘物分配於EtOAc與1N HCl之間。分離各相。將有機相用1N HCl洗滌兩次，用飽和NaHCO₃水溶液和鹽水洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾並且在減壓下濃縮。藉由使用於庚烷中的EtOAc (20%至100%) 的梯度在矽膠上快速層析來純化殘餘物。將含有預期化合物的級分合併，並且在減壓下濃縮。將殘餘物從Et₂O、乙腈和庚烷的混合物中結晶以得到作為外消旋混合物的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6,7-二氟-1*H*-吡啶-3-基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)乙酮 (化合物**11**, 1.54 g)。

【0129】 經由製備型手性SFC (固定相：Chiralcel® OD-H 5 μm 250 × 30 mm，流動相：55% CO₂，45% MeOH) 分離化合物**11** (1.22 g) 的鏡像異構物以得到550 mg的第一洗脫鏡像異構物和570 mg的第二洗脫鏡像異構物。將第一洗脫鏡像異構物從CH₃CN/二異丙基醚中固化以得到鏡像異構物**11A** (487 mg)。將第二洗脫鏡像異構物從CH₃CN/二異丙基醚中固化以得到鏡像異構物**11B** (460 mg)。兩種鏡像異構物均作為無定形粉末出現。

化合物**11**：

【0130】 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.56 - 3.69 (m, 5 H)

3.75 - 3.90 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.79 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 5.73 (s, 1 H) 5.95 (d, $J=1.9$ Hz, 2 H) 6.18 (d, $J=8.3$ Hz, 1 H) 6.41 (d, $J=8.3$ Hz, 1 H) 6.97 (dd, $J=8.1$, 1.7 Hz, 1 H) 7.10 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 7.16 - 7.30 (m, 1 H) 7.36 (d, $J=8.3$ Hz, 1 H) 7.92 (dd, $J=8.7$, 4.5 Hz, 1 H) 8.50 (s, 1 H) 12.78 (br. s., 1 H)

LC/MS (方法LC-D) : R_t 1.52分鐘, MH^+ 517

鏡像異構物11A :

【0131】 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12.79 (br. s., 1 H) 8.50 (s, 1 H) 7.92 (dd, $J=8.7$, 4.3 Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 7.20 - 7.27 (m, 1 H) 7.10 (d, $J=1.6$ Hz, 1 H) 6.97 (dd, $J=8.4$, 1.7 Hz, 1 H) 6.42 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.18 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 5.95 (d, $J=1.6$ Hz, 2 H) 5.72 (s, 1 H) 4.79 (t, $J=5.4$ Hz, 1 H) 3.94 (s, 3 H) 3.78 - 3.89 (m, 2 H) 3.59 - 3.68 (m, 5 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 3.07分鐘, MH^+ 517

$[\alpha]_D^{20}$: -99.6° (c 0.2218, DMF)

手性SFC (方法SFC-D) : R_t 1.80分鐘, MH^+ 517, 手性純度100%。

鏡像異構物11B :

【0132】 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12.79 (br. s., 1 H) 8.50 (s, 1 H) 7.91 (dd, $J=8.7$, 4.3 Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.17 - 7.28 (m, 1 H) 7.10 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H) 6.97 (dd, $J=8.2$, 1.9 Hz, 1 H) 6.41 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 6.18 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 5.95 (d, $J=1.9$ Hz, 2 H) 5.72 (t, $J=1.9$ Hz, 1 H) 4.79 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 3.94 (s, 3 H) 3.77 - 3.88 (m, 2 H) 3.55 - 3.70 (m, 5 H)

LC/MS (方法LC-C) : R_t 3.07分鐘, MH^+ 517

$[\alpha]_D^{20}$: $+99.2^\circ$ (c 0.2127, DMF)

手性SFC（方法SFC-D）： R_t 3.38分鐘， MH^+ 517，手性純度100%。

本發明的化合物的抗病毒活性

DENV-2 抗病毒測定

【0133】 本發明所有化合物之抗病毒活性針對DENV-2 16681株進行測試，該菌株用增強型綠色螢光蛋白標記（eGFP）。培養基由補充有2%熱滅活的胎牛血清、0.04%慶大黴素（50 mg/mL）以及2 mM L-穀胺醯胺的最低必需培養基組成。將獲自ECACC的Vero細胞懸浮於培養基中，並且將25 μ L添加至384孔板（2500個細胞/孔），這些板已經含有抗病毒化合物。通常，這些板含有測試化合物的9 個稀釋步驟的4倍連續稀釋液，在於100% DMSO（200 nL）中的最終濃度的200倍下。此外，每種化合物濃度一式四份地進行測試（最終濃度範圍：25 μ M-0.00038 μ M）。最後，每個板包括被指定為病毒對照（在不存在化合物的情況下含有細胞和病毒）、細胞對照（在不存在病毒和化合物的情況下含有細胞）和培養基對照（在不存在細胞、病毒和化合物的情況下含有培養基）的孔。向被指定為培養基對照的這些孔添加25 μ L的培養基而不是Vero細胞。一旦細胞被添加到這些板，就將這些板在室溫下培養30分鐘以便允許這些細胞在這些孔內均勻地分佈。接著，將這些板在完全潤濕的培養箱（37°C，5%CO₂）中培養直到第二天。然後，以0.5的感染複數（MOI）添加用eGFP標記的DENV-2株16681。因此，將15 μ L的病毒懸浮液添加至所有含有測試化合物的孔中並且添加至被指定為病毒對照的孔中。並行地，將15 μ L的培養基添加至培養基對照和細胞對照。接著，將這些板在一個完全潤濕的培養箱（37°C，5%CO₂）中培養3天。在讀出當天，使用一個自動化螢光顯微鏡在488 nm（藍色雷射）下測量eGFP螢光。使用內部LIMS系統，計算每種化合物的抑制劑量反應曲

線並且測定半最大有效濃度（EC₅₀）。因此，使用以下公式來計算每一測試濃度的抑制百分比（I）： $I = 100 \times (S_T - S_{CC}) / (S_{VC} - S_{CC})$ ；S_T、S_{CC}和S_{VC}分別是測試化合物孔、細胞對照孔和病毒對照孔中的eGFP信號的量。EC₅₀表示如藉由相較於病毒對照的eGFP螢光強度的50%降低所測量，病毒複製被抑制50%的化合物的濃度。使用線性內插法計算EC₅₀（表1）。

【0134】 並行地，在相同板上評定這些化合物的毒性。一旦進行eGFP信號的讀出，就將10 μL的刃天青（細胞存活力染色劑）添加至384孔板的所有孔。刃天青測定係基於藉由由這些細胞產生的NADH將藍色刃天青還原成高度螢光產物試鹵靈。粉色螢光試鹵靈的形成與孔中存活細胞的數目直接相關。將這些板在完全潤濕的培養箱（37°C，5% CO₂）中培育另外5小時。接著，在一無限閱讀器（帝肯（Tecan））上使用530 nm的激發波長對這些板進行測量。還測定了半最大細胞毒性濃度（CC₅₀），其被定義為使刃天青轉化相較于細胞對照孔的轉化降低50%所需的濃度（表1）。最後，測定這些化合物的選擇性指數（SI），該指數如下計算： $SI = CC_{50} / EC_{50}$ 。

【0135】 表1：在DENV-2抗病毒測定中本發明之化合物之EC₅₀、CC₅₀和SI

化合物#	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
1	0.0030	4	6.2	4	2053	4
1A	0.00081	14	4.3	16	5395	13
1B	0.14	7	6.3	7	44	7
2A	0.00081	4	4.2	4	5166	4
2B	0.081	3	6.2	3	77	3
3	0.00072	3	5.5	3	7587	3
3A	0.00034	4	4.5	4	20070	4
3B	0.045	3	7.1	3	158	3
4	0.0014	3	6.3	4	4398	3
4A	0.00070	3	4.9	3	6965	3
4B	0.045	3	7.4	3	164	3
5	0.0023	3	6.5	3	2860	3
5A	0.00084	4	5.9	4	7057	4



化合物#	EC50 (μ M)	N	CC50 (μ M)	N	SI	N
5B	0.40	3	8.1	3	21	3
6	0.0012	3	5.6	3	4639	3
6A	0.00082	15	5.1	15	6520	14
6B	0.076	4	5.4	4	71	4
7	0.0026	3	7.4	3	2860	3
7A	0.0011	4	6.1	4	5569	4
7B	0.069	3	7.8	3	112	3
8	0.0024	3	8.0	3	3270	3
8A	0.0012	3	4.2	3	3457	3
8B	0.26	3	5.7	3	22	3
9	0.0022	3	7.3	3	3329	3
9A	0.0044	4	3.9	4	899	4
9A	0.076	3	6.5	3	85	3
10	0.0075	3	5.8	3	767	3
10A	0.0032	3	4.5	3	1416	3
10B	0.19	4	3.8	3	20	3
11	0.0031	3	5.8	3	1879	3
11A	0.090	3	6.5	3	72	3
11B	0.0012	3	4.1	3	3526	3

N= 對這些化合物進行測試的獨立實驗之數目。

四價逆轉錄酶定量-PCR (RT-qPCR) 測定：方案A。

【0136】 在RT-qPCR測定中針對DENV-1株TC974#666 (NCPV)、DENV-2株16681、DENV-3株H87 (NCPV) 以及DENV-4株H241 (NCPV) 和EDEN (SG/06K2270DK1/2005；GenBank登錄號QG398256) 測試本發明的這些化合物之抗病毒活性。因此，在存在或不存在測試化合物的情況下用DENV-1抑或-2抑或-3抑或-4感染Vero細胞。在感染後第3天，將細胞溶解並且細胞溶解產物用於製備病毒靶標 (DENV的3'UTR；表2) 和細胞參考基因 (β -肌動蛋白，表2) 兩者的cDNA。隨後，在一Lightcycler480儀器上進行雙重即時PCR。所生成的Cp值與這些靶標的RNA表現的量成反比。藉由一測試化合物抑制DENV複製導致3'UTR基因的Cp的移位。另一方面，如果一測試化合物係對這些細胞來說毒性的，那麼將觀察到對 β -肌動蛋白表現的類似作用。對比 $\Delta\Delta$ Cp方法用於計算計算EC₅₀，該方法係基於用細胞管家

基因 (β-肌動蛋白) 標準化的靶基因 (3'UTR) 的相對基因表現。此外，CC₅₀ 值係基於針對管家基因β-肌動蛋白獲取的Cp值。

【0137】 表2：用於即時定量RT-PCR之引物和探針。

引物/探針	靶標	序列 ^{a, b}
F3utr258	DENV 3'-UTR	5'-CGGTTAGAGGAGACCCCTC-3'
R3utr425	DENV 3'-UTR	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTC-3'
P3utr343	DENV 3'-UTR	FAM -5'-AAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACC CCCC-3'- BHQ1
Factin743	β-肌動蛋白	5'-GGCCAGGTCATCACCATT-3'
Ractin876	β-肌動蛋白	5'-ATGTCCACGTCACACTTCATG-3'
Pactin773	β-肌動蛋白	HEX -5'-TTCCGCTGCCCTGAGGCTCTC-3'- BH Q1

^a報導染料 (FAM, HEX) 和淬滅劑 (BHQ1) 元素以粗體和斜體指示。

^b這些引物和探針的核苷酸序列選自登革熱病毒基因組的3'UTR區中的保守區，其係基於保藏在Genbank的四種登革熱血清型的300個核苷酸序列的比對 (Gong等人, 2013, 分子生物學方法 (Methods Mol Biol), 第16章)。

【0138】 培養基由補充有2%熱滅活的胎牛血清、0.04%慶大黴素 (50 mg/mL) 以及2 mM L-穀胺醯胺的最低必需培養基組成。將獲自ECACC的Vero細胞懸浮於培養基中，並且將75 μL/孔添加在96孔板 (10000個細胞/孔) 中，這些板已經含有抗病毒化合物。通常，這些板含有測試化合物的9 個稀釋步驟的4倍連續稀釋液，在於100% DMSO (500 nL；最終濃度範圍：25 μM – 0.00038 μM) 中的最終濃度的200倍下。此外，每個板包括被指定為病毒對照 (在不存在化合物的情況下含有細胞和病毒) 和細胞對照 (在不存在病毒和化合物的情況下含有細胞)。一旦將這些細胞添加在這些板中，就將這些板在一完全潤濕的培養箱 (37°C, 5%CO₂) 中培養直到第二天。然後，添加DENV-1株TC974#666、DENV-2株16681、DENV-3株H87或



DENV-4株H241或EDEN。因此，將25 µL的病毒懸浮液（其中在RTqPCR中實現約22的Cp）添加至所有含有測試化合物的孔並且添加至被指定為病毒對照的孔。並行地，將25 µL的培養基添加至細胞對照。接著，將這些板在一完全潤濕的培養箱（37°C，5%CO₂）中培養3天。在3天之後，將上清液從這些孔中除去並且將這些孔用冰冷PBS（約100 µL）洗滌兩次。將這些96孔板內的細胞沈澱儲存在-80°C下持續至少1天。接著，根據製造商的指導（應用生物系統公司(Applied Biosystems))使用Cells-to-CT™溶解套件(kit) 萃取RNA。這些細胞溶解產物可以儲存在-80°C下或立即用於逆轉錄步驟中。

【0139】 在逆轉錄步驟的準備中，製備混合物A（表3A）並且將7.57 µL/孔分配在96孔板中。在添加5 µL的細胞溶解產物之後，進行在75°C下的五分鐘變性步驟（表3B）。之後，添加7.43 µL的混合物B（表3C）並且起始逆轉錄步驟（表3D）以產生cDNA。

【0140】 最後，製備RT-qPCR混合物，混合物C（表4A），將該混合物分配在96孔LightCycler qPCR板中，向這些板添加3 µL的cDNA，並且根據表4B中的條件在LightCycler 480上進行qPCR。

【0141】 使用LightCycler軟體和內部LIMS系統，計算每種化合物的劑量反應曲線，並且測定半最大有效濃度（EC₅₀）和半最大細胞毒性濃度（CC₅₀）（表6-9）。

【0142】 表3：使用混合物A、變性、混合物B和逆轉錄進行cDNA合

成

混合物 A			
A	板	8	
	樣品	828	反應體積 (µl) 20
	混合物項目	濃度	體積 (µl)

	單位	儲備液	最終	1 個樣品	x 個樣品
Milli-Q H ₂ O				7.27	6019.56
R3utr425	μM	20	0.27	0.15	124.20
Ractin876	μM	20	0.27	0.15	124.20
混合物體積/孔 (μl)				7.57	
細胞溶解產物				5.00	

B 變性步驟：

步驟	溫度	時間
變性	75°C	5'
保持	4°C	保持

C 混合物 B

樣品	864				
混合物項目	濃度	體積 (μl)			
	單位	儲備液	最終	1 個樣品	x 個樣品
擴增 HIFI 緩衝液 2	X	10.00	1.00	2.00	1728.0
MgCl ₂	mM	25.00	3.50	2.80	2419.2
dNTPs	mM	10.00	1.00	2.00	1728.0
RNA 酶製劑	U/ μl	40.00	1.00	0.50	432.0
擴增 RT	U/ μl	50.00	0.33	0.13	112.3
混合物總體積 (μl)				7.43	

D 方案 cDNA 合成

步驟	溫度	時間
逆轉錄	42°C	30'
變性	99°C	5'
保持	4°C	保持

【0143】 表4：qPCR混合物和方案。

A 混合物 C

樣品	833	反應體積 (μl)				25
混合物項目	濃度	體積 (μl)				
	單位	儲備液	最終	1 個樣品	x 個樣品	
H ₂ O PCR 級羅氏				7.74		6447.42
羅氏 2xMM 混合物	X	2	1	12.50		10412.50
F3utr258	μM	20	0.3	0.38		316.54
R3utr425	μM	20	0.3	0.38		316.54
P3utr343	μM	20	0.1	0.13		108.29
Factin743	μM	20	0.3	0.38		316.54
Ractin876	μM	20	0.3	0.38		316.54
Pactin773	μM	20	0.1	0.13		108.29
混合物體積/管 (μl)				22.02		
cDNA				3.00		

B 方案 qPCR3

步驟	溫度	時間	斜升速率
預培養/變性	95°C	10 分鐘	4.4



變性	95°C	10 秒	4.4	40 次循環
退火	58°C	1 分鐘	2.2	
延伸	72°C	1 秒	4.4	
冷卻	40°C	10 秒	1.5	

四價定量逆轉錄酶-PCR (RT-qPCR) 測定：方案B。

【0144】 將Vero細胞 (4×10^4) 接種在96孔板中。在一天之後，將細胞培養基用100 μ L的含有化合物的2 $\times$ 、3 $\times$ 或5 $\times$ 連續稀釋液（濃度範圍：分別50 μ g/mL – 0.00038 μ g/mL、50 μ g/mL – 0.0076 μ g/mL以及50 μ g/mL – 0.00013 μ g/mL）和100 μ L的登革熱病毒稀釋液的測定培養基替換，其中在中RTqPCR實現約20的Ct。在2小時培養期之後，將細胞單層用測定培養基洗滌3次以除去殘餘物，將未吸附的病毒和培養物在抑制劑存在下進一步培養 4 天（DENV-2 NGC-Tongalike）抑 或 7 天（DENV-1 Djibouti 株 D1/H/IMTSSA/98/606、DENV-3株H87原型、DENV-4株H241）。收穫上清液並且藉由即時定量RT-PCR測定病毒DNA負載。使用對數內插法測定50%有效濃度 (EC₅₀)（其被定義為將病毒RNA複製抑制50%所需的化合物濃度）（表7和8）。

【0145】 使用NucleoSpin 96病毒套件（Filter Service，狄倫（Düren），德國）如由製造商所描述從100 μ L上清液分離RNA。TaqMan引物（DENV-For，DENV-Rev；表5）和TaqMan探針（DENV-探針表5）的序列係使用引物表現軟體（2.0版；應用生物系統公司，萊尼克（Lennik），比利時）選自對應黃病毒的非結構基因3（NS3）或NS5。將TaqMan探針在5'端用6-羧基螢光素（FAM）標記作為報導染料，並且在3'端用小溝結合物（MGB）標記作為淬滅劑（表5）。一步定量RT-PCR在25 μ L的總體積中進行，該總體積含有13.9375 μ L H₂O、6.25 μ L主混合物（Eurogentec，Seraing，比利時）、0.375 μ L正向引物、0.375 μ L反向引物、1 μ L探針、0.0625 μ L逆

轉錄酶（Eurogentec）和3 μL樣品。使用ABI 7500快速即時PCR系統（應用生物系統公司，布蘭斯堡（ranchburg），新澤西州（New Jersey），美國）使用以下條件進行RT-PCR：在48°C下30分鐘和在95°C下10分鐘，接著40次循環的在95°C下15秒和在60°C下1分鐘。使用ABI PRISM 7500 SDS軟體（1.3.1版；應用生物系統公司）分析資料。對於絕對定量，使用具有已知濃度的範本製劑的10倍稀釋液產生標準曲線。

【0146】 表5：用於即時定量RT-PCR之引物和探針。

引物/探針	序列 (5' → 3') ^a	來源 ^b	靶標
DENV-For	TCGGAGCCGGAGTTTACAAA (SEQ ID N.1)	DENV 2 NGC	NS3
DENV-Rev	TCTTAACGTCCGCCCATGAT (SEQ ID N.2)		
DENV- 探針	FAM -ATTCCACACAATGTGGCAT- MGB (SEQ ID N.3)		
DenS	GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT (SEQ ID N.4)	DENV-1 、 -3 、-4	NS5
DenAS1-3	CATTCCATTTTCTGGCGTTC (SEQ ID N.5)	DENV-1 、-3	
DenAS4	CAATCCATCTTGCGGCGCTC (SEQ ID N.6)	DENV-4	
DEN_1-3 探針	FAM -CAGCATCATTCCAGGCACAG- MGB (SEQ ID N.7)	DENV-1 、-3	
DEN_4 探針	FAM -CAACATCAATCCAGGCACAG- MGB (SEQ ID N.8)	DENV-4	

^a 報導染料 (FAM) 和淬滅劑 (MGB/TAMRA) 元素以粗體和斜體指示。
^b 基因組內引物和探針的核苷酸序列和位置推導自DENV 2 NGC (GenBank登錄號M29095；Irie 等人，1989) 的核苷酸序列、登革熱病毒血清型1 Djibouti株D1/H/IMTSSA/98/606 (Genbank登錄號AF298808)、登革熱病毒血清型3株H87原型(c93130)、登革熱病毒血清型4株H241 (不可獲得序列)。

細胞毒性測定 (方案B)

【0147】 在未感染的Vero細胞中評價這些化合物的潛在細胞毒性作用。在化合物的兩倍、三倍或五倍連續稀釋液（分別50 μg/mL – 0.0038 μg/mL、50 μg/mL – 0.0076 μg/mL以及50 μg/mL – 0.00013 μg/mL的範圍）存



在下將細胞以 4×10^4 個細胞/孔接種在96孔板中並且培養4至7天。將培養基丟棄並且將PBS中的100 μ L 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四氮唑/吩嗪硫酸甲酯（MTS/PMS；普洛麥格（Promega），萊頓（Leiden），荷蘭（The Netherlands））添加至各孔。在37°C下培養2小時時間段之後，在498 nm下測定光密度。使用以下公式計算細胞毒性活性：細胞存活力% = $100 \times (\text{OD}_{\text{化合物}}/\text{OD}_{\text{CC}})$ ，其中OD_{化合物} 和OD_{CC}分別對應於用化合物處理的未感染的細胞培養物在498 nm下的光密度和未感染的未處理的細胞培養物在498 nm下的光密度。使用線性內插法計算50%細胞毒性濃度（即，使總細胞數目減少50%的濃度；CC₅₀）（表7和表8）。

【0148】 表6：在RT-qPCR測定中化合物針對血清型1之EC₅₀、CC₅₀和SI

方案 A						
RT-qPCR 血清型 1 TC974#666						
化合物#	EC50 (μ M)	N	CC50 (μ M)	N	SI	N
1A	0.0077	5	4.1	5	530	5
2A	0.0071	4	4.5	4	628	4
3A	0.0053	3	3.8	3	721	3
4A	0.0078	4	4.6	3	447	3
5A	0.013	3	5.2	3	392	3
6A	0.0036	5	4.8	5	1348	5
7A	0.016	3	4.6	3	282	3
8A	0.0096	3	3.5	3	368	3
9A	0.0050	3	4.7	3	934	3
10A	0.014	3	4.1	3	290	3
11B	0.018	3	3.7	3	202	3

方案 B						
RT-qPCR 血清型 1 Djibouti						
化合物#	EC50 (μ M)	N	CC50 (μ M)	N	SI	N
1A	0.022	3	9.7	9	506	2
2A	0.017	2	7.4	5	447	2
3A	0.018	2	7.7	5	450	2
4A	0.020	2	9.5	5	392	2

5A	0.019	2	7.8	5	471	2
6A	<0.015	3	8.1	7	>693	3
7A	0.020	2	7.2	5	366	2
8A	0.017	2	7.7	5	450	2
9A	0.019	2	7.9	5	454	2
10A	0.020	2	8.0	5	413	2
11B	0.025	2	7.7	5	320	2

N= 對這些化合物進行測試的獨立實驗之數目。

【0149】 表7：在RT-qPCR測定中化合物針對血清型2之EC₅₀、CC₅₀和SI

方案 A						
RT-qPCR 血清型 2 16681						
化合物#	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
1A	0.0011	9	4.7	9	4457	9
2A	0.00085	4	5.7	4	6744	4
3A	0.00024	3	4.3	6	25632	3
4A	0.00044	5	5.2	6	12915	5
5A	0.00050	4	4.5	5	10575	4
6A	0.00054	7	3.7	7	8391	6
7A	0.00091	3	4.7	4	5763	3
8A	0.0012	3	5.2	3	4406	3
9A	0.00079	3	3.8	3	4833	3
10A	0.0032	3	4.2	3	1312	3
11B	0.0010	3	4.7	3	4562	3

方案 B						
RT-qPCR 血清型 2 NGC-Tongalike						
化合物#	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
1A	0.00038	5	14	6	36900	5
2A	0.00040	3	13	3	31100	3
3A	<0.00033	3	12	3	>37200	3
4A	<0.00034	3	13	3	>37300	3
5A	<0.00040	3	11	3	>28000	3
6A	0.00040	4	13	4	29300	3
7A	0.00027	3	12	2	18900	2
8A	0.0014	3	11	3	8050	3
9A	<0.00031	3	12	3	>37300	3
10A	0.0014	3	12	3	8910	3
11B	0.00027	3	11	3	37900	1

N= 對這些化合物進行測試的獨立實驗的數目。

【0150】 表8：在RT-qPCR測定中化合物針對血清型3之EC₅₀、CC₅₀



和SI

方案 A						
RT-qPCR 血清型 3 H87						
化合物#	EC50 (μ M)	N	CC50 (μ M)	N	SI	N
1A	0.063	5	1.7	4	28	4
2A	0.053	4	3.9	3	76	3
3A	0.036	3	3.7	3	104	3
4A	0.065	4	3.8	2	52	2
5A	0.068	3	2.9	3	42	3
6A	0.026	5	3.0	4	106	4
7A	0.070	3	4.6	2	66	2
8A	0.076	3	3.6	3	47	3
9A	0.063	3	3.0	3	48	3
10A	0.070	3	3.3	3	47	3
11B	0.070	3	3.4	3	48	3

方案 B						
RT-qPCR 血清型 3 H87						
化合物#	EC50 (μ M)	N	CC50 (μ M)	N	SI	N
1A	<0.015	6	9.7	9	>1440	6
2A	0.021	3	7.4	5	350	3
3A	0.020	3	7.7	5	383	3
4A	0.029	3	9.5	5	376	3
5A	0.025	3	7.8	5	291	3
6A	<0.015	4	8.1	7	>591	4
7A	<0.017	3	7.2	5	>423	3
8A	0.032	3	7.7	5	244	3
9A	0.018	3	7.9	5	400	3
10A	0.027	3	8.0	5	291	3
11B	0.026	3	7.7	5	294	3

N= 對這些化合物進行測試的獨立實驗之數目。

【0151】 表9：在RT-qPCR測定中化合物針對血清型4株H241（A）和SG/06K2270DK1/2005（B）之EC₅₀、CC₅₀和SI

方案 A						
RT-qPCR 血清型 4 H241						
化合物#	EC50 (μ M)	N	CC50 (μ M)	N	SI	N
1A	0.24	10	3.1	9	13	9
2A	0.26	4	1.7	3	7	3
3A	0.18	5	3.0	5	17	5
4A	0.24	4	2.4	4	10	4
5A	0.32	4	4.5	4	13	4

方案 A						
RT-qPCR 血清型 4 H241						
化合物#	EC50 (μ M)	N	CC50 (μ M)	N	SI	N
6A	0.084	8	2.1	8	25	8
7A	0.23	3	2.8	3	12	3
8A	0.30	3	3.1	2	11	2
9A	0.24	3	2.7	3	11	3
10A	0.32	3	2.7	2	8	2
11B	0.35	3	2.5	3	7	3

N= 對這些化合物進行測試的獨立實驗之數目。

方案 A						
RT-qPCR 血清型 4 EDEN						
化合物#	EC50 (μ M)	N	CC50 (μ M)	N	SI	N
1A	0.0062	6	3.7	6	583	6
2A	0.0043	5	4.4	5	1007	5
3A	0.0029	4	4.1	3	1579	3
4A	0.0052	5	4.4	3	981	3
5A	0.0046	3	4.2	2	630	2
6A	0.0029	3	3.6	3	1241	3
7A	0.0066	4	3.7	3	536	3
8A	0.0065	4	4.5	4	690	4
9A	0.0047	3	2.6	3	717	3
10A	0.0086	4	4.4	3	436	3
11B	0.0098	4	4.0	3	374	3

N= 對這些化合物進行測試的獨立實驗之數目。

【符號說明】 無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)



<110> 楊森製藥公司 (Janssen Pharmaceuticals, Inc) 比利时天主教魯汶大學 (Katholieke Universiteit Leuven)	
<120> 作為登革熱病毒複製抑制劑之單取代或二取代吡啶	
<130> TIP 326 PCT	
<150> EP14187374.5	
<151> 2014-10-01	
<150> EP15159164.1	
<151> 2015-03-16	
<160> 14	
<170> BiSSAP 1.2	
<210> 1	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 登革熱病毒	
<220>	
<221> 來源	
<222> 1..20	
<223> /生物體= “登革熱病毒” /分子類型= “未指定DNA”	
<400> 1	
tcggagccgg agtttacaaa	20
<210> 2	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 登革熱病毒	
<220>	
<221> 來源	
<222> 1..20	
<223> /生物體= “登革熱病毒” /分子類型= “未指定DNA”	
<400> 2	
tcttaacgtc cgcccatgat	20
<210> 3	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 登革熱病毒	
<220>	
<221> 來源	
<222> 1..19	
<223> /生物體= “登革熱病毒” /分子類型= “未指定DNA”	
<400> 3	
attccacaca atgtggcat	19
<210> 4	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 登革熱病毒	
<220>	
<221> 來源	
<222> 1..23	
<223> /生物體= “登革熱病毒” /分子類型= “未指定DNA”	
<400> 4	
ggatagacca gagatcctgc tgt	23

<210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> 登革熱病毒 <220> <221> 來源 <222> 1..20 <223> /生物體= “登革熱病毒” /分子類型= “未指定DNA” <400> 5 cattccattt tctggcgttc	20
<210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> 登革熱病毒 <220> <221> 來源 <222> 1..20 <223> /生物體= “登革熱病毒” /分子類型= “未指定DNA” <400> 6 caatccatct tgcggcgctc	20
<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 登革熱病毒 <220> <221> 來源 <222> 1..20 <223> /生物體= “登革熱病毒” /分子類型= “未指定DNA” <400> 7 cagcatcatt ccaggcacag	20
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 登革熱病毒 <220> <221> 來源 <222> 1..20 <223> /生物體= “登革熱病毒” /分子類型= “未指定DNA” <400> 8 caacatcaat ccaggcacag	20
<210> 9 <211> 19 <212> DNA <213> 登革熱病毒 <220> <221> 來源 <222> 1..19 <223> /生物體= “登革熱病毒” /分子類型= “未指定DNA” <400> 9 cggttagagg agaccctc	19
<210> 10	



<211> 21
<212> DNA
<213> 登革熱病毒

<220>
<221> 來源
<222> 1..21
<223> /生物體= “登革熱病毒”
/分子類型= “未指定DNA”

<400> 10
gagacagcag gatctctggt c 21

<210> 11
<211> 28
<212> DNA
<213> 登革熱病毒

<220>
<221> 來源
<222> 1..28
<223> /生物體= “登革熱病毒”
/分子類型= “未指定DNA”

<400> 11
aaggactaga ggtagagga gaccccc 28

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> 登革熱病毒

<220>
<221> 來源
<222> 1..18
<223> /生物體= “登革熱病毒”
/分子類型= “未指定DNA”

<400> 12
ggccaggtca tcaccatt 18

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 登革熱病毒

<220>
<221> 來源
<222> 1..21
<223> /生物體= “登革熱病毒”
/分子類型= “未指定DNA”

<400> 13
atgtccacgt cacacttcat g 21

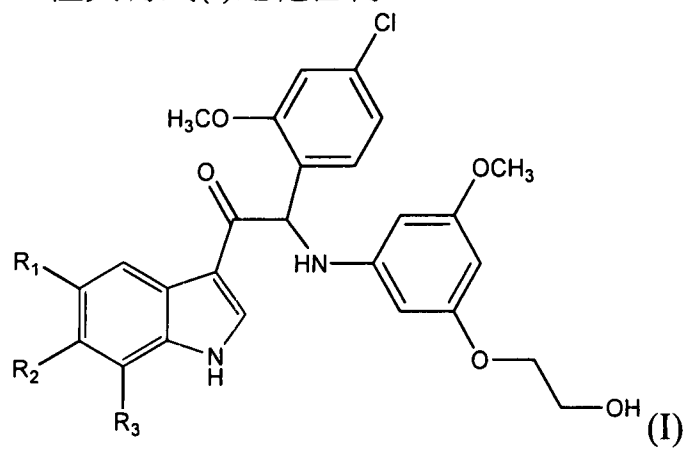
<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> 登革熱病毒

<220>
<221> 來源
<222> 1..21
<223> /生物體= “登革熱病毒”
/分子類型= “未指定DNA”

<400> 14
ttccgctgcc ctgaggtct c 21

申請專利範圍

1. 一種具有式(I)之化合物，



其立體異構形式、藥學上可接受之鹽、溶劑合物或多晶型物，該化合物包含單取代或二取代吡啶基團；所述化合物選自下組，其中：

R₁係H，R₂係F並且R₃係H、F或CH₃；

R₁係F或CH₃，R₂係OCH₃並且R₃係H；

R₁係F，R₂係H並且R₃係CH₃；

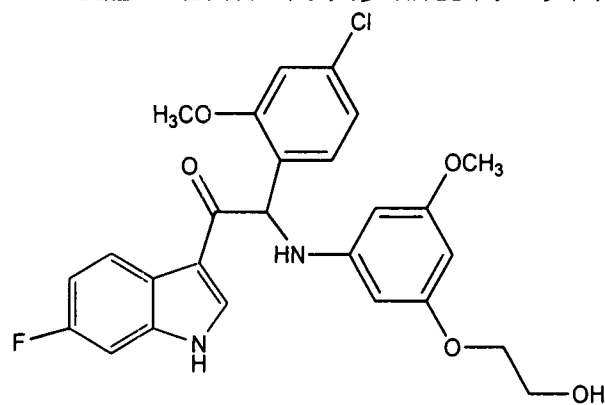
R₁係H，R₂係OCH₃並且R₃係H；

R₁係H，R₂係Cl並且R₃係H或CH₃；

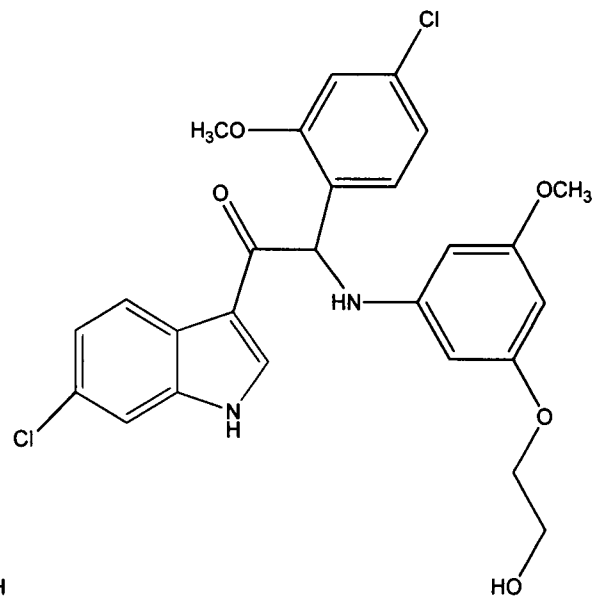
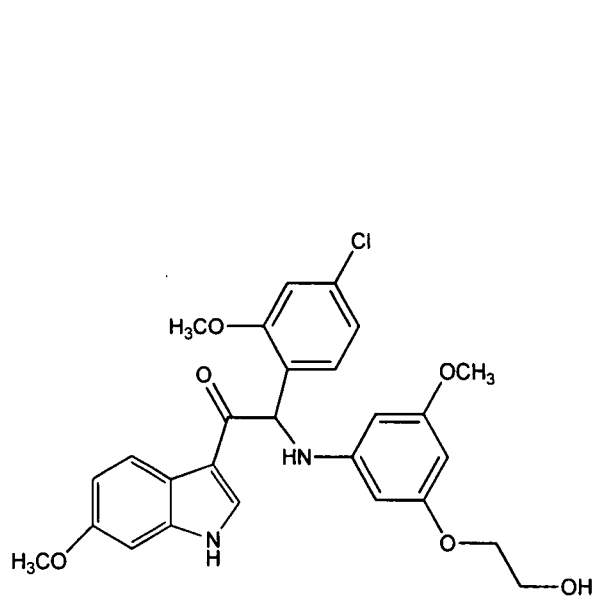
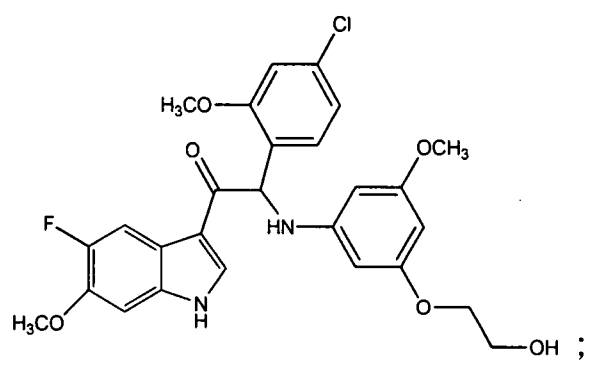
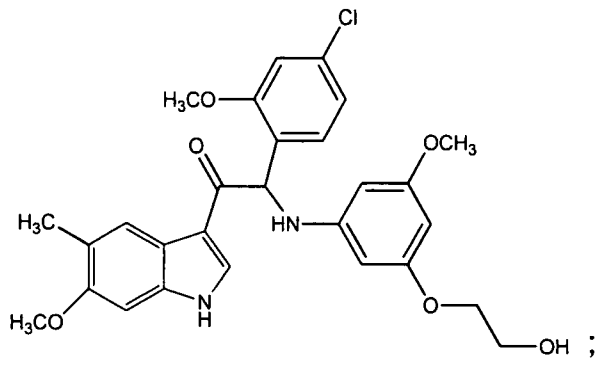
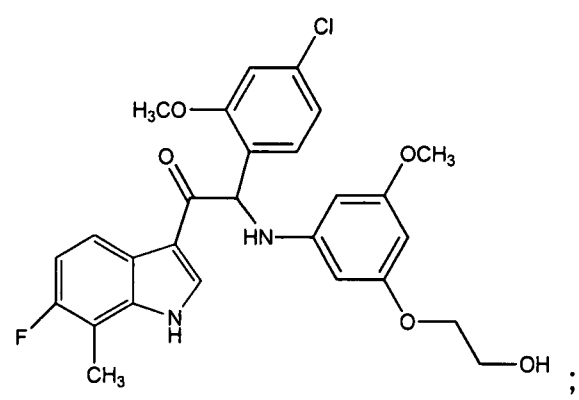
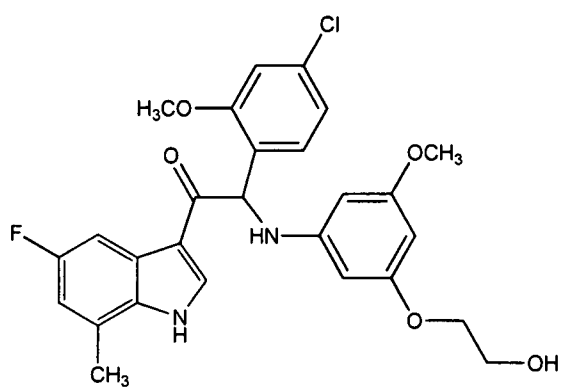
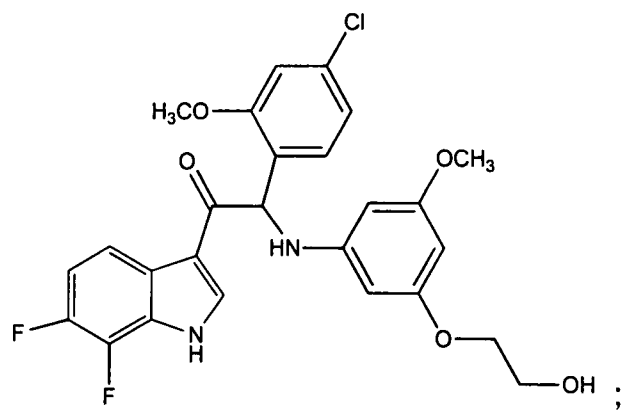
R₁係F，R₂係F並且R₃係H或

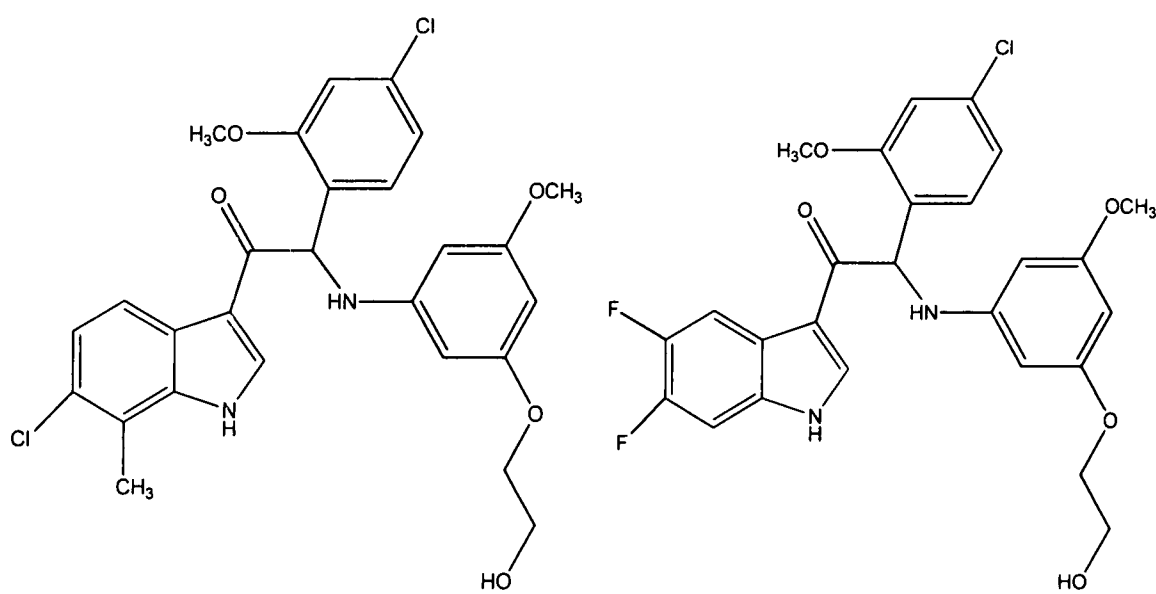
R₁係CH₃，R₂係H並且R₃係F。

2. 如申請專利範圍第1項所述之化合物或其立體異構形式、其藥學上可接受之鹽、溶劑合物或多晶型物，其中所述化合物選自下組：

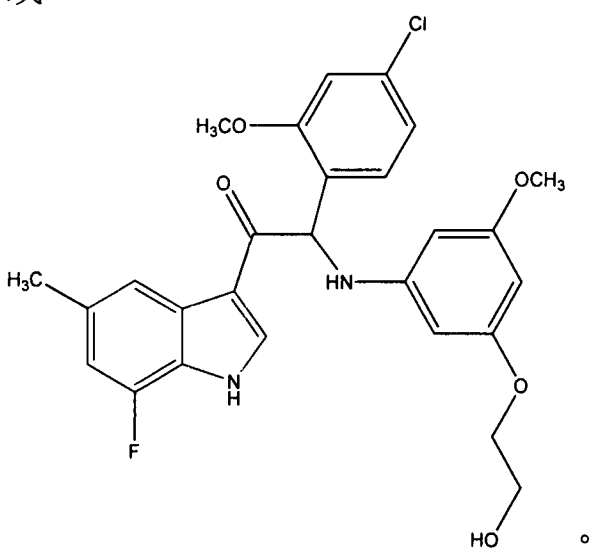


；



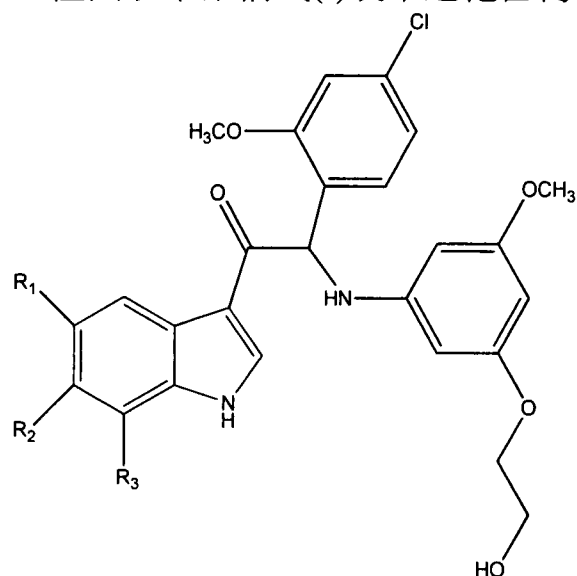


或



- 3. 一種藥物組成物，該藥物組成物包含如申請專利範圍第1或2項所述之具有式(I)之化合物或其立體異構形式、藥學上可接受之鹽、溶劑合物或多晶型物，連同一種或多種藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載體。
- 4. 如申請專利範圍第1項所述之具有式(I)之化合物或其立體異構形式、藥學上可接受之鹽、溶劑合物或多晶型物，或如申請專利範圍第3項所述之藥物組成物，用於用作藥劑。
- 5. 如申請專利範圍第1項所述之具有式(I)之化合物或其立體異構形式、藥學上可接受之鹽、溶劑合物或多晶型物，或如申請專利範圍第3項所述之藥物組成物，用於在治療登革熱中使用。

6. 一種由以下結構式(I)表示之化合物的用途，



其立體異構形式、藥學上可接受之鹽、溶劑合物或多晶型物的用途，
該化合物包含單取代或二取代吡啶基團；所述化合物選自下組，其中：

R_1 係H， R_2 係F並且 R_3 係H、F或 CH_3 ；

R_1 係F或 CH_3 ， R_2 係 OCH_3 並且 R_3 係H；

R_1 係F， R_2 係H並且 R_3 係 CH_3 ；

R_1 係H， R_2 係 OCH_3 並且 R_3 係H；

R_1 係H， R_2 係Cl並且 R_3 係H或 CH_3 ；

R_1 係F， R_2 係F並且 R_3 係H或

R_1 係 CH_3 ， R_2 係H並且 R_3 係F，

用於抑制一生物樣品或患者中的一種或多種登革熱病毒的複製。

7. 如申請專利範圍第6項所述之化合物的用途，進一步包括共同給予一另外的治療劑。

8. 如申請專利範圍7項所述之用途，其中所述另外的治療劑選自抗病毒劑或登革熱疫苗或兩者。

發明摘要

※ 申請案號：104132008

※ 申請日：104.9.30

※ IPC 分類：C07D 209/04, 209/30, 209/32 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 31/2 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

作為登革熱病毒複製抑制劑之單-或二-取代的吲哚衍生物

MONO- OR DI-SUBSTITUTED INDOLE DERIVATIVES AS DENGUE

VIRAL REPLICATION INHIBITORS

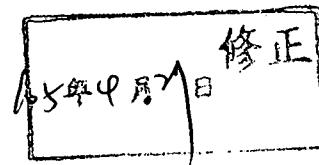
【中文】

本發明涉及單取代或二取代吲哚衍生物、藉由使用所述化合物預防或治療登革熱病毒感染之方法，並且還涉及所述化合物用作藥物，更佳的是用作治療或預防登革熱病毒感染之藥物。此外，本發明涉及這些化合物之藥物組成物或組合製劑，涉及用作藥物、更佳的是用於預防或治療登革熱病毒感染之組成物或製劑。本發明還涉及用於製備這些化合物之方法。

【英文】

The present invention concerns mono- or di-substituted indole derivatives, methods to prevent or treat dengue viral infections by using said compounds and also relates to said compounds for use as a medicine, more preferably for use as a medicine to treat or prevent dengue viral infections.

The present invention furthermore relates to pharmaceutical compositions or combination preparations of the compounds, to the compositions or preparations for use as a medicine, more preferably for the prevention or treatment of dengue viral infections. The invention also relates to processes for preparation of the compounds.



【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 無 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

作為登革熱病毒複製抑制劑之單-或二-取代的吲哚衍生物

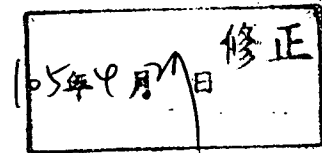
MONO- OR DI-SUBSTITUTED INDOLE DERIVATIVES AS DENGUE
VIRAL REPLICATION INHIBITORS

【技術領域】

【0001】 本發明涉及單取代或二取代吲哚化合物、藉由使用所述化合物預防或治療登革熱病毒感染之方法，並且還涉及所述化合物用作藥物，更佳的是用作治療或預防登革熱病毒感染之藥物。此外，本發明涉及這些化合物之藥物組成物或組合製劑，涉及用作藥物、更佳的是用於預防或治療登革熱病毒感染之組成物或製劑。本發明還涉及用於製備這些化合物之方法。

【先前技術】

【0002】 藉由蚊子或蜱傳播的黃病毒在人中引起危及生命的感染，如腦炎和出血熱。已知黃病毒登革熱的四種不同的但密切相關的血清型，所謂的DENV-1、-2、-3和-4。登革熱係在全世界大多數熱帶和亞熱帶地區地方性的，主要在城市和半城市地區。根據世界衛生組織(WHO)，25億人(其中10億兒童)處於DENV感染的風險(WHO，2002)。估計每年在世界範圍內發生5000萬至1億登革熱[DF]病例、50萬嚴重登革熱疾病(即登革出血熱[DHF]和登革休克綜合症[DSS])病例以及超過20,000例死亡。DHF已經成為流行地區中兒童之中住院和死亡的一主要原因。總而言之，登革熱代表蟲媒病毒(arboviral)疾病的最常見原因。由於在位於拉丁美洲、東南亞和

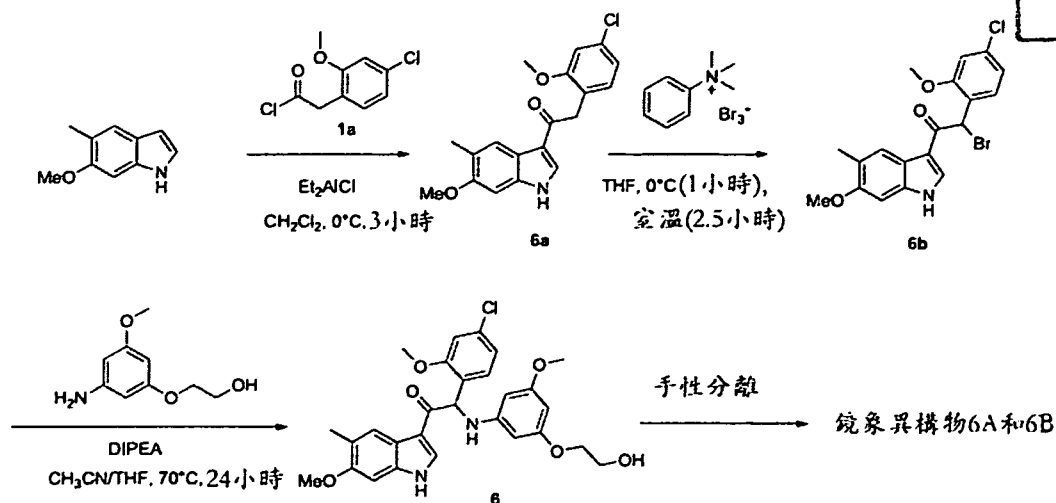


西太平洋的國家（包括巴西、波多黎各、委內瑞拉、柬埔寨、印尼、越南、泰國）中的最近大暴發，登革熱病例的數量已經在過去幾年急劇上升。隨著疾病傳播至新的區域，不僅登革熱病例的數量在增加，而且暴發傾向於更嚴重。

【0003】 為了預防和/或控制與登革病毒感染相關之疾病，目前僅有的可用方法係滅蚊策略以便控制載體。雖然正在針對登革熱的疫苗開發中取得進展，但是遇到許多困難。這些困難包括被稱為抗體依賴性增強作用（ADE）的現象的存在。從一種血清型感染中恢復提供針對該血清型的終身免疫，但是僅賦予針對其他三種血清型中的一種的隨後感染的部分和短暫保護。在感染另一種血清型之後，預先存在的異源抗體與新感染的登革病毒血清型形成複合物，但是不中和病原體。相反，據信促進病毒進入細胞，從而導致不受控制的病毒複製和更高的峰病毒滴度。在原發感染和繼發感染兩者中，更高的病毒滴度與更嚴重的登革熱疾病相關。因為母體抗體能夠容易地藉由母乳餵養傳遞至嬰兒，所以這可能是兒童比成年人更多受嚴重登革熱疾病影響的原因之一。

【0004】 在具有兩種或更多種血清型同時流通的區域（還被稱為超流行地區），嚴重登革熱疾病的風險顯著更高，這係由於經歷繼發性、更嚴重感染的風險增加。此外，在超流行性的情況下，更強毒株出現的概率增加，這進而增加登革出血熱（DHF）或登革休克綜合症之概率。

【0005】 攜帶登革熱的蚊子，包括埃及伊蚊（*Aedes aegypti*）和白紋伊蚊（*Aedes albopictus*）（虎斑蚊（tiger mosquito））在地球上向北方移動。根據美國（US）疾病控制與預防中心（CDC），兩種蚊子當前在德克薩斯州南部普遍存在。攜帶登革熱的蚊子向北傳播不限於美國，而且也已在歐洲觀察到。



中間體6a之合成：

【0086】 在 0°C 下將於己烷 (13.5 mL, 13.5 mmol) 中的二乙基氯化鋁1M逐滴添加至6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶[CAS 1071973-95-9] (1.45 g, 9 mmol) 於 CH_2Cl_2 (45 mL) 中的溶液中。在 0°C 下30分鐘之後，在 0°C 下緩慢添加2-(4-氯-2-甲氧基苯基)乙醯氯**1a** (2.4 g, 10.9 mmol, 合成：參見實例1) 於 CH_2Cl_2 (45 mL) 中的溶液。將反應在 0°C 下攪拌3小時。添加冰水並且將沈澱物濾出且用水洗滌。將固體在真空下乾燥以得到2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**6a** (2.1 g)。

中間體6b之合成：

【0087】 在 0°C 下，將苯基三甲基三溴化銨[CAS 4207-56-1] (2.4 g, 6.4 mmol) 於THF (65 mL) 中的溶液逐滴添加至2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**6a** (2.1 g, 6.1 mmol) 於THF (60 mL) 中的混合物中。將混合物在 0°C 下攪拌1小時，並且在室溫下攪拌2.5小時。將沈澱物濾出並且用EtOAc洗滌。在減壓下濃縮濾液。將殘餘物用最少的二異丙基醚吸收。將沈澱物濾出並且在真空下乾燥以得到2-溴-2-(4-氯-2-甲氧

基苯基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮 **6b** (2.36 g)。

化合物**6**之合成以及手性分離成鏡像異構物**6A**和**6B**：

【0088】 將2-溴-2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙酮**6b** (1.35 g, 3.2 mmol)、2-(3-胺基-5-甲氧基苯氧基)乙醇[CAS 725237-16-1] (0.585 g, 3.2 mmol) 和二異丙基乙胺 (0.83 mL, 4.8 mmol) 於CH₃CN/THF (1/1) (80 mL) 中的混合物在70°C下攪拌24小時。在減壓下濃縮混合物。將殘餘物用CH₂Cl₂稀釋，用1N HCl和水洗滌。將有機層分離，經MgSO₄乾燥，過濾並且在減壓下蒸發溶劑。藉由在矽膠上柱層析(15-40 μm, 80 g於CH₂Cl₂/MeOH (99.5/0.5) 中) 來純化粗化合物。從Et₂O/CH₃CN中結晶少量以得到作為一種外消旋混合物的2-(4-氯-2-甲氧基苯基)-2-((3-(2-羥基乙氧基)-5-甲氧基苯基)胺基)-1-(6-甲氧基-5-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-乙酮 (化合物**6**) 的分析樣品。將剩餘量的粗化合物**6**與另一批混合 (總量1.19 g) 並且經由製備型LC (固定相：不規則的裸二氧化矽 150 g, 流動相：CH₂Cl₂/MeOH (98/2)，並且然後甲苯/*i*PrOH (95/5) 進一步純化兩次。

【0089】 經由製備型手性SFC (固定相：Chiralpak® IC 5 μm 250 × 30 mm, 流動相：50% CO₂, 50% MeOH) 分離化合物**6** (950 mg) 的鏡像異構物以得到485 mg的第一洗脫鏡像異構物和480 mg的第二洗脫鏡像異構物。將第一洗脫鏡像異構物從CH₃CN/Et₂O中固化以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**6A** (406 mg)。將第二洗脫鏡像異構物從CH₃CN/Et₂O中固化以得到呈無定形白色粉末的鏡像異構物**6B** (436 mg)。

化合物**6**：

【0090】 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.21 (s, 3 H) 3.61 (s, 3