



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121741** (13) **C2**  
(51) МПК (2020.01)

**C07D 271/08** (2006.01)

**C07D 413/04** (2006.01)

**A61K 31/4245** (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	<b>а 2016 06159</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Тао Мін (US), Фритце Вільям (US), Мелоні Девід Дж. (US), Вен Лінкай (US), Чжоу Цзячен (US), Пань Юнчунь (US)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>07.11.2014</b>	(73) Власник(и):	<b>ІНСАЙТ ХОЛДІНГС КОРПОРЕЙШН, 1801 Augustine Cut-Off, Wilmington, DE 19803, United States of America (US)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>27.07.2020</b>	(74) Представник:	<b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</b>
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/901,689</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2010/005958 A2, 14.01.2010 WO 2006/122150 A1, 16.11.2006 A new method for the synthesis of nonsymmetrical sulfamides using Burgess- type reagents / ANGEWANDTE CHEMIE. - 2002. - Vol. 41. - № 20. - P. 3866-3870</b>
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>08.11.2013</b>		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		
(41) Публікація відомостей про заявку:	<b>10.08.2016, Бюл.№ 15</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>27.07.2020, Бюл.№ 14</b>		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2014/064531, 07.11.2014</b>		

## (54) СПОСІБ СИНТЕЗУ ІНГІБІТОРА ІНДОЛАМІН-2,3-ДІОКСИГЕНАЗИ

### (57) Реферат:

Винахід стосується способів та проміжних сполук для одержання 4-({2-[(аміносультфоніл)аміно]етил}аміно)-N-(3-бром-4-фторфеніл)-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідаміду, що являє собою інгібітор індоламін-2,3-діоксигенази, що придатний для лікування раку та інших розладів.

UA 121741 C2



В даній заявці заявлений пріоритет згідно з попередньою заявкою на патент США № 61/901689, поданою 8 листопада 2013 року, повний вміст якої включений в 5 цей документ за допомогою посилання.

#### ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

5 Дана заявка стосується способів та проміжних сполук для одержання 4-({2-[(аміносультфоніл)аміно]етил)аміно)-N-(3-бром-4-фторфеніл)-N'-гідрокси-1,2,5-10 оксадіазол-3-карбоксимідаміду, що являє собою інгібітор індоламін-2,3-діоксигенази, що придатний для лікування раку та інших розладів.

#### РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

10 Триптофан (Тгр) являє собою незамінну амінокислоту, необхідну для біосинтезу 15 білків, ніацину і нейротрансмітеру 5-гідрокситриптаміну (серотоніну). Фермент індоламін-2,3-діоксигеназа (також відомий як INDO або IDO) каталізує першу і лімітуючу стадію розкладання L-триптофану до N-формілкінуреніну. У клітинах людини виснаження Тгр в результаті активності IDO являє собою виражений протимікробний ефекторний механізм, індукований гама-інтерфероном (IFN-γ). 20 Стимуляція IFN-γ викликає активацію IDO, що призводить до виснаження Тгр, в результаті чого відбувається зупинка росту Тгр-залежних внутрішньоклітинних патогенів, таких як *Toxoplasma gondii* та *Chlamydia trachomatis*. Активність IDO також має антипроліферативну дію на багато пухлинних клітин і спостерігалась індуція IDO in vivo при відторгненні алогенних пухлин, що вказує на можливу роль зазначеного 25 ферменту в процесі відторгнення пухлини (Daubener, et al., 1999, Adv. Exp. Med. Biol., 467: 517-24; Taylor, et al., 1991, FASEB J., 5: 2516-22).

Спостерігали, що клітини HeLa, вирощені разом з лімфоцитами периферичної крові (PBL), набувають імуноінгібуючий фенотип при підвищувальній регуляції активності IDO. Зниження проліферації PBL при обробці інтерлейкіном-2 (IL2) 30 імовірно обумовлено IDO, вивільненої з клітин пухлини у відповідь на секрецію IFNG клітинами PBL. Вказаним ефект був обернений при обробці 1-метилтриптофаном (1MT), специфічним інгібітором IDO. Було зроблено припущення, що активність IDO в клітинах пухлини може служити для забезпечення протипухлинної відповіді (Logan, et al., 2002 Immunology, 105: 478-87).

Останнім часом велику увагу привертає імунорегуляторна роль виснаження Тгр. Кілька груп даних дозволяють припустити, що IDO бере участь в індукції імунної толерантності. Дослідження вагітності, пухлинної резистентності, хронічних інфекцій і 5 аутоімунних захворювань ссавців показали, що клітини, які експресують IDO, можуть пригнічувати відповідь Т-клітин і промотувати толерантність. Прискорений катаболізм Тгр спостерігали при захворюваннях і розладах, пов'язаних з клітинною імунною активацією, таких як інфекція, злоякісні новоутворення, аутоімунні захворювання та СНІД, а також при вагітності. Наприклад, підвищені рівні IFN і підвищені рівні 10 метаболітів Тгр в сечі спостерігали при аутоімунних захворюваннях; постульовано, що системне або локальне виснаження Тгр, що має місце при аутоімунних захворюваннях, може бути пов'язано з симптомами дегенерації і виснаження зазначених захворювань. На підтвердження даної гіпотези, високі рівні IDO спостерігали в 40 клітинах, виділених з синовії артритних суглобів. Рівні IFN також підвищені у пацієнтів з вірусом 15 імунодефіциту людини (ВІЛ) та підвищені рівні IFN пов'язані також з погіршенням прогнозу. Таким чином, було зроблено припущення, що IDO хронічно індукується ВІЛ-інфекцією, та його рівень додатково підвищується інфекціями, спровокованими ослабленням імунітету, а також що хронічна втрата Тгр ініціює механізми, що відповідають за кахексію, деменцію і діарею, а також 45 можливо за пригнічення 20 імунітету у пацієнтів із СНІДом (Brown, et al., 1991, Adv. Exp. Med. Biol., 294: 425-35). У зв'язку з цим, нещодавно було показано, що гальмування IDO може підвищувати рівні вірус-специфічних Т-клітин і паралельно знижувати кількість заражених вірусом макрофагів в мишачій моделі ВІЛ (Portula et al., 2005, Blood, 106: 2382-90).

Імовірно, IDO грає роль в процесах пригнічення імунітету, які перешкоджають 25 відторгненню ембріона в матці. Більше 40 років тому спостерігали, що під час вагітності генетично різномірні концептуси ссавців виживають, незважаючи на теоретичний прогноз імунології трансплантації тканин (Medawar, 1953, Symp. Soc. Exp. Biol. 7: 320-38). Анатомічний поділ матері і плоду, а також антигенна незрілість плода не можуть повністю пояснити виживання ембріонального алотрансплантату. Останнім 30 часом увага була сконцентрована на імунологічній толерантності матері. Оскільки IDO експресується синцитіотрофобластними 55 клітинами людини, а системна концентрація триптофану знижується протягом нормальної вагітності, була висунута гіпотеза, що експресія IDO на кордоні між матір'ю і плодом необхідна для запобігання імунологічного відторгнення ембріональних алотрансплататів. Для перевірки цієї гіпотези вагітних мишей (з сингенними або алогенними ембріонами) обробляли 1MT і 60 спостерігали швидке відторгнення всіх алогенних концептусів під дією Т-клітин. Таким чином,

катаболізуючи триптофан, концептус ссавця пригнічує активність Т-клітин і захищає себе від відторгнення, а блокування катаболізму триптофану при 5 вагітності мишей забезпечує можливість провокування відторгнення ембріонального алотрансплантату материнськими Т-клітинами (Munn, et al., 1998, *Science*, 281: 1191-3).

Додаткові дані про механізм пухлинної імунорезистентності, заснованої на розкладанні триптофану під дією IDO, виходять з спостереження, що більшість людських пухлин конститутивно експресують IDO, і що експресія IDO імунотоксичними 10 пухлинними клітинами мишей перешкоджає їх відторгненню у попередньо імунізованих мишей. Такий ефект супроводжується недоліком накопичення специфічних Т-клітин у осередку пухлини і може бути частково обернено системним лікуванням мишей інгібітором IDO, за відсутності помітної токсичності. Тому було зроблено припущення, що ефективність терапевтичної вакцинації онкологічних 15 пацієнтів може бути поліпшена паралельним введенням інгібітору IDO (Uyttenhove et al., 2003 *Nature Med.*, 9: 1269-74). Було також показано, що інгібітор IDO, 1-MT, може проявляти синергетичну дію з хіміотерапевтичними агентами для зниження росту пухлини у мишей, що дозволяє припустити, що гальмування IDO також може посилювати протипухлинну активність звичайних цитотоксичних методів лікування 20 (Muller et al., 2005, *Nature Med.*, 11: 312-9).

Один з механізмів, що сприяє імунологічній толерантності щодо пухлин, може бути представлений пухлинними антигенами толерогенних APC господарів. Описано також підмножина людських IDO-експресуючих антиген-презентуючих клітин (APC), які спільно експресують CD123 (IL3RA) і CCR6 і пригнічують проліферацію Т-клітин. 25 Зрілі і незрілі CD123-позитивні дендритні клітини придушували активність Т-клітин і така IDO-переважна активність була блокована дією 1MT (Munn, et al., 2002 *Science*, 297: 1867-70). Було також показано, що мишачі лімфатичні вузли, що вивільнюють пухлину (TDLN), містять підмножину плазмацитоїдних дендритних клітин (pDC), які конститутивно експресують імуносупресивні кількості IDO. Незважаючи на вміст 30 лише 0,5 % клітин лімфовузлів, *in vitro*, зазначені pDC ефективно пригнічували відповідь Т-клітин на антигени, презентовані самим pDC, а також домінуючим чином придушували відповідь Т-клітин на антигени третьої сторони, презентовані несупресорними APC. У межах групи pDC, основна частина функціональної IDO-опосередкованої супресорної активності була зосереджена в новій підмножині pDC, що спільно експресують В-лінійний маркер CD19. Тому була висунута гіпотеза, що IDO-опосередковане придушення під дією pDC в TDLN створює мікроови, які ефективно пригнічують протипухлинні відповіді Т-клітин господаря (Munn, et al., 2004, *J. Clin. Invest.*, 114 (2): 280-90). 5

IDO руйнує індольний фрагмент триптофану, серотоніну і мелатоніну і ініціює вироблення нейроактивних і імунорегуляторних метаболітів, відомих в сукупності як кінуренін. За рахунок локального виснаження триптофану і підвищення рівня проапоптозного кінуреніну, IDO, експресуемого дендритними клітинами (DC), може в значній мірі впливати на проліферацію і виживання Т-клітин. Індукція IDO в DC може 10 являти собою загальний механізм делеційної толерантності, обумовленої регуляторними Т-клітинами. Оскільки можна очікувати, що такі толерогенні відповіді мають місце при різних фізіопатологічних станах, то метаболізм триптофану і вироблення кінуреніну можуть являти собою ключову взаємодію між імунною та нервовою системами (Grohmann, et al., 2003 *Trends Immunol.*, 24: 242-8). У станах 15 хронічної імунної активації доступність вільного сироваткового Trp знижена і, як наслідок зниженого продукування серотоніну, серотонінергічної функції також можуть бути порушені (Wirleitner, et al., 2003 *Curr. Med. Chem.*, 10: 1581-91). 45

Цікаво, що введення інтерферону- $\alpha$ , за спостереженнями, викликає нейропсихіатричні побічні ефекти, такі як депресивні симптоми і зміни в когнітивній 20 функції. Безпосередній вплив на серотонінергічну нейротрансмісію може посилювати зазначені побічні ефекти. Крім того, оскільки активація IDO призводить до зниження рівня триптофану, попередника серотоніну (5-HT), то IDO може грати роль в зазначених нейропсихіатричних побічних ефектах за допомогою зниження центрального синтезу 5-HT. Більш того, метаболіти кінуреніну, такі як 3-25 гідроксикінуренін (3-OH-KYN) і хінолінова кислота (QUIN) мають токсичну дію на функцію головного мозку. 3-OH-KYN може викликати окислювальний стрес, підвищуючи вироблення реакційноздатних частинок кисню (ROS), а QUIN може викликати надстимуляцію гіпокампульних рецепторів N-метил-D-аспартату (NMDA), що призводить до апоптозу і гіпокампульної атрофії. Надсинтез ROS і гіпокампульна 30 атрофія, викликані надстимуляцією NMDA, пов'язані з депресією (Wichers and Maes, 2004, *J. Psychiatry Neurosci.*, 29: 11-17). Таким чином, активність IDO може грати роль при депресії. Розроблені низькомолекулярні інгібітори IDO для лікування або попередження пов'язаних з IDO захворювань, таких як описані вище. 60 Наприклад, оксадіазол і інші гетероциклічні інгібітори IDO (описані в US 2006/0258719 і US

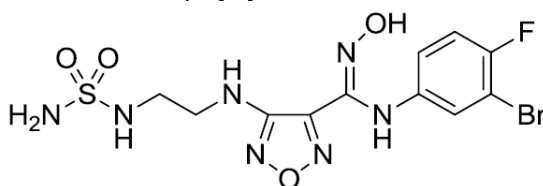
2007/0185165). У публікації (PCT WO 99/29310) описані способи зміни імунітету, опосередкованого Т-клітинами, що включають зміну локальних позаклітинних концентрацій триптофану і 5 метаболітів триптофану з використанням інгібітору IDO, такого як 1-метил-DL-триптофан, п-(3-бензофураніл)-DL-аланін, п-[3-бензо(b)тієніл]-DL-аланін і 6-нітро-L-триптофан) (Munn, 1999). В WO 03/087347, також опублікована як Європейський патент 1501918, описані способи отримання антиген-презентуючих клітин для посилення або зниження толерантності Т-клітин (Munn, 2003). Сполуки, що мають 10 інгібуючу активність щодо індоламін-2,3-діоксигенази (IDO), також описані в (WO 2004/094409; і в публікації заявки на патент США № 2004/0234623), яка відноситься до способів лікування суб'єкта, що страждає від раку або інфекції, за допомогою введення інгібітора індоламін-2,3-діоксигенази в комбінації з іншими терапевтичними впливами.

У світлі експериментальних даних, що вказують на роль IDO в пригніченні імунітету, пухлинної резистентності і/або відторгненні, хронічних інфекціях, інфекції ВІЛ, СНІД (включаючи його прояви, такі як кахексія, деменція і діарея), аутоімунних захворювань або розладах (таких як ревматоїдний артрит) і імунологічній толерантності, а також запобігання відторгнення ембріона in utero, бажані терапевтичні агенти, призначені для пригнічення розкладання триптофану за допомогою інгібування IDO. Інгібітори IDO можуть бути використані для активації Т-клітин і, отже, посилення Т-клітинної активності при пригніченні Т-клітин під час вагітності, при злоякісних новоутвореннях або вірусах, таких як ВІЛ. Інгібування IDO може являти собою важливу стратегію лікування пацієнтів з неврологічними або нейропсихіатричними захворюваннями або розладами, такими як депресія. 25

Завдяки застосуванню інгібіторів IDO, існує потреба в розробці нових способів отримання інгібіторів IDO. Дана заявка спрямована на задоволення цієї та інших потреб.

#### КОРОТКИЙ ОПИС СУТНОСТІ ВИНАХОДУ

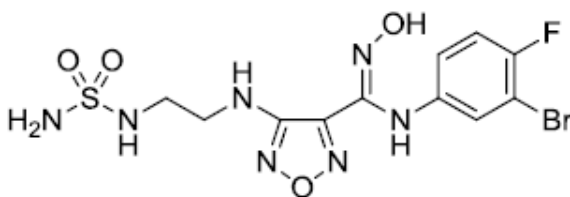
Сполука 4-({2-[(аміносульфоніл)аміно]етил}аміно)-N-(3-бром-4-фторфеніл)-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідамід, що має Формулу I:



I

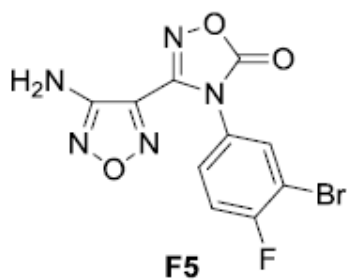
являє собою інгібітор ферменту індоламін-2,3-діоксигенази (також відома як IDO). Сполука Формули I, а також її одержання та застосування описані в патенті США № 8088803, повний зміст якого включений в цей документ за допомогою посилання. 5 Проміжні сполуки і способи, представлені в цьому документі, сприяють задоволенню існуючої потреби в розробці інгібіторів IDO для лікування важких захворювань.

В даній заявці запропоновані, inter alia, проміжні сполуки і способи одержання сполуки Формули I:

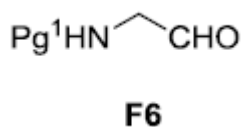


I

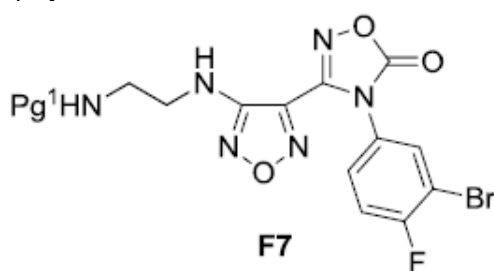
Відповідно, в даній заявці запропонований спосіб, що включає приведення в контакт сполуки Формули F5:



з альдегідом Формули F6:



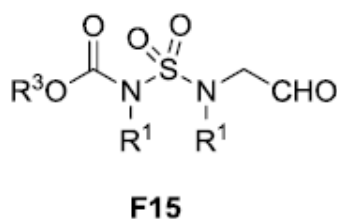
з одержанням сполуки Формули F7:



5

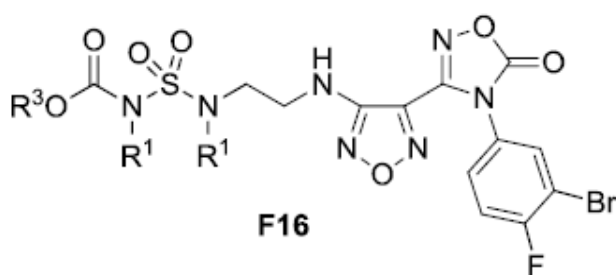
де Pg1 визначений *infra*.

В даній заявці додатково запропонований спосіб, що включає приведення в контакт сполуки Формули F15:



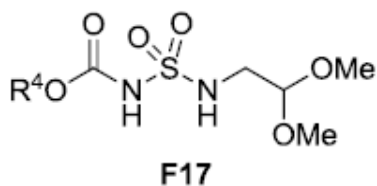
10

з сполукою Формули F5 з одержанням сполуки Формули F16:



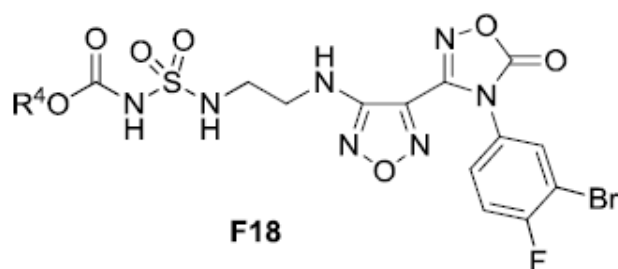
де R1 і R3 визначені *infra*.

В даній заявці додатково запропонований спосіб, що включає приведення в контакт сполуки Формули F17:



15

з сполукою Формули F5 з одержанням сполуки Формули F18:



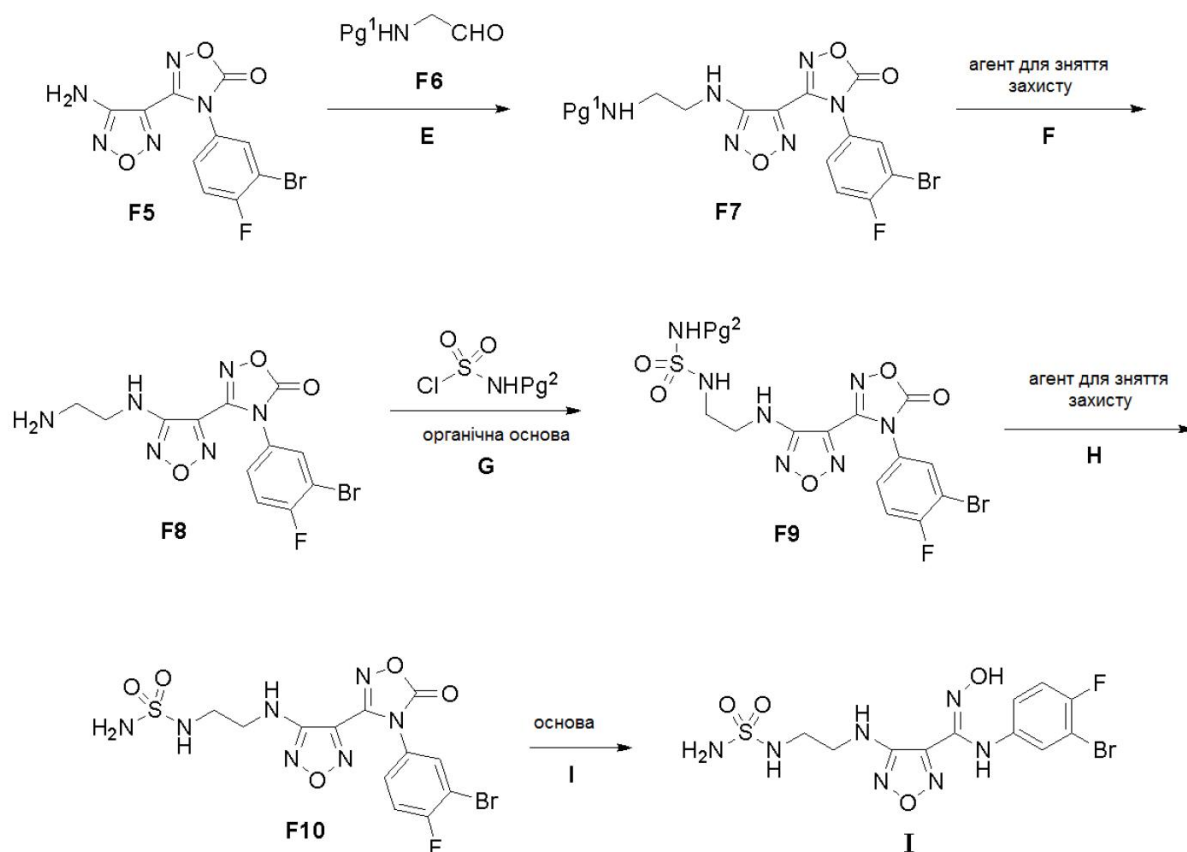
де R4 визначений infra.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС СУТНОСТІ ВІНАХОДУ

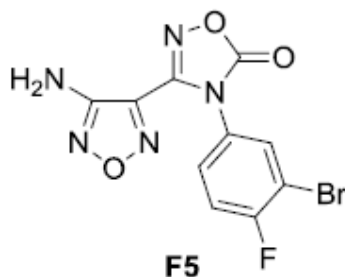
- Незважаючи на те, що деякі стадії Способів показані на Схемах, представлених 15 нижче, передбачається, що окремі стадії Способів можуть бути заявлені індивідуально або в будь-якій комбінації (наприклад, на Схемі 1 стадії E, F, G, H і I можуть бути заявлені індивідуально або в комбінації). Мається на увазі, що зазначені Способи не обмежені загальним Способом, що включає всі і кожен етап на Схемах, представлених нижче. 20

Відповідно, загальна схема одержання сполуки Формули I описана на Схемі 1.

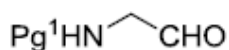
#### Схема 1



Відповідно, в даній заявці запропонований спосіб, що включає приведення в контакт сполуки Формули F5:

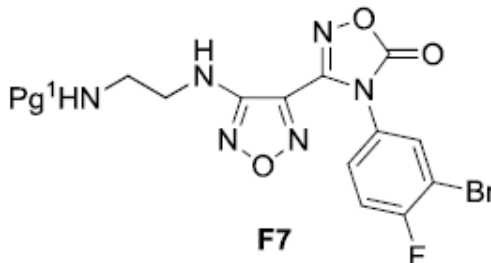


з альдегідом Формули F6: - - -



F6

де  $\text{Pg}_1$  являє собою амінозахисну групу, з одержанням сполуки Формули F7:



F7

Амінозахисні групи  $\text{Pg}^1$  можуть бути використані для попередження небажаних реакцій аміногрупи при здійсненні необхідного перетворення. Амінозахисні групи забезпечують можливість простого ковалентного приєднання до атома нітрогену, а також селективного розщеплення по атому нітрогену. Відповідні "амінозахисні 5 групи", такі як алкоксикарбоніл (такий як етоксикарбоніл, трет-бутоксикарбоніл (Boc), бензилоксикарбоніл (Cbz), 9-флуоренілметилоксикарбоніл (Fmoc) і т.п.), ацил (такий як ацетил (Ac), бензоїл (Bz) і т.п.), сульфоніл (такий як метансульфоніл, трифторметансульфоніл і т.п.), арилалкіл (такий як бензил, 4-метоксибензил, дифенілметил, трифенілметил (тритил) і т.п.), алкенілалкіл (такий як аліл, преніл і т.п.), 10 діарилметиленіл (такий як  $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{C}=\text{N}$  і т.п.) і силіл (такий як трет-бутилдиметилсиліл, триізопропілсиліл і т.п.), відомі фахівцям в даній області техніки. Хімія амінозахисних груп описана в книзі Wuts and Greene, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, четверте вид., Сс. 696-926, John Wiley & Sons: New York, 2006, повний зміст якої включено в цей документ за допомогою посилання.

В деяких варіантах реалізації винаходу  $\text{Pg}^1$  являє собою етоксикарбоніл, трет-бутоксикарбоніл, бензилоксикарбоніл або 9-флуоренілметилоксикарбоніл.

В деяких варіантах реалізації винаходу  $\text{Pg}^1$  являє собою  $\text{C}_{1-6}$  алкоксикарбоніл.

В деяких варіантах реалізації винаходу  $\text{Pg}^1$  являє собою трет-бутоксикарбоніл.

Придатні розчинники для стадії Е включають, але необмежуються ними, 20 метанол або тетрагідрофуран (ТГФ), ацетонітрил і т.п. Також можуть бути використані галогеновані вуглеводневі розчинники (тобто галогеновані алкани, такі як дихлорметан, хлороформ, дихлоретан або тетрахлоретан).

В деяких варіантах реалізації винаходу вказане приведення в контакт проводять в компоненті розчинника, що містить тетрагідрофуран. В даному контексті компонент розчинника може стосуватись одного розчинника або суміші розчинників. В деяких варіантах реалізації винаходу компонент розчинника являє собою органічний розчинник. В деяких варіантах реалізації винаходу вказане приведення в контакт проводять в компоненті розчинника, що містить галогенований вуглеводневий розчинник. В деяких варіантах реалізації винаходу вказаний галогенований вуглеводневий розчинник являє собою дихлорметан.

В деяких варіантах реалізації вказане приведення в контакт проводять в компоненті розчинника, що містить ацетонітрил.

В деяких варіантах реалізації вказане приведення в контакт проводять в 5 компоненті розчинника, що містить дихлорметан і ацетонітрил.

В деяких варіантах реалізації вказане приведення в контакт проводять в присутності відновлювального агента.

Відновлювальний агент може являти собою будь-яку сполуку здатну відновлювати органічну сполуку до більш низького ступеня окислення. Відновлення 10 зазвичай включає приєднання атомів гідрогену або відщеплення атомів кисню від групи. Наприклад, альдегіди, такі як F6, можуть бути відновлені в присутності аміну Формули F5 (стадія Е, Схема 1) шляхом приєднання гідрогену, або у формі газоподібного гідрогену ( $\text{H}_2$ ), або з використанням гідридного реагенту (такого як  $\text{NaB}(\text{OAc})_3\text{H}$ ,  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{LiAlH}_4$  і т.п.); з використанням трифенілфосфіну; або з використанням комбінації йодиду натрію, хлортриметилсилану і метанолу. У деяких варіантах реалізації винаходу зазначена стадія може бути проведена в кислотних умовах в присутності кислоти (такої як трифтороцтова кислота). У деяких варіантах реалізації зазначена стадія може бути проведена при температурі від приблизно  $-15^\circ\text{C}$  до приблизно  $30^\circ\text{C}$ , наприклад, від

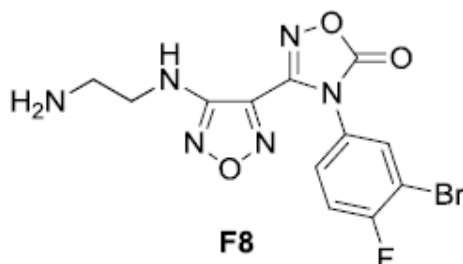
приблизно -15 °С до приблизно 0 °С, від приблизно 20-5 °С до приблизно 5 °С, від приблизно -5 °С до приблизно 0 °С або від приблизно 0 °С до приблизно 45 °С.

В деяких варіантах реалізації вказаний відновлювальний агент може являти собою боргідридний відновлювальний агент (наприклад,  $\text{NaB}(\text{OAc})_3\text{H}$ ,  $\text{NaBH}_4$  або інший борвмісний гідридний відновлювальний агент). 25

В деяких варіантах реалізації винаходу вказаний боргідридний відновлювальний агент являє собою триацетоксиборгідрид.

В деяких варіантах реалізації вказане приведення в контакт проводять в присутності трифтороцтової кислоти.

В деяких варіантах реалізації винаходу спосіб додатково включає зняття захисту 30 з вказаної сполуки Формули F7 з одержанням сполуки Формули F8:



Агенти для зняття захисту з аміногрупи, використовувані для даної стадії F, відомі спеціалістам в даній області техніки і описані, наприклад, в книзі Wuts and Greene (supra). Зокрема, амінозахисні групи, описані вище, можуть бути легко видалені за допомогою багатьох доступних агентів для зняття захисту з аміногрупи, які є 5 специфічними для різних груп, зазначених вище, не впливаючи на інші необхідні частини сполуки. трет-Бутоксикарбонільна група може бути видалена (наприклад, гідролізована) з атома нітрогену, наприклад, за допомогою обробки кислотою (такою як соляна кислота, трифтороцтова кислота, толуолсульфонова кислота і т.п.); комбінацією реагентів (наприклад, сумішшю ацетилхлориду і метанолу), які, як 10 відомо, утворюють кислоту; або кислотою Льюїса (наприклад,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ). Бензоїлоксикарбонільна група може бути видалена (наприклад, гідролізована) з атома нітрогену, наприклад, обробкою гідрогеном і каталізатором (таким як палладій на вугіллі).

В деяких варіантах реалізації винаходу агент для зняття захисту з аміногрупи 15 являє собою трифтороцтову кислоту. В деяких варіантах реалізації агент для зняття захисту з аміногрупи містить трифтороцтову кислоту і >0,5 % по об'єму води, наприклад, >1,0 % по об'єму води, >1,5 % по об'єму води, >2,0 % по об'єму води, від приблизно 2 % до приблизно 10 % по об'єму води, від приблизно 10 % до приблизно 20 % по об'єму води або від приблизно 20 % до приблизно 50 % по об'єму води. В 20 деяких варіантах реалізації агент для зняття захисту з аміногрупи може являти собою суміш трифтороцтової кислоти і води з об'ємним співвідношенням приблизно 98:2. В деяких варіантах реалізації винаходу агент для зняття захисту з аміногрупи може являти собою хлорводневу кислоту, необов'язково в розчиннику (наприклад, у воді, ТГФ, діоксані, етилацетаті і т.п.). В деяких варіантах реалізації компонент розчинника 25 являє собою етилацетат. В деяких варіантах реалізації агент для зняття захисту з аміногрупи може являти собою хлорводневу кислоту, необов'язково в розчиннику, такому як спирт (такий як ізопропанол, метанол або етанол). Також можуть бути використані галогеновані вуглеводневі розчинники (наприклад, дихлорметан, хлороформ, дихлоретан або тетрахлоретан). В деяких варіантах реалізації винаходу молярне співвідношення хлорводневої кислоти і сполуки Формули F7 складає приблизно 6,0, приблизно 5,0, приблизно 4,0, приблизно 3,0, приблизно 2,0, приблизно 1,0 або приблизно 1,1. В деяких варіантах реалізації винаходу стадія F може бути проведена при температурі від приблизно -10 °С до приблизно 60 °С, наприклад, від приблизно -10 °С до приблизно 0 °С, від приблизно 0 °С до приблизно 25 °С, від 5 приблизно 25 °С до приблизно 45 °С або від приблизно 45 °С до приблизно 60 °С.

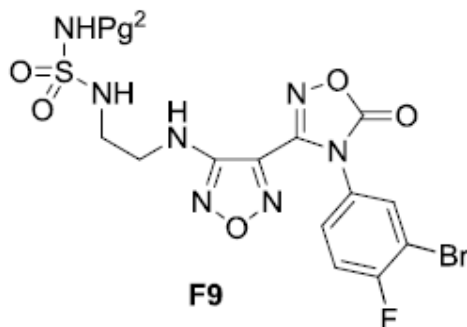
В деяких варіантах реалізації вказане зняття захисту включає приведення в контакт сполуки Формули F7 з хлорводневою кислотою.

В деяких варіантах реалізації вказане зняття захисту включає приведення в контакт сполуки Формули F7 з хлорводневою кислотою в компоненті розчинника, що 10 містить ізопропанол.

В деяких варіантах реалізації вказане зняття захисту включає приведення в контакт сполуки Формули F7 з хлорводневою кислотою в компоненті розчинника, що містить галогенований вуглеводневий розчинник.

В деяких варіантах реалізації винаходу вказаний галогенований вуглеводневий 15 розчинник являє собою дихлорметан.

В деяких варіантах реалізації даний винахід додатково включає приведення в контакт вказаної сполуки Формули F8 з  $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{-X}$  в присутності органічної основи з одержанням сполуки Формули F9:



5 де:

$\text{Pg}^2$  являє собою амінозахисну групу; і

X являє собою галоген.

В деяких варіантах реалізації  $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{Cl}$  може бути одержаний і зразу використаний в реакції із сполукою Формули F8. Захисна група  $\text{Pg}^2$  може бути вибрана з будь-яких захисних груп, відомих в даній області техніки для захисту амінів або сульфонамідів (таких як описані вище для  $\text{Pg}^1$ ). В деяких варіантах реалізації  $\text{Pg}^2$  може являти собою алкоксикарбонільну групу (таку як трет-бутоксикарбоніл).

Придатні розчинники включають, але не обмежуються ними, галогеновані вуглеводневі розчинники, такі як дихлорметан і т.п. Органічна основа може являти собою будь-яку основу, що служить для нейтралізації HCl, що утворюється під час реакції сполуки Формули F8 і захищеного аміносальфонілхлориду. Органічна основа може включати ациклічні третинні аміни, такі як три(C1-6)алкіламін (наприклад, 5 триетиламін, діізопропілетиламін (DIPEA) і т.п.), циклічні третинні аміни (наприклад, N-метилпіперидин, 1,4-діазабіцикло[2.2.2]октан (DABCO) і т.п.). В деяких варіантах реалізації органічна основа може являти собою триетиламін. В деяких варіантах реалізації винаходу вказана стадія може бути проведена при температурі від приблизно  $-15^\circ\text{C}$  до приблизно  $60^\circ\text{C}$ , наприклад, від приблизно  $-15^\circ\text{C}$  до приблизно  $0^\circ\text{C}$ , від 10 приблизно  $0^\circ\text{C}$  до приблизно  $25^\circ\text{C}$ , від приблизно  $25^\circ\text{C}$  до приблизно  $45^\circ\text{C}$  або від приблизно  $45^\circ\text{C}$  до приблизно  $60^\circ\text{C}$ .

В таких варіантах реалізації  $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{Cl}$  може бути одержаний приведенням в контакт спирту (такого як етанол, трет-бутиловий спирт і т.п.) з хлорсульфонілізоціанатом ( $\text{ClS(O)}_2\text{NCO}$ ).

В деяких варіантах реалізації  $\text{Pg}^2$  являє собою етоксикарбоніл, трет-бутоксикарбоніл, бензилоксикарбоніл або 9-флуоренілметилоксикарбоніл.

В деяких варіантах реалізації  $\text{Pg}^2$  являє собою  $\text{C}_{1-6}$  алкоксикарбоніл.

В деяких варіантах реалізації  $\text{Pg}^2$  являє собою трет-бутоксикарбоніл.

В деяких варіантах реалізації винаходу вказане приведення в контакт проводять в компоненті розчинника, що містить галогенований вуглеводневий розчинник.

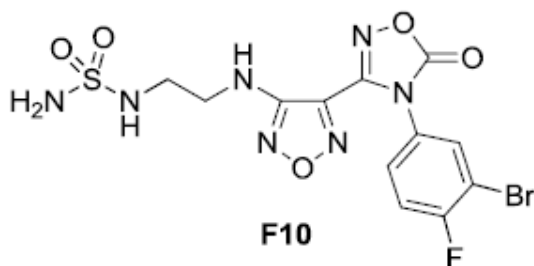
В деяких варіантах реалізації винаходу вказаний галогенований вуглеводневий розчинник являє собою дихлорметан.

В деяких варіантах реалізації вказана органічна основа містить три(C1-6)алкіламін.

В деяких варіантах реалізації вказана органічна основа являє собою триетиламін.

В деяких варіантах реалізації X являє собою хлор.

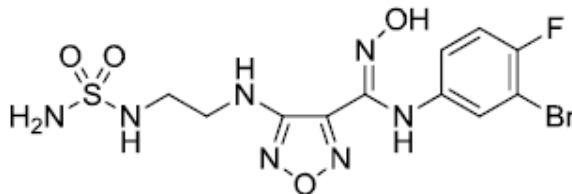
В деяких варіантах реалізації даний винахід додатково включає зняття захисту з вказаної сполуки Формули F9 з одержанням сполуки Формули F10:



В деяких варіантах реалізації придатні агенти для зняття захисту можуть включати агенти, описані вище для зняття захисту з сполуки Формули F7.

В деяких варіантах реалізації вказане зняття захисту включає приведення в контакт сполуки Формули F9 з хлорводневою кислотою. В деяких варіантах реалізації 5 вказане зняття захисту включає приведення в контакт сполуки Формули F9 з хлорводневою кислотою в компоненті розчинника, що містить спирт. В деяких варіантах реалізації вказаний спирт являє собою етанол. В деяких варіантах реалізації винаходу вказане зняття захисту включає приведення в контакт сполуки Формули F9 з хлорводневою кислотою в компоненті розчинника, що містить етилацетат.

В деяких варіантах реалізації даний винахід додатково включає приведення в контакт вказаної сполуки Формули F10 з основою з одержанням сполуки Формули I:



I.

Основа може бути використана для перетворення (наприклад, гідролізу) оксадіазолонового кільця в F10 з одержанням амідоксиму в сполучі Формули I, необов'язково в розчиннику (стадія I, Схема 1). Захист амідоксиму в формі оксадіазолону може бути придатним для попередження небажаних реакцій гідроксильної групи або амідоксиму в цілому. Основа може являти собою неорганічну основу, таку як гідроксид лужного металу (наприклад, NaOH, LiOH, KOH, Mg(OH)<sub>2</sub> і 20 т.п.); або органічну основу, таку як ациклічний амін (наприклад, триетиламін, діізопропілетиламін (DIPEA) і т.п.) або циклічний амін (наприклад, піролідін, піперидин і т.п.). Основа може бути доступною в формі смоли (такої як Amberlite® і т.п.). У деяких додаткових варіантах реалізації винаходу основа може бути представлена у формі розчину в воді (наприклад, приблизно 0,5 н. розчин, приблизно 1 25 н. розчин, приблизно 1,5 н. розчин, приблизно 2,5 н. розчин, від приблизно 3 н. до приблизно 5 н. розчин, від приблизно 5 н. до приблизно 10 н. розчин). У деяких варіантах реалізації основа являє собою гідроксид лужного металу (такий як гідроксид натрію). У деяких варіантах реалізації основа може являти собою 2 н. розчин NaOH в воді. У деяких варіантах реалізації розчинник може являти собою етанол або тетрагідрофуран (ТГФ). У деяких варіантах реалізації розчинник може являти собою суміш етанолу і води. У деяких варіантах реалізації винаходу приведення в контакт 5 сполуки Формули F10 з основою з одержанням сполуки Формули I може бути проведено при температурі від приблизно -10° С до приблизно 60° С, наприклад, від приблизно -10° С до приблизно 20° С, від приблизно 0° С до приблизно 30° С, від приблизно 0° С до приблизно 10° С або від 30 приблизно 0° С до приблизно 5° С.

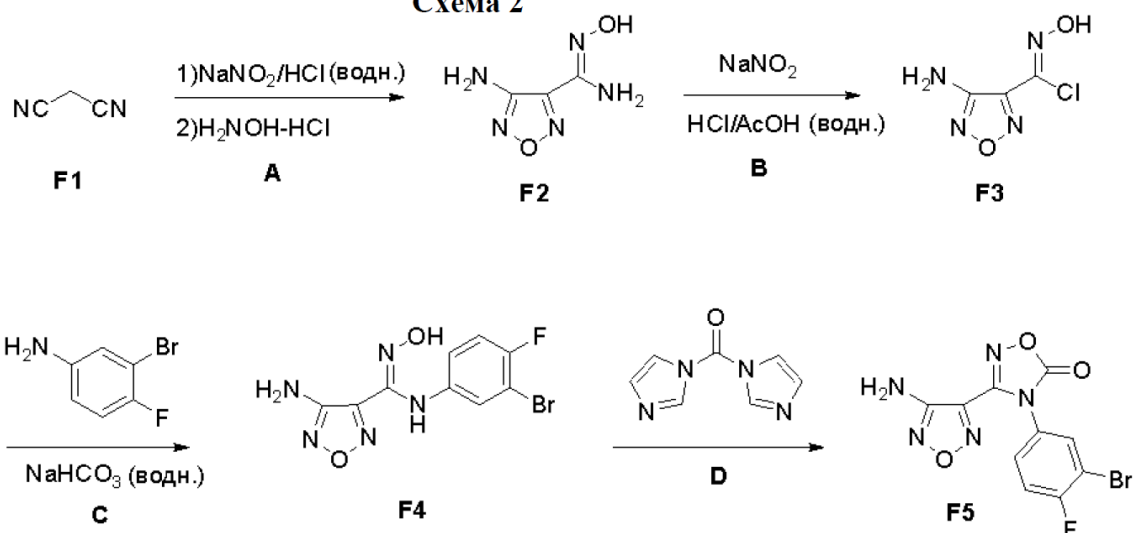
В деяких варіантах реалізації вказана основа містить гідроксид лужного металу. 10

В деяких варіантах реалізації вказаний гідроксид лужного металу являє собою гідроксид натрію.

В деяких варіантах реалізації вказане приведення в контакт проводять в компоненті розчинника, що містить тетрагідрофуран, воду і етанол.

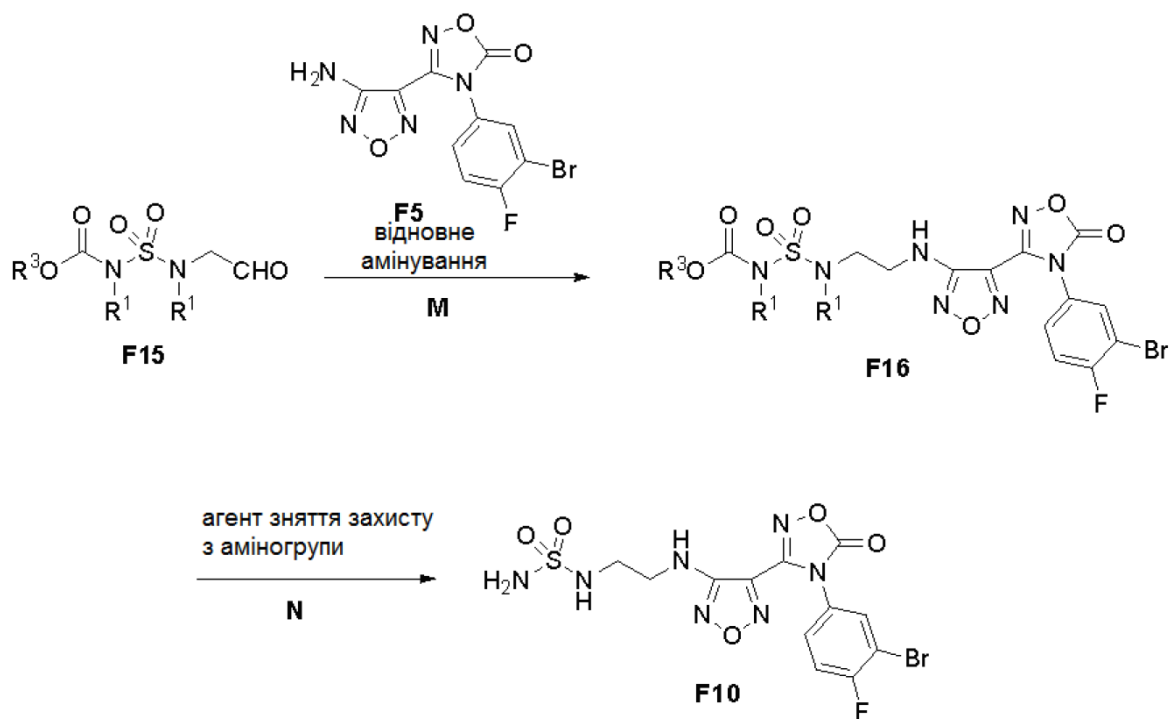
В деяких варіантах реалізації сполука Формули F5 може бути одержана у 15 відповідності з послідовністю стадій, представлених на Схемі 2. Одержання проміжної сполуки, 4-аміно-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідаміду F2, описано в публікації J. Heterocycl. Chem. (1965), 2, 253, повний зміст якої включено в даний документ за допомогою посилання, а його перетворення в хлороксим F3 описано в публікації Synth. Commun. (1988), 18, 1427, повний зміст якої включено в даний 20 документ за допомогою посилання. В деяких варіантах реалізації винаходу хлороксим Формули F3 може бути зв'язаний з 3-бром-4-фтораніліном, необов'язково в розчиннику (такому як вода), з наступним додаванням бікарбонату натрію з одержанням амідоксиму Формули F4. Амідоксимна функціональна група сполуки F4 може буту 45 потім перетворена в оксадіазолон або Формулу F5 за допомогою N, N-25 карбонілдімідазолу (DCI) в розчиннику (такому як етилацетат, діоксан, ТГФ і т.п.) при підвищених температурах, таких як приблизно 50 °С, приблизно 60 °С, приблизно 70 °С, приблизно 80 °С, приблизно 90 °С або приблизно 100 °С.

## Схема 2

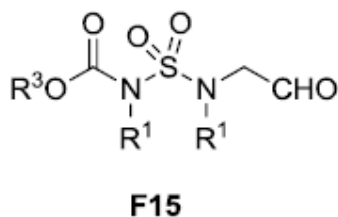


В альтернативному варіанті сполука Формули F10 може бути одержана у відповідності з послідовністю стадій, показаних на Схемі 3.

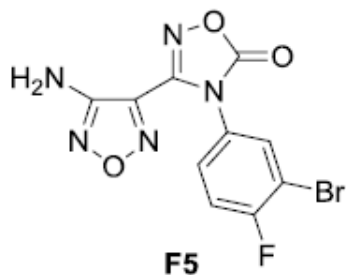
## Схема 3



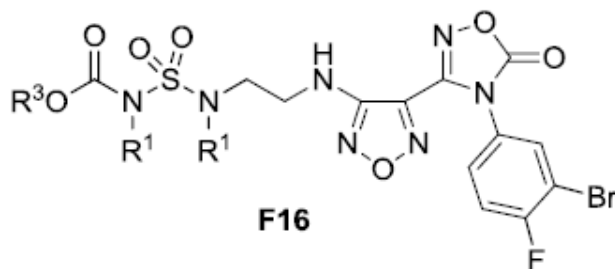
- 5 В деяких варіантах реалізації даної заявки запропонований спосіб, що включає приведення в контакт сполуки Формули F15:



з сполукою Формули F5:

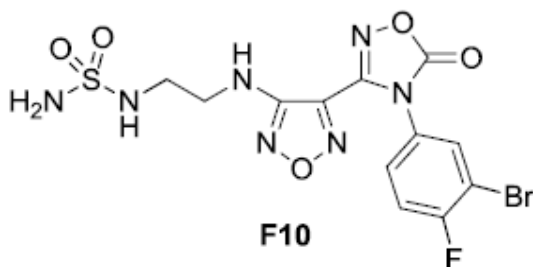


з одержанням сполуки Формули F16:



де:

- 5      кожен  $R^1$  незалежно являє собою амінозахисну групу; і  
        $R^3$  являє собою  $C_{1-6}$  алкіл або бензил.  
       В деяких варіантах реалізації винаходу  $R_1$  являє собою  $C_{2-4}$  алкеніл- $C_{1-3}$  алкіл або феніл- $C_{1-3}$  алкіл, де вказаний феніл- $C_{1-3}$  алкіл необов'язково заміщений 1, 2 або 3 10 незалежно вибраними  $C_{1-4}$  алкоксигрупами.
- 10      В деяких варіантах реалізації  $R^1$  являє собою  $C_{2-4}$  алкеніл- $C_{1-3}$  алкіл або феніл- $C_{1-3}$  алкіл, де вказаний феніл- $C_{1-3}$  алкіл необов'язково заміщений 1, 2 або 3 метоксигрупами.  
       В деяких варіантах реалізації винаходу  $R_1$  являє собою аліл. 15  
       В деяких варіантах реалізації  $R^1$  являє собою 4-метоксибензил.  
       В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою  $C_{1-6}$  алкіл.
- 15      В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою трет-бутил.  
       В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою  $C_{1-4}$  алкіл.  
       В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою бутил. 20
- Переважно, реакцію проводять в присутності відновлювального агента. Відновлювальний агент може являти собою будь-яку сполуку, здатну відновлювати органічну сполуку до більше  
 20      низького ступеня окислення. В деяких варіантах реалізації винаходу відновлювальний агент може являти собою газоподібний гідроген в присутності каталізатора або гідридний реагент (такий як  $NaB(OAc)_3H$ ,  $NaBH_4$ ,  $LiAlH_4$  і т.п.); із застосуванням трифенілфосфіну; або із застосуванням комбінації йодиду натрію, хлортриметилсилану і метанолу. В деяких варіантах реалізації вказана стадія може бути проведена в присутності кислоти, такої як трифтороцтова  
 25      кислота. 5 Придатні розчинники для вказаної стадії включають ізопропіловий спирт, ТГФ, діоксан або т.п. В деяких варіантах реалізації вказана стадія може бути проведена при температурі від приблизно  $-15^\circ C$  до приблизно  $30^\circ C$ , наприклад, від приблизно  $-15^\circ C$  до приблизно  $0^\circ C$ , від приблизно  $-5^\circ C$  до приблизно  $5^\circ C$ , від приблизно  $-5^\circ C$  до приблизно  $0^\circ C$ , від приблизно  $0$  до  $5^\circ C$  або від приблизно  $0^\circ C$  до приблизно  $45^\circ C$ . 10
- 30      В деяких варіантах реалізації винаходу вказане приведення в контакт проводять в компоненті розчинника, що містить тетрагідрофуран.  
       В деяких варіантах реалізації вказане приведення в контакт проводять в присутності відновлювального агента.
- 35      В деяких варіантах реалізації вказаний відновлювальний агент являє собою 15 боргідридний відновлювальний агент.  
       В деяких варіантах реалізації винаходу вказаний боргідридний відновлювальний агент являє собою триацетоксиборгідрид.
- В деяких варіантах реалізації вказане приведення в контакт проводять в присутності трифтороцтової кислоти. 20
- 40      В деяких варіантах реалізації даний винахід додатково включає зняття захисту з вказаної сполуки Формули F16 з одержанням сполуки Формули F10:



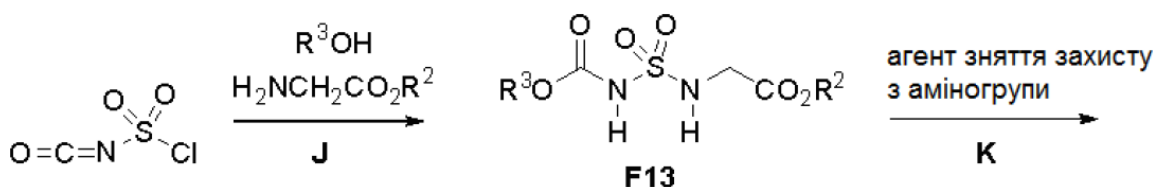
Обробка сполуки F16 для заміни R<sup>1</sup>N на NH<sub>2</sub> може бути проведена за способом зняття конкретних амінозахисних груп, відомих спеціалістам в даній області техніки, 25 таким як описані в книзі Wuts and Greene, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 4-е вид., сс. 696-926, John Wiley & Sons: New York, 2006. В деяких варіантах реалізації, якщо R<sup>1</sup> являє собою аліл, то агент для зняття захисту може являти собою паладієвий каталізатор (наприклад, Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>, Pd/C або Pd(dba)DPPB). В деяких варіантах реалізації, якщо R<sup>1</sup> являє собою 4-метоксибензил, то агент для зняття захисту може містити органічну кислоту (таку як трифтороцтова кислота або метансульфонова кислота і т.п.); неорганічну кислоту (таку як хлорводнева кислота); гідроген і паладій; або натрій в рідкому аміаку. Зняття захисту може бути проведено при температурі від приблизно 30 °C до приблизно 90 °C, наприклад, від приблизно 50 °C до приблизно 100 °C або від приблизно 60 °C до приблизно 80 °C. 5

В деяких варіантах реалізації вказане зняття захисту включає приведення в контакт сполуки Формули F16 з трифтороцтовою кислотою.

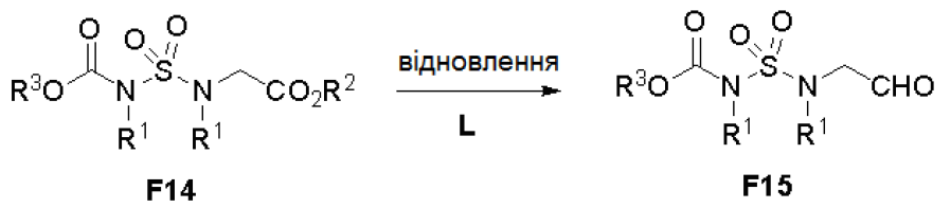
В деяких варіантах реалізації вказане зняття захисту включає приведення в контакт сполуки Формули F16 з хлорводневою кислотою.

Сполука F15 може бути одержана тристадійним способом (стадії J, K і L) з 10 хлорсульфонілізоціанату, як показано на Схемі 4.

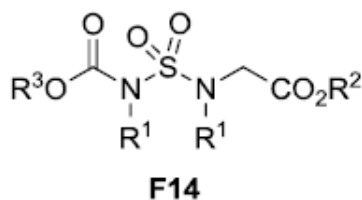
#### Схема 4



агент зняття захисту  
з аміногрупи  
**K**



Відповідно, в даній заявці додатково запропонований спосіб, в якому вказану сполуку Формули F15 одержують за способом, що включає обробку сполуки Формули F14:



відновлювальним агентом з одержанням вказаної сполуки Формули F15; де  $R^2$  являє собою  $C_{1-4}$  алкіл; і  $R^3$  визначений *supra*.

В деяких варіантах реалізації  $R^2$  являє собою метил.

В деяких варіантах реалізації  $R^2$  являє собою етил.

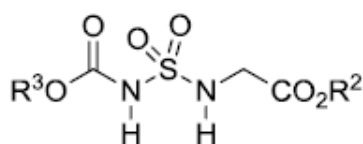
- 5 В деяких варіантах реалізації відновлення може бути проведено гібридом діізобутилалюмінію (DIBAL-H). Придатні розчинники включають галогеновані вуглеводневі розчинники, такі як дихлорметан, хлороформ, дихлоретан, тетрачлоретан і т.п. В деяких варіантах реалізації відновлення може бути проведено приблизно при 5 кімнатній температурі, наприклад, від приблизно  $-80^\circ\text{C}$  до приблизно  $30^\circ\text{C}$ , від приблизно  $-78^\circ\text{C}$  до приблизно  $0^\circ\text{C}$ , від приблизно  $0^\circ\text{C}$  до приблизно  $30^\circ\text{C}$  або від приблизно  $25^\circ\text{C}$  до приблизно  $30^\circ\text{C}$ .

- 10 В деяких варіантах реалізації вказану обробку проводять в галогенованому вуглеводневому розчиннику. 10

В деяких варіантах реалізації винаходу вказаний галогенований вуглеводневий розчинник являє собою дихлорметан.

- 15 В деяких варіантах реалізації винаходу вказаний відновлювальний агент являє собою гібрид діізобутилалюмінію.

В деяких варіантах реалізації вказану сполуку Формули F14 одержують за 15 способом, що включає захист сполуки Формули F13:



**F13**

- 20 одним або більше незалежно вибраними амінозахисними агентами з одержанням сполуки Формули F14.

Захисна група  $R^1$  в F14 може бути вибрана з різних амінозахисних груп, відомих 20 в даній області техніки (*supra*). В деяких варіантах реалізації амінозахисний агент являє собою алілбромід або 4-метоксибензилхлорид.

- 25 В деяких варіантах реалізації вказані один або більше амінозахисних агентів вибрані з алілброміду і 4-метоксибензилхлориду.

В деяких варіантах реалізації захист проводять в присутності основи.

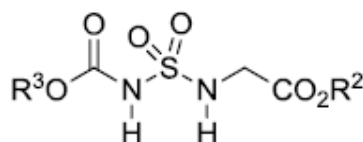
В деяких варіантах реалізації вказана основа являє собою карбонат калію.

- 30 В деяких варіантах реалізації вказаний захист проводять в компоненті розчинника, що містить ацетонітрил.

В деяких варіантах реалізації одержання сполуки F13 може бути проведено обробкою хлорсульфонізоціанату спиртом  $R^3\text{OH}$  (де  $R^3$  визначений вище) і естером гліцину  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{R}^2$ , де  $R^2$  являє собою  $C_{1-4}$  алкіл. В деяких варіантах реалізації вказану стадію J проводять в присутності органічної кислоти (такої як оцтова кислота, бензойна кислота, трифтороцтова кислота). Придатні розчинники для вказаної стадії включають дихлорметан, хлороформ, дихлоретан, тетрачлоретан і т.п.

- 35

В деяких варіантах реалізації даної заявки запропонована сполука Формули F13:

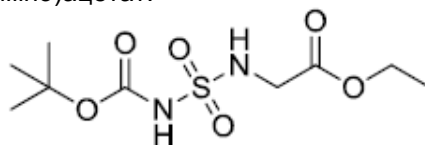


**F13**

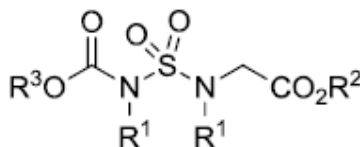
де:

- 40  $R^2$  являє собою  $C_{1-4}$  алкіл; і  
 $R^3$  являє собою  $C_{1-6}$  алкіл або бензил.  
В деяких варіантах реалізації  $R^2$  являє собою метил. 10  
В деяких варіантах реалізації  $R^2$  являє собою етил.  
В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою  $C_{1-6}$  алкіл.  
45 В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою трет-бутил.

В деяких варіантах реалізації сполука Формули F13 являє собою етил-2-((N- (трет-бутоксикарбоніл)сульфамоїл)аміно)ацетат:



В деяких варіантах реалізації даного винаходу додатково запропонована сполука Формули F14:



**F14**

де:

кожен R<sup>1</sup> незалежно являє собою амінозахисну групу;

R<sup>2</sup> являє собою C<sub>1-4</sub> алкіл; і

R<sup>3</sup> являє собою C<sub>1-6</sub> алкіл або бензил.

В деяких варіантах реалізації винаходу R<sup>1</sup> являє собою C<sub>2-4</sub> алкеніл-C<sub>1-3</sub> алкіл або феніл-C<sub>1-3</sub> алкіл, де вказаний феніл-C<sub>1-3</sub> алкіл необов'язково заміщений 1, 2 або 3 25 незалежно вибраними C<sub>1-4</sub> алкоксигрупами.

В деяких варіантах реалізації винаходу R<sup>1</sup> являє собою аліл.

В деяких варіантах реалізації R<sup>1</sup> являє собою 4-метоксибензил.

В деяких варіантах реалізації R<sup>2</sup> являє собою метил.

В деяких варіантах реалізації R<sup>2</sup> являє собою етил.

В деяких варіантах реалізації R<sup>3</sup> являє собою C<sub>1-6</sub> алкіл.

В деяких варіантах реалізації R<sup>3</sup> являє собою трет-бутил.

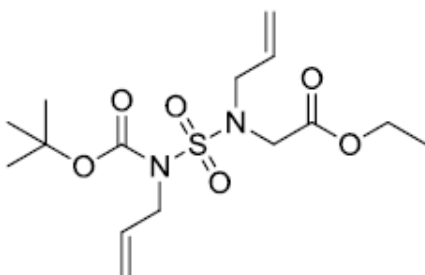
В деяких варіантах реалізації R<sup>3</sup> являє собою C<sub>1-4</sub> алкіл.

В деяких варіантах реалізації R<sup>3</sup> являє собою бутил.

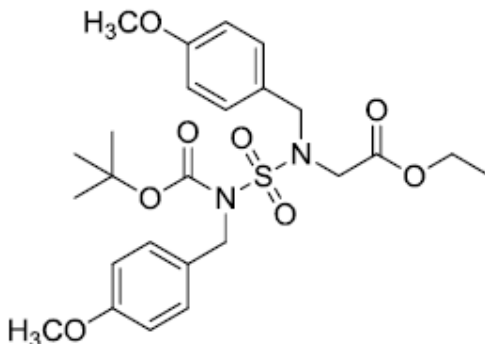
В деяких варіантах реалізації R<sup>3</sup> являє собою C<sub>1-4</sub> алкіл.

В деяких варіантах реалізації R<sup>3</sup> являє собою бутил.

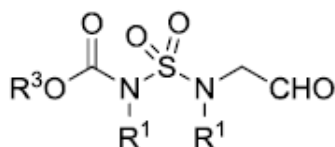
В деяких варіантах реалізації сполука Формули F14 являє собою етил-2-(аліл(N- аліл-N- (трет-бутоксикарбоніл)сульфамоїл)аміно)ацетат:



В деяких варіантах реалізації сполука Формули F14 являє собою етил-2-(4- метоксибензил- (N-4-метоксибензил-N-(трет-бутоксикарбоніл)сульфамоїл)аміно)-ацетат:



В деяких варіантах реалізації даної заявки запропонована сполука Формули F15:

**F15**

де:

$R^3$  являє собою  $C_{1-6}$  алкіл або бензил; і

кожен  $R^1$  незалежно являє собою амінозахисну групу.

- 5 В деяких варіантах реалізації винаходу  $R^1$  являє собою  $C_{2-4}$  алкеніл- $C_{1-3}$  алкіл або феніл- $C_{1-3}$  алкіл, де вказаний феніл- $C_{1-3}$  алкіл необов'язково заміщений 1, 2 або 3 незалежно вибраними  $C_{1-4}$  алкоксигрупами.

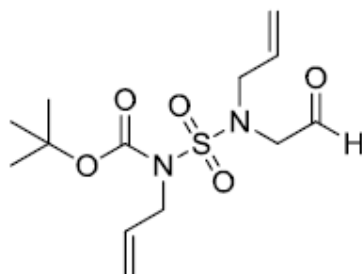
В деяких варіантах реалізації винаходу  $R^1$  являє собою аліл.

В деяких варіантах реалізації  $R^1$  являє собою 4-метоксибензил.

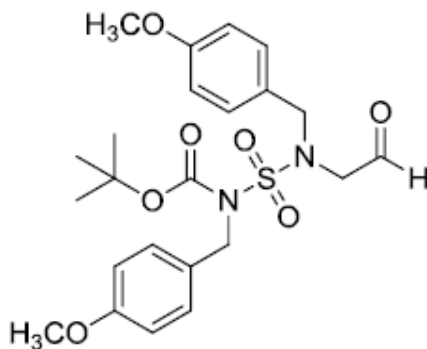
- 10 В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою  $C_{1-6}$  алкіл.

В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою трет-бутил.

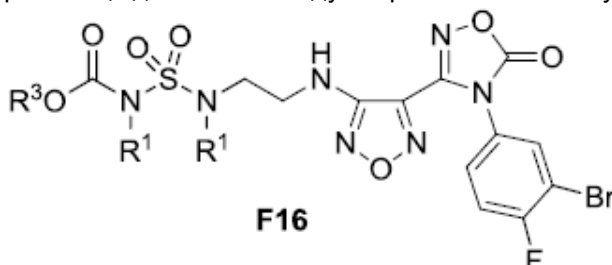
В деяких варіантах реалізації сполука Формули F15 являє собою трет-бутилаліл{[аліл(2-оксоетил)аміно]сульфоніл}карбамат:



- 15 В деяких варіантах реалізації сполука Формули F15 являє собою трет-бутил(4-метоксибензил){[(4-метоксибензил)(2-оксоетил)аміно]сульфоніл}карбамат:



В деяких варіантах реалізації даного винаходу запропонована сполука Формули F16:

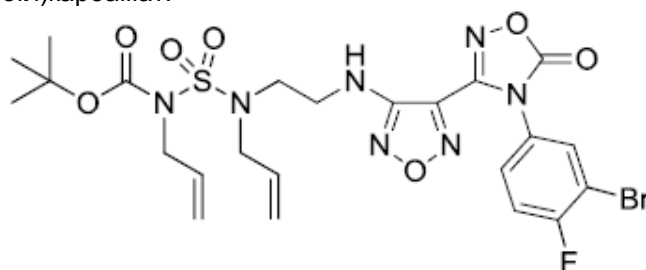
**F16**

- 20 де  $R^3$  являє собою  $C_{1-6}$  алкіл або бензил, і кожен  $R^1$  незалежно являє собою амінозахисну групу.

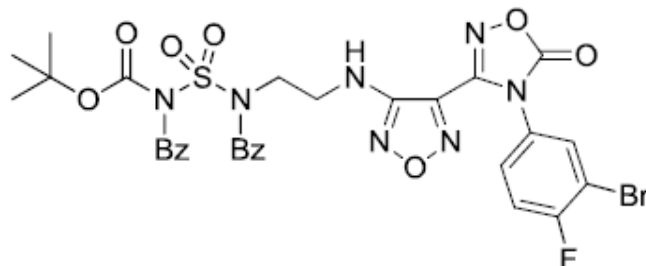
В деяких варіантах реалізації винаходу  $R^1$  являє собою  $C_{2-4}$  алкеніл- $C_{1-3}$  алкіл або феніл- $C_{1-3}$  алкіл, де вказаний феніл- $C_{1-3}$  алкіл необов'язково заміщений 1, 2 або 3 20 незалежно вибраними  $C_{1-4}$  алкоксигрупами.

- 25 В деяких варіантах реалізації винаходу  $R^1$  являє собою аліл.

- В деяких варіантах реалізації  $R^1$  являє собою 4-метоксибензил.  
 В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою  $C_{1-6}$  алкіл.  
 В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою трет-бутил.  
 В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою  $C_{1-4}$  алкіл.  
 5 В деяких варіантах реалізації  $R^3$  являє собою бутил.  
 В деяких варіантах реалізації сполука Формули F16 являє собою трет-бутилаліл(N-аліл-N-(2-(4-(4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл)-1,2,5-оксадіазол-3-іламіно)етил)сульфамойл)карбамат:

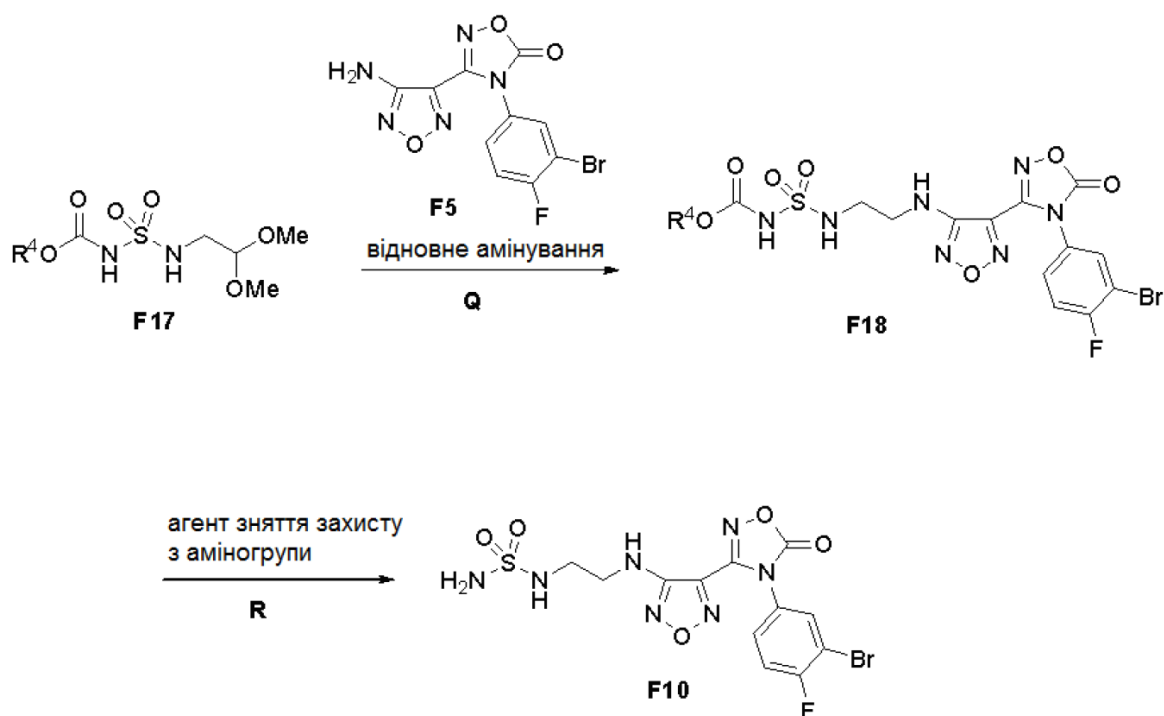


- 10 В деяких варіантах реалізації сполука Формули F16 являє собою трет-бутил-(4-метоксибензил)-(N-(4-метоксибензил)-N-(2-(4-(4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл)-1,2,5-оксадіазол-3-іламіно)етил)сульфамойл)карбамат:

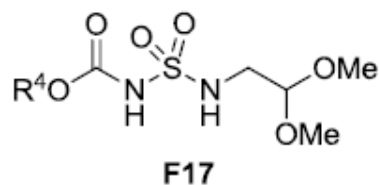


На Схемі 5 представлений альтернативний шлях для одержання сполуки Формули F10.

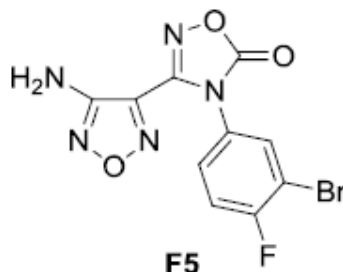
**Схема 5**



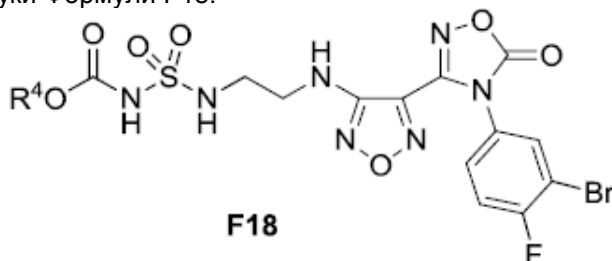
- 15 В даній заявці запропонований також спосіб, що включає приведення в контакт сполуки Формули F17:



де  $R^4$  являє собою  $C_{1-6}$  алкіл,  $C_{1-6}$  галогеналкіл, бензил або 9H-флуорен-9-ілметил, з сполукою Формули F5: - - -



5 з одержанням сполуки Формули F18:



В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою трет-бутил.

В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою бензил.

В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою етил.

10 В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою  $C_{1-3}$  галогеналкіл.

В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою 2,2,2-трихлоретил.

В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою 9H-флуорен-9-ілметил.

На вказаній стадії Q сполуки F18 можуть бути одержані, в деяких варіантах реалізації, шляхом взаємодії F17 з амінами Формули F5 в присутності відновлювального агенту.

15 В деяких варіантах реалізації вказане приведення в контакт проводять в 10 присутності відновлювального агенту.

Відновлювальний агент може являти собою будь-яку сполуку, спосіб відновлення органічної сполуки до більш низького ступеня окислення, наприклад, із застосуванням органосилану, такого як три( $C_{1-3}$  алкіл)силан (наприклад, триетилсилан); елементарного гідрогену або із застосуванням гідридного реагенту 15 (такого як  $NaB(OAc)_3H$ ,  $NaBH_4$ ,  $LiAlH_4$  і т.п.); із застосуванням трифенілфосфіну; або із застосуванням комбінації йодиду натрію, хлортриметилсилану і метанолу. В деяких варіантах реалізації вказана стадія може бути проведена в присутності кислоти, такої як трифтороцтова кислота. Придатні розчинники включають, але необмежуються ними, галогеновані вуглеводневі розчинники (наприклад, дихлорметан, хлороформ, 20 дихлоретан або тетрахлоретан). В деяких варіантах реалізації винаходу галогенований вуглеводневий розчинник являє собою 1,2-дихлоретан.

В деяких варіантах реалізації вказаний відновлювальний агент являє собою органосилан.

В деяких варіантах реалізації вказаний відновлювальний агент являє собою 25 три( $C_{1-3}$  алкіл)силан.

30 В деяких варіантах реалізації вказаний відновлювальний агент являє собою триетилсилан.

В деяких варіантах реалізації вказане приведення в контакт проводять в присутності органічної кислоти.

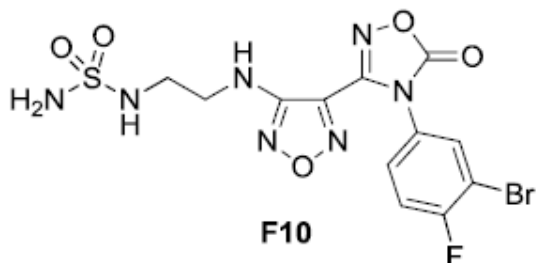
В деяких варіантах реалізації винаходу вказана органічна кислота являє собою трифтороцтову кислоту.

35 В деяких варіантах реалізації вказана органічна кислота являє собою метансульфонову кислоту. В деяких варіантах реалізації винаходу вказане приведення в контакт проводять в компоненті розчинника, що містить галогенований вуглеводневий розчинник.

В деяких варіантах реалізації винаходу вказаний галогенований вуглеводневий розчинник являє собою дихлорметан.

В деяких варіантах реалізації вказаний галогенований вуглеводневий розчинник 5 являє собою 1,2-дихлоретан.

- 5 В деяких варіантах реалізації спосіб додатково включає зняття захисту з вказаної сполуки Формули F18 з одержанням сполуки Формули F10:

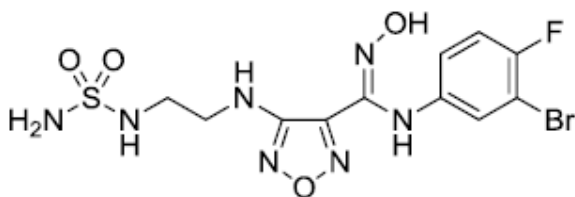


- В деяких варіантах реалізації способи зняття конкретних амінозахисних груп (таких як карбамати) відомі спеціалістам в даній області техніки і описані, наприклад, в книзі Wuts and Greene, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 4 вид., сс. 696-926, John Wiley & Sons: New York, 2006. Наприклад, трет-бутоксикарбонільна група (наприклад, якщо R4 являє собою трет-бутил) може бути видалена (наприклад, гідролізована) з атома нітрогену, наприклад, обробкою кислотою (такою як хлорводнева кислота, трифтороцтова кислота, толуолсульфонова кислота і т.п.); комбінацією реагентів (наприклад, сумішшю ацетилхлориду та метанолу), які, як відомо, утворюють кислоту; або кислотою Льюїса (наприклад, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O). Бензилоксикарбонільна група (наприклад, якщо R4 являє собою бензил) може бути видалена (наприклад, гідролізована) з атома нітрогену, наприклад, обробкою гідрогеном і каталізатором (таким як паладій на вугіллі). Метоксикарбонільні етоксикарбонільні групи (тобто якщо R4 являє собою метил або етил) можуть бути видалені обробкою неорганічною основою (такою як KOH або K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); комбінацією реагентів (наприклад, сумішшю ацетилхлориду, йодиду натрію і ацетонітрилу); або обробкою кислотою (наприклад, HBr, AcOH). 2,2,2-Трихлоретоксикарбонільна група 25 може бути видалена, наприклад, обробкою каталізатором (наприклад, Zn/AcOH або Cd/AcOH). Придатні розчинники для вказаної стадії включають, але необмежуються ними, метанол або тетрагідрофуран (ТГФ), ацетонітрил і т.п. В деяких варіантах реалізації обробку проводять при температурі від приблизно 30 °C до приблизно 90 °C, наприклад, від приблизно 50 °C до приблизно 100 °C або від приблизно 60 °C до приблизно 80 °C.

В деяких варіантах реалізації винаходу вказане зняття захисту включає приведення в контакт сполуки Формули F18 з цинком в присутності оцтової кислоти.

- 30 В деяких варіантах реалізації вказане зняття захисту проводять в компоненті 5 розчинника, що містить тетрагідрофуран.

В деяких варіантах реалізації Спосіб додатково включає приведення в контакт вказаної сполуки Формули F10 з основою з одержанням сполуки Формули I:



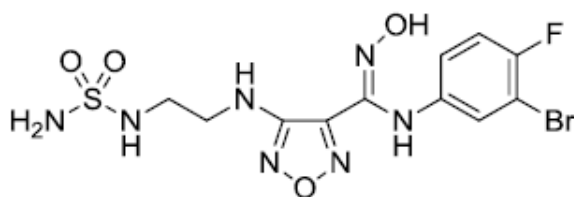
**I.**

- 35 В деяких варіантах реалізації вказана основа містить гідроксид лужного металу.

В деяких варіантах реалізації вказаний гідроксид лужного металу являє собою гідроксид натрію.

В деяких варіантах реалізації вказане приведення в контакт проводять в компоненті розчинника, що містить тетрагідрофуран, воду і етанол.

- 40 В деяких варіантах реалізації винаходу спосіб додатково включає перетворення вказаної сполуки Формули F18 в сполуку Формули I:



I,

де вказане перетворення включає об'єднання сполуки Формули F18 з основою з одержанням першої суміші. В деяких варіантах реалізації основа являє собою N, N- біс(2-аміноетил)етан-1,2-діамін.

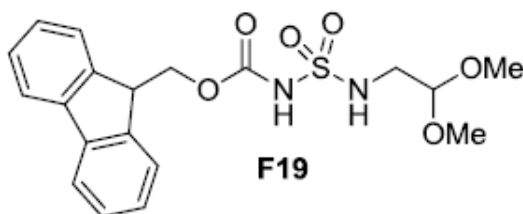
5 В деяких варіантах реалізації перетворення додатково включає додавання кислоти до першої суміші. В деяких варіантах реалізації вказана кислота являє собою водну сильну кислоту. В деяких варіантах реалізації вказана водна сильна кислота 25 являє собою водну хлорводневу кислоту.

В деяких варіантах реалізації вказане перетворення проводять в компоненті розчинника, що містить тетрагідрофуран і етилацетат.

10

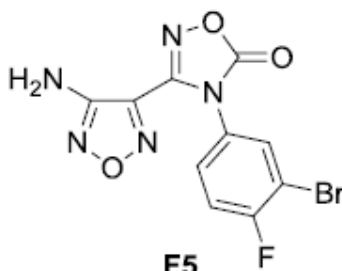
В даній заявці також запропонований спосіб, що включає:

i) приведення в контакт сполуки Формули F19: - - -



F19

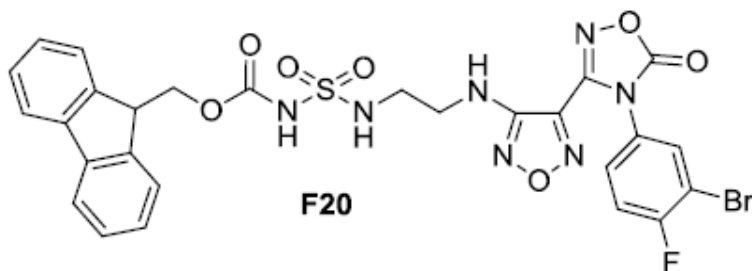
з сполукою Формули F5:



F5

15

в присутності триетилсилану та метансульфонової кислоти з одержанням сполуки Формули F20:

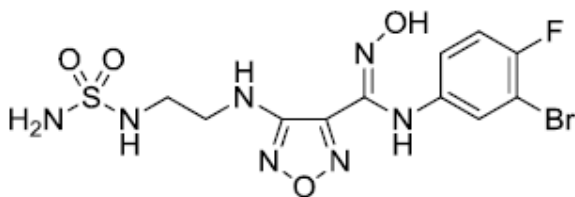


F20

та

20

ii) перетворення вказаної сполуки Формули F20 в сполуку Формули I:

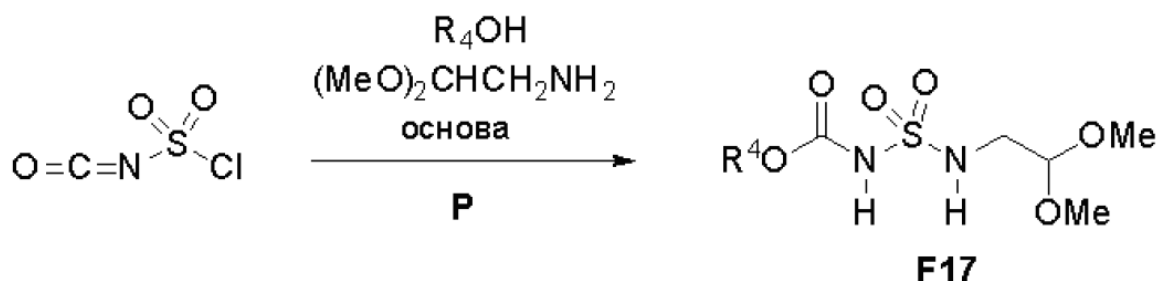


I,

де вказане перетворення включає об'єднання вказаної сполуки Формули F20 з N,N-біс(2-аміноетил)етан-1,2-діаміном. В деяких варіантах реалізації вказане перетворення додатково включає додавання водної хлорводневої кислоти після вказаного 15 об'єднання.

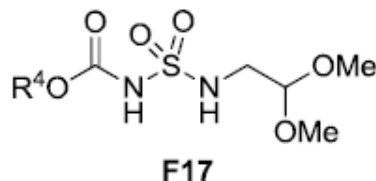
Сполука F17 може бути одержана одностадійним способом (стадія P) з  
5 хлорсульфонілізоціанату, як показано на Схемі 6.

### Схема 6



В деяких варіантах реалізації винаходу одержання сполуки Формули F17 може бути проведено шляхом обробки хлорсульфонілізоціанату 2,2-диметоксиетанаміном і спиртом R<sup>4</sup>OH (R<sup>4</sup> визначений вище), необов'язково в розчиннику (наприклад, галогенованому вуглеводневому розчиннику, такому як дихлорметан, хлороформ, 5 дихлоретан, тетрахлоретан). В деяких  
10 варіантах реалізації вказану стадію проводять в присутності основи. Основа може являти собою органічну основу, таку як ациклічний амін (наприклад, триетиламін, діізопропілетиламін (DIPEA) і т.п.) або циклічний амін (наприклад, піролідин, піперидин і т.п.); або неорганічну основу, таку як луг (наприклад, NaOH, LiOH, KOH, Mg(OH)<sub>2</sub> і т.п.). У деяких варіантах реалізації винаходу  
15 реакцію проводять в розчиннику, наприклад, в галогенованому вуглеводневому розчиннику, такому як дихлорметан, хлороформ, дихлоретан або тетрахлоретан.

В деяких варіантах реалізації даної заявки додатково запропонована сполука Формули F17:



де R<sup>4</sup> являє собою C<sub>1-6</sub> алкіл, C<sub>1-6</sub> галогеналкіл або бензил.

20 В деяких варіантах реалізації R<sup>4</sup> являє собою трет-бутил.

В деяких варіантах реалізації R<sup>4</sup> являє собою бензил.

В деяких варіантах реалізації R<sup>4</sup> являє собою етил.

В деяких варіантах реалізації R<sup>4</sup> являє собою C<sub>1-3</sub> галогеналкіл.

В деяких варіантах реалізації R<sup>4</sup> являє собою 2,2,2-трихлоретил.

25 В деяких варіантах реалізації R<sup>4</sup> являє собою 9H-флуорен-9-ілметил.

В деяких варіантах реалізації сполука Формули F17 являє собою трет-бутил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамоїлкарбамат.

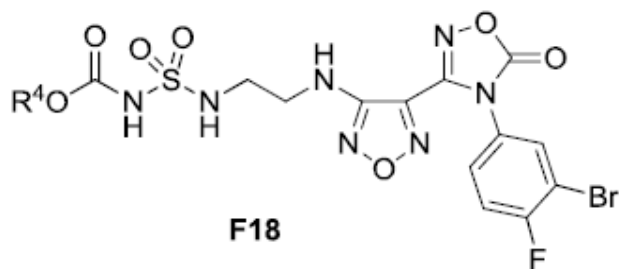
В деяких варіантах реалізації сполука Формули F17 являє собою бензил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамоїлкарбамат.

30 В деяких варіантах реалізації сполука Формули F17 являє собою етил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамоїлкарбамат.

В деяких варіантах реалізації сполука Формули F17 являє собою 2,2,2- трихлоретил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамоїлкарбамат.

В деяких варіантах реалізації сполука Формули F17 являє собою (9H-флуорен-9-іл)метил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамоїлкарбамат.

35 В деяких варіантах реалізації даної заявки додатково запропонована сполука Формули F18:



де  $R^4$  являє собою  $C_{1-6}$  алкіл,  $C_{1-6}$  галогеналкіл або бензил.

В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою трет-бутил.

В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою бензил.

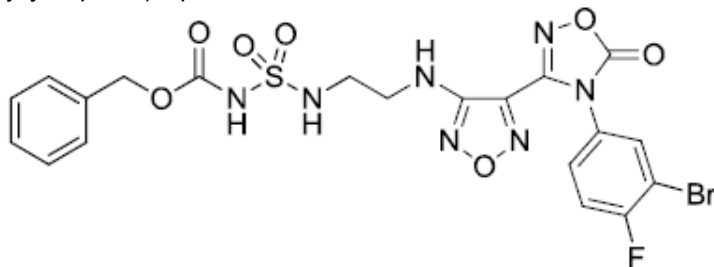
5 В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою етил.

В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою  $C_{1-3}$  галогеналкіл.

В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою 2,2,2-трихлоретил. 15

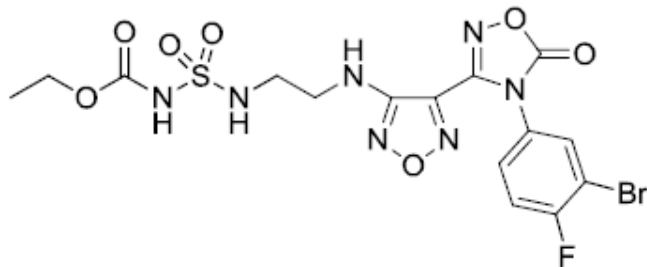
В деяких варіантах реалізації  $R^4$  являє собою 9H-флуорен-9-ілметил.

10 В деяких варіантах реалізації сполука Формули F18 являє собою бензил-((2- ((4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл)-1,2,5-оксадіазол-3-іл)аміно)етил)аміно)сульфоніл)карбамат:

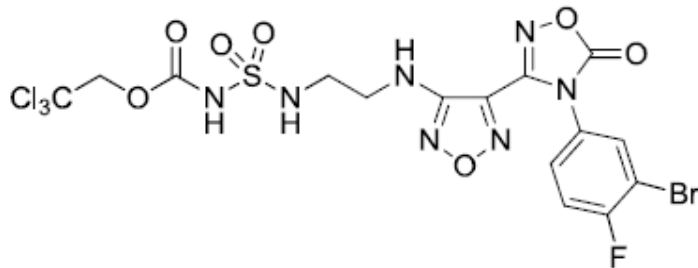


В деяких варіантах реалізації сполука Формули F18 являє собою етил-((2- ((4- (3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл)-1,2,5-оксадіазол-3-іл)аміно)етил)аміно)сульфоніл)карбамат:

15

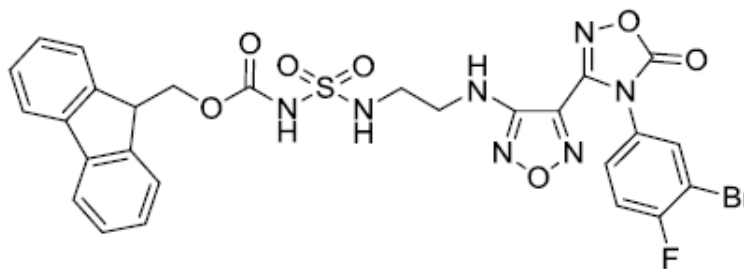


В деяких варіантах реалізації сполука Формули F18 являє собою 2,2,2- трихлоретил-((2- ((4- (3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл)-1,2,5-оксадіазол-3-іл)аміно)етил)аміно)сульфоніл)карбамат:



20

В деяких варіантах реалізації сполука Формули F18 являє собою (9H-флуорен-9- іл)метил-N-(2-((4-(4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл)-1,2,5-оксадіазол-3-іл)аміно)етил)сульфамоїл)карбамат:



В даному контексті термін "алкіл", що використовується самостійно або разом з термінами додаткового фрагмента, стосується лінійної або розгалуженої насиченої вуглеводневої групи, що має від 1 до 6 атомів карбону, від 1 до 4 атомів карбону або від 1 до 3 атомів карбону. Приклади алкільних груп включають метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, втор-бутил, трет-бутил і т.п.

В даному контексті "алкеніл" стосується алкільної групи, що має одну або 15 більше подвійних карбон-карбонових зв'язків. В деяких варіантах реалізації вказана алкільна група має від 2 до 6 атомів карбону, від 2 до 4 атомів карбону або від 2 до 3 атомів карбону. Ілюстративні алкенільні групи включають етеніл (вініл), пропеніл і т.п.

В даному контексті "алкеніалкіл" стосується групи формули -алкіл-алкеніл. В деяких варіантах реалізації винаходу алкеніалкільна група являє собою аліл.

В даному контексті термін "галогеналкіл", що використовується самостійно або разом з додатковим фрагментом, стосується алкільної групи, заміщеної одним або більше атомів галогену, незалежно вибраними з F, Cl, Br і I. Ілюстративні галогеналкільні групи включають CF<sub>3</sub>, CHF<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> і т.п.

В контексті даного документу термін "алкокси" стосується групи -О-алкіл. В деяких варіантах реалізації алкільна група має від 1 до 6 атомів карбону, від 1 до 4 атомів карбону або від 1 до 3 атомів карбону. Ілюстративні алкоксигрупи включають 5 метокси, етокси, пропокси (наприклад, н-пропокси і ізопропокси), трет-бутокси і т.п.

В даному контексті "триалкіламін" стосується атому нітрогену, заміщеному трьома незалежно вибраними алкільними групами. В деяких варіантах реалізації винаходу кожна алкільна група має від 2 до 6 атомів карбону, від 2 до 4 атомів карбону або від 2 до 3 атомів карбону. Ілюстративні триалкіламініні групи включають 10 триметиламін, триетиламін і т.п.

В контексті даного документу термін "алкоксикарбоніл" стосується групи формули -C(O)-О-алкіл. В деяких варіантах реалізації алкільна група має від 2 до 6 атомів карбону, від 2 до 4 атомів карбону або від 2 до 3 атомів карбону. Ілюстративні алкоксикарбонільні групи включають етоксикарбоніл, трет-бутоксикарбоніл (Вос) і 15 т.п.

Галогеновані вуглеводневі розчинники означає галогеновані алкани, такі як дихлорметан, хлороформ, дихлоретан або тетрахлоретан, де вказаний алкан може бути розгалуженим або лінійним, що має від 1 до 22 атомів карбону, від 1 до 6 атомів карбону або від 1 до 4 атомів карбону з одним або більше атомів галогену. В деяких 20 варіантах реалізації галогенований вуглеводневий розчинник являє собою хлорований алкан, що містить від 1 до 12 атомів карбону, від 1 до 6 атомів карбону або від 1 до 4 атомів карбону.

У різних місцях цього опису замісники сполук відповідно до даного винаходу можуть бути описані в групах або діапазонах. Зокрема, передбачається, що даний 25 винахід включає кожен окрему субкомбінацію членів таких груп або діапазонів.

Передбачається, що сполуки відповідно до даного винаходу є стабільними. В даному контексті "стабільний" відноситься до сполуки, яка є досить міцною, щоб витримувати виділення з реакційної суміші до підходящого ступеня чистоти і переважно до сполуки, яка може бути сформульована в композицію ефективного 30 терапевтичного агента.

Крім того, зрозуміло, що деякі ознаки винаходу, які для ясності описані в різних варіантах реалізації винаходу, також можуть бути об'єднані в один варіант реалізації винаходу. З іншого боку, різні ознаки винаходу, які для стислості описані в одному варіанті реалізації винаходу, також можуть бути представлені окремо або в будь-якій зручній субкомбінації.

Передбачається також, що сполуки відповідно до даного винаходу включають всі можливі геометричні ізомери. Описано цис і транс геометричні ізомери сполук, і вони можуть бути виділені у вигляді суміші ізомерів або у вигляді окремих ізомерних 5 форм.

Сполуки відповідно до даного винаходу включають також таутомерні форми. Таутомерні форми виникають внаслідок обміну одинарного зв'язку з сусідньої подвійним зв'язком і супутнього переходу протона.

Сполуки відповідно до даного винаходу можуть також містити всі ізотопи 10 атомів, які зустрічаються в проміжних або кінцевих сполуках. Ізотопи включають ті атоми, які мають однаковий атомний номер, але різні масові числа. Наприклад, ізотопи гідрогену включають тритій і дейтерій.

У деяких варіантах реалізації сполуки відповідно до даного винаходу і їх солі є по суті виділеними. "По суті виділені" означає, що сполуки є щонайменше частково 15 або по суті виділеними з середовища, в якому вони були отримані чи виявлені. Часткове виділення може включати, наприклад, композиції, збагачені сполуками відповідно до даного винаходу. Значне виділення може включати композиції, що містять щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше 20 приблизно 95 %, щонайменше приблизно 97 % або щонайменше приблизно 99 % по масі сполуки відповідно до даного винаходу або її солі. Способи виділення сполук і їх солей відомі в даній області техніки.

Дана заявка включає також солі сполук, описаних в цьому документі. В даному контексті "солі" відноситься до похідних описаних сполук, в яких вихідну сполуку 25 модифіковано шляхом перетворення існуючого кислотного або основного фрагмента в його сольову форму. Приклади солей включають, але не обмежуються ними, солі мінеральних кислот (таких як HCl, HBr, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) або органічних кислот (таких як оцтова кислота, бензойна кислота, трифтороцтова кислота) з основними залишками, такими як аміни; солі лугів (таких як Li, Na, K, Mg, Ca) або органічних основ (таких як 30 триалкіламоній) з кислотними залишками, такими як карбонові кислоти; і т.п. Солі згідно з цією заявкою можуть бути синтезовані з вихідної сполуки, яка містить основний або кислотний фрагмент, за допомогою звичайних хімічних способів. Як правило, такі солі можуть бути отримані шляхом взаємодії даних сполук у вільній кислотній або основній формах із стехіометричною кількістю відповідної основи або кислоти у воді або в органічному розчиннику або в їх суміші; в цілому переважно є неводне середовище, таке як етер, етилацетат, етанол, ізопропанол або ацетонітріл (ACN).

Дана заявка включає також фармацевтично прийнятні солі сполук, описаних в 5 цьому документі. "Фармацевтично прийнятні солі" включають підмножину "солей", описаних вище, які представляють собою звичайні нетоксичні солі вихідної сполуки, отримані, наприклад, з нетоксичних неорганічних або органічних кислот. Список відповідних солей представлений в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17 вид., Mack Publishing Company, Істон, штат Пенсильванія, 1985, с. 1418, і в Journal of 10 Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), повний зміст кожного з яких включено в цей документ за допомогою посилання. Фраза "фармацевтично прийнятний" використовується в даному описі для позначення таких сполук, матеріалів, композицій і/або лікарських форм, які з медичної точки зору, є придатними для застосування в контакті з тканинами людини і тварин без надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції або іншої проблеми або ускладнення, пропорційно з розумним співвідношенням користі/ризиків.

Способи, описані в цьому документі, можна контролювати відповідно до будь-якого підходящого способу, відомого в даній області техніки. Наприклад, за утворенням продукту можна стежити за допомогою спектроскопії, такої як 20 спектроскопія ядерного магнітного резонансу (наприклад, <sup>1</sup>H або <sup>13</sup>C), інфрачервона спектроскопія, спектрофотометрія (наприклад, УФ-видима область) або мас-спектрометрії; або за допомогою хроматографії, такої як високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) або тонкошарова хроматографія. Сполуки, отримані в реакціях, можуть бути очищені будь-яким підходящим способом, відомим в даній області 25 техніки. Наприклад, хроматографією (середнього тиску) на відповідному адсорбенті (наприклад, силікагелі, оксиді алюмінію і т.п.), ВЕРХ або препаративної тонкошарової хроматографії; дистиляцією; сублімацією; розтиранням або перекристалізацією. Чистоту сполук, в цілому, визначають фізичними методами, такими як вимірювання температури плавлення (в разі твердої речовини), отримання ЯМР спектру або виконання ВЕРХ розділення. При зниженні температури плавлення, при зниженні небажаних сигналів в ЯМР спектрі або при усуненні сторонніх піків при ВЕРХ виявленні, можна сказати, що сполуку очищено. У деяких варіантах реалізації винаходу сполуки є по суті очищеними.

Отримання сполук може включати захист і зняття захисту з різних хімічних груп. Фахівцем в даній області без праці може бути встановлена необхідність в захисті або зняття захисту, а також здійснено вибір відповідних захисних груп. Хімія захисних груп описана, наприклад, в книзі Wuts and Greene, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 4те вид., John Wiley & Sons: New York, 2006, повний зміст якої включено в 5 цей документ за допомогою посилання.

Реакції способів, описаних у цьому документі, можуть бути виконані у відповідних розчинниках, які фахівець в області органічного синтезу може легко підібрати. Відповідні розчинники повинні бути по суті інертними по відношенню до вихідних речовин (реагентів),

проміжних сполук або продуктів при температурах 10 проведення реакцій, тобто при температурах, які можуть бути в інтервалі від температури замерзання розчинника до температури кипіння розчинника. Дана реакція може бути виконана в одному розчиннику або в суміші більше ніж одного розчинника. Залежно від стадії реакції може бути вибраний відповідний розчинник(и) для певної стадії реакції. Відповідні розчинники включають воду, алкани (такі як пентан, гексани, 15 гептани, циклогексан і т.п. або їх суміш), ароматичні розчинники (такі як бензол, толуол, ксилол і т.п.), спирти (такі як метанол, етанол, ізопропанол і т.п.), етери (такі як діалкілетиери, метил-трет-бутиловий етер (МТБЕ), тетрагідрофуран (ТГФ), діоксан і т.п.), естери (такі як етилацетат, бутилацетат і т.п.), галогеновані вуглеводні розчинники (такі як дихлорметан (ДХМ), хлороформ, дихлоретан, тетрахлоретан), 20 диметилформамід (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО), ацетон, ацетонітрил (АСН), гексаметилфосфорамід (НМРА) і N-метилпіролідон (NMP). Такі розчинники можуть бути використані або у вологій, або в безводній формі.

Розділення рацемічних сумішей сполук може бути проведено будь-яким з численних способів, відомих в даній області техніки. Ілюстративний спосіб включає 25 фракційну перекристалізацію з використанням "хіральної розділюючої кислоти", яка є оптично активною солеутворюючою органічною кислотою. Відповідні розділювальні агенти для способів фракційної перекристалізації включають, наприклад, оптично активні кислоти, такі як D і L форми винної кислоти, діацетилвинної кислоти, дібензоїлвинної кислоти, мигдальної кислоти, яблучної кислоти, молочної кислоти або 30 різних оптично активних камфорсульфонових кислот. Розділення рацемічних сумішей також може бути проведено елюювання на колонці, що містить оптично активний розділюючий агент (наприклад, динітробензоїлфенілгліцин). Фахівець у даній галузі техніки може визначити відповідний склад розчинників для елюювання.

#### Способи застосування

Сполуки Формули I можуть пригнічувати активність ферменту індоламін-2,3-діоксигенази (IDO). Наприклад, сполуки Формули I може бути використано для пригнічення активності IDO в клітині або у пацієнта, що потребує модуляції ферменту, 5 за допомогою введення інгібувальної кількості сполуки Формули I.

Сполуки Формули I можуть бути використані в способах інгібування руйнування триптофану в системі, що містить клітини, які експресують IDO, такої як тканина, живий організм або клітинна культура. У деяких варіантах реалізації цієї заявки запропоновані способи зміни (наприклад, підвищення) позаклітинних рівнів 10 триптофану у ссавця за допомогою введення ефективною кількості сполуки Формули I. Способи вимірювання рівнів триптофану і руйнування триптофану відомі в даній області техніки.

Сполуки Формули I можуть бути використані в способах інгібування пригнічення імунітету, такого як IDO-опосередковане пригнічення імунітету, у 15 пацієнта за допомогою введення пацієнтові ефективною кількості сполуки Формули I. IDO-опосередковане пригнічення імунітету може бути пов'язано, наприклад, з раком, ростом пухлини, метастазом, вірусною інфекцією, вірусною реплікацією і т.п.

Сполуки Формули I також можуть бути використані в способах лікування захворювань, пов'язаних з активністю або експресією, включаючи патологічну 20 активність і/або надекспресію IDO у індивідуума (наприклад, пацієнта), шляхом введення індивідууму, що потребує такого лікування, терапевтично ефективною кількості або дози сполуки Формули I або її фармацевтичної композиції. Приклади захворювань можуть включати будь-яке захворювання, розлад або патологічний стан, який прямо або опосередковано пов'язаний з експресією або активністю ферменту IDO, 25 включаючи надекспресію або патологічну активність. Захворювання, пов'язане з IDO, може також включати будь-яке захворювання, розлад або патологічний стан, якому можна запобігти, поліпшити або вилікувати модулюванням активності ферменту. Приклади захворювань, пов'язаних з IDO, включають рак, вірусну інфекцію, таку як інфекція ВІЛ, інфекція ВГС, депресія, нейродегенеративні розлади, такі як хвороба 30 Альцгеймера і хвороба Хантінгтона, травма, вікові катаракти, трансплантація органу (наприклад, відторгнення трансплантата органу) і аутоімунні захворювання, включаючи астму, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, алергічне запалення, запальну хвороба кишечника, псоріаз та системний червоний вовчак. Приклади ракових захворювань, які можна лікувати за способами, описаними у цьому документі, включають рак товстої кишки, підшлункової залози, 45 молочної залози, передміхурової залози, легень, головного мозку, яєчників, шийки матки, яєчок, нирок, голови і шиї, лімфому, лейкоз, меланому і т.п. Сполуки Формули I також можуть бути використано при лікуванні ожиріння і ішемії.

В даному контексті "клітина" відноситься до клітини, яка знаходиться in vitro, ex vivo або in vivo. У деяких варіантах реалізації ex vivo клітина може являти собою частину зразка тканини,

вирізаної з організму, такого як ссавець. У деяких варіантах реалізації *in vitro* клітина може являти собою клітину в клітинній культурі. У деяких варіантах реалізації *in vivo* клітина являє собою клітину, яка живе в організмі, такому як ссавець.

В даному контексті термін "приведення в контакт" відноситься до об'єднання зазначених фрагментів в системі *in vitro* або в системі *in vivo*. Наприклад, "приведення в контакт" ферменту IDO з сполуками Формули I включає введення сполуки Формули I індивідууму або пацієнтові, такому як людина, який має IDO, а також, наприклад, 15 введення сполуки Формули I в зразок, що містить клітинний або очищений препарат, що містить фермент IDO.

В даному контексті терміни "індивідуум" або "пацієнт", використовувані як взаємозамінні, відносяться до будь-якої тварини, включаючи ссавців, переважно мишей, щурів, інших гризунів, кроликів, собак, котів, свиней, велику рогату худобу, 20 овець, коней або приматів, і найпреважніше до людей.

В даному контексті вираз "терапевтично ефективна кількість" відноситься до кількості активної сполуки або фармацевтичного агента, яка викликає біологічний або медичний відгук в тканини, системі, тварині, індивідуумі або людині, необхідний досліднику, ветеринару, лікарю або іншому клініцисту.

В даному контексті термін "лікувати" або "лікування" відноситься до 1) попередження захворювання; наприклад, до попередження захворювання, патологічного стану або розладу у індивідуума, який може бути схильний до захворювання, патологічного стану або розладу, але ще не відчуває або не демонструє патології або симптоматології захворювання; 2) пригнічення захворювання; наприклад, 30 до пригнічення захворювання, патологічного стану або розладу у індивідуума, який відчуває або демонструє патологію або симптоматологію захворювання, патологічного стану або розладу (тобто, до зупинки подальшого розвитку патології і/або симптоматології) або 3) ослаблення захворювання; наприклад, до ослаблення захворювання, патологічного стану або розладу у індивідуума, який відчуває або демонструє патологію або симптоматологію захворювання, патологічного стану або розладу (тобто, реверсування патології і/або симптоматології).

#### Комбінована терапія

Один або більше додаткових фармацевтичних агентів або способів лікування, таких як, наприклад, протівірусні агенти, хіміотерапевтичні або інші протиракові агенти, імунозміцнюючі агенти, імунопригнічуючі агенти, опромінення, протипухлинні та протівірусні вакцини, терапія цитокінами (наприклад, IL2, GM-CSF, і т.п.), і/або інгібітори тирозинкінази, можуть бути використані в комбінації з 10 сполукою Формули I для лікування захворювань, розладів або патологічних станів, пов'язаних з IDO. Зазначені агенти можуть бути скомбіновані з сполукою Формули I в одній лікарській формі, або вказані агенти можуть бути введені одночасно або послідовно у вигляді окремих лікарських форм.

Відповідні протівірусні агенти, передбачені для застосування в комбінації з 15 сполукою Формули I, можуть включати нуклеозидні і нуклеотидні інгібітори зворотної транскриптази (NRTI), ненуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази (NNRTI), інгібітори протеази та інші протівірусні засоби.

Приклади відповідних NRTI включають зидовудин (AZT); діданозин (ddI); залцитабін (ddC); ставудін (d4T); ламивудин (3TC); абакавір (1592U89); адефовір 20 дипівоксил [біс(POM)-PMEA]; лобукавір (BMS-180194); BCH-10652; емітрицитабін [(-)- FTC]; бета-L-FD4 (також має назву бета-L-D4C і має назву бета-L-2',3'-діклеокси-5-фторцитиден); DAPD, ((-)-бета-D-2,6,-діамінопуридин діоксолан); і лоденозин (FddA). Типові відповідні NNRTI включають невірапін (BI-RG-587); делавірадин (BNAF, U-90152); ефавіренц (DMP-266); PNU-142721; AG-1549; MKC-442 (1-(етоксиметил)-5-(1-25 метилетил)-6-(фенілметил)-(2,4(1H, 3H)-піримідиндіон); і (+)-каланолід A (NSC-675451) і B. Типові відповідні інгібітори протеази включають саквінавір (Ro 31-8959); ритонавір (ABT-538); індинавір (MK-639); нелфнавір (AG-1343); ампренавір (141W94); лазинавір (BMS-234475); DMP-450; BMS-2322623; ABT-378; і AG-1 549. Інші протівірусні агенти включають гідроксисечовини, рибавірин, IL-2, IL-12, пентафузід і 30 Yissum Project № 11607.

Відповідні хіміотерапевтичні або інші протиракові агенти включають, наприклад, алкілувальні агенти (включаючи, але не обмежуючись, азотистий іприт, похідні етиленіміну, алкілсульфонати, нітрозосечовини і триазени), такі як урациловий іприт, хлорметін, циклофосфамід (Cytoxan<sup>TM</sup>), іфосфамід, мелфалан, хлорамбуцил, піпоброман, триетиленмеламін, триетилентіофосфориамін, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин і темозоломід.

При лікуванні меланоми відповідні агенти для застосування в комбінації з сполукою Формули I включають: дакарбазин (DTIC), необов'язково разом з іншими 5 хіміотерапевтичними ліками, такими як кармустин (BCNU) і цисплатин; "Дартмутський режим", який складається з

DTIC, BCNU, цисплатину і тамоксифену; комбінацію цисплатину, вінбластин і DTIC; або темозоломід. При лікуванні меланоми сполуки відповідно до даного винаходу також можуть бути скомбіновані з імунотерапевтичними засобами, включаючи цитокіни, такі як інтерферон альфа, 10 інтерлейкін 2 і фактор некрозу пухлини (TNF).

5 При лікуванні меланоми сполука Формули I також може бути використана в комбінації з вакцинною терапією. Антимеланомні вакцини трохи схожі на противірусні вакцини, які використовують для попередження захворювань, викликаних вірусами, такими як віруси поліомієліту, кору і свинки. Ослаблені клітини 15 меланоми або частини клітин меланоми, звані антигенами, можуть бути введені пацієнту за допомогою ін'єкції для стимулювання імунної системи організму для руйнування клітин меланоми.

Меланоми, обмежені руками і ногами, також можна лікувати комбінацією агентів, що містять сполуку Формули I, з використанням технології ізольованої 20 гіпертермічної перфузії кінцівок. Такий протокол лікування тимчасово відокремлює кровотік в ураженій кінцівці від решти тіла і забезпечує ін'єкцію високих доз хіміотерапевтичного агента в артерію, що постачає кінцівку, що створює високі дози в області пухлини без впливу зазначених доз на внутрішні органи, що може в іншому випадку викликати важкі побічні ефекти. Як правило, рідину нагрівають до 102°-104° 25 F. Мелфалан є засобом, який найчастіше використовують у зазначеній хіміотерапевтичній процедурі. Він може бути введений з іншим агентом, що має назву фактор некрозу пухлини (TNF) (див. Розділ, присвячений цитокінам).

20 Відповідні хіміотерапевтичні або інші протиракові агенти включають, наприклад, антиметаболіти (включаючи, але не обмежуючись, антагоністи фолієвої 30 кислоти, аналоги піримідину, аналоги пурину і інгібітори аденозиндезамінази), такі як метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабін, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, фосфат флударабіну, пентостатин і гемцитабін.

25 Відповідні хіміотерапевтичні або інші протиракові агенти додатково включають, наприклад, деякі природні продукти та їх похідні (наприклад, алкалоїди барвінку, протипухлинні антибіотики, ферменти, лімфокіни та епідодифілотоксини), такі як вінбластин, вінкрестин, віндезин, блеоміцин, дактиноміцин, даунорубіцин, доксорубіцин, епірубіцин, ідарубіцин, ага-С, паклітаксел (TAXOL<sup>TM</sup>), мітраміцин, 5 деоксикоформіцин, мітоміцин-С, L-аспарагиназа, 30 інтерферони (особливо IFN-α), етопозид і Теніпозид.

Інші цитотоксичні агенти включають навелбен, CPT-11, анастразол, летразол, капецитабін, релоксафін, циклофосфамід, іфосфамід і дролоксафін.

35 Також придатними є цитотоксичні агенти, такі як епідодифілотоксин; 10 антинеопластичний фермент; інгібітор топоізомерази; прокарбазин; мітоксантрон; координаційні комплекси платини, такі як цисплатин і карбоплатин; модифікатори біологічної відповіді; інгібітори росту; антигормональні терапевтичні агенти; лейковорин; тегафур; і гематопоетичні фактори росту.

Інший протираковий агент(и) включає терапевтичні агенти з антитілами, такі як трастузумаб (Herceptin), антитіла до костимулюючих молекул, такі як CTLA-4, 4-1BB і PD-1, або антитіла до цитокінів (IL-10, TGF-β і т.п.).

40 Інші протиракові агенти включають також агенти, які блокують міграцію імунних клітин, такі як антагоністи до рецепторів хемокінів, включаючи CCR2 і CCR4.

Інші протиракові агенти включають також агенти, які зміцнюють імунну 20 систему, такі як ад'юванти або адаптивне перенесення Т-клітин.

Протиракові вакцини включають дендритні клітини, синтетичні пептиди, ДНК вакцини і 45 рекомбінантні віруси.

Способи безпечного і ефективного введення більшості із зазначених хіміотерапевтичних агентів відомі фахівцям в даній області техніки. Крім того, їх 25 введення описано в стандартній літературі. Наприклад, введення багатьох хіміотерапевтичних агентів описано в книзі "Physicians' Desk Reference" (PDR, наприклад, видання 1996 року, Medical Economics Company, 50 Монтвал, штат Нью-Джерсі), повний опис якої включено в цей документ за допомогою посилання, як яби воно було викладено в цьому документі в повному обсязі. 30

Фармацевтичні рецептури і лікарські форми  
При застосуванні в якості ліків, сполуки Формули I може бути введено в формі фармацевтичних композицій, які представляють собою комбінацію сполуки Формули I та 55 фармацевтичні прийнятного носія. Зазначені композиції можуть бути отримані за допомогою способів, добре відомих у фармацевтичній галузі, і можуть бути введені різними способами, в залежності від того, необхідно місцеве або системне лікування, і 5 від області, що підлягає лікуванню. Введення може бути місцевим (включаючи офтальмологічне і в слизові оболонки, включаючи інтраназальну, вагінальну і ректальну доставку), пульмональним (наприклад, 60 шляхом інгаляції або інсуфляції порошків або аерозолів, в тому числі за допомогою

розпилювача; інтратрахеально, інтраназально, епідермально або трансдермально), окулярним, пероральним або 10 парентеральним. Способи окулярної доставки можуть включати місцеве введення (очні краплі), субкон'юнктивальне, періокулярне або інтравітреальне введення ін'єкції або введення за допомогою балонного катетера або офтальмологічних вставок, хірургічним шляхом встановлюються в кон'юнктивальний мішок. Парентеральне введення включає внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, підшкірне, внутрішньоочеревинне або 15 внутрішньом'язове введення ін'єкції або інфузії; або інтракраніальне, наприклад, інтратекальне або інтравентрикулярне введення. Парентеральне введення може бути в формі однієї болюсної дози або може бути, наприклад, здійснено безперервно за допомогою перфузійного насоса. Фармацевтичні композиції і склади для місцевого застосування можуть включати 10 трансдермальні пластирі, мазі, лосьйони, креми, гелі, 20 краплі, супозиторії, спреї, рідини і порошки. Необхідними або бажаними є традиційні фармацевтичні носії, водні, порошкові або масляні основи, загусники тощо.

Фармацевтичні композиції, що містять сполуку Формули I, можуть бути отримані в комбінації з одним або більше фармацевтичними прийнятними носіями. При отриманні композицій відповідно до даного винаходу активний інгредієнт зазвичай 25 змішують з допоміжною речовиною, розбавляють допоміжною речовиною або включають в носій у формі, наприклад, капсули, саше, паперового пакета або іншого контейнера. Якщо допоміжна речовина служить розчинником, воно може бути твердою, напівтвердою або рідкою речовиною, яка служить наповнювачем, носієм або середовищем для активного компонента. Таким чином, композиції можуть бути в 20 формі таблеток, пігулок, порошоків, пастилок, саше, крохмальних капсул, настоїв, суспензій, емульсій, розчинів, сиропів, аерозолів (твердих або в рідкому середовищі), мазей, що містять, наприклад, до 10 % мас. активної сполуки, м'яких та твердих желатинових капсул, супозиторіїв, стерильних ін'єкційних розчинів або стерильних упакованих порошоків.

Для отримання рецептури активну сполуку розмелюють, щоб забезпечити відповідний розмір частинок, до об'єднання з іншими компонентами. Якщо активна сполука практично нерозчинна, її розмелюють до отримання частинок розміром менше 5 200 меш. Якщо активна сполука добре розчиняється в воді, розмір часточок можна регулювати розмелюванням, щоб 25 забезпечити практично однорідний розподіл в рецептурі, наприклад, приблизно 40 меш.

Деякі приклади відповідних допоміжних речовин включають лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбіт, маніт, крохмаль, гуміарабік, фосфат кальцію, альгінати, 10 трагакант, желатин, силікат кальцію, мікрокристалічну целюлозу, полівінілпіролідон, целюлозу, воду, патоку і метилцеллюлозу. Рецептури можуть додатково містити: змащувальні агенти, такі як тальк, стеарат магнію і мінеральну олію; змочувальні агенти; емульгатори і суспендувальні агенти; консерванти, такі як метил і пропілгідроксибензоат; і підсолоджувачі; і ароматизатори. 35 Композиції відповідно до 15 даного винаходу можуть бути сформовані так, щоб забезпечувати швидке, тривале або уповільнене вивільнення активного інгредієнта після введення пацієнтові з використанням способів, відомих в даній області техніки.

Композиції можуть бути сформовані у вигляді одиничної лікарської форми, кожна доза 40 містить від приблизно 5 до приблизно 100 мг, більш часто від приблизно 10 до приблизно 30 мг активного інгредієнта. Термін "одиничні лікарські форми" відноситься до фізично окремих одиниць, що відповідає одноразовій дозі для людей та інших ссавців, кожна одиниця містить попередньо визначену кількість активного матеріалу, розраховану так, щоб забезпечувати необхідний терапевтичний ефект, у поєднанні з відповідною фармацевтичною допоміжною речовиною. 25 45

Активна сполука може бути ефективною в широкому діапазоні доз і її зазвичай вводять в фармацевтично ефективній кількості. Однак слід розуміти, що кількість сполуки, що фактично вводиться, зазвичай визначає лікар відповідно до релевантних обставин, включаючи патологічний стан, що підлягає лікуванню, обраний спосіб введення, сполука, що фактично 50 вводиться, вік, маса і відгук конкретного пацієнта, 30 тяжкість симптомів пацієнта і т.п.

Для отримання твердих композицій, таких як таблетки, головний активний компонент змішують з фармацевтичними допоміжними речовинами з отриманням попередньої композиції, що містить гомогенну суміш сполуки Формули I. Якщо вказано, що попередня композиція є гомогенною, розуміють, що активний компонент, як правило, диспергований рівномірно по всій композиції, так що композиція може бути легко розділена на рівноефективні одиничні лікарські 55 форми, такі як таблетки, пігулки і капсули. Потім отриману тверду попередню композицію розділяють на одиничні лікарські форми описаного вище типу, що містять, наприклад, від 0,1 до 5 приблизно 500 мг активного інгредієнта згідно з цією заявкою.

Таблетки або пігулки, що містять сполуку Формули I, можуть мати покриття або 60 компаундовані іншим способом для одержання лікарської форми, яка переважно має

пролонговану дію. Наприклад, таблетка або пілюля може містити внутрішній компонент дози і зовнішній компонент дози, причому останній в формі оболонки 10 навколо першого. Два компонента можуть бути розділені ентросолюбільним шаром, який перешкоджає розкладанню в шлунку і забезпечує можливість проходження внутрішнього компонента в незмінному вигляді в дванадцятипалу кишку або його відстроченого вивільнення. Для зазначених ентросолюбільних шарів або покриттів можуть бути використані різні матеріали, такі як матеріали, що містять безліч 15 полімерних кислот і сумішей полімерних кислот з такими матеріалами як шелак, цетиловий спирт і ацетатцелюлози.

Рідкі форми, до складу яких можуть бути включені сполуки і композиції відповідно до даного винаходу, для перорального введення або ін'єкції, включають водні розчини, спеціально ароматизовані сиропи, водні або олійні суспензії і ароматизовані емульсії з харчовими оліями, такими як бавовняна олія, кунжутна олія, кокосова олія або арахісова олія, а також еліксири і подібні фармацевтичні середовища.

Композиції для інгаляції або інсуфляції включають розчини і суспензії в фармацевтично прийнятних водних або органічних розчинниках або їх сумішах, і 25 порошки. Рідкі або тверді композиції можуть містити відповідні фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, описані *supra*. У деяких варіантах реалізації винаходу композиції вводять перорально або в дихальні шляхи через ніс для місцевого або системного ефекту. Композиції можна розпорошувати, використовуючи інертні гази. Розпилений розчин можна вдихати безпосередньо з пристрою для розпилення, або 30 пристрій для розпилення можна приєднати до дихальної маски або дихального апарата з періодичним позитивним тиском. Розчини, суспензії або порошкові композиції можна вводити перорально або через ніс, використовуючи пристрої, які доставляють препарат відповідним чином.

Кількість сполуки або композиції, що вводиться пацієнтові, варіюється в залежності від введеного препарату, цілі введення, як, наприклад, профілактика або терапія, стану пацієнта, способу введення і т.п. Для терапевтичних цілей композиція може бути введена пацієнту, що вже має захворювання, в кількості, достатній для лікування або щонайменше часткового послаблення симптомів захворювання і його 5 ускладнень. Ефективні дози залежать від патологічного стану, що підлягає лікуванню, а також відповідно до висновку лікаря, залежно від таких факторів, як тяжкість захворювання, вік, маса і загальний стан пацієнта і т.п.

Композиції, що вводяться пацієнтові, можуть бути в формі фармацевтичних композицій, описаних вище. Композиції можуть бути стерилізовані із застосуванням 10 традиційних способів стерилізації або за допомогою стерилізуючого фільтра. Водні розчини можуть бути упаковані для застосування в незмінному вигляді або ліофілізовані, причому ліофілізований препарат об'єднують із стерильним водним носієм перед введенням. рН препаратів з сполуками, як правило, становить від 3 до 11, ще краще, від 5 до 9 і найбільш переважно від 7 до 8. Слід розуміти, що використання 15 деяких з вищезазначених допоміжних речовин, носіїв або стабілізаторів буде призводити до утворення фармацевтичних солей.

Терапевтична доза сполуки Формули I може варіюватися відповідно, наприклад, до конкретної мети, для якої здійснюється лікування, способу введення сполуки, стану здоров'я і захворювання пацієнта і висновку лікаря. Частка або концентрація сполуки 20 Формули I в фармацевтичній композиції може варіюватися в залежності від ряду факторів, у тому числі дози, хімічних характеристик (наприклад, гідрофобності) і способу введення. Наприклад, сполука Формули I може бути представлена у формі водного фізіологічного буферного розчину, що містить від приблизно 0,1 до приблизно 10 мас./об. % сполуки для парентерального введення. Деякі типові діапазони доз 25 складають від приблизно 1 мкг/кг до приблизно 1 г/кг маси тіла на добу. У деяких варіантах реалізації діапазон доз становить від приблизно 0,01 мг/кг до приблизно 100 мг/кг маси тіла на добу. Доза може залежати від таких змінних, як тип і ступінь розвитку захворювання або розладу, загальний стан здоров'я конкретного пацієнта, відносна біологічна ефективність вибраної сполуки, склад допоміжних речовин і 30 способів введення. Ефективні дози можуть бути екстрапольовані за кривими залежності ефекту від дози, отриманих з *in vitro* або тестових модельних системах на тваринах.

Сполуки Формули I також може бути складено в комбінацію з одним або більше додаткових активних інгредієнтів, які можуть включати будь-які фармацевтичні агенти, такі як протівірусні агенти, вакцини, антитіла, імунозміцнюючі агенти, імунопригнічуючі агенти, протизапальні агенти і т.п.

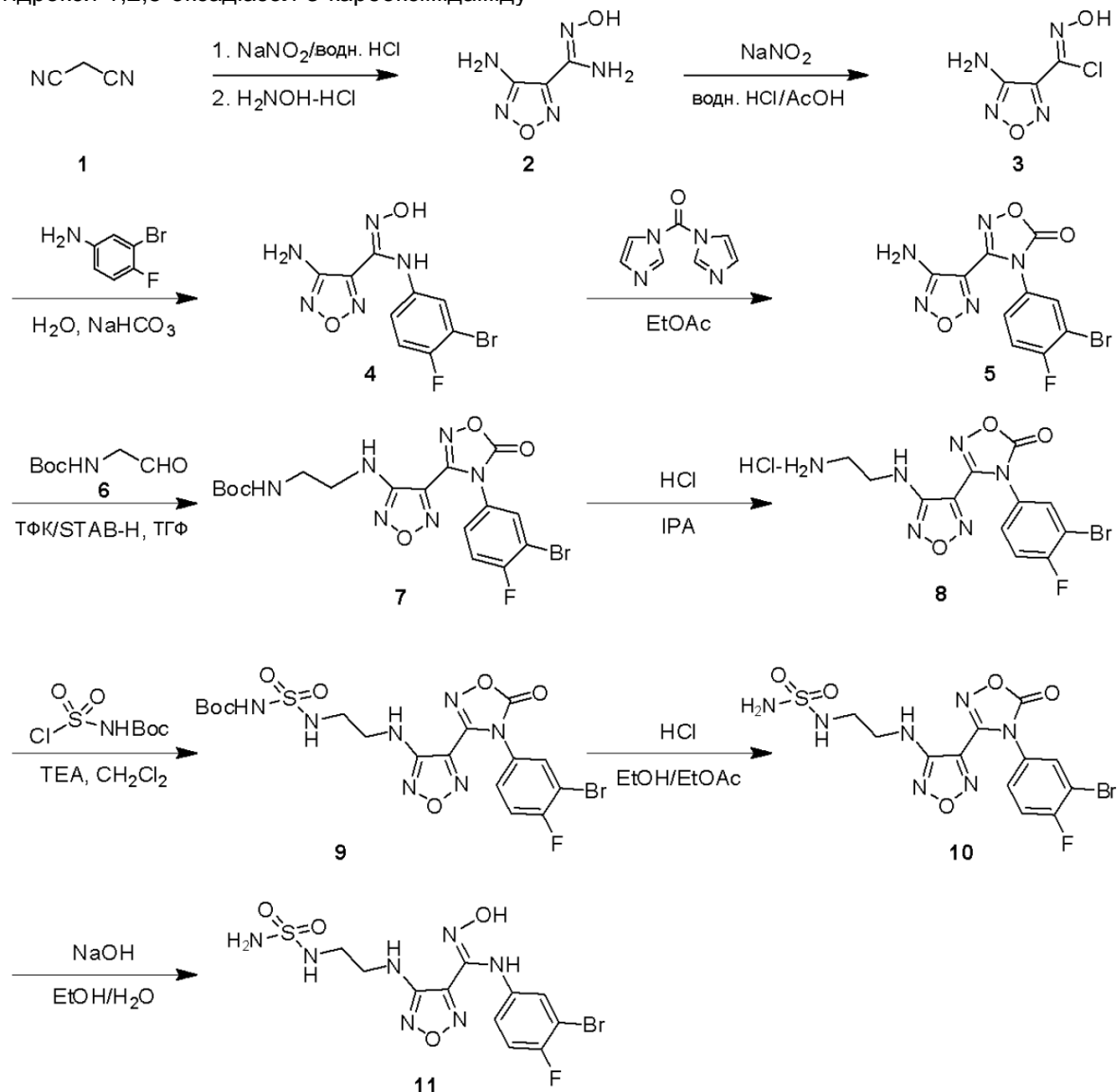
Дана заявка включає також фармацевтичні набори, які підходять, наприклад, для лікування або попередження захворювань або розладів, пов'язаних з IDO, ожиріння, діабету та інших захворювань, зазначених у цьому документі, які містять 5 один або більше контейнерів, що містять фармацевтичну композицію, яка містить терапевтично ефективну кількість сполуки

Формули І. Такі набори можуть додатково містити, при необхідності, один або більше різних традиційних компонентів для фармацевтичних наборів, як, наприклад, ємності з одним або більше фармацевтично прийнятними носіями, додаткові ємності і т.п., що очевидно для фахівців в даній галузі 10 техніки. Також в набір можуть бути включені інструкції, або у вигляді вкладиша, або у вигляді етикетки, із зазначенням кількості компонентів, які потрібно прийняти, вказівками з прийому та/або вказівками по змішуванню компонентів.

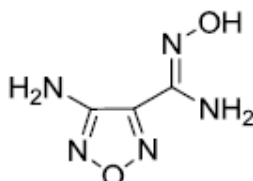
#### ПРИКЛАДИ

Даний винахід буде більш детально описано на конкретних прикладах. Наступні приклади служать для цілей наочності, і жодним чином не обмежують даний винахід. Фахівцям в даній області зрозумілі різні некритичні параметри, які можуть бути змінені або модифіковані для отримання практично таких же результатів.

Приклад 1. Синтез 4-({2-[(аміносультоніл)аміно]етил}аміно)-N-(3-бром-4-фторфеніл)-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідаміду



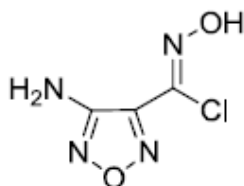
Стадія А: 4-Аміно-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідамід (2)



Малононітрил [Aldrich, продукт № M1407] (320,5 г, 5 моль) додавали до води (7 л), попередньо нагрітої до 45 °C і перемішували при 45 °C протягом 5 хвилин. Одержаний 5 розчин

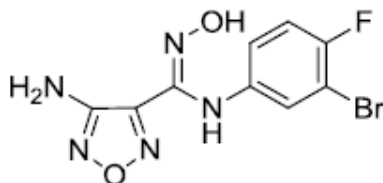
охолоджували на льодяній бані і додавали нітрит натрію (380 г, 5,5 моль, 1,1 екв.). Після досягнення температури 10 °С, додавали 6 н. розчин хлорводневої кислоти (55 мл). Реакція проходила з помірним екзотермічним ефектом з підвищенням температури до 16 °С. Через 15 хвилин холодну баню прибирали і перемішували реакційну суміш протягом 1,5 годин при 16-18 °С. Реакційну суміш охолоджували до 13 °С і однією порцією додавали 50 % водний розчин гідроксиламіну гідрохлориду (990 г, 15 моль, 3,0 екв.). Температура підвищувалась до 26 °С. Після ослаблення екзотермічної реакції холодну баню прибирали і продовжували перемішування протягом 1 години при 26-27 °С, потім повільно доводили до кипіння із зворотним 5 холодильником. Кип'ятіння із зворотним холодильником продовжували протягом 2 годин, потім реакційну суміш залишали поступово охолоджуватись протягом ночі. Реакційну суміш перемішували на льодяній бані і частинами додавали 6 н. розчин хлорводневої кислоти (800 мл) протягом 40 хвилин, доводячи рН до 7,0. Перемішування продовжували на льодяній бані при 5 °С. Осад збирали фільтрацією, 10 гарно промивали водою і висушували у вакуумній печі (50 °С) з одержанням необхідного продукту (644 г, 90 %) у вигляді майже-білої твердої речовини. <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, CD<sub>3</sub>OD):  $\beta$ 156,0, 146,9, 141,3; C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (Мол. маса 143,10), РХМС (EI) m/e 144,0 (M<sup>+</sup>+H).

Стадія В: 4-Аміно-N-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідоїлхлорид (3)



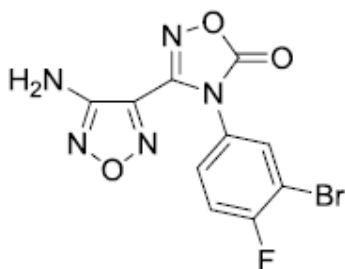
4-Аміно-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідамід (422 г, 2,95 моль) додавали до суміші води (5,9 л), оцтової кислоти (3 л) і 6 н. розчину хлорводневої кислоти (1,475 л, 3,0 екв.) і перемішували суспензію при 42-45 °С до одержання прозорого розчину. Додавали хлорид натрію (518 г, 3,0 екв.) і перемішували 20 одержаний розчин на бані з лід/вода/метанол. Додавали розчин нітриту натрію (199,5 г, 0,98 екв.) у воді (700 мл) протягом 3,5 годин, підтримуючи температуру нижче 0 °С. Після завершення додавання продовжували перемішування на льодяній бані протягом 1,5 годин, а потім залишали реакційну суміш нагріватись до 15 °С. Осад збирали фільтрацією, гарно промивали водою, розчиняли в етилацетаті (3,4 л), обробляли 25 безводним сульфатом натрію (500 г) і перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. Суспензію відфільтровували через сульфат натрію (200 г) і концентрували фільтрат на роторному випарнику. Залишок розчиняли в метил-трет-бутиловому етері (5,5 л), обробляли активованим вугіллям (40 г), перемішували при кімнатній температурі протягом 40 хвилин і відфільтровували через целіт. Розчинник видаляли на роторному випарнику, а одержаний продукт висушували у вакуумній печі (45 °С) з одержанням необхідного продукту (256 г, 53,4 %) у вигляді майже-білої твердої речовини. <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, CD<sub>3</sub>OD)  $\beta$ 155,8, 143,4, 129,7; C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (Мол. маса 162,53), РХМС (EI) m/e 163/165 (M<sup>+</sup> + H).

Стадія С: 4-Аміно-N-(3-бром-4-фторфеніл)-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3- карбоксимідамід (4)



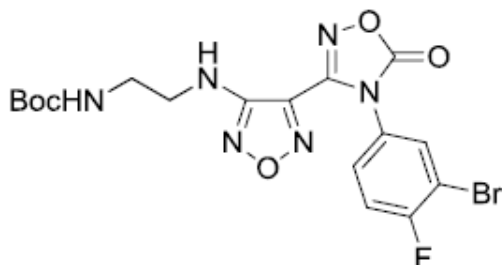
4-Аміно-N-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідоїлхлорид (33,8 г, 208 ммоль) змішували з водою (300 мл). При 60 °С до суспензії додавали 3-бром-4-фторанілін 10 (Sigma-Aldrich) (43,6 г, 229 ммоль, 1,1 екв.) при перемішуванні протягом 10 хвилин. Протягом 15 хвилин додавали розчин бікарбонату натрію (26,3 г, 313 ммоль, 1,5 екв.) в воді (300 мл) при перемішуванні при 60 °С. Після перемішування протягом 20 хвилин РХМС показала завершення реакції. Потім реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і екстрагували етилацетатом (2 × 300 мл). Об'єднаний 15 етилацетатний розчин висушували над безводним сульфатом натрію і концентрували з одержанням необхідного продукту (65 г, 99 %) у вигляді майже-білої твердої речовини, яку використовували в наступній реакції без додаткової очистки. C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>BrFN<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (Мол. маса 316,09), РХМС (EI) m/e 316/318 (M<sup>+</sup> + H).

Стадія D: 3-(4-Аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол- 5(4H)-он (5)



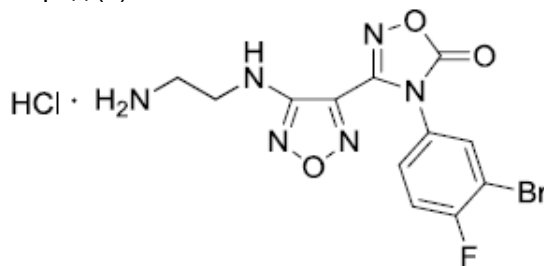
Суміш 4-аміно-N-(3-бром-4-фторфеніл)-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідаміду (65,7 г, 208 ммоль), N, N-карбонілдіімідазолу (Sigma-Aldrich) (50,6 г, 25 312 ммоль, 1,5 екв.) і етилацетату (750 мл) нагрівали до 60 °C і перемішували протягом 20 хвилин. РХМС показала завершення реакції. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, промивали 1 н. розчином хлорводневої кислоти (2 × 750 мл), висушували над сульфатом натрію і концентрували. Неочищений продукт розтирали з сумішшю дихлорметану, етилацетату і діетилового етеру з одержанням необхідного продукту (60,2 г, 85 %) у вигляді майже-білої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 8,05 (м, 1H), 7,69 (м, 1H), 7,57 (т, 1H, J=8,7 Гц), 6,58 (с, 2H); 5 C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>BrFN<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (Мол. маса 342,08), РХМС (EI) m/e 342/344 (M<sup>+</sup> +H).

Стадія E: трет-Бутил-[2-({4-[2-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-2,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}аміно)етил]карбамат (7)



До розчину трифтороцтової кислоти (20,0 мл) і тетрагідрофурану (10,0 мл) частинами додавали триацетоксиборгідрид натрію (10,59 г, 49,97 ммоль, 10,0 екв.), перемішуючи в атмосфері азоту. Суміш перемішували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, а потім охолоджували до -5 °C. По краплям додавали розчин 3- (4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4H)-ону (1,71 г, 5,0 ммоль) і трет-бутил-(2-оксоетил)карбамату (Sigma-Aldrich) (1,99 г, 12,5 ммоль, 2,5 екв.) в ТГФ (15,0 мл) протягом 30 хвилин при перемішуванні, підтримуючи температуру нижче 0 °C. Реакційну суміш перемішували при температурі від -5 до 0 °C і по краплям додавали додаткові порції трет-бутил-(2-оксоетил)карбамату (0,20 г, 1,2 ммоль, 0,24 екв.) в ТГФ (1,0 мл) з інтервалами 20 хвилин, 40 хвилин і 4 годин. ВЕРХ 20 показала завершення реакції через 5,25 годин. Реакційну суміш виливали в льодяний розчин бікарбонату натрію (500 мл) і перемішували одержаний розчин при кімнатній температурі протягом ночі. Осад збирали фільтрацією і промивали насиченим сольовим розчином. Одержаний залишок змішували з гептаном (40 мл) і діетиловим етером (40 мл) і перемішували при кімнатній температурі протягом 5 годин. Осад 25 збирали фільтрацією, промивали діетиловим етером і висушували у вакуумній печі з одержанням необхідного продукту (1953 мг, 80,5 %) у вигляді майже-білої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 8,08 (м, 1H), 7,71 (м, 1H), 7,59 (т, <sup>1</sup>H, J=8,7 Гц), 6,94 (м, 1H), 6,52 (м, 1H), 3,32 (м, 2H), 3,15 (м, 2H), 1,36 (с, 9H); C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>BrFN<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (Мол. маса 485,26); РХМС (EI) m/e 507/509 (M<sup>+</sup> +Na).

Стадія F: 3-{4-[(2-Аміноетил)аміно]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4H)-ону гідрохлорид (8)



Спосіб A (одержання з трет-бутил-[2-({4-[2-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-2,5-5 дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}аміно)етил]карбамату; стадія E):

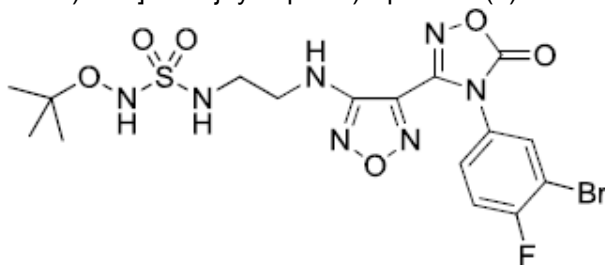
В колбу об'ємом 500 мл завантажували трет-бутил-[2-({4-[2-(3-бром-4- фторфеніл)-5-оксо-2,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3- іл}аміно)етил]карбамат (20 г, 41,2 ммоль) і ізопропанол (255 мл). Суспензію перемішували при кімнатній температурі. До суспензії додавали газоподібний 10 хлороводень (7,55 г, 207 ммоль, 5,0 екв.) за допомогою скляної трубки протягом 16 хвилин. Потім до суміші додавали етилацетат (111 мл) і нагрівали реакційну суміш до 43 °С, і перемішували протягом 7,5 годин. Суміш охолоджували до 19 °С і додавали етилацетат (44 мл). Суспензію відфільтровували, а одержаний залишок промивали етилацетатом (2 × 55 мл). Виділену тверду речовину висушували при пониженому тиску при 45 °С протягом 15 годин з одержанням необхідного продукту (16,61 г, вихід 95,5 %) у вигляді твердої речовини від майже-білого до білого кольору. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 8,11 (шс, 3H), 7,78 (м, 1H), 7,73 (м, 1H), 7,59 (т, 1H, J=8,7 Гц), 6,74 (т, 1H, J=6,1 Гц), 3,50 (м, 2H), 3,02 (м, 2H); C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>BrClFN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, (Мол. маса 421,61; C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>BrFN<sub>6</sub>O<sub>3</sub> для вільної основи, Мол. маса 385,15), PXMC (EI) m/e 385/387 (M<sup>+</sup> + H). 20

Спосіб В (одержання напрямку з 3-(4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4- фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4H)-ону; стадія D):

Триацетоксиборгидрид натрію (2,33 г, 11,0 ммоль, 11,0 екв.) змішували з трифтороцтовою кислотою (12,0 мл, 155,8 ммоль, 155,8 екв.). Одержаний розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Розчин 3-(4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4H)-ону (5, 0,342 г, 1,0 ммоль) і трет-бутил-(2-оксоетил)карбамату (Sigma-Aldrich) (1,04 г, 6,51 ммоль, 6, 5екв.) в дихлорметані (10,0 мл) і ацетонітрилі (6,0 мл) перемішували в атмосфері N<sub>2</sub>.

Розчин охолоджували до -5 °С і по краплям додавали розчин триацетоксиборгидриду натрію і трифтороцтової кислоти протягом 5 хвилин. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин. ВЕРХ і ЖХ-МС (M<sup>+</sup> - Вос+H: 385/387, бромідна структура) показали, що співвідношення необхідного продукту до вихідного матеріалу складало 4 до 1. Суміш концентрували і розбавляли дихлорметаном (10 мл). Розчин охолоджували до 0 °С і повільно додавали 4 н. розчин гідроксиду натрію, підтримуючи температуру при 0-5 °С, доводячи рН до 8-9. Водний шар екстрагували дихлорметаном (3×10 мл). Об'єднаний дихлорметановий розчин промивали розчином бікарбонату натрію і насиченим сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували. Потім розчиняли неочищений залишок в дихлорметані (6,0 мл) і охолоджували одержаний розчин до 0 °С. По краплям додавали 4 н. розчин хлорводневої кислоти в діоксані (3,0 мл) при 0-5 °С. Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Осад збирали фільтрацією, промивали діетиловим етером і висушували в вакуумі з одержанням необхідного продукту (289 мг, 54 %) у вигляді майже-білої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 8,11 (шс, 3H), 7,78 (м, 1H), 7,73 (м, 1H), 7,59 (т, 1H, J=8,7 Гц), 6,74 (т, 1H, J=6,1 Гц), 3,50 (м, 2H), 3,02 (м, 2H); C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>BrClFN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, (Мол. маса 421,61; C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>BrFN<sub>6</sub>O<sub>3</sub> для вільної основи, мол. маса 385,15), PXMC (EI) m/e 385/387 (M<sup>+</sup> + H).

Стадія G: трет-Бутил-([2-({4-[4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4- оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}аміно)етил]аміно)сульфоніл)карбамат (9)



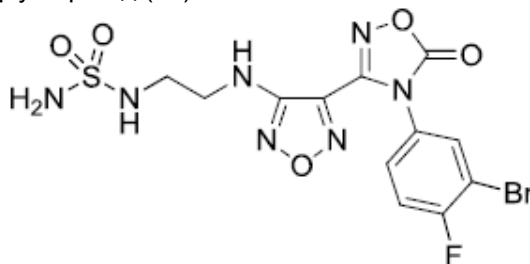
В скляний реактор об'ємом 20 л завантажували 3-(4-((2-аміноетил)аміно)-1,2,5- оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4H)-ону гідрохлорид (1200 г, 2,846 моль) і дихлорметан (6,5 л) при кімнатній температурі. До суміші протягом 7 25 хвилин додавали триетиламін (950 г, 9,39 моль, 3,3 екв.). Потім суміш охолоджували до -14,6 °С.

В круглодонну колбу об'ємом 5 л завантажували трет-бутанол (253 г, 3,41 моль, 1,2 екв.) і дихлорметан (2,6 л). Розчин охолоджували до 0,9 °С. До одержаного розчину протягом 43 хвилин додавали хлорсульфонілізоціанат (463 г, 3,27 моль, 1,15 екв.), підтримуючи температуру суміші нижче 10 °С. Одержаний розчин трет- бутил(хлорсульфоніл)карбамату витримували при 3-5 °С протягом 1 години.

В реактор протягом 73 хвилин додавали розчин трет- бутил(хлорсульфоніл)карбамату, підтримуючи температуру суміші нижче 0 °С. Потім суміш нагрівали до 10 °С за 1 годину, а потім перемішували при 10-14 °С протягом 1 години. В реакційну суміш додавали воду (4,8 л) і

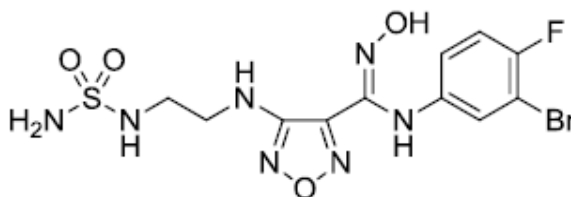
перемішували погашену реакційну суміш при кімнатній температурі протягом 14,5 годин. Суміш залишали осаджуватись і фази розділяли. Дихлорметановий розчин знаходився в реакторі окремо і в нього протягом 25 хвилин додавали оцтову кислоту (513 г) для осадження продукту. 10 Одержану суспензію перемішували при 20 °С протягом 2,5 годин. Продукт виділяли фільтрацією і промивали дихлорметаном (1,8 л). Продукт сушили при пониженому тиску (-30 дюймів рт.ст.) при 45 °С протягом 16 годин з одержанням необхідного продукту (1342 г, вихід 83,5 %) у вигляді білої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 10,90 (с, 1H), 8,08 (дд, J=6,2, 2,5 Гц, 1H), 7,72 (м, 1H), 7,59 (т, J=8,6 Гц, 1H), 6,58 (т, J=5,7 Гц, 1H), 3,38 (дд, J=12,7, 6,2 Гц, 2H), 3,10 (дд, J=12,1, 5,9 Гц, 2H), 1,41 (с, 9H). C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>BrFN<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S (Мол. маса 564,34), РХМС (EI) m/e 585,9/587,9 (M<sup>+</sup> + Na)

Стадія Н: N-[2-({4-[4-(3-Бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}аміно)етил]сульфамід (10)



В колбу об'ємом 20 л, що містить трет-бутил-({2-({4-[4-(3-бром-4- фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3- іл}аміно)етил]аміно)сульфоніл)карбамат (1200 г, 2,126 моль), додавали етанол (12 л) 25 при 20 °С. Одержану суміш перемішували при кімнатній температурі і насичували газоподібним хлороводнем (472 г, 12,9 моль, 6,07 екв.). Суміш нагрівали до 50 °С і підтримували температуру протягом 3 годин до завершення реакції. Розчинник видаляли вакуумною перегонкою при 33-39 °С і збирали 6 кг дистиляту. До суміші додавали етилацетат (6,8 л, 6,1 кг) і переганяли, зібрав 5,1 кг дистиляту. До суміші додавали етилацетат (7,2 л, 6,48 кг) і переганяли, зібрав 5,1 кг дистиляту. До суміші додавали етилацетат (2,4 л, 2,14 кг), щоб відрегулювати співвідношення розчинників. <sup>1</sup>H ЯМР показав молярне співвідношення етилацетату до етанолу 1,0:0,1. Розчин 5 нагрівали до 65 °С. н-Гептан (4,1 кг) додавали до розчину при 60-65 °С протягом 43 хвилин. Одержану суспензію перемішували при 65 °С протягом 1 години. Суспензію охолоджували до 20 °С за 2,5 години і перемішували при вказаній температурі протягом 15 годин. Продукт збирали фільтрацією і промивали н-гептаном (2,42 л). Продукт сушили при пониженому тиску при 45 °С протягом 65 годин з одержанням необхідного продукту (906 г, вихід 91,8 %) у вигляді майже-білої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 8,08 (дд, J=6,2) 7,72 (м, 1H), 7,59 (т, J=8,7 Гц, 1H), 6,67 (т, J=5,9 Гц, 1H), 6,55 (с, 2H) 6,52 (т, J=6,0 Гц, 1 H), 3,38 (дд, J=12,7, 6,3 Гц, 2 H), 3,11 (дд, J=12,3, 6,3 Гц, 2H); C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>BrFN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S (Мол. маса 464,23), РХМС (EI) m/e 485,8/487,8 (M<sup>+</sup> - C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>+Na).

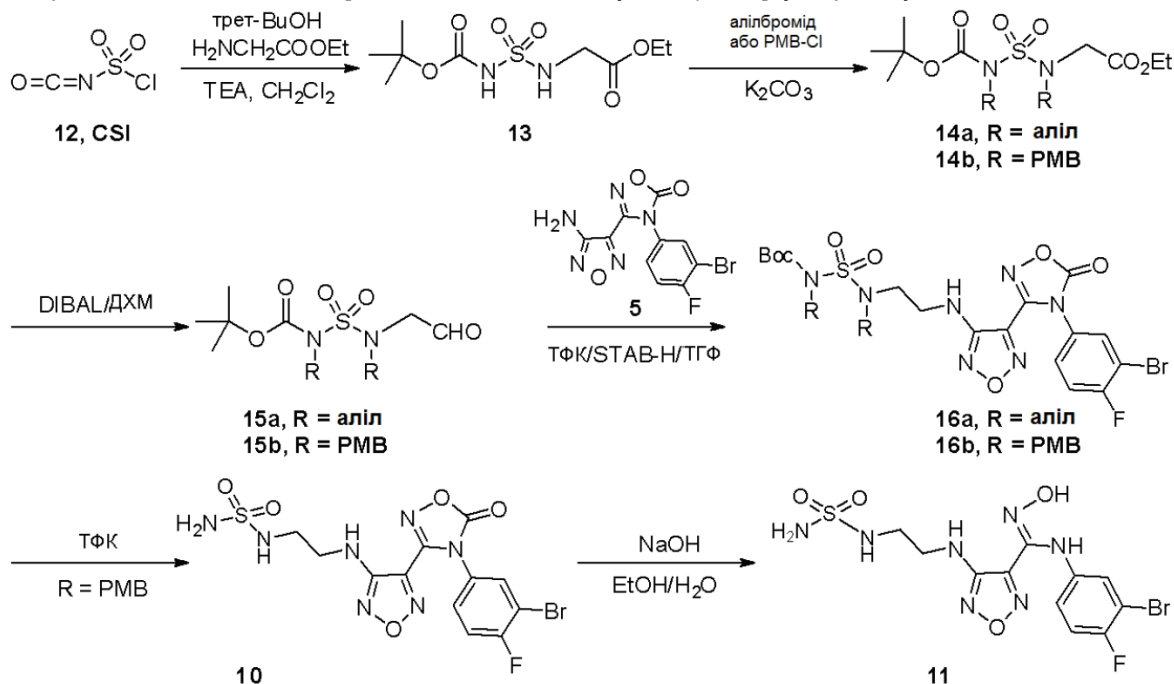
Стадія І: 4-({2-[(Аміноссульфоніл)аміно]етил}аміно)-N-(3-бром-4-фторфеніл)-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимід (11)



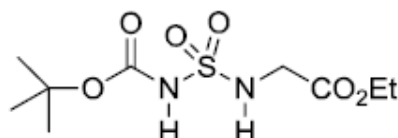
В скляний реактор об'ємом 20 л додавали N-[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфеніл)-5- оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}аміно)етил]сульфамід 20 (799,4 г, 1,72 моль) і ТГФ (3,2 л). Одержаний розчин перемішували при 20 °С протягом 7 хвилин, а потім додавали воду (1,6 л). Суміш охолоджували до 2 °С і додавали 30 мас. % розчин гідроксиду натрію (475 мл, 666,4 г, 4,99 моль, 2,9 екв.) за 8 хвилин. Суміш нагрівали до 20 °С і підтримували температуру протягом 16 годин. Потім в суміш додавали метил-трет-бутиловий етер (8,0 л) за 23 хвилини. Додавали воду (2,7 25 л) і охолоджували суміш до температури приблизно 0 °С. Потім в суміш додавали 85 % фосфорну кислоту (370,7 г, 3,22 моль, 1,9 екв.) за 9 хвилин. Суміш нагрівали до 20 °С і перемішували протягом 1 години. Суміш залишали осаджуватись і фази розділяли. Органічний шар залишали в реакторі і додавали воду (2,9 л) і 85 мас. % фосфорну кислоту (370,7 г, 3,22 моль) і перемішували при 20 °С протягом 1 години. Суміш залишали осаджуватись і фази розділяли. Органічний шар залишали в реакторі і додавали воду (3,2 л) і перемішували при 20 °С протягом 1 години. Суміш залишали осаджуватись і фази

розділяли. Органічний розчин залишали в реакторі і переганяли при пониженому тиску при 20 °С для видалення 3,4 кг дистилату. До суміші додавали 5 етанол (4,8 л) і переганяли суміш до об'єму 3,2 л. Процес перегонки повторювали ще один раз. До суміші додавали етанол (0,6 л) для доведення об'єму суміші до 4 л. Суміш перемішували при 20 °С протягом 16 годин, а потім додавали воду (6,39 л). Одержану суспензію перемішували при 20 °С протягом 5 годин. Продукт збирали фільтрацією і два рази промивали сумішшю етанолу (529 мл) і води (1059 мл). Продукт сушили при 10 пониженому тиску при 45 °С протягом 65 годин з одержанням необхідного продукту (719,6 г, 95,4 %) у вигляді білої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 11,51 (с, 1H), 8,90 (с, 1H), 7,17 (т, J=8,8 Гц, 1H), 7,11 (дд, J=6,1, 2,7 Гц, 1H), 6,76 (м, 1H), 6,71 (т, J=6,0 Гц, 1H), 6,59 (с, 2H), 6,23 (т, J=6,1 Гц, 1H), 3,35 (дд, J=10,9, 7,0 Гц, 2H), 3,10 (дд, J=12,1, 6,2 Гц, 2H); C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>BrFN<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S (Мол. маса 438,23), РХМС (EI) m/e 437,9/439,9 (M<sup>+</sup> + H).

Приклад 2. Альтернативний спосіб одержання N-[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}аміно)етил]сульфаміду

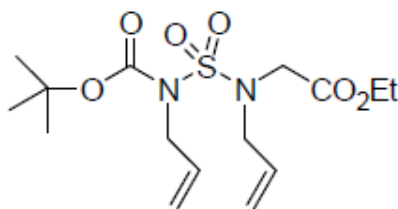


Стадія 1: Етил-[[трет-бутоксикарбоніл]аміно]сульфоніл]аміноацетат (13)



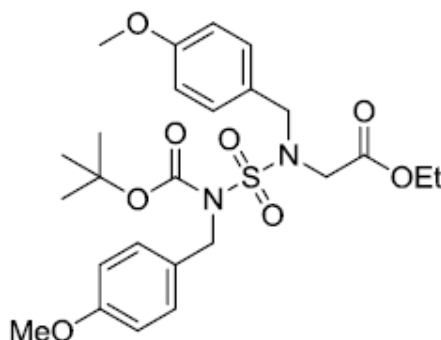
Розчин хлорсульфонілізоціанату (Sigma-Aldrich) (5,0 мл, 57,4 ммоль) в дихлорметані (100 мл) охолоджували до 0 °С. Трет-бутиловий спирт (4,26 г, 57,4 ммоль, 1,0 екв.) і дихлорметан (100 мл) додавали через крапельну воронку. Одержаний розчин перемішували при 0 °С протягом 30 хвилин. Додавали гідрохлорид етилового 5 естеру глицину (8,82 г, 63,2 ммоль, 1,1 екв.), потім по краплям додавали триетиламін (20,0 мл, 144 ммоль, 2,5 екв.) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин. Реакційну суміш розбавляли дихлорметаном (100 мл) і промивали 0,1 н. розчином хлорводневої кислоти і насиченим сольовим розчином. Органічний шар висушували над сульфатом натрію і концентрували з одержанням 10 необхідного продукту (13,2 г, 81,4 %) у вигляді неочищеної майже-білої твердої речовини, яку використовували в наступній реакції без додаткової очистки. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,88 (с, 1H), 8,07 (т, 1H, J=6,1 Гц), 4,08 (к, 2H, J=7,1 Гц), 3,78 (д, 2H, J=6,1 Гц), 1,40 (с, 9H), 1,18 (т, 3H, J=7,1 Гц).

Стадія 2а. Етил(аліл[аліл(трет-бутоксикарбоніл)аміно]сульфоніл]аміно)ацетат (14а)



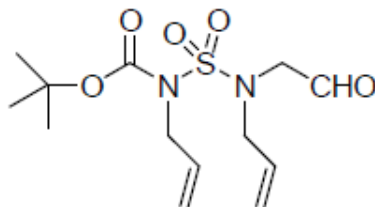
Етил(2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)сульфоніл)аміноацетат (1,0 г, 3,54 ммоль) змішували з карбонатом калію (2,45 г, 17,7 ммоль, 5,0 екв.) і ацетонітрилом (23,0 мл) в 20 атмосфері N<sub>2</sub> при кімнатній температурі. По краплям додавали алілбромід (1,84 мл, 21,2 ммоль, 6,0 екв.). Реакційну суміш нагрівали до 70 °С і перемішували при вказаній температурі протягом 14 годин. ВЕРХ і РХМС показали завершення реакції. Реакційну суміш відфільтровували і концентрували фільтрат. Залишок розчиняли в дихлорметані і промивали розчином бікарбонату натрію і насиченим сольовим 25 розчином. Органічний шар висушували над сульфатом натрію і концентрували з одержанням необхідного продукту (1,11 г, 87 %) у вигляді неочищеної майжебілої твердої речовини, яку використовували в наступній реакції без додаткової очистки. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 5,75 (м, 2H), 5,20 (м, 4H), 4,12 (м, 6H), 3,89 (м, 2H), 1,43 (с, 9H), 1,18 (т, 3H, J=8,7 Гц).

Стадія 2b. Етил(2-((трет-бутоксикарбоніл) (4-метоксибензил)аміно)сульфоніл)(4-метоксибензил)аміноацетат (14b)



Етил(2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)сульфоніл)аміноацетат (1,00 г, 4,0 ммоль) змішували з N, N-диметилформамідом (ДМФА, 6,0 мл) і перемішували при кімнатній температурі. До суміші додавали йодид натрію (0,01 г, 0,1 ммоль, 0,025 екв.), карбонат калію (2,40 г, 20 ммоль, 5,0 екв.) і пара-метоксибензилхлорид (2,64 мл, 19,5 10 ммоль, 4,875 екв.). Реакційну суміш нагрівали до 80 °С і перемішували при 80 °С протягом 2 годин. РХМС показала завершення реакції. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і відфільтровували через целіт. Шар целіту промивали дихлорметаном і концентрували об'єднані органічні фільтрати. Концентрований залишок розчиняли в дихлорметані (20 мл) і промивали розчином бікарбонату натрію 15 (5 × 12 мл) і насиченим сольовим розчином. Органічний шар висушували над сульфатом натрію і концентрували. Залишок очищали на силікагелі (градієнтне елювання, 0-40 % етилацетату в гексані) з одержанням необхідного продукту (1,39 г, 80 %) у вигляді майжебілої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 7,22 (м, 2H), 7,14 (м, 2H), 6,88 (м, 4H), 4,64 (с, 2H), 4,33 (с, 2H), 4,03 (к, 2H, J=7,1 Гц), 3,92 (с, 20 2H), 3,72 (с, 3H), 3,71 (с, 3H), 1,39 (с, 9H), 1,14 (т, 3H, J=7,1 Гц).

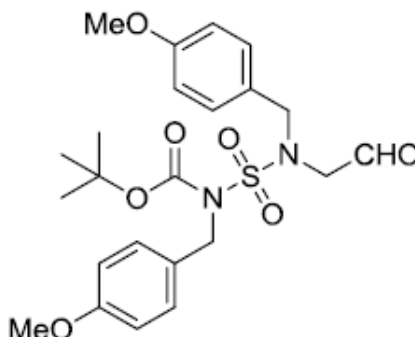
Стадія 3a. трет-Бутилаліл{аліл(2-оксоетил)аміно}сульфонілкарбамат (15a)



Розчин етил(аліл{аліл(трет-бутоксикарбоніл)аміно}сульфоніл)аміноацетату (1,11 г, 3,05 ммоль) і дихлорметану (15 мл) при -78 °С в атмосфері N<sub>2</sub> обробляли 1,0 М розчином гідриду діізобутилалюмінію в дихлорметані (3,66 мл, 3,66 ммоль, 1,2 екв.). Реакційну суміш перемішували при -78 °С протягом 1 години, а потім гасили метанолом (1,5 мл) і обробляли насиченим розчином тартрату натрію-калію (65 мл). 5 Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Потім екстрагували водний шар дихлорметаном (3 × 20 мл). Об'єднаний дихлорметановий розчин промивали насиченим сольовим розчином, висушували

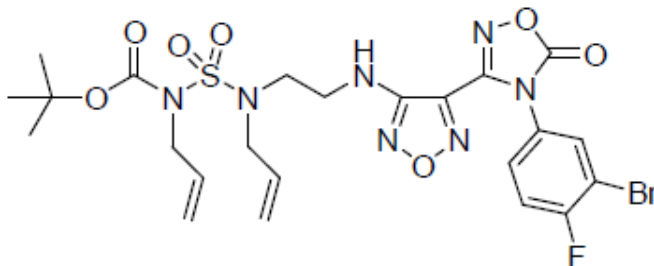
над сульфатом натрію, відфільтровували і концентрували з одержанням необхідного продукту (0,62 г, 64 %) у вигляді неочищеної густої безбарвної олії, яку використовували в наступній реакції без 10 додаткової очистки.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9,45 (с, 1H), 5,76 (м, 2H), 5,18 (м, 4H), 4,15 (м, 4H), 3,72 (м, 2H), 1,43 (с, 9H).

5 Стадія 3b. трет-Бутил(4-метоксибензил){[(4-метоксибензил)(2-оксоетил)аміно]сульфоніл}карбамат (15b)



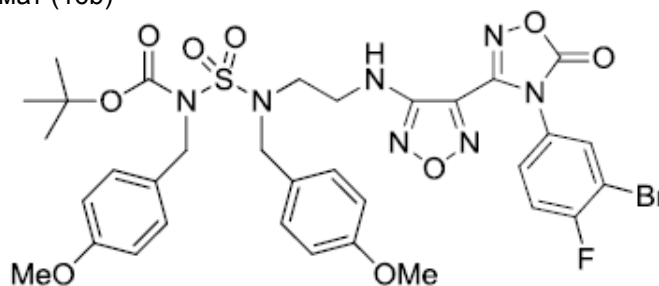
Розчин етил{[(трет-бутоксикарбоніл)(4-метоксибензил)аміно]сульфоніл}(4-метоксибензил)аміно]ацетату (5,30 г, 10 ммоль) в дихлорметані (20,0 мл) при  $-78^\circ\text{C}$  в атмосфері  $\text{N}_2$  обробляли 1,0 М розчином гідриду діізобутилалюмінію в дихлорметані (12,2 мл, 12,2 ммоль, 1,22 екв.). Реакційну суміш перемішували при  $-78^\circ\text{C}$  протягом 3 20 годин. Потім реакцію гасили метанолом (3 мл) і обробляли дихлорметаном (100 мл) і насиченим розчином тартрату натрію-калію (150 мл). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Потім екстрагували водний шар дихлорметаном (3  $\times$  20 мл). Об'єднаний дихлорметановий розчин промивали насиченим сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували. Потім залишок 25 очищали на силікагелі (градієнтне елювання, 0-30 % етилацетату в гексані) з одержанням необхідного продукту (3,45 г, 71 %) у вигляді майже-білої твердої речовини.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9,24 (с, 1H), 7,23 (м, 4H), 6,88 (м, 4H), 4,68 (с, 2H), 4,31 (с, 2H), 4,07 (с, 2H), 3,72 (с, 3H), 3,71 (с, 3H), 1,40 (с, 9H).

20 Стадія 4a. трет-Бутилаліл(N-аліл-N-(2-(4-(4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл)-1,2,5-оксадіазол-3-іламіно)етил)сульфамойл}карбамат (16a)



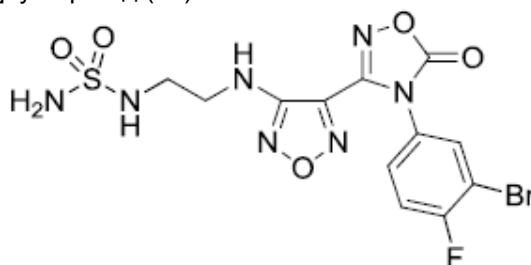
В колбу об'ємом 50 мл додавали триацетоксиборгідрид натрію (1,06 г, 5,0 ммоль, 1,0 екв.), трифтороцтову кислоту (ТФК, 2,0 мл, 26 ммоль) і тетрагідрофуран (ТГФ, 1,0 мл) при кімнатній температурі. Одержану суміш охолоджували до  $-5^\circ\text{C}$  в атмосфері  $\text{N}_2$  і перемішували при  $0-5^\circ\text{C}$  протягом 10 хвилин. До розчину по краплям додавали 3-(4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-10 5(4H)-он (0,171 г, 5,0 ммоль; стадія D) і трет-бутилаліл{[аліл(2-оксоетил)аміно]сульфоніл}карбамат (0,398 г, 2,5 ммоль, 0,5 екв.) в ТГФ (1,5 мл) при  $0-5^\circ\text{C}$  протягом 5 хвилин. Одержану реакційну суміш перемішували в атмосфері  $\text{N}_2$  при  $0-5^\circ\text{C}$ . Через 20 хвилин, 40 хвилин і 2,5 години по краплям додавали розчин трет-бутилаліл{[аліл(2-оксоетил)аміно]сульфоніл}карбамату (0,040 г, 0,125 ммоль, 0,25 15 екв.) в ТГФ (0,20 мл) при  $0-5^\circ\text{C}$ . Через 2,5 години додавали розчин триацетоксиборгідриду натрію (0,211 г, 1,0 ммоль, 0,2 екв.) в трифтороцтовій кислоті (ТФК, 1,5 мл, 9,5 ммоль) при  $0-5^\circ\text{C}$ . Реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури і перемішували протягом ночі. Потім реакційну суміш виливали в льодяний насичений розчин карбонату натрію (50 мл) і екстрагували дихлорметаном (3 20  $\times$  20 мл). Об'єднані дихлорметанові екстракти промивали насиченим сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували. Потім залишок очищали на силікагелі (градієнтне елювання, 0-75 % етилацетату в гексані) з одержанням необхідного продукту (0,239 г, 74,2 %) у вигляді майже-білої твердої речовини.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8,07 (м, 1H), 7,71 (м, 1H), 7,58 (т, 1H,  $J=8,7$  25 Гц), 6,62 (м, 1H), 5,77 (м, 2H), 5,19 (м, 4H), 4,17 (м, 2H), 3,89 (м, 2H), 3,44 (м, 2H), 3,38 (м, 2H), 1,42 (с, 9H);  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{BrFN}_7\text{O}_7\text{S}$  (Мол. маса 644,47), PXMC (EI)  $m/e$  544/546 ( $\text{M}^+$  - Вос+H).

Стадія 4b. трет-Бутил-N-(2-(4-(4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл)-1,2,5-оксадіазол-3-іламіно)етил)-N-(4-метоксибензил)сульфаміол(4-метоксибензил)карбамат (16b)



В колбу об'ємом 50 мл додавали триацетоксиборгідрид натрію (0,50 г, 2,37 ммоль, 4,74 5 екв.), трифтороцтову кислоту (ТФК, 1,0 мл, 13 ммоль) і тетрагідрофуран при кімнатній температурі. Суміш охолоджували до 0-5 °С в атмосфері N<sub>2</sub> і перемішували при 0-5 °С протягом 10 хвилин. До одержаного розчину додавали трет-бутил-(4- метоксибензил){[(4-метоксибензил)(2-оксоетил)аміно]сульфоніл}карбамат (0,40 г, 0,84 ммоль, 1,68 екв.) і 3-(4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-10 оксадіазол-5(4Н)-он (0,17 г, 0,50 ммоль; стадія D) в тетрагідрофурані (ТГФ, 1,50 мл) при 0-5 °С. Реакційну суміш перемішували при 0-5 °С протягом 45 хвилин і потім додавали розчин трет-бутил-(4-метоксибензил){[(4-метоксибензил)(2-оксоетил)аміно]сульфоніл}карбамату (0,12 г, 0,20 ммоль, 0,4 екв.) в ТГФ (0,50 мл) при 0-5 °С. Після перемішування при 0-5 °С протягом 1 години реакційну суміш поступово 15 нагрівали до кімнатної температури при перемішуванні. Через 2,5 години і 4,5 години додавали трифтороцтову кислоту (0,25 мл). Через 5 годин додавали розчин трет-бутил-(4-метоксибензил){[(4-метоксибензил)(2-оксоетил)аміно]сульфоніл}карбамату (0,060 г, 0,1 ммоль, 0,2 екв.) в ТГФ (0,20 мл). Через 6,5 годин додавали розчин триацетоксиборгідриду натрію (0,060 г, 0,24 ммоль, 0,48 екв.) в трифтороцтовій кислоті (0,25 мл). ВЕРХ показала, що залишилось 20 приблизно 4 % вихідного матеріалу, 3-(4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4Н)-ону (з стадії D). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. ВЕРХ показала завершення реакції. Реакційну суміш виливали в льодяний насичений розчин карбонату натрію (50 мл) і екстрагували суміш дихлорметаном (3 × 20 мл). 25 Об'єднані дихлорметанові екстракти промивали насиченим сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували. Потім залишок очищали на силікагелі (градієнтне елювання, 0-30 % етилацетату в гексані) з одержанням необхідного продукту (0,33 г, 82,5 %) у вигляді майже-білої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,06 (м, 1H), 7,69 (м, 1H), 7,57 (т, 1H, J=8,7 Гц), 7,22 (м, 4H), 6,87 (м, 4H), 6,48 (м, 1H), 4,72 (с, 2H), 4,36 (с, 2H), 3,70 (с, 6H), 3,39 (м, 2H), 3,31 (м, 2H), 1,37 (с, 9H); C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>BrFN<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S (Мол. маса 804,64), PXMC (EI) m/e 826/828 (M<sup>+</sup> - Вос+Na).

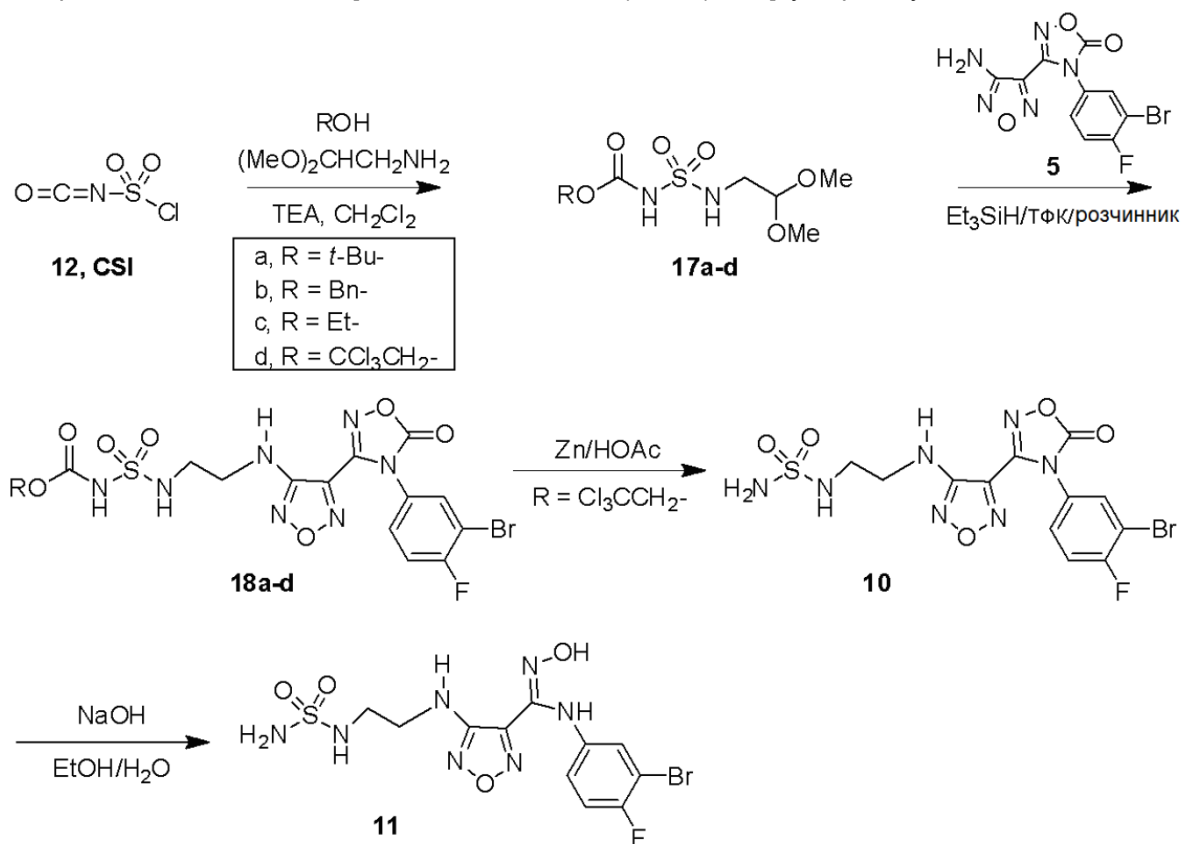
Стадія 5: N-[2-({4-[4-(3-Бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}аміно)етил]сульфамід (10)



В колбу об'ємом 25 мл вводили трет-бутил{[[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфеніл)-5- оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}аміно)етил](4-метоксибензил)аміно]сульфоніл}(4-метоксибензил)карбамат (40,2 г, 0,050 ммоль) в 10 трифтороцтовій кислоті (ТФК, 0,50 мл, 6,5 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали до 70 °С в атмосфері N<sub>2</sub> і перемішували протягом 1 години. ВЕРХ показала завершення реакції. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і випарювали ТФК. ТФК, що залишилась видаляли обробкою дихлорметаном (3 × 10 мл) з наступним випарюванням у вакуумі. Потім розтирали 15 залишок з дихлорметаном і метанолом з одержанням необхідного продукту (20 мг, 87 %) у вигляді неочищеної майже-білої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,08 (дд, J=6,2, 2,5 Гц, 1 H), 7,72 (м, 1 H), 7,59 (т, J=8,7 Гц, 1 H), 6,67

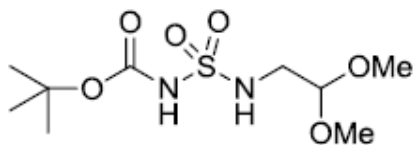
(т, J=5,9 Гц, 1H), 6,55 (с, 2H) 6,52 (т, J=6,0 Гц, 1 H), 3,38 (дд, J=12,7, 6,3 Гц, 2 H), 3,11 (дд, J=12,3, 6,3 Гц, 2H); C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>BrFN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S (Мол. маса 464,23), РХМС (EI) m/e 487,8/489,8 (M<sup>+</sup> +Na). 20

Приклад 3. Альтернативний спосіб одержання N-[2-([4-(3-бром-4-фторфеніл)-5- оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл)аміно)етил]сульфаміду



5

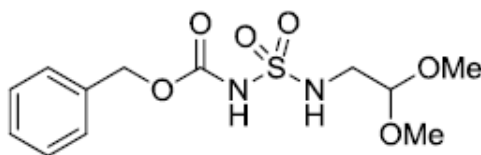
Стадія 1а. трет-Бутил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамойлкарбамат (17а)



Розчин хлорсульфонілізоціанату (11,32 г, 80 ммоль) в дихлорметані (120 мл) охолоджували до 0 °С. Через крапельну воронку додавали трет-бутиловий спирт (7,65 5 мл, 80,0 ммоль, 1,0 екв.). Суміш перемішували при 0 °С протягом 1,5 годин. До одержаної суміші по краплям, через крапельну воронку, додавали розчин аміноацетальдегіду диметилацеталю (8,76 мл, 80,0 ммоль, 1,0 екв.) і триетиламіну (ТЕА, 33,4 мл, 240 ммоль, 3,0 екв.) в метиленхлориді (ДХМ, 120,0 мл). Реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури і перемішували протягом ночі. Реакційну 10 суміш обробляли 0,1 н. розчином хлорводневої кислоти і промивали органічний шар насиченим сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували з одержанням необхідного продукту (15,6 г, 68,5 %) у вигляді неочищеної майже-білої твердої речовини, яку використовували для наступної реакції без додаткової очистки: <sup>1</sup>Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,84 (с, 1H), 7,62 (т, 1H, J=6,0 Гц), 4,38 (т, 1H, J=5,5 15 Гц), 3,24 (с, 6H), 2,96 (дд, 2H, J=5,8 Гц), 1,41 (с, 9H).

20

Стадія 1b. Бензил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамойлкарбамат (17b)

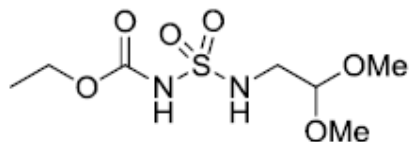


Розчин хлорсульфонілізоціанату (16,26 г, 114,9 ммоль) в дихлорметані (100 мл) охолоджували до 0 °С. Через крапельну воронку додавали бензиловий спирт (12,44 г, 115,0 ммоль, 1,0 екв.). Суміш перемішували при 0 °С протягом 0,5 годин. До одержаної 5 суміші по краплям, через крапельну воронку додавали суміш аміноацетальдегіду диметилацеталю (13,25

25

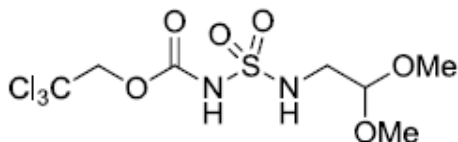
г, 126,0 ммоль, 1,1 екв.) і триетиламіну (ТЕА, 17,4 г, 172 ммоль, 1,5 екв.) при температурі нижче 15 °С. Реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури і перемішували протягом ночі. Реакційну суміш обробляли 0,5 н. розчином хлорводневої кислоти (100 мл), а зібрану органічну фазу промивали 10 насиченим сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували в вакуумі з одержанням необхідного продукту (23,5 г, 64,3 %) у вигляді неочищеної майже-білої твердої речовини. <sup>1</sup>Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 11,29 (с, 1Н), 7,90 (т, 1Н, J=6,0 Гц), 7,37 (м, 5Н), 5,12 (с, 2Н), 4,35 (т, 1Н, J=5,5 Гц), 3,21 (с, 6Н), 2,97 (дд, 2Н, J=5,8 Гц).

Стадія 1с. Етил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамойлкарбамат (17с)



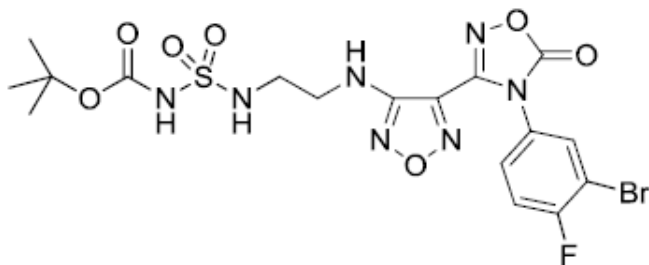
Розчин хлорсульфонілізоціанату (11,32 г, 80 ммоль) в дихлорметані (120 мл) охолоджували до 0 °С. Через крапельну воронку додавали етанол (4,67 мл, 80,0 ммоль, 1,0 екв.). Суміш перемішували при 0 °С протягом 1,5 годин. До суміші додавали 20 розчин аміноацетальдегіду диметилацеталю (8,76 мл, 80,0 ммоль, 1,0 екв.), триетиламіну (ТЕА, 33,4 мл, 240 ммоль, 3,0 екв.) в дихлорметані (ДХМ, 120,0 мл), по краплям, через крапельну воронку, при 0 °С. Реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури і перемішували протягом ночі. Реакційну суміш обробляли 0,1 н. розчином хлорводневої кислоти, а зібрану органічну фазу промивали насиченим 25 сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували в вакуумі з одержанням необхідного продукту (11,2 г, 55 %) у вигляді неочищеної майже-білої твердої речовини. <sup>1</sup>Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 11,13 (с, 1Н), 7,81 (т, 1Н, J=6,0 Гц), 4,37 (т, 1Н, J=5,5 Гц), 4,09 (к, 2Н, J=7,1 Гц), 3,23 (с, 6Н), 2,97 (дд, 2Н, J=5,8 Гц), 1,19 (т, 3Н, J=7,1 Гц).

Стадія 1d. 2,2,2-Трихлоретил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамойлкарбамат (17d)



Розчин хлорсульфонілізоціанату (6,96 мл, 80 ммоль) в дихлорметані (120 мл) охолоджували до 0 °С. Через крапельну воронку додавали 2,2,2-трихлоретанол (7,67 мл, 80,0 ммоль, 1,0 екв.) при 0 °С. Суміш перемішували при 0 °С протягом 1,5 годин. Потім до суміші по краплям, через крапельну воронку, додавали розчин аміноацетальдегіду диметилацеталю (8,76 мл, 80,0 ммоль, 1,0 екв.) і триетиламіну 10 (ТЕА, 33,4 мл, 240 ммоль, 3,0 екв.) в дихлорметані (ДХМ, 120,0 мл) при 0 °С. Реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури і перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Реакційну суміш обробляли 0,1 н. розчином хлорводневої кислоти, а зібрану органічну фазу промивали насиченим сольовим розчином, висушували над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> і концентрували з одержанням необхідного продукту (28,01 г, 15 97 %) у вигляді неочищеної майже-білої твердої речовини, яку використовували в наступній реакції без додаткової очистки. <sup>1</sup>Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 11,79 (с, 1Н), 8,08 (т, 1Н, J=5,9 Гц), 4,90 (с, 2Н), 4,37 (т, 1Н, J=5,5 Гц), 3,23 (с, 6Н), 3,00 (дд, 2Н, J=5,7 Гц).

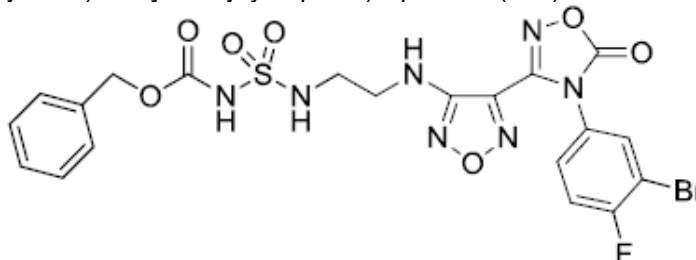
Стадія 2а. Трет-бутил-([2-([4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл)аміно)етил]аміно)сульфоніл)карбамат (18а)



Суміш 3-(4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4Н)-ону (103 мг, 0,302 ммоль, 1,5 екв.; стадія D) і трет-бутил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамойлкарбамату (57,2 мг, 0,201 ммоль) в дихлорметані (1,0 мл) 25 перемішували в атмосфері N<sub>2</sub> при кімнатній температурі. До одержаної суміші по краплям додавали трифтороцтову кислоту (0,50 мл, 6,5 ммоль) і триетилсилан (80,2 мкл, 0,502 ммоль, 2,5 екв.). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. ВЕРХ показала приблизно 30 % перетворення. Реакційну суміш охолоджували до 0 °С і гасили

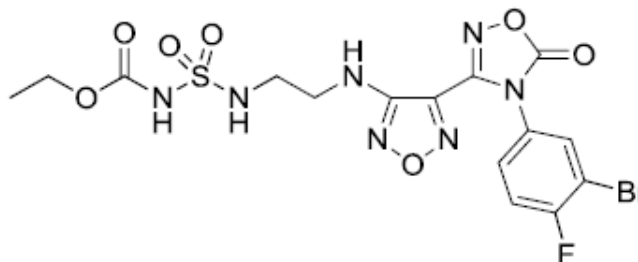
насиченим розчином бікарбонату натрію до pH ~ 8. Суміш екстрагували в етилацетаті (3 × 10 мл). Об'єднані органічні екстракти 5 промивали насиченим сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували. Залишок очищали препаративною ТСХ (50 % етилацетату в гексані) з одержанням необхідного продукту (27,5 мг, 29,5 %) у вигляді майже-білої твердої речовини. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 МГц): δ 10,90 (с, 1H), 8,08 (дд, J=6,2, 2,5 Гц, 1H), 7,72 (м, 1H), 7,59 (т, J=8,6 Гц, 1H), 6,58 (т, J=5,7 Гц, 1H), 3,38 (дд, J=12,7, 6,2 Гц, 10 2H), 3,10 (дд, J=12,1, 5,9 Гц, 2H), 1,41 (с, 9H). C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>BrFN<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S (Мол. маса 564,34), РХМС (EI) m/e 485,8/487,8 (M<sup>+</sup> - C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>+Na).

Стадія 2b. Бензил([2-([4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл)аміно)етил]сульфоніл)карбамат (18b)



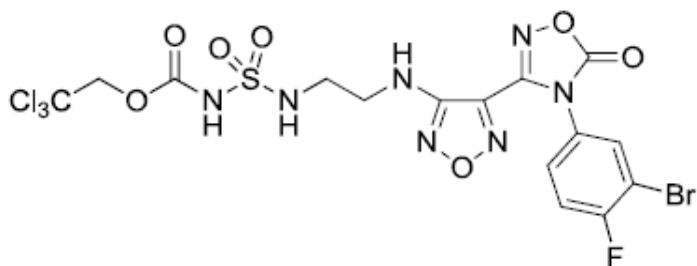
Суміш 3-(4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4H)-ону (68 мг, 0,20 ммоль; із стадії D) і бензил{[(2,2-диметоксиетил)аміно]сульфоніл}карбамату (191 мг, 0,60 ммоль, 3,0 екв.) в 1,2-дихлоретані (3,0 мл) охолоджували до 0 °С. До суміші по краплям додавали трифтороцтову кислоту (1,0 мл, 13,0 ммоль) і триетилсилан (105 мкл, 0,66 ммоль, 3,3 20 екв.). Реакційну суміш перемішували при 0 °С протягом 2 годин. ВЕРХ показала завершення реакції. Реакційну суміш охолоджували до 0 °С і гасили насиченим розчином бікарбонату натрію до pH ~ 8, і погашену реакційну суміш екстрагували EtOAc (3 × 10 мл). Об'єднані органічні екстракти промивали насиченим сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували. Потім перемішували 25 залишок в суміші гептану і діетилового етеру протягом 20 ночі. Тверді речовини збирали фільтрацією, промивали гептаном і висушували в вакуумі з одержанням необхідного продукту (125 мг, 99 %) у вигляді неочищеної майже-білої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11,31 (с, 1H), 8,05 (м, 1H), 7,87 (м, 1H), 7,68 (м, 1H), 7,56 (м, 1H), 7,32 (м, 5H), 6,54 (м, 1H), 5,07 (с, 2H), 3,29 (м, 2H), 3,09 (м, 2H); C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>BrFN<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S (Мол. маса 598,36), РХМС m/e 598/600 (M<sup>+</sup> +H).

Стадія 2c. Етил([2-([4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл)аміно)етил]аміно)сульфоніл)карбамат (18c)



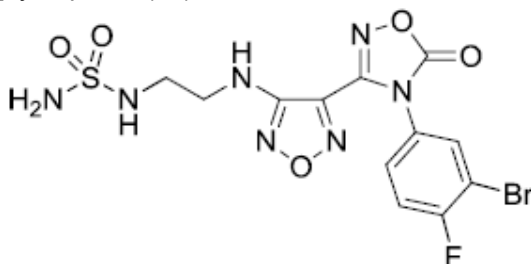
Суміш 3-(4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4H)-ону (68 мг, 0,20 ммоль; із стадії D) і етил{[(2,2-диметоксиетил)аміно]сульфоніл}карбамату (154 мг, 0,600 ммоль, 3,0 екв.) в 1,2-дихлоретані (2,50 мл, 31,7 ммоль) перемішували при 0 °С. До суміші додавали трифтороцтову кислоту (1,00 мл, 13,0 ммоль) і триетилсилан (105 мкл, 0,66 ммоль, 3,3 екв.) по краплям. Реакційну суміш перемішували при 0 °С протягом 3 годин. ВЕРХ показала 97,5 % перетворення в необхідний продукт. Реакційну суміш охолоджували до 0 °С і гасили насиченим розчином бікарбонату натрію до pH ~ 8. Суміш екстрагували в 15 етилацетаті (3 × 10 мл). Об'єднані органічні екстракти промивали насиченим сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували. Залишок перемішували в суміші гептану і діетилового етеру протягом ночі. Тверді речовини збирали фільтрацією, промивали гептаном з одержанням необхідного продукту (95 мг, 88 %) у вигляді неочищеної майже-білої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 20 11,18 (с, 1H), 8,08 (м, 1H), 7,70 (м, 2H), 7,59 (т, 1H, J=8,7 Гц), 6,56 (с, 1H), 4,04 (д, 2H, J=7,2 Гц), 3,35 (м, 2H), 3,11 (м, 2H), 1,15 (т, 3H, J=7,2 Гц); C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>BrFN<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S (Мол. маса 536,29), РХМС (EI) m/e 536/538 (M<sup>+</sup> +H).

Стадія 2d. 2,2,2-Трихлоретил([2-([4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл)аміно)етил]аміно)сульфоніл)карбамат 25 (18d)



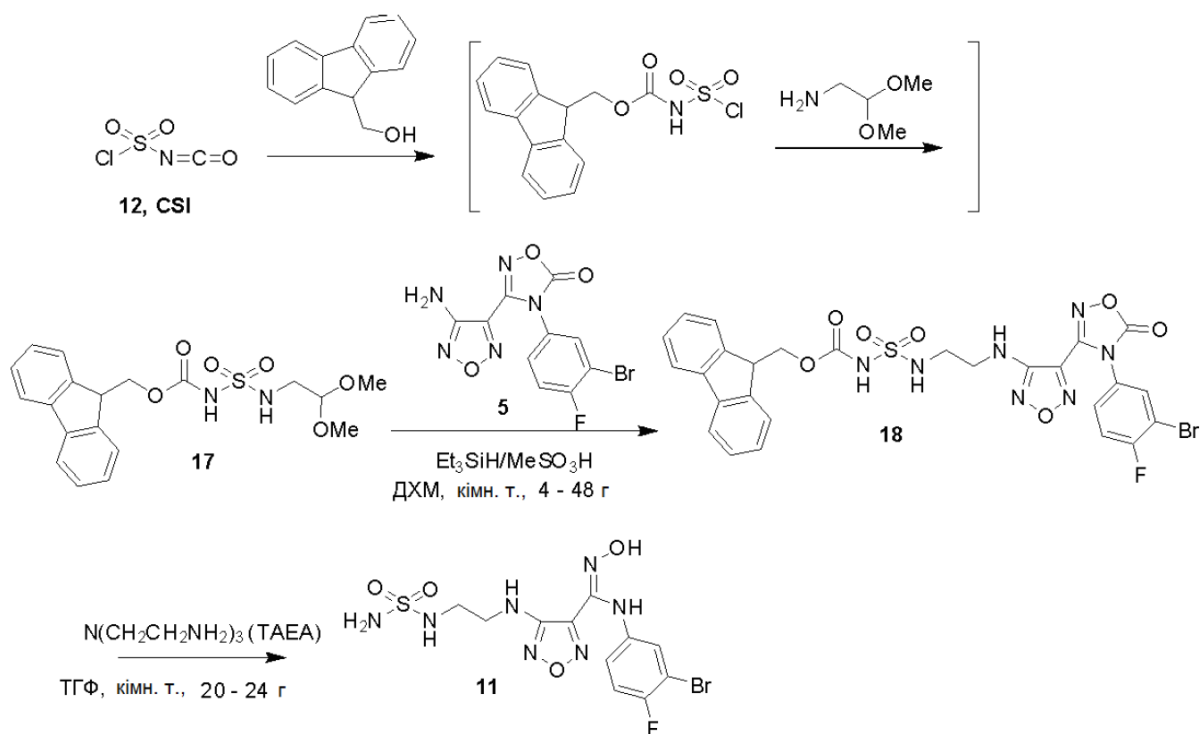
Суспензію 3-(4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4H)-ону (5, 0,680 г, 1,99 ммоль) і 2,2,2-трихлоретил[[(2,2-диметоксиетил)аміно]сульфоніл]карбамату (17d, 2,22 г, 6,17 ммоль, 3,1 екв.) в дихлорметані (ДХМ, 6,0 мл) перемішували при кімнатній температурі. До суміші 5 додавали триетилсилан (1,27 мл, 7,95 ммоль, 4,0 екв.) і розчин трифтороцтової кислоти (ТФК, 3,0 мл, 39,0 ммоль) в дихлорметані (ДХМ, 2,0 мл), підтримуючи температуру реакційної суміші нижче 30 °С. Реакційна суміш ставала однорідною через 5 хвилин струшування при кімнатній температурі і її перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. ВЕРХ показала завершення реакції. Реакційну суміш 10 відфільтровували і суспендували осад в суміші дихлорметану і гептану (співвідношення дихлорметану до гептану складало 1 до 9 по об'єму). Суспензію перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Осад збирали фільтрацією і промивали 10 % розчином дихлорметану в гептані і висушували в вакуумі з одержанням необхідного продукту (1,15 г, 90,4 %) у вигляді майже-білої твердої речовини, яку використовували в наступній реакції без додаткової очистки. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11,85 (с, 1H), 8,07 (м, 2H), 7,70 (м, 1H), 7,57 (т, 1H, J=8,7 Гц), 6,56 (м, 1H), 4,88 (м, 2H), 3,37 (м, 2H), 3,16 (м, 2H); C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>BrCl<sub>3</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S (Мол. маса 639,62), РХМС (EI) m/e 638/640/642 (M<sup>+</sup> + H).

Стадія 3. N-[2-({4-[4-(3-Бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}аміно)етил]сульфамід (10)

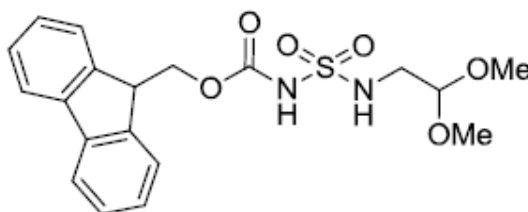


Розчин 2,2,2-трихлоретил[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл}аміно)етил]аміно]сульфоніл]карбамату 25 (320 мг, 0,50 ммоль; із стадії Q, Спосіб D) в тетрагідрофурані (ТГФ, 4,0 мл) перемішували при кімнатній температурі. Послідовно додавали оцтову кислоту (0,30 мл, 5,3 ммоль) і цинкові пластинки (160 мг, 2,5 ммоль, 5,0 екв.). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 3 годин. ВЕРХ показала завершення реакції. Реакційну суміш відфільтровували через целіт і промивали целіт ТГФ. Об'єднаний фільтрат концентрували в вакуумі і розчиняли одержаний залишок в 5 етилацетаті (20 мл). Етилацетатний розчин промивали насиченим розчином карбонату натрію і насиченим сольовим розчином, висушували над сульфатом натрію і концентрували. Неочищений матеріал кристалізували з етилацетату і діетилового етеру з одержанням необхідного продукту (147 мг, 63 %) у вигляді майже-білої твердої речовини.

Приклад 4. Альтернативний спосіб одержання 4-({2-[(аміносульфоніл)аміно]етил}аміно)-N-(3-бром-4-фторфеніл)-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідаміду

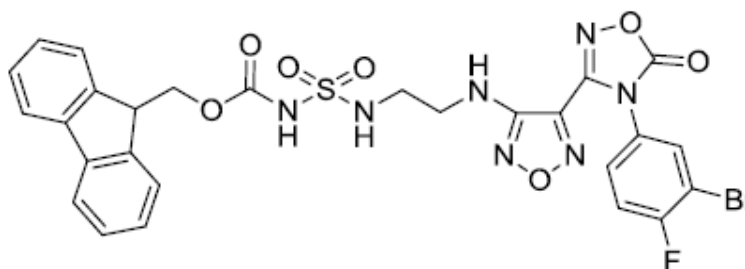


Стадія 1. (9Н-Флуорен-9-іл)метил-N-(2,2-диметоксиетил)сульфамойлкарбамат



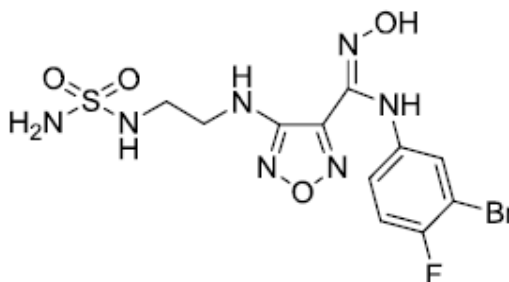
У висушену в печі 4-горлу круглодонну колбу об'ємом 2 л завантажували 9-флуоренілметанол (50,0 г, 255 ммоль) і безводний ДХМ (382 мл) при кімнатній температурі. Одержану суспензію охолоджували на льодяній бані до температури приблизно 0-5 °С. До суспензії через крапельну воронку по краплям додавали розчин хлорсульфонілізоціанату (CSI, 23,0 мл, 264 ммоль) в безводному ДХМ (127 мл) протягом 22 хвилин, підтримуючи температуру реакційної суміші < 5 °С. Одержану суміш перемішували при 0-5 °С протягом 1,75 години з одержанням густої білої суспензії. До суміші додавали розчин аміноацетальдегіду диметилацеталю (27,9 мл, 255 ммоль) в безводному ДХМ (382 мл) і 4-метилморфолін (84,0 мл, 764 ммоль) при температурі приблизно 0-5 °С протягом 71 хвилини. Потім одержану реакційну суміш перемішували на льодяній бані протягом 1,5 годин. Коли ВЕРХ показала завершення 10 реакції, реакційну суміш підкислювали, додаючи по краплям 1,0 М розчин фосфорної кислоти (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, водн., 640 мл) протягом 22 хвилин до рН 1-2. Потім додавали воду (300 мл), EtOAc (2150 мл) і гептан (250 мл) і перемішували одержану суміш протягом 10 хвилин. Розділяли дві фази і післідовно промивали органічну фазу водою (500 мл), гептаном (300 мл) і водою (2 × 500 мл) і висушували над MgSO<sub>4</sub>. 15 Фільтрат концентрували під вакуумом досуха. Одержані тверді речовини повторно розчиняли в EtOAc (600 мл) при 65 °С і відфільтровували теплий розчин в чисту круглодонну колбу об'ємом 3 л. Фільтрат охолоджували до кімнатної температури і перемішували протягом 2,5 годин, потім додавали гептан (1200 мл) via крапельну воронку за 80 хвилин. Після перемішування при кімнатній температурі суміш 20 охолоджували на льодяній бані протягом 1 години. Одержані тверді речовини збирали фільтрацією, промивали 25 % EtOAc в гептані (250 мл) і сушили протягом ночі при температурі приблизно 40-45 °С у вакуумі з одержанням 9Н-флуорен-9-ілметил-[(2,2-диметоксиетил)аміно]сульфоніл}карбамату (91,3 г, вихід 88 %) у вигляді білого порошку. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 11,43 (с, 1Н), 7,98 – 7,85 (м, 3Н), 7,76 (д, J=25 7,5 Гц, 2Н), 7,43 (т, J=7,2 Гц, 2Н), 7,33 (тд, J=7,4, 1,1 Гц, 2Н), 4,44 – 4,33 (м, 3Н), 4,33 – 4,22 (м, 1Н), 3,23 (с, 6Н), 2,99 (т, J=5,8 Гц, 2Н) м.д.

Стадія 2. 9Н-Флуорен-9-ілметил({[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл]аміно)етил]аміно}сульфоніл)карбамат



До перемішуваної суспензії 3-(4-аміно-1,2,5-оксадіазол-3-іл)-4-(3-бром-4-фторфеніл)-1,2,4-оксадіазол-5(4H)-ону (10,00 г, 29,23 ммоль) в ДХМ (160 мл) додавали метансульфонову кислоту (MeSO<sub>3</sub>H, 8,46 г, 88,04 ммоль) і триетилсилан (Et<sub>3</sub>SiH, 8,37 г, 71,96 ммоль) при кімнатній температурі за 10 хвилин з одержанням суспензії. 5 Частинами додавали твердий 9Н-флуорен-9-ілметил({[2,2-диметоксиетил]аміно}сульфоніл)карбамат (12,25 г, 30,14 ммоль) (1 г/3-4 хв.; протягом 1 години), підтримуючи внутрішню температуру нижче приблизно 20 °С за допомогою водяної бані. Після додавання одержану суміш перемішували при температурі приблизно 13-22 °С протягом 3 днів. Додавали додаткову кількість триетилсилану 10 (Et<sub>3</sub>SiH, 0,1755 г, 1,51 ммоль) і 9Н-флуорен-9-ілметил({[2,2-диметоксиетил]аміно}сульфоніл)карбамату (0,3082 г, 0,76 ммоль) і перемішували одержану суміш при кімнатній температурі ще 23 години. Додавали ізопропіловий спирт (IPA, 15 мл) і перемішували одержану суміш при кімнатній температурі протягом 1 години. Додавали гептан (100 мл) і перемішували суміш при кімнатній температурі ще 2 години. Тверді речовини збирали фільтрацією, промивали IPA/гептаном (1/5; 2 × 30 мл) і гептаном (2 × 30 мл) і висушували під вакуумом з одержанням 9Н-флуорен-9-ілметил({[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл]аміно)етил]аміно}сульфоніл)карбамату у вигляді білої твердої речовини (18,30 г, 20 вихід 91,1 %). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 11,44 (с, 1H), 8,07 (дд, J=6,2, 2,5 Гц, 1H), 7,90 (т, J=5,6 Гц, 1H), 7,88 (д, J=7,6 Гц, 2H), 7,72 (д, J=7,0 Гц, 2H), 7,71 (ддд, J=8,9, 4,3, 2,6 Гц, 1H), 7,57 (дд, J=8,7, 8,7 Гц, 1H), 7,40 (т, J=7,4 Гц, 2H), 7,31 (тд, J=7,4, 1,0 Гц, 2H), 6,55 (т, J=6,0 Гц, 1H), 4,35 (д, J=7,3 Гц, 2H), 4,25 (т, J=7,2 Гц, 1H), 3,39 (к, J=6,4 Гц, 2H), 3,15 (к, J=6,3 Гц, 2H); <sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 159,03 (д, J=25 248,7 Гц), 156,61 (с), 155,22 (с), 151,55 (с), 148,67 (с), 143,29 (с), 140,68 (с), 133,82 (с), 133,39 (с), 130,05 (д, J=8,5 Гц), 128,54 (д, J=3,2 Гц), 127,73 (с), 127,07 (с), 125,24 (с), 120,11 (с), 117,42 (д, J=24,0 Гц), 108,19 (д, J=22,5 Гц), 66,70 (с), 46,17 (с), 43,34 (с), 40,79 (с) м.д.; <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ -103,99 – -107,39 (м) м.д.

Стадія 3. 4-({2-[(Аміноссульфоніл)аміно]етил]аміно)-N-(3-бром-4-фторфеніл)-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідамід



В 4-горлу круглодонну колбу об'ємом 1 л завантажували 9Н-флуорен-9-ілметил({[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфеніл)-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-оксадіазол-3-іл]-1,2,5-оксадіазол-3-іл]аміно)етил]аміно}сульфоніл)карбамат (25,0 г, 36,4 ммоль) і безводний ТГФ (250 мл) при кімнатній температурі з одержанням однорідного розчину. Потім розчин охолоджували до 0-5 °С на льодяній бані, потім по краплям додавали N, N-біс(2-аміноетил)етан-1,2-діамін (114 мл, 728 ммоль) протягом 35 хвилин в крапельну воронку. Крапельну воронку промивали безводним ТГФ (50 мл) і до 10 реакційної суміші додавали промивний розчин. Охолоджувальну баню прибирали і поступово нагрівали реакційну суміш до кімнатної температури і перемішували при кімнатній температурі протягом 2,5 годин. Додавали EtOAc (400 мл) і одержану суміш переносили в 4-горлу круглодонну колбу об'ємом 2 л і охолоджували до температури приблизно 0-5 °С на льодяній бані. По краплям додавали 2,0 М водний розчин HCl (400 15 мл, 800,0 ммоль) в крапельну воронку, підтримуючи внутрішню температуру нижче 10 °С. Дві фази розділяли і екстрагували водну фазу EtOAc (200 мл). Органічні фракції об'єднували і охолоджували до температури приблизно 6-7 °С. До холодної органічної фракції по краплям

додавали 2,0 М водний розчин HCl (200,0 мл, 400,0 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру нижче 10 °С. Дві фази розділяли і промивали 20 органічну фазу водою (2 × 400 мл), висушували над MgSO<sub>4</sub> і концентрували при пониженому тиску до світло-жовтої сиропоподібної речовини. Сиропоподібну речовину розчиняли в EtOAc (60,0 мл) з одержанням

5 однорідного розчину. До розчину по краплям додавали розчин ДХМ (250,0 мл) і метил-трет-бутилового етеру (МТБЕ, 100,0 мл). Одержану суспензію перемішували протягом ночі при кімнатній температурі, потім охолоджували на льодяній бані протягом 1 години. Тверді речовини збирали фільтрацією, промивали 250 мл холодного розчину ДХМ (150 мл) і МТБЕ (100 мл), і висушували під вакуумом з одержанням 14,4 г неочищеного необхідного продукту у

10 вигляді білої твердої речовини.

Неочищений продукт розчиняли в EtOAc (140,0 мл) при 60 °С і відфільтровували теплий розчин. Фільтрат охолоджували до кімнатної температури, потім по краплям додавали гептан (100,0 мл) протягом 55 хв. Потім перемішували одержану суміш при кімнатній температурі протягом ночі. Тверді речовини збирали фільтрацією, промивали 2:1 сумішшю гептану і EtOAc (75 мл) і висушували під вакуумом при 40-50 °С до постійної маси з одержанням 4-((2-5

15 [(аміносультоніл)аміно]етил)аміно)-N-(3-бром-4-фторфеніл)-N'-гідрокси-1,2,5-оксадіазол-3-карбоксимідаміду (12,9 г, вихід 81 %) у вигляді білої твердої речовини.

Приклад А: Ферментний аналіз людської індоламін-2,3-діоксигенази (IDO)

Людську індоламін-2,3-діоксигеназу (IDO) з N-кінцевою міткою His 10 експресували в E.coli і

20 очищали до однорідності. IDO каталізує окисне розщеплення пірольного кільця індольного ядра триптофану з утворенням N'-формілінуреніну. Аналізи проводили при кімнатній температурі, як описано в літературних джерелах, використовуючи 95 нМ IDO і 2 мМ D-Trp в присутності 20 мМ аскорбату, 5 мМ метиленового синього і 0,2 мг/мл каталази в 50 мМ фосфатно-калійному буфері (рН 15 6,5). Безперервно записували вихідну швидкість реакції щодо підвищення

25 поглинання при 321 нм в результаті утворення N'-формілінуреніну (див.: Sono, M., et al., 1980, J. Biol. Chem. 255, 1339-1345). Сполуку Формули I досліджували в аналізі Прикладу А і виявили, що вона має IC<sub>50</sub> <200 нМ.

Приклад В: Визначення інгібуючої активності індоламін-2,3-діоксигенази (IDO)/кінуреніну в аналізі на клітинах HeLa

Клітини HeLa (#CCL-2) одержували від Американської колекції тканинних культур (ATCC, Манассас, штат Вірджинія) і звичайним чином витримували в мінімально необхідному середовищі (Ігла) з 2 мМ L-глутаміну і збалансованим 25 сольовим розчином Ерла (Earle BSS), що містить 1,5 г/л бікарбонату натрію, 0,1 мМ замінних амінокислот, 1 мМ пірувату натрію і 10 % ембріональної бичачої сироватки (всі виробництва Invitrogen). Клітини витримували при 37 °С в зволоженому інкубаторі з 5 % CO<sub>2</sub>. Аналіз проводили наступним чином: Клітини HeLa висівали в

30 96-луночний культуральний планшет при щільності 5 × 10<sup>3</sup> на лунку і вирощували протягом ночі. На 30 наступний день до клітин додавали IFN-γ (кінцева концентрація 50 нг/мл) і серійні розведення сполук (в загальному об'ємі 200 мкл культурального середовища). Через 48 годин інкубування в кожну лунку нового 96-лункового планшету перенесли 140 мкл надосадкової

40 рідини. 10 мкл 6,1 н. трихлороцтової кислоти (# T0699, Sigma) змішували в кожній лунці і інкубували при 50 °С протягом 30 хвилин для гідролізу N-формілінуреніну, утвореного під дією індоламін-2,3-діоксигенази на кінуренін. Потім реакційну суміш центрифугували протягом 10 хвилин при 2500 об./хв. для видалення осаду. 100 мкл надосадкової рідини на лунку перенесли в інший 96-лунковий планшет і 5 змішували з 100 мкл 2 % (мас./об.) п-

45 диметиламінобензальдегіду (# 15647-7, Sigma-Aldrich) в оцтовій кислоті. Жовтий колір, обумовлений кінуреніном, вимірювали при 480 нм, використовуючи мікропланшетний зчитувач SPECTRAmax 250 (Molecular Devices). Як стандарт використовували L-кінуренін (# K8625, Sigma). Стандартні зразки (240, 120, 60, 30, 15, 7,5, 3,75, 1,87 мкМ) отримували в 100 мкл культурального 10 середовища і змішували з рівним об'ємом 2 % (мас./об.) п-

50 диметиламінобензальдегіду. Визначали процентне інгібування при окремих концентраціях і отримували середні значення для двох примірників. Дані аналізували, використовуючи нелінійну регресію, з отриманням значень IC<sub>50</sub> (Prism Graphpad). (Див.: Takikawa O, et al., 1988, J. Biol. Chem., 263 (4): 2041-8.)

Приклад С: Визначення впливу інгібіторів IDO на проліферацію Т-клітин, пригнічену IDO-експресуючими дендритними клітинами

Моноцити збирали з мононуклеарних клітин периферичної крові людини за допомогою лейкофорезу. Потім моноцити висівали при густині 1×10<sup>6</sup> клітин на лунку 20 в 96-лунковий планшет, використовуючи середовище RPMI 1640 з додаванням 10 % ембріональної бичачої сироватки і 2 мМ L-глутаміну (всі виробництва Invitrogen). Адгезивні клітини залишилися на

60 планшеті після вирощування протягом ночі при 37 °С. Потім адгезивні моноцити стимулювали

протягом 5-7 днів за допомогою 100 нг/мл GM-CSF (#300-03, PeproTech) і 250 нг/мл IL-4 (#200-04, PeproTech), потім активували 25 за допомогою 5 мкг/мл LPS з *Salmonella typhimurium* (#437650, Sigma) і 50 нг/мл IFN- $\gamma$  (# 285-IF, R&D Systems) протягом ще 2 днів для дозрівання дендритних клітин.

Після активації дендритних клітин середовище замінювали на доповнену RPMI 1640 з додаванням 100-200 О/мл IL-2 (#CYT-209, ProSpec-Tany TechnoGene) і 100 нг/мл анти-CD3 антитіла (# 555336, PharMingen), Т-клітин (2-3  $\times$  10<sup>5</sup> клітин на лунку) і 30 серійних розведень сполук IDO. Після інкубації протягом ще 2 днів, вимірювали проліферацію Т-клітин за допомогою аналізу включення BrdU, використовуючи набір для колориметричного імуоферментного аналізу клітинної проліферації за інструкціями виробника (#1647229, Roche Molecular Biochemicals). Клітини безперервно вирощували протягом 16-18 годин в присутності 10 мкМ розчину мітки BrdU. Потім видалили середовище з міткою і додавали до клітин 200 мкл FixDenat на лунку і інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Розчин FixDenat видаляли і додавали 100 мкл на лунку робочого розчину анти-BrdU-POD антитіла. 5 Реакцію проводили протягом 90 хвилин при кімнатній температурі. Потім видаляли кон'югат антитіла і три рази промивали клітини 200 мкл на лунку для промивання. Нарешті, додавали 100 мкл на лунку розчину субстрату і отримали результати з допомогою мікропланшетного зчитувача (Spectra Max PLUS, Molecular Devices) при прояві кольору. У різних точках часу отримували кілька значень, щоб дані потрапляли в лінійний діапазон. Дані були отримані звичайним чином при багаторазовому проведенні експериментів, включені також відповідні контрольні значення. (Див.: Terness P, et al. 2002 J. Exp. Med., 196 (4): 447-57; і Hwu, P, et al. 2000, J. Immunol., 164 (7): 3596-9).

Приклад D: In vivo дослідження протипухлинної активності інгібіторів IDO

In vivo протипухлинна ефективність може бути досліджена за допомогою модифікованих протоколів алотрансплантат/ксенотрансплантат пухлини. Наприклад, в літературних джерелах описано, що інгібування IDO може мати синергетичну дію з цитотоксичною хіміотерапією у імунокомпетентних мишей (Muller, A.J., et al. 2005, 20 Nat. Med. 11: 312-319). Залежність синергії від Т-клітин була показана за допомогою порівняння синергетичного ефекту досліджуваного інгібітору IDO в мишачих моделях ксенотрансплантата пухлини (наприклад, B16 і родинні варіанти, CT-26, LLC), що розвивалася у імунокомпетентних сингенних мишей, з ефектом, що спостерігається у сингенних мишей, оброблених нейтралізуючими анти-CD4 антитілами, або з ростом 25 таких же пухлин у мишей з пригніченим імунітетом (наприклад, nu/nu).

Концепція диференціальної протипухлинної дії у імунокомпетентних мишей у порівнянні з мишами з пригніченим імунітетом також може забезпечувати можливість тестування досліджуваних інгібіторів IDO як агентів монотерапії. Наприклад, пухлини LLC добре розвиваються в їх сингенному штамі-господаря, 30 C57Bl/6. Однак якщо зазначених мишей обробляють інгібітором IDO 1-MT (в порівнянні з плацебо), то утворення пухлин помітно сповільнюється, дозволяючи зробити висновок, що інгібування IDO має ефект пригнічення росту (Friberg, M., et al. 2002 Int. J. Cancer 101: 151-155). За такою логікою, може бути досліджена ефективність інгібування IDO в моделі ксенотрансплантата пухлини LLC, що розвинулася у імунокомпетентних мишей C57Bl/6, яка може бути порівняна з ефектом інгібіторів IDO на ріст пухлини LLC у "голих" мишей або мишей SCID (або мишей C57Bl/6, оброблених антитілами, які нейтралізують активність Т-клітин). Оскільки ефект виявлення імунопригнічуючої активності IDO, опосередкованої пухлиною, 5 ймовірно буде відрізнятися в залежності від імуногенного потенціалу різних пухлинних моделей, то клітини пухлини можуть бути піддані генетичним модифікаціям для підвищення їх імуногенного потенціалу. Наприклад, експресія GM-CSF в клітинах B16.F10 підвищує їх імуногенний потенціал (Dranoff, G., et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 3539-3543). Отже, в деяких пухлинних моделях 10 (наприклад, B16.F10) можуть бути створені [полі]клони, які експресують імуностимулюючі білки, такі як GM-CSF, і може бути досліджений ефект пригнічення росту інгібіторів IDO проти пухлин, що виникли із зазначених пухлинних клітинах у імунокомпетентних мишей і у мишей з пригніченим імунітетом.

Третій напрямок для оцінки ефективності інгібіторів IDO in vivo заснований на використанні "попередньої імунізації" мишачих моделей алотрансплантата/ксенотрансплантата пухлини. У зазначених моделях імунокомпетентних мишей сенсibilізують до певного антигену або антигенів пухлини для імітації терапевтичної протипухлинної вакцинації. Це дає можливість виникнення протипухлинного відгуку у мишей, опосередкованого імунною системою, якщо миші 20 були досить сенсibilізовані мишачими пухлинними клітинними лініями (мають такі ж антигени пухлини, як були використані для імунізації) в експериментах ксенотрансплантата. Було показано, що експресія IDO притупляє протипухлинний відгук і забезпечує можливість 60 більш швидкого росту ксенотрансплантатів. Важливо, що ріст пухлин в даній моделі інгібують

інгібітором IDO 1-MT (Uyttenhove, C., et al. 25 2003 Nat. Med. 9: 1269-1274). Зазначена модель є особливо привабливою, оскільки активність IDO допускає ріст пухлини P815 а, отже, специфічне інгібування IDO буде пригнічувати ріст.

Нарешті, для оцінки впливу інгібіторів *in vivo* може бути використана терапевтична імунізація. Наприклад, за допомогою клітин B16-BL6 було 30 продемонстровано, що можна сенсibilізувати мишей B16/6 внутрішньовенною ін'єкцією пухлинних клітин з наступною обробкою добре відомим імуногенним пептидом (наприклад, TRP-2), що експресується клітинами пухлини (Ji, et al., 2005, J. Immunol, 175: 1456-63). Важливо, що модифікатори імунної системи, такі як анти-CTL-4 антитіла, можуть покращувати відповідь на таку терапевтичну імунізацію. Вплив інгібіторів IDO може бути перевірено таким же чином - імунізацією пухлинним пептидом з інгібітором IDO і без нього. Ефективність є оцінкою виживання тварин (час до загину) або вимірювання метастазів пухлини в легені і/або інші органи в певні точки часу.

У будь-яких/всіх описаних вище моделях можна також прямо і/або опосередковано вимірювати кількість і/або активність реактивних імунних до пухлини клітин. Способи вимірювання кількості та/або активності реактивних імунних до пухлини клітин добре вивчені і можуть бути здійснені за допомогою технологій, знайомих фахівцям в даній області техніки (Current Protocols in Immunology, том 4, 10 Coligan, JE, et al.; Immunotherapy of Cancer, Human Press, 2006, Disis, ML і посилання, наведені в ньому). Концептуально, зниження імунопригнічуючого ефекту IDO може призводити до підвищення кількості або реактивності пухлинспецифічних імунних клітин. Крім того, інгібування IDO може додатково збільшувати кількість або реактивність реактивних імунних до пухлини клітин при об'єднанні з іншими 15 терапевтичними агентами, наприклад, хіміотерапевтичними агентами і/або імуномодуляторами (наприклад, анти-CTLA4 антитіло).

Всі експерименти з алотрансплантат/ксенотрансплантат можуть бути проведені за допомогою стандартних технологій роботи з пухлинами (огляд Corbett, et al., в Cancer Drug Discovery and Development: Anticancer Drug Development Guide: Preclinical 20 Screening, Clinical Trials, and Approval, 2e вид. Teicher, B.A. and Andrews, PA, Humana Press Inc.: Тотова, штат Нью-Джерсі, 2004). Клонування і введення генів (наприклад, IDO, GM-CSF) в пухлинні клітинні лінії може бути проведено за допомогою технологій, відомих фахівцям в даній області техніки (огляд Sambrook, J. and Russel, D., Molecular Cloning: A laboratory Manual (3e видання), Cold Spring Harbor Laboratory Press: Колд Спрінг Харбор, штат Нью-Йорк, 2001).

Приклад Е: *In vivo* дослідження інгібіторів IDO в моделі енцефаліту з вірусом імунодефіциту людини 1 (ВІЛ-1)

#### 1. Виділення клітин і вірусна інфекція

Моноцити і PBL можуть бути одержані за допомогою протипотокового елютраційного центрифугування лейкофореозних пакетів, отриманих від серонегативних донорів з ВІЛ-1, 2 і гепатитом В. Моноцити вирощували в суспензійній культурі, використовуючи тefлонові колби в середовищі Ігла, модифікованого за способом Дульбекко (DMEM, Sigma-Aldrich), з додаванням 10 % інактивованої нагріванням змішаної сироватки людини, 1 % глутаміну, 50 мкг/мл гентаміцину, 10 мкг/мл ципрофлоксацину (Sigma) і 1000 Е/мл рекомбінантного людського макрофагального колонієстимулюючого фактора високого очищення. Через сім днів в культурі MDM інфікували ВІЛ-1ADA з множинністю зараження 0,01. 5

#### 2. Миші Hu-PBL-NOD/SCID HIVE

Самці мишей NOD/C.B-17 SCID віком чотири тижні можуть бути одержані (Jackson Laboratory). Тварин витримували в стерильних клітинах-мікроізоляторах в безмікробних умовах. Всім тваринам вводили внутрішньочеревенно ін'єкцію щурячих 10 анти-CD122 (0,25 мг/миша) за три дні до трансплантації PBL і два рази кролячі асіало-GM1 антитіла (0,2 мг/мише) (Wako) за один день до і через три дня після трансплантації PBL ( $20 \times 10^6$  клітин/мишу). ВІЛ-1ADA-інфікування MDM ( $3 \times 10^5$  клітин в 10 мкл) вводили інтракраніальною ін'єкцією (і.к.) через вісім днів після відтворення PBL з отриманням мишей hu-PBL-NOD/SCID HIVE. Відразу після і.к. 15 ін'єкції ВІЛ-1 інфікованим MDM мишам hu-PBL-NOD/SCID HIVE підшкірно (п.ш) імплантували імплантат з контролем (носієм) або гранули сполуки (повільне вивільнення протягом 14 або 28 днів, Innovative Research). Початкові експерименти призначені для підтвердження індукції вірус-специфічних CTL у тварин hu PBL-NOD/SCID HIVE, оброблених IDO сполуками. Це підтверджувало тетрамерне 20 фарбуванням і нейропатологічні аналізи елімінування MDM з тканини головного мозку. Крім того, експеримент призначений для аналізу відтворення людських лімфоцитів, гуморальної імунної відповіді і нейропатологічних змін. У зазначених експериментах тварин знекровлювали на 7 день і присипляли на 14 і 21 день після і.к. ін'єкції людського MDM. Кров, збирали в пробірки, що містять ЕДТА, і 25 використовували для проточної цитометрії, а плазму використовували для виявлення ВІЛ-1 р24 за допомогою

імуноферментного твердофазного аналізу (Beckman Coulter <sup>TM</sup>). Специфічні до ВІЛ-1 антитіла виявляли за допомогою досліджень вестерн-блот за інструкціями виробника (набір для вестерн-блот ВІЛ-1 Cambridge Biotech, Calypse Biomedical). У контрольних тварин і у тварин, оброблених сполуками, виявляли 30 однакову кількість специфічних до вірусу антитіл. В цілому, може бути

5

проведено три незалежні експерименти з використанням трьох різних донорів лейкоцитів людини.

### 3. FACSscan периферичної крові та селезінки у мишей hu PBL-NOD/SCID HIVE

Двоколірний аналіз FACS може бути проведений на периферичній крові через 1-3 тижні і на спленоцитах через 2 і 3 тижні після і.к. ін'єкції людського MDM. Клітини інкубували з флуорофор-кон'югованим моноклональним Abs (mAbs) до людського CD4, CD8, CD56, CD3, IFN- $\gamma$  (eBioscience) протягом 30 хв. при 4 °C. Для оцінки клітинної імунної відповіді проводили IFN- $\gamma$  внутрішньоклітинне фарбування в 5 комбінації з антилюдським CD8 і FITC-кон'югованим антимишачим CD45 для виключення мишачих клітин. Для визначення Ag-специфічного CTL, проводили фарбування алофікоціанін-кон'югованого тетрамера для ВІЛ-1<sup>gag</sup> (p17 (aa77-85) SLYNTVATL, SL-9) і ВІЛ-1<sup>pol</sup> [(aa476-485) ILKEPVHGV, IL-9] на спленоцитах, стимульованих фітогеммаглютиніном/інтерлейкіном-2 (PHA/IL-2). Клітини фарбували 10 за рекомендаціями NIH/Національного інституту алергії та інфекційних захворювань, National Tetramer Core Facilities. Дані аналізували за допомогою FACS Calibur<sup>TM</sup>, використовуючи програмне забезпечення CellQuest (імуноцитометрична система Becton Dickinson).

10

### 4. Гістопатологія і аналіз зображень

Тканину головного мозку збирали на 14 і 21 день після і.к. ін'єкції MDM, фіксували в 4 % параформальдегіді з фосфатним буфером і заливали парафіном або заморожували при -80 °C для подальшого використання. Із залитих блоків нарізали коронарні зрізи для визначення місця ін'єкції. Для кожної миші вирізали 30-100 20 (товщиною 5 мкм) серійних сегментів з ділянки ін'єкції людського MDM і аналізували 3-7 слайдів (віддалених один від одного на 10 сегментів). Зрізи мозку депарафінізували ксилолом і гідратували в спиртовому градієнті. Імуногістохімічне фарбування проводили відповідно до базового непрямого протоколу, використовуючи демаскування антигену шляхом нагрівання до 95 °C в 0,01 моль/л цитратному буфері 25 протягом 30 хвилин для демаскування антигену. Для визначення людських клітин в головному мозку мишей використовували mAb до віментин (1:50, клон 3B4, Dako Corporation), який ідентифікує всі людські лейкоцити. Людський MDM і лімфоцити CD8<sup>+</sup> виявляли за допомогою антитіл CD68 (розведення 1:50, клон KP 1) і CD8 (розведення 1:50, клон 144B), відповідно. Інфіковані вірусом клітини мітили за 30 допомогою mAb до ВІЛ-1 p24 (1:10, клон Kal-1, всі виробництва Dako). Реактивні мишачі мікрогліальні клітини виявляли з антитілом Iba-1 (1: 500, Wako). Експресію людської IDO (huIDO) візуалізували за допомогою антитіл, набутих у Відділі клітинної фармакології Центрального дослідницького інституту, Вища медична школа, Університет Хоккайдо, Саппоро, Японія. Первинні антитіла виявляли з відповідними біотинільованими вторинними антитілами і візуалізували з комплексами авідин-біотин (набір Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories) і пероксидазою хрому (HRP), зв'язаною з полімером декстрану (EnVision, Dako Corporation). Імунофарбовані зрізи 5 дофарбовували гематоксиліном Майєра. В якості контрольних зразків використовували зрізи, з яких видалено первинне антитіло або в які введено нерелевантні ізотип IgG як контролю. Два незалежних спостерігача сліпим чином підраховували кількість лімфоцитів CD8<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>MDM і ВІЛ-1 p24<sup>+</sup> клітин в кожному зрізі від кожної миші. Дослідження в світловому мікроскопі проводили за допомогою 10 мікроскопа Nikon Eclipse 800 (Nikon Instruments Inc). Напівкількісний аналіз Iba1 (відсоток площі, зайнятої імунофарбуванням) проводили за допомогою комп'ютерного аналізу зображення (Image-Pro<sup>®</sup>Plus, Media Cybernetics), як описано раніше.

25

30

35

40

45

### 5. Статистичний аналіз

Дані можуть бути проаналізовані за допомогою Prism (Graph Pad) t-критерієм Ст'юдента для проведення порівнянь і дисперсійного аналізу. Р-значення <0,05 вважали значущими.

50

### 6. Джерела інформації

Poluektova LY, Munn DH, Persidsky Y and Gendelman HE (2002). Generation of cytotoxic T cells against virus-infected human brain macrophages in a murine model of HIV-1 encephalitis. J. Immunol. 168 (8): 3941-9.

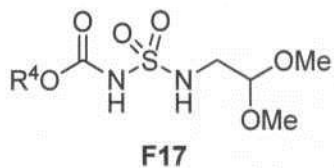
55

Для фахівців в даній області з попереднього опису будуть очевидні різні 25 модифікації винаходу, на додаток до описаних в даному документі. Передбачається, що такі модифікації також входять в рамки прикладеної формули винаходу. Кожна згадка, включаючи всі патенти, патентні заявки і публікації, цитовані в цій заявці, включені в даний документ в повному обсязі за допомогою посилання.

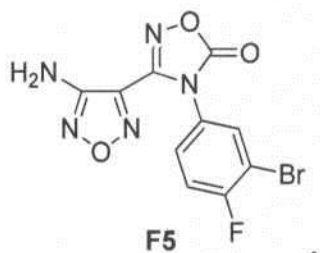
60

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

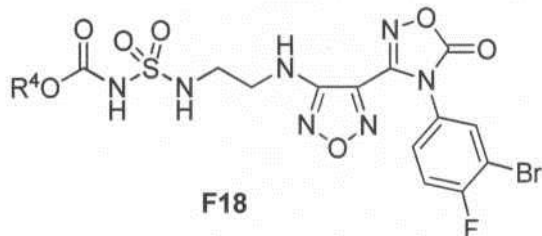
1. Спосіб, за яким приводять в контакт сполуку Формули F17:



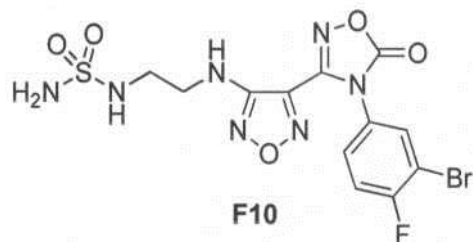
5 де R<sup>4</sup> є C<sub>1-6</sub>-алкілом, C<sub>1-6</sub>-галогеналкілом, бензилом або 9H-флуорен-9-ілметилом, зі сполукою Формули F5:



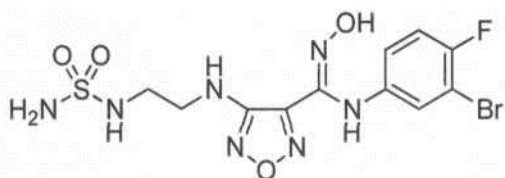
з одержанням сполуки Формули F18:



- 10 2. Спосіб за п. 1, де R<sup>4</sup> є трет-бутилом.
3. Спосіб за п. 1, де R<sup>4</sup> є бензилом.
4. Спосіб за п. 1, де R<sup>4</sup> є етилом.
5. Спосіб за п. 1, де R<sup>4</sup> є 2,2,2-трихлоретиллом.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, де вказане приведення в контакт проводять в присутності відновлювального агента.
- 15 7. Спосіб за п. 6, де вказаний відновлювальний агент є триетилсиланом.
8. Спосіб за п. 6 або 7, де вказане приведення в контакт проводять в присутності органічної кислоти.
9. Спосіб за п. 8, де вказана органічна кислота є трифтороцтовою кислотою.
- 20 10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, який додатково включає зняття захисту з вказаної сполуки Формули F18 з одержанням сполуки Формули F10:



11. Спосіб за п. 10, де вказане зняття захисту включає приведення в контакт сполуки Формули F18 з цинком в присутності оцтової кислоти.
- 25 12. Спосіб за п. 10 або 11, який додатково включає приведення в контакт вказаної сполуки Формули F10 з основою з одержанням сполуки Формули I:



I.

13. Спосіб за п. 12, де вказана основа є гідроксидом натрію.

14. Спосіб за п. 13, де R<sup>4</sup> є 9H-флуорен-9-ілметилом.

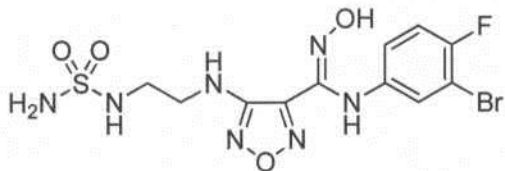
5 15. Спосіб за п. 14, де вказане приведення в контакт проводять в присутності відновлювального агента.

16. Спосіб за п. 15, де вказаний відновлювальний агент є триетилсиланом.

17. Спосіб за п. 15 або 16, де вказане приведення в контакт проводять в присутності органічної кислоти.

10 18. Спосіб за п. 17, де вказане приведення в контакт проводять в присутності метансульфонової кислоти.

19. Спосіб за будь-яким з пп. 14-18, який додатково включає перетворення вказаної сполуки Формули F18 в сполуку Формули I:



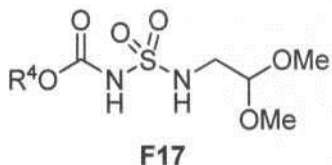
I,

15 причому вказане перетворення включає об'єднання сполуки Формули F18 з основою з одержанням першої суміші.

20. Спосіб за п. 19, де вказана основа є N,N-біс(2-аміноетил)етан-1,2-діаміном.

21. Спосіб за будь-яким з пп. 19-20, де вказане перетворення додатково включає додавання водного розчину хлористоводневої кислоти до вказаної першої суміші.

22. Сполука Формули F17:



F17

20

де R<sup>4</sup> є C<sub>1-6</sub>-галогеналкілом, бензилом або 9H-флуорен-9-ілметилом.

23. Сполука за п. 22, яка є бензил-N-(2,2-диметоксіетил)сульфамойлкарбаматом.

24. Сполука за п. 22, яка є 2,2,2-трихлоретил-N-(2,2-диметоксіетил)сульфамойлкарбаматом.

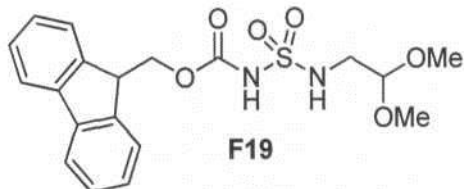
25 25. Сполука за п. 22, яка є (9H-флуорен-9-іл)метил-N-(2,2-диметоксіетил)сульфамойлкарбаматом.

26. Сполука, яка є трет-бутил-N-(2,2-диметоксіетил)сульфамойлкарбаматом.

27. Сполука, яка є етил-N-(2,2-диметоксіетил)сульфамойлкарбаматом.

28. Спосіб, за яким:

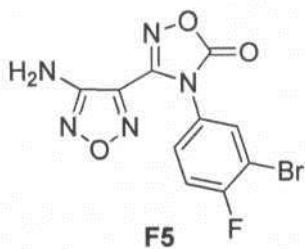
i) приводять в контакт сполуку Формули F19:



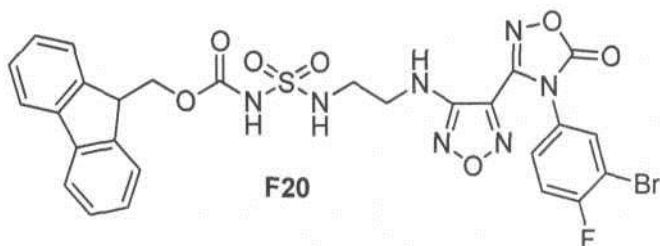
F19

30

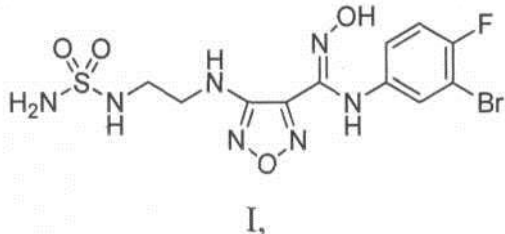
зі сполукою Формули F5:



в присутності триетилсилану і метансульфонової кислоти з одержанням сполуки Формули F20:

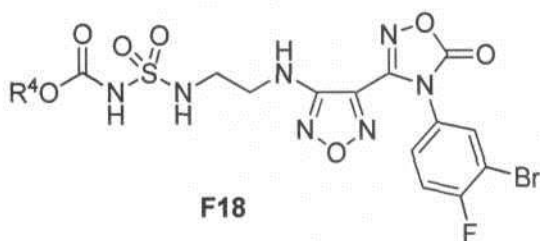


- 5 i)  
ii) перетворюють вказану сполуку Формули F20 в сполуку Формули I:



причому вказане перетворення включає об'єднання вказаної сполуки Формули F20 з N,N-біс(2-аміноетил)етан-1,2-діаміном.

29. Сполука Формули F18:



- 10 де R<sup>4</sup> є бензилом, етилом, C<sub>1-3</sub>-галогеналкілом, 2,2,2-трихлоретилом або 9H-флуорен-9-ілметилом.
30. Спосіб за п. 29, де R<sup>4</sup> є бензилом.
31. Спосіб за п. 29, де R<sup>4</sup> є етилом.
- 15 32. Спосіб за п. 29, де R<sup>4</sup> є C<sub>1-3</sub>-галогеналкілом.
33. Спосіб за п. 29, де R<sup>4</sup> є 2,2,2-трихлоретилом.
34. Спосіб за п. 29, де R<sup>4</sup> є 9H-флуорен-9-ілметилом.