

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991770 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2014.11.07

(51) Int. Cl. C07D 271/08 (2006.01)
C07D 413/04 (2006.01)
A61K 31/4245 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ СИНТЕЗА ИНГИБИТОРА ИНДОЛАМИН-2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ

(31) 61/901,689

(32) 2013.11.08

(33) US

(62) 201690959; 2014.11.07

(71) Заявитель:
ИНСАЙТ ХОЛДИНГС
КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Тао Мин, Фритце Уилльям, Мелони
Дэвид Дж., Вен Линкай, Чжоу Цзячэн,
Пань Юнчунь (US)

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

(57) Заявка относится к способам и промежуточным соединениям для получения 4-({2-[(аминосulьфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамида, который представляет собой ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы, подходящий для лечения рака и других расстройств.

A1

201991770

201991770

A1

СПОСОБ СИНТЕЗА ИНГИБИТОРА ИНДОЛАМИН-2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ

5

В настоящей заявке заявлен приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/901689, поданной 8 ноября 2013 года, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

10

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка относится к способам и промежуточным соединениям для получения 4-({2-[(аминосulфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамида, который представляет собой ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы, подходящий для лечения рака и других расстройств.

15

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Триптофан (Trp) представляет собой незаменимую аминокислоту, необходимую для биосинтеза белков, ниацина и нейротрансммиттера 5-гидрокситриптамина (серотонина). Фермент индоламин-2,3-диоксигеназа (также известный как INDO или IDO) катализирует первую и лимитирующую стадию разложения L-триптофана до N-формилкинуренина. В клетках человека истощение Trp в результате активности IDO представляет собой выраженный противомикробный эффекторный механизм, индуцируемый гамма-интерфероном (IFN- γ). Стимуляция IFN- γ вызывает активацию IDO, что приводит к истощению Trp, в результате чего происходит остановка роста Trp-зависимых внутриклеточных патогенов, таких как *Toxoplasma gondii* и *Chlamydia trachomatis*. Активность IDO также оказывает антипролиферативный эффект на многие опухолевые клетки, и индукцию IDO наблюдали *in vivo* при отторжении аллогенных опухолей, что указывает на возможную роль указанного фермента в процессе отторжения опухоли (Daubener, *et al.*, 1999, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 467: 517-24; Taylor, *et al.*, 1991, *FASEB J.*, 5: 2516-22).

30

Наблюдали, что клетки HeLa, выращенные вместе с лимфоцитами периферической крови (PBL), приобретают иммуноингибирующий фенотип при повышающей регуляции активности IDO. Снижение пролиферации PBL при обработке интерлейкином-2 (IL2) предположительно обусловлено IDO, высвобожденной из клеток опухоли в ответ на

секрецию IFNG клетками PBL. Указанный эффект был реверсирован при обработке 1-метилтриптофаном (1MT), специфическим ингибитором IDO. Было сделано предположение, что активность IDO в клетках опухоли может служить для обеспечения противоопухолевого ответа (Logan, *et al.*, 2002, *Immunology*, 105: 478-87).

5 В последнее время большое внимание привлекает иммунорегуляторная роль истощения T_гp. Несколько групп данных позволяют предположить, что IDO участвует в индукции иммунной толерантности. Исследования беременности, опухолевой резистентности, хронических инфекций и аутоиммунных заболеваний млекопитающих показали, что клетки, экспрессирующие IDO, могут подавлять ответ Т-клеток и

10 промотировать толерантность. Ускоренный катаболизм T_гp наблюдали при заболеваниях и расстройствах, связанных с клеточной иммунной активацией, таких как инфекция, злокачественные новообразования, аутоиммунные заболевания и СПИД, а также при беременности. Например, повышенные уровни IFN и повышенные уровни метаболитов T_гp в моче наблюдали при аутоиммунных заболеваниях; постулировано, что системное

15 или локальное истощение T_гp, имеющее место при аутоиммунных заболеваниях, может быть связано с симптомами дегенерации и изнурения указанных заболеваний. В подтверждение данной гипотезы, высокие уровни IDO наблюдали в клетках, выделенных из синовиальной жидкости артритных суставов. Уровни IFN также повышены у пациентов с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и повышенные уровни IFN связаны также с

20 ухудшением прогноза. Таким образом, было сделано предположение, что IDO хронически индуцируется ВИЧ-инфекцией, и ее уровень дополнительно повышается инфекциями, спровоцированными ослаблением иммунитета, а также что хроническая потеря T_гp инициирует механизмы, отвечающие за кахексию, деменцию и диарею, а также возможно за подавление иммунитета у пациентов со СПИДом (Brown, *et al.*, 1991, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 294: 425-35). В связи с этим недавно было показано, что ингибирование IDO может

25 повышать уровни вирус-специфических Т-клеток и параллельно снижать количество зараженных вирусом макрофагов в мышечной модели ВИЧ (Portula *et al.*, 2005, *Blood*, 106: 2382-90).

Предположительно, IDO играет роль в процессах подавления иммунитета, которые

30 препятствуют отторжению эмбриона в матке. Более 40 лет назад наблюдали, что во время беременности генетически разнородные концептусы млекопитающих выживают, несмотря на теоретический прогноз иммунологии трансплантации тканей (Medawar, 1953, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7: 320-38). Анатомическое разделение матери и плода, а также антигенная незрелость плода не могут полностью объяснить выживание эмбрионального

35 аллотрансплантата. В последнее время внимание было сконцентрировано на

иммунологической толерантности матери. Поскольку IDO экспрессируется синцитиотрофобластными клетками человека, а системная концентрация триптофана снижается в течение нормальной беременности, была выдвинута гипотеза, что экспрессия IDO на границе между матерью и плодом необходима для предотвращения

- 5 иммунологического отторжения эмбриональных аллотрансплататов. Для проверки данной гипотезы беременных мышей (с сингенными или аллогенными эмбрионами) обрабатывали 1MT и наблюдали быстрое отторжение всех аллогенных концептусов под действием Т-клеток. Таким образом, катаболизируя триптофан, концептус
- 10 млекопитающего подавляет активность Т-клеток и защищает себя от отторжения, а блокирование катаболизма триптофана при беременности мышей обеспечивает возможность провоцирования отторжения эмбрионального аллотрансплантата материнскими Т-клетками (Munn, *et al.*, 1998, *Science*, 281: 1191-3).

- Дополнительные данные о механизме опухолевой иммунорезистентности, основанной на разложении триптофана под действием IDO, исходят из наблюдения, что
- 15 большинство человеческих опухолей конститутивно экспрессируют IDO, и что экспрессия IDO иммуногенными опухолевыми клетками мышей препятствует их отторжению у предварительно иммунизированных мышей. Такой эффект сопровождается недостатком накопления специфических Т-клеток в очаге опухоли и может быть частично
- 20 реверсирован системным лечением мышей ингибитором IDO, в отсутствие заметной токсичности. Поэтому было сделано предположение, что эффективность терапевтической вакцинации онкологических пациентов может быть улучшена параллельным введением ингибитора IDO (Uyttenhove *et al.*, 2003, *Nature Med.*, 9: 1269-74). Было также показано, что ингибитор IDO, 1-MT, может проявлять синергетическое действие с
- 25 химиотерапевтическими агентами для снижения роста опухоли у мышей, что позволяет предположить, что ингибирование IDO также может усиливать противоопухолевую активность обычных цитотоксических методов лечения (Muller *et al.*, 2005, *Nature Med.*, 11: 312-9).

- Один из механизмов, способствующих иммунологической толерантности в отношении опухолей, может представлять собой презентирование опухолевых антигенов
- 30 толерогенными APC хозяина. Описано также подмножество человеческих IDO-экспрессирующих антиген-презентирующих клеток (APC), которые совместно экспрессируют CD123 (IL3RA) и CCR6 и ингибируют пролиферацию Т-клеток. Зрелые и незрелые CD123-положительные дендритные клетки подавляли активность Т-клеток, и такая IDO-подавляющая активность была блокирована действием 1MT (Munn, *et al.*, 2002,
- 35 *Science*, 297: 1867-70). Было также показано, что мышинные лимфатические узлы,

дренирующие опухоль (TDLN), содержат подмножество плазмацитоидных дендритных клеток (pDC), которые конститутивно экспрессируют иммунодепрессивные количества IDO. Несмотря на содержание лишь 0,5% клеток лимфоузла, *in vitro*, указанные pDC эффективно подавляли ответ Т-клеток на антигены, презентированные самими pDC, а также доминантным образом подавляли ответ Т-клеток на антигены третьей стороны, презентированные несупрессорными APC. В пределах группы pDC, основная часть функциональной IDO-опосредованной супрессорной активности была сосредоточена в новом подмножестве pDC, совместно экспрессирующих В-линейный маркер CD19. Поэтому была выдвинута гипотеза, что IDO-опосредованное подавление под действием pDC в TDLN создает микроусловия, которые эффективно подавляют противоопухолевые ответы Т-клеток хозяина (Munn, *et al.*, 2004, *J. Clin. Invest.*, 114(2): 280–90).

IDO разрушает индолный фрагмент триптофана, серотонина и мелатонина и инициирует выработку нейроактивных и иммунорегуляторных метаболитов, известных в совокупности как кинуренины. За счет локального истощения триптофана и повышения уровня проапоптозных кинуренинов, IDO, экспрессируемая дендритными клетками (DC), может в значительной степени влиять на пролиферацию и выживание Т-клеток. Индукция IDO в DC может представлять собой общий механизм делеционной толерантности, обусловленной регуляторными Т-клетками. Поскольку можно ожидать, что такие толерогенные ответы имеют место при различных физиопатологических состояниях, то метаболизм триптофана и выработка кинуренина могут представлять собой ключевое взаимодействие между иммунной и нервной системами (Grohmann, *et al.*, 2003, *Trends Immunol.*, 24: 242-8). В состояниях хронической иммунной активации доступность свободного сывороточного Тгр снижена и, как следствие сниженной выработки серотонина, серотонинергические функции также могут быть нарушены (Wirleitner, *et al.*, 2003, *Curr. Med. Chem.*, 10: 1581-91).

Интересно, что введение интерферона- α , по наблюдениям, вызывает нейропсихиатрические побочные эффекты, такие как депрессивные симптомы и изменения в когнитивной функции. Непосредственное влияние на серотонинергическую нейротрансмиссию может усиливать указанные побочные эффекты. Кроме того, поскольку активация IDO приводит к снижению уровня триптофана, предшественника серотонина (5-НТ), то IDO может играть роль в указанных нейропсихиатрических побочных эффектах посредством снижения центрального синтеза 5-НТ. Более того, метаболиты кинуренина, такие как 3-гидроксикинуренин (3-ОН-KYN) и хинолиновая кислота (QUIN) имеют токсичное действие на функцию головного мозга. 3-ОН-KYN может вызывать окислительный стресс, повышая выработку реакционноспособных частиц

кислорода (ROS), а QUIN может вызывать сверхстимуляцию гиппокампальных рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA), что приводит к апоптозу и гиппокампальной атрофии. Сверхсинтез ROS и гиппокампальная атрофия, вызванные сверхстимуляцией NMDA, связаны с депрессией (Wichers and Maes, 2004, *J. Psychiatry Neurosci.*, 29: 11–17).

5 Таким образом, активность IDO может играть роль при депрессии.

Разработаны низкомолекулярные ингибиторы IDO для лечения или предупреждения связанных с IDO заболеваний, таких как описаны выше. Например, оксадиазол и другие гетероциклические ингибиторы IDO описаны в US 2006/0258719 и US 2007/0185165. В публикации PCT WO 99/29310 описаны способы изменения

10 иммунитета, опосредованного Т-клетками, включающие изменение локальных внеклеточных концентраций триптофана и метаболитов триптофана с использованием ингибитора IDO, такого как 1-метил-DL-триптофан, п-(3-бензофуранил)-DL-аланин, п-[3-бензо(б)тиенил]-DL-аланин и 6-нитро-L-триптофан (Munn, 1999). В WO 03/087347, также опубликованной как Европейский патент 1501918, описаны способы получения антиген-

15 презентующих клеток для усиления или снижения толерантности Т-клеток (Munn, 2003). Соединения, обладающие ингибирующей активностью в отношении индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) дополнительно описаны в WO 2004/094409; и в публикации заявки на патент США № 2004/0234623, которая относится к способам лечения субъекта, страдающего от рака или инфекции, посредством введения ингибитора индоламин-2,3-

20 диоксигеназы в комбинации с другими терапевтическими воздействиями.

В свете экспериментальных данных, указывающих на роль IDO в подавлении иммунитета, опухолевой резистенции и/или отторжении, хронических инфекциях, инфекции ВИЧ, СПИД (включая его проявления, такие как кахексия, деменция и диарея), аутоиммунных заболеваниях или расстройствах (таких как ревматоидный артрит) и

25 иммунологической толерантности, а также предотвращении отторжения эмбриона *in utero*, желательны терапевтические агенты, предназначенные для подавления разложения триптофана посредством ингибирования активности IDO. Ингибиторы IDO могут быть использованы для активации Т-клеток и, следовательно, усиления Т-клеточной активности при подавлении Т-клеток во время беременности, при злокачественных

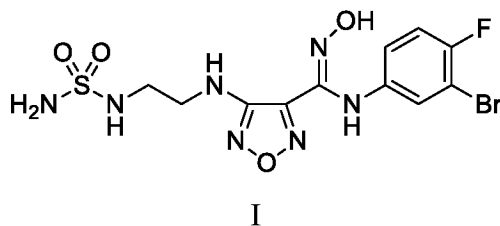
30 новообразованиях или вирусах, таких как ВИЧ. Ингибирование IDO может представлять собой важную стратегию лечения пациентов с неврологическими или нейropsychиатрическими заболеваниями или расстройствами, такими как депрессия.

Благодаря применимости ингибиторов IDO, существует потребность в разработке новых способов получения ингибиторов IDO. Настоящая заявка направлена на

35 удовлетворения этой и других потребностей.

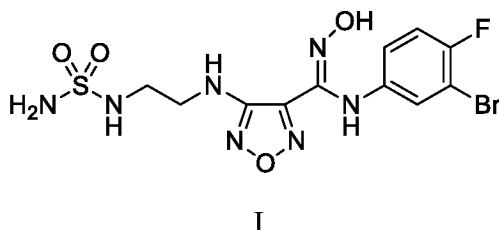
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Соединение 4-({2-[(аминосульфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидаид, имеющее Формулу I:

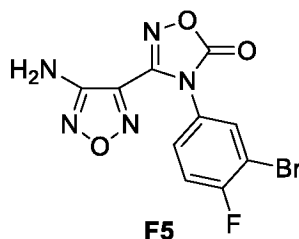


представляет собой ингибитор фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (также известного как IDO). Соединение Формулы I, а также его получение и применение описаны в патенте США № 8088803, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Промежуточные соединения и способы, представленные в настоящем документе, способствуют удовлетворению существующей потребности в разработке ингибиторов IDO для лечения тяжелых заболеваний.

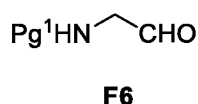
В настоящей заявке предложены, *inter alia*, промежуточные соединения и способы получения соединения Формулы I:



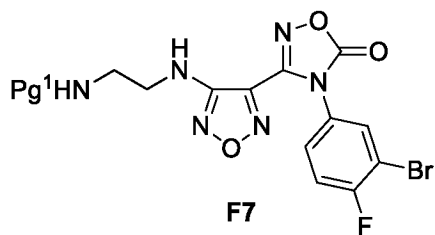
Соответственно, в настоящей заявке предложен способ, включающий приведение в контакт соединения Формулы F5:



с альдегидом Формулы F6:

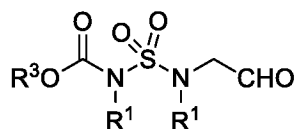


с получением соединения Формулы F7:



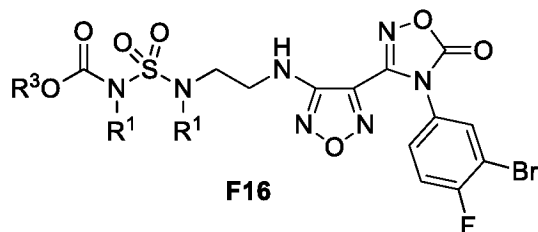
где Pg¹ определен *infra*.

В настоящей заявке дополнительно предложен способ, включающий приведение в контакт соединения Формулы F15:



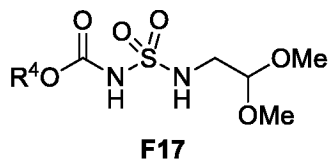
5

с соединением Формулы F5 с получением соединения Формулы F16:

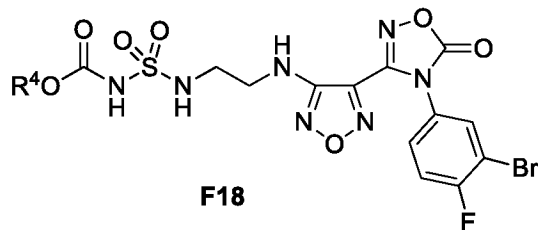


где R¹ и R³ определены *infra*.

10 В настоящей заявке дополнительно предложен способ, включающий приведение в контакт соединения Формулы F17:



с соединением Формулы F5 с получением соединения Формулы F18:



где R⁴ определен *infra*.

15

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

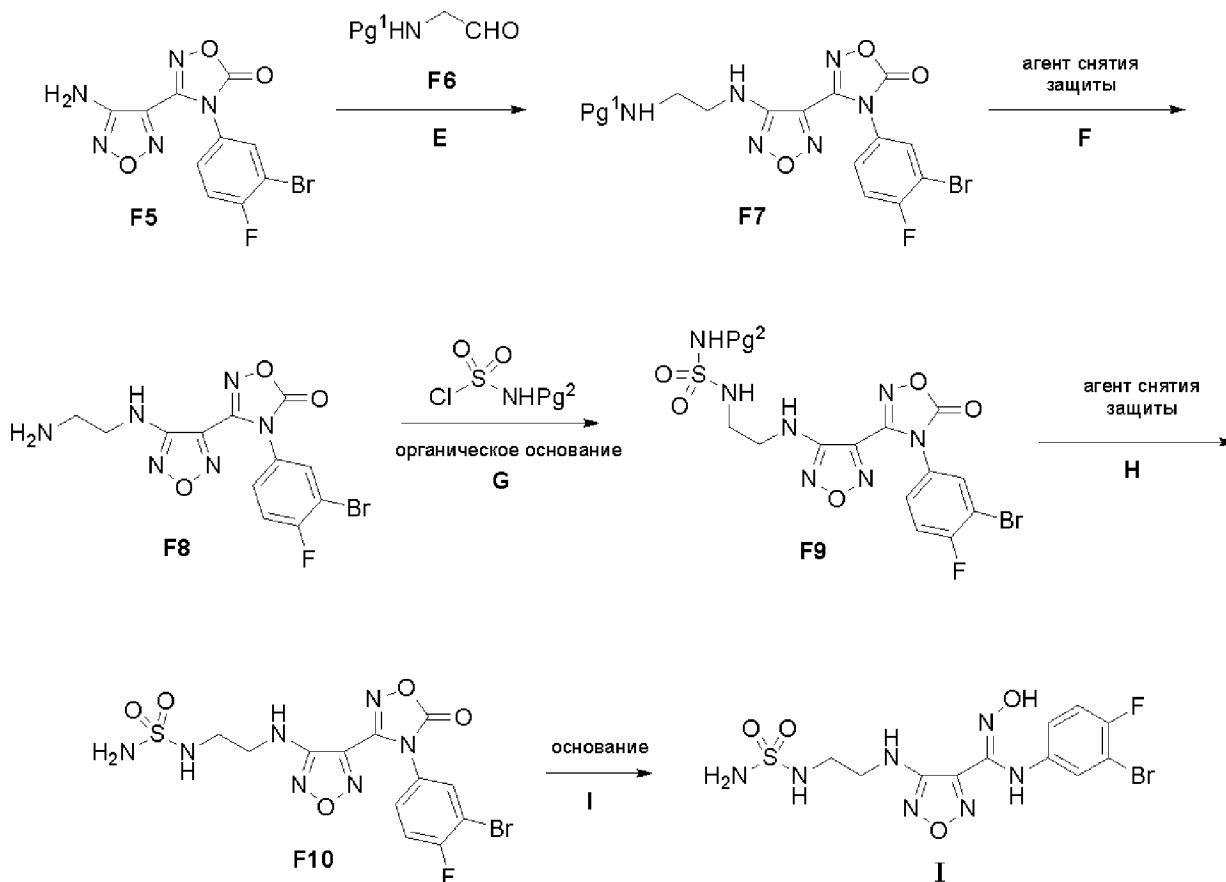
Несмотря на то, что некоторые стадии способов иллюстрированы на Схемах, представленных ниже, предполагается, что отдельные стадии способов могут быть заявлены индивидуально или в любой комбинации (например, на Схеме I стадии E, F, G,

Н и I могут быть заявлены индивидуально или в комбинации). Подразумевается, что указанные способы не ограничены общим способом, включающим все и каждую стадию на Схемах, представленных ниже.

Соответственно, общая схема получения соединения Формулы I описана на Схеме

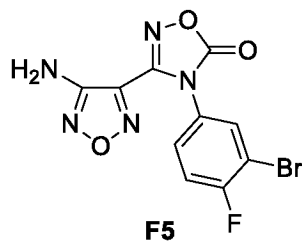
5 1.

Схема 1

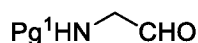


10

Соответственно, в настоящей заявке предложен способ, включающий приведение в контакт соединения Формулы F5:

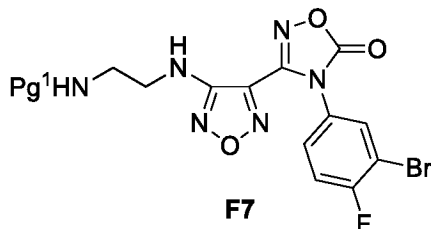


с альдегидом Формулы F6:



F6

где Pg^1 представляет собой аминозащитную группу, с получением соединения Формулы F7:



F7

5 Аминозащитные группы Pg^1 могут быть использованы для предотвращения
нежелательных реакций аминогруппы при осуществлении требуемого превращения.
Аминозащитные группы обеспечивают возможность простого ковалентного
присоединения к атому азота, а также селективного расщепления у атома азота.
Подходящие «аминозащитные группы», такие как алкоксикарбонил (такой как
10 этоксикарбонил, *трет*-бутоксикарбонил (Boc), бензилоксикарбонил (Cbz), 9-
флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc) и т.п.), ацил (такой как ацетил (Ac), бензоил (Bz) и
т.п.), сульфонил (такой как метансульфонил, трифторметансульфонил и т.п.), арилалкил
(такой как бензил, 4-метоксибензил, дифенилметил, трифетилметил (тритил) и т.п.),
алкенилалкил (такой как аллил, пренил и т.п.), диарилметиленил (такой как $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{C}=\text{N}$ и
15 т.п.) и силил (такой как *трет*-бутилдиметилсилил, триизопропилсилил и т.п.), известны
специалистам в данной области техники. Химия аминозащитных групп описана в книге
Wuts и Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^{oe} изд., сс. 696-926, John
Wiley & Sons: Нью-Йорк, 2006, полное содержание которого включено в настоящий
документ посредством ссылки.

20 В некоторых вариантах реализации изобретения Pg^1 представляет собой
этоксикарбонил, *трет*-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил или 9-
флуоренилметилоксикарбонил.

В некоторых вариантах реализации изобретения Pg^1 представляет собой C_{1-6}
алкоксикарбонил.

25 В некоторых вариантах реализации изобретения Pg^1 представляет собой *трет*-
бутоксикарбонил.

Подходящие растворители для стадии E включают, но не ограничиваются ими,
метанол или тетрагидрофуран (ТГФ), ацетонитрил и т.п. Также могут быть использованы
галогенированные углеводородные растворители (т.е. галогенированные алканы, такие
30 как дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан или тетрахлорэтан).

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное приведение в контакт проводят в компоненте растворителя, содержащем тетрагидрофуран. В данном контексте компонент растворителя может относиться к одному растворителю или смеси растворителей. В некоторых вариантах реализации изобретения компонент растворителя представляет собой органический растворитель. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное приведение в контакт проводят в компоненте растворителя, содержащем галогенированный углеводородный растворитель. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный галогенированный углеводородный растворитель представляет собой дихлорметан.

В некоторых вариантах реализации указанное приведение в контакт проводят в компоненте растворителя, содержащем ацетонитрил.

В некоторых вариантах реализации указанное приведение в контакт проводят в компоненте растворителя, содержащем дихлорметан и ацетонитрил.

В некоторых вариантах реализации указанное приведение в контакт проводят в присутствии восстанавливающего агента.

Восстанавливающий агент может представлять собой любое соединение, способное восстанавливать органическое соединение до более низкой степени окисления. Восстановление обычно включает присоединение атомов водорода или отщепление атомов кислорода от группы. Например, альдегиды, такие как F6, могут быть восстановлены в присутствии амина Формулы F5 (стадия E, Схема 1) путем присоединения водорода, либо в форме газообразного водорода (H_2), либо с использованием гидридного реагента (такого как $NaB(OAc)_3H$, $NaBH_4$, $LiAlH_4$ и т.п.); с использованием трифенилфосфина; или с использованием комбинации йодида натрия, хлортриметилсилана и метанола. В некоторых вариантах реализации изобретения указанная стадия может быть проведена в кислотных условиях в присутствии кислоты (такой как трифторуксусная кислота). В некоторых вариантах реализации указанная стадия может быть проведена при температуре от около $-15\text{ }^{\circ}C$ до около $30\text{ }^{\circ}C$, например, от около $-15\text{ }^{\circ}C$ до около $0\text{ }^{\circ}C$, от около $-5\text{ }^{\circ}C$ до около $5\text{ }^{\circ}C$, от около $-5\text{ }^{\circ}C$ до около $0\text{ }^{\circ}C$ или от около $0\text{ }^{\circ}C$ до около $45\text{ }^{\circ}C$.

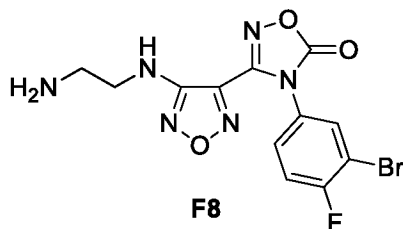
В некоторых вариантах реализации указанный восстанавливающий агент может представлять собой боргидридный восстанавливающий агент (например, $NaB(OAc)_3H$, $NaBH_4$ или другой борсодержащий гидридный восстанавливающий агент).

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный боргидридный восстанавливающий агент представляет собой триацетоксиборгидрид.

В некоторых вариантах реализации указанное приведение в контакт проводят в присутствии трифторуксусной кислоты.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает снятие защиты с указанного соединения Формулы F7 с получением соединения Формулы

5 F8:



Агенты для снятия защиты с аминогруппы, используемые для данной стадии F, известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в книге Wuts и Greene (*supra*). В частности, аминозащитные группы, описанные выше, могут быть легко удалены с помощью многих доступных агентов для снятия защиты с аминогруппы, которые являются специфичными для различных групп, указанных выше, не влияя на другие требуемые части соединения. *трет*-Бутоксикарбонильная группа может быть удалена (например, гидролизована) с атома азота, например, посредством обработки кислотой (такой как хлористоводородная кислота, трифторуксусная кислота, 15 толуолсульфоновая кислота и т.п.); комбинацией реагентов (например, смесью ацетилхлорида и метанола), которые, как известно, образуют кислоту; или кислотой Льюиса (например, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$). Бензоилоксикарбонильная группа может быть удалена (например, гидролизована) с атома азота, например, обработкой водородом и катализатором (таким как палладий на углеороде).

В некоторых вариантах реализации изобретения агент для снятия защиты с аминогруппы представляет собой трифторуксусную кислоту. В некоторых вариантах реализации агент для снятия защиты с аминогруппы содержит трифторуксусную кислоту и >0,5% по объему воды, например, >1,0% по объему воды, >1,5% по объему воды, >2,0% по объему воды, от около 2% до около 10% по объему воды, от около 10% до около 20% 25 по объему воды или от около 20% до около 50% по объему воды. В некоторых вариантах реализации агент для снятия защиты с аминогруппы может представлять собой смесь трифторуксусной кислоты и воды в объемном соотношении около 98:2. В некоторых вариантах реализации изобретения агент для снятия защиты с аминогруппы может представлять собой хлористоводородную кислоту, необязательно в растворителе 30 (например, в воде, ТГФ, диоксане, этилацетате и т.д.). В некоторых вариантах реализации компонент растворителя представляет собой этилацетат. В некоторых вариантах

реализации агент для снятия защиты с аминокруппы может представлять собой хлористоводородную кислоту, необязательно в растворителе, таком как спирт (такой как изопропанол, метанол или этанол). Также могут быть использованы галогенированные углеводородные растворители (например, дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан или тетрахлорэтан). В некоторых вариантах реализации изобретения молярное соотношение хлористоводородной кислоты и соединения Формулы F7 составляет около 6,0, около 5,0, около 4,0, около 3,0, около 2,0, около 1,0 или около 1,1. В некоторых вариантах реализации изобретения стадия F может быть проведена при температуре от около -10 °C до около 60 °C, например, от около -10 °C до около 0 °C, от около 0 °C до около 25 °C, от около 25 °C до около 45 °C или от около 45 °C до около 60 °C.

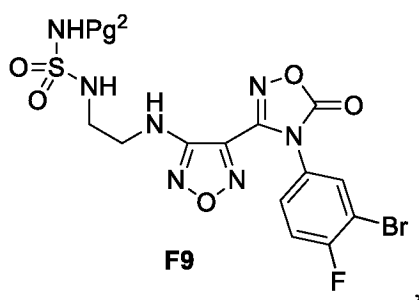
В некоторых вариантах реализации указанное снятие защиты включает приведение в контакт соединения Формулы F7 с хлористоводородной кислотой.

В некоторых вариантах реализации указанное снятие защиты включает приведение в контакт соединения Формулы F7 с хлористоводородной кислотой в компоненте растворителя, содержащем изопропанол.

В некоторых вариантах реализации указанное снятие защиты включает приведение в контакт соединения Формулы F7 с хлористоводородной кислотой в компоненте растворителя, содержащем галогенированный углеводородный растворитель.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный галогенированный углеводородный растворитель представляет собой дихлорметан.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение дополнительно включает приведение в контакт указанного соединения Формулы F8 с $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{-X}$ в присутствии органического основания с получением соединения Формулы F9:



где:

Pg^2 представляет собой аминозащитную группу; и

X представляет собой галоген.

В некоторых вариантах реализации $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{Cl}$ может быть получен и сразу использован в реакции с соединением Формулы F8. Защитная группа Pg^2 может быть выбрана из любых защитных групп, известных в данной области техники для защиты

аминов или сульфонамидов (таких как описаны выше для Pg^1). В некоторых вариантах реализации Pg^2 может представлять собой алкоксикарбонильную группу (такую как *трет*-бутоксикарбонил).

Подходящие растворители включают, но не ограничиваются ими,

5 галогенированные углеводородные растворители, такие как дихлорметан и т.п.

Органическое основание может представлять собой любое основание, которое служит для нейтрализации HCl, образующейся во время реакции соединения Формулы F8 и защищенного аминосульфонила. Органическое основание может включать ациклические третичные амины, такие как три(C_{1-6})алкиламин (например, триэтиламин, диизопропилэтиламин (DIPEA) и т.п.), циклические третичные амины (например, N-метилпиперидин, 1,4-дизабицикло[2.2.2]октан (DABCO) и т.п.). В некоторых вариантах реализации органическое основание может представлять собой триэтиламин. В некоторых вариантах реализации изобретения указанная стадия может быть проведена при температуре от около $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ до около $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, например, от около $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ до около $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, от 10 около $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ до около $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, от около $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до около $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ или от около $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ до около $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. 15

В таких вариантах реализации Pg^2 -NH-SO₂Cl может быть получен приведение в контакт спирта (такого как этанол, *трет*-бутиловый спирт и т.п.) с хлорсульфонилоизоцианатом (ClS(O)₂NCO).

20 В некоторых вариантах реализации Pg^2 представляет собой этоксикарбонил, *трет*-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил или 9-флуоренилметилоксикарбонил.

В некоторых вариантах реализации Pg^2 представляет собой C_{1-6} алкоксикарбонил.

В некоторых вариантах реализации Pg^2 представляет собой *трет*-бутоксикарбонил.

25 В некоторых вариантах реализации изобретения указанное приведение в контакт проводят в компоненте растворителя, содержащем галогенированный углеводородный растворитель.

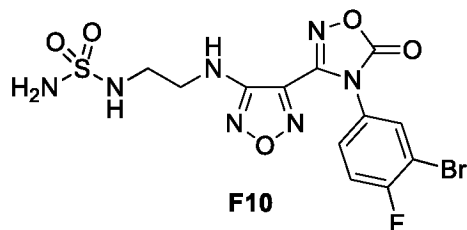
В некоторых вариантах реализации изобретения указанный галогенированный углеводородный растворитель представляет собой дихлорметан.

30 В некоторых вариантах реализации указанное органическое основание содержит три(C_{1-6})алкиламин.

В некоторых вариантах реализации указанное органическое основание представляет собой триэтиламин.

В некоторых вариантах реализации X представляет собой хлор.

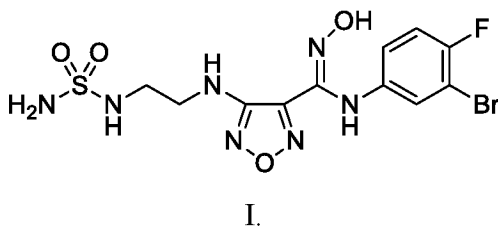
В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение дополнительно включает снятие защиты с указанного соединения Формулы F9 с получением соединения Формулы F10:



В некоторых вариантах реализации подходящие агенты для снятия защиты могут включать агенты, описанные выше для снятия защиты с соединения Формулы F7.

В некоторых вариантах реализации указанное снятие защиты включает приведение в контакт соединения Формулы F9 с хлористоводородной кислотой. В некоторых вариантах реализации указанное снятие защиты включает приведение в контакт соединения Формулы F9 с хлористоводородной кислотой в компоненте растворителя, содержащем спирт. В некоторых вариантах реализации указанный спирт представляет собой этанол. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное снятие защиты включает приведение в контакт соединения Формулы F9 с хлористоводородной кислотой в компоненте растворителя, содержащем этилацетат.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение дополнительно включает приведение в контакт указанного соединения Формулы F10 с основанием с получением соединения Формулы I:



Основание может быть использовано для превращения (например, гидролиза) оксадиазолонового кольца в F10 для получения амидоксима в соединении Формулы I, необязательно в растворителе (стадия I, Схема 1). Защита амидоксима в форме оксадиазолона может быть подходящей для предотвращения нежелательных реакций гидроксильной группы или амидоксима в целом. Основание может представлять собой неорганическое основание, такое как гидроксид щелочного металла (например, NaOH, LiOH, KOH, Mg(OH)₂ и т.д.); или органическое основание, такое как ациклический амин (например, триэтиламин, диизопропилэтиламин (DIPEA) и т.д.) или циклический амин (например, пирролидин, пиперидин и т.д.). Основание может быть доступно в форме смолы (такой как Amberlite® и т.п.). В некоторых дополнительных вариантах реализации

изобретения основание может быть представлено в форме раствора в воде (например, около 0,5 н. раствор, около 1 н. раствор, около 1,5 н. раствор, около 2,5 н. раствор, от около 3 н. до около 5 н. раствор, от около 5 н. до около 10 н. раствор). В некоторых вариантах реализации основание представляет собой гидроксид щелочного металла (такой как гидроксид натрия). В некоторых вариантах реализации основание может представлять собой 2 н. раствор NaOH в воде. В некоторых вариантах реализации растворитель может представлять собой этанол или тетрагидрофуран (ТГФ). В некоторых вариантах реализации растворитель может представлять собой смесь этанола и воды. В некоторых вариантах реализации изобретения приведение в контакт соединения Формулы F10 с основанием с получением соединения Формулы I может быть проведено при температуре от около -10 °C до около 60 °C, например, от около -10 °C до около 20 °C, от около 0 °C до около 30 °C, от около 0 °C до около 10 °C или от около 0 °C до около 5 °C.

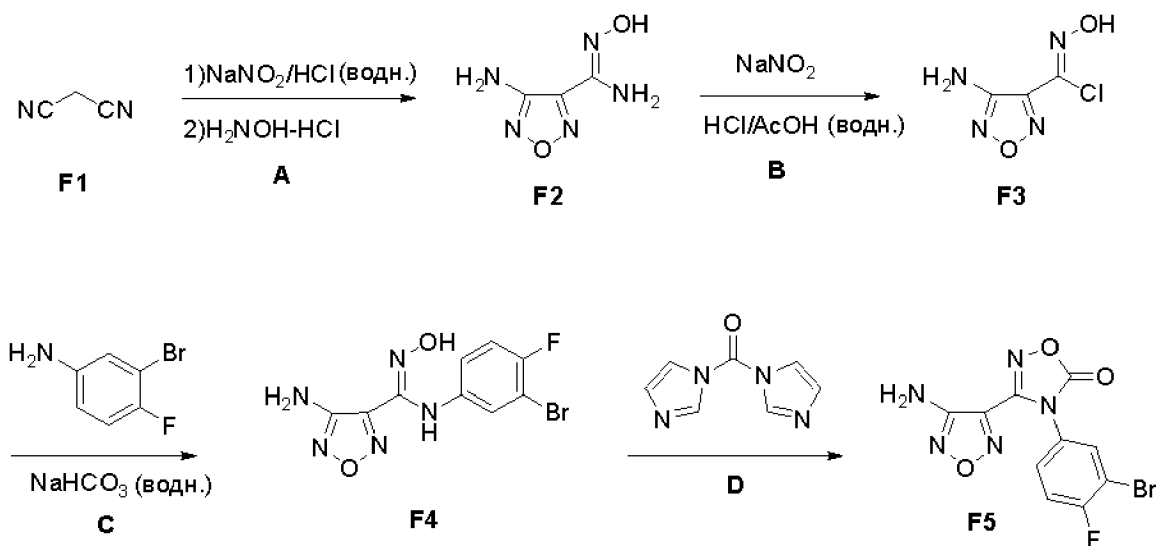
В некоторых вариантах реализации указанное основание содержит гидроксид щелочного металла.

В некоторых вариантах реализации указанный гидроксид щелочного металла представляет собой гидроксид натрия.

В некоторых вариантах реализации указанное приведение в контакт проводят в компоненте растворителя, содержащем тетрагидрофуран, воду и этанол.

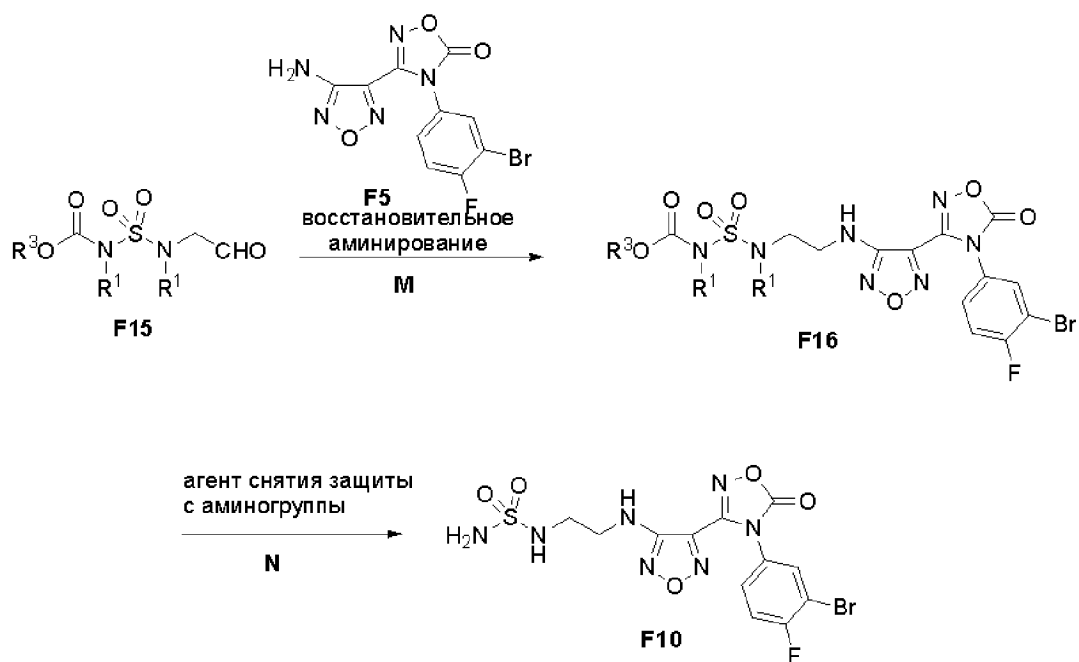
В некоторых вариантах реализации соединение Формулы F5 может быть получено в соответствии с последовательностью стадий, представленной на Схеме 2. Получение промежуточного соединения, 4-амино-*N*-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамида F2, описано в публикации *J. Heterocycl. Chem.* (1965), 2, 253, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, а его превращение в хлороксим F3 описано в публикации *Synth. Commun.* (1988), 18, 1427, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения хлороксим Формулы F3 может быть связан с 3-бром-4-фторанилином, необязательно в растворителе (таком как вода), с последующим добавлением бикарбоната натрия с получением амидоксима Формулы F4. Амидоксимная функциональная группа соединения F4 может быть затем превращена в оксадиазолон или Формулу F5 с помощью N,N-карбонилдиимидазола (DCI) в растворителе (таком как этилацетат, диоксан, ТГФ и т.п.) при повышенных температурах, таких как около 50 °C, около 60 °C, около 70 °C, около 80 °C, около 90 °C или около 100 °C.

Схема 2

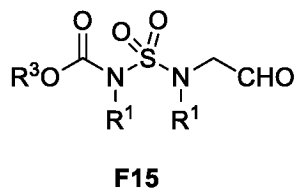


В альтернативном варианте соединение Формулы F10 может быть получено в соответствии с последовательностью стадий, изображенной на Схеме 3.

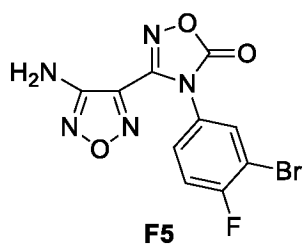
Схема 3



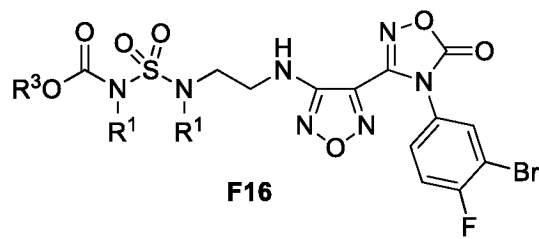
В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложен способ,
5 включающий приведение в контакт соединения Формулы F15:



с соединением Формулы F5:



с получением соединения Формулы F16:



10

где:

каждый R^1 независимо представляет собой аминокзащитную группу; и

R^3 представляет собой C_{1-6} алкил или бензил.

В некоторых вариантах реализации изобретения R^1 представляет собой C_{2-4} алкенил- C_{1-3} алкил или фенил- C_{1-3} алкил, где указанный фенил- C_{1-3} алкил необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными C_{1-4} алкоксигруппами.

5 В некоторых вариантах реализации R^1 представляет собой C_{2-4} алкенил- C_{1-3} алкил или фенил- C_{1-3} алкил, где указанный фенил- C_{1-3} алкил необязательно замещен 1, 2 или 3 метоксигруппами.

В некоторых вариантах реализации изобретения R^1 представляет собой аллил.

В некоторых вариантах реализации R^1 представляет собой 4-метоксибензил.

10 В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой C_{1-6} алкил.

В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой *трет*-бутил.

В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой C_{1-4} алкил.

В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой бутил.

Предпочтительно, реакцию проводят в присутствии восстанавливающего агента.

15 Восстанавливающий агент может представлять собой любое соединение, способное восстанавливать органическое соединение до более низкой степени окисления. В некоторых вариантах реализации изобретения восстанавливающий агент может представлять собой газообразный водород в присутствии катализатора или гидридный реагент (такой как $NaB(OAc)_3H$, $NaBH_4$, $LiAlH_4$ и т.п.); с применением трифенилфосфина;
20 или с применением комбинации йодида натрия, хлортриметилсилана и метанола. В некоторых вариантах реализации указанная стадия может быть проведена в присутствии кислоты, такой как трифторуксусная кислота. Подходящие растворители для указанной стадии включают изопропиловый спирт, ТГФ, диоксан или т.п. В некоторых вариантах реализации указанная стадия может быть проведена при температуре от около $-15\text{ }^{\circ}C$ до
25 около $30\text{ }^{\circ}C$, например, от около $-15\text{ }^{\circ}C$ до около $0\text{ }^{\circ}C$, от около $-5\text{ }^{\circ}C$ до около $5\text{ }^{\circ}C$, от около $-5\text{ }^{\circ}C$ до около $0\text{ }^{\circ}C$, от около 0 до $5\text{ }^{\circ}C$ или от около $0\text{ }^{\circ}C$ до около $45\text{ }^{\circ}C$.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное приведение в контакт проводят в компоненте растворителя, содержащем тетрагидрофуран.

В некоторых вариантах реализации указанное приведение в контакт проводят в
30 присутствии восстанавливающего агента.

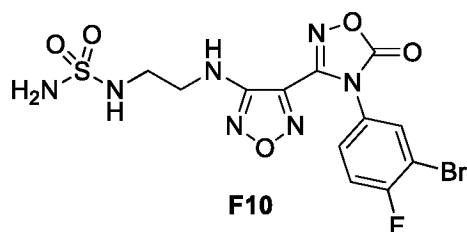
В некоторых вариантах реализации указанный восстанавливающий агент представляет собой боргидридный восстанавливающий агент.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный боргидридный восстанавливающий агент представляет собой триацетоксиборгидрид.

В некоторых вариантах реализации указанное приведение в контакт проводят в присутствии трифторуксусной кислоты.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение дополнительно включает снятие защиты с указанного соединения Формулы F16 с получением соединения

5 Формулы F10:



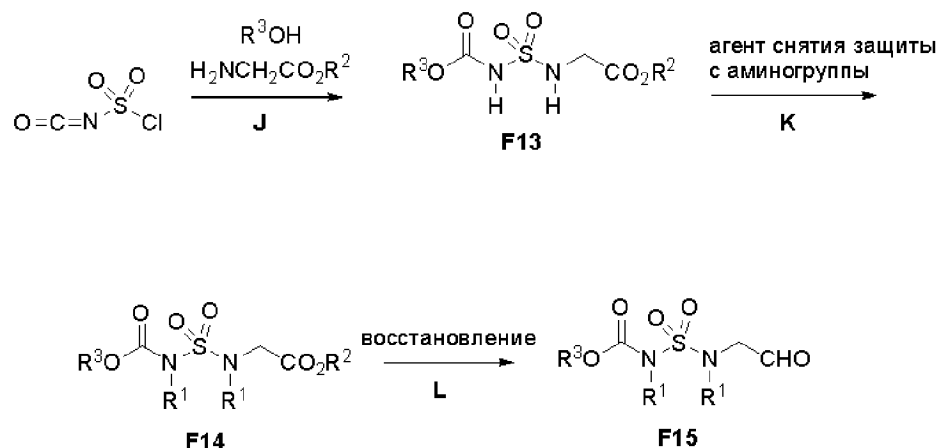
Обработка соединения F16 для замены R^1N на NH_2 может быть проведена по способам снятия конкретных аминозащитных групп, известных специалистам в данной области техники, таким как описаны в книге Wuts и Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^{oe} изд., сс. 696-926, John Wiley & Sons: Нью-Йорк, 2006. В некоторых вариантах реализации, если R^1 представляет собой аллил, то агент для снятия защиты может представлять собой палладиевый катализатор (например, $Pd(Ph_3P)_4$, Pd/C или $Pd(dba)DPPB$). В некоторых вариантах реализации, если R^1 представляет собой 4-метоксибензил, то агент для снятия защиты может содержать органическую кислоту (такую как трифторуксусная кислота или метансульфоновая кислота и т.п.); неорганическую кислоту (такую как хлористоводородная кислота); водород и палладий; или натрий в жидком аммиаке. Снятие защиты может быть проведено при температуре от около 30 °C до около 90 °C, например, от около 50 °C до около 100 °C или от около 60 °C до около 80 °C.

20 В некоторых вариантах реализации указанное снятие защиты включает приведение в контакт соединения Формулы F16 с трифторуксусной кислотой.

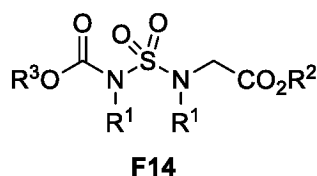
В некоторых вариантах реализации указанное снятие защиты включает приведение в контакт соединения Формулы F16 с хлористоводородной кислотой.

Соединение F15 может быть получено трехстадийным способом (стадии J, K и L)
25 из хлорсульфонилизотиоцианата, как показано на Схеме 4.

Схема 4



5 Соответственно, в настоящей заявке дополнительно предложен способ, в котором указанное соединение Формулы F15 получают по способу, включающему обработку соединения Формулы F14:



10 восстанавливающим агентом с получением указанного соединения Формулы F15; где R² представляет собой C₁₋₄ алкил; и R³ определен *supra*.

В некоторых вариантах реализации R² представляет собой метил.

В некоторых вариантах реализации R² представляет собой этил.

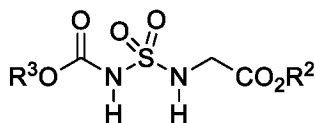
15 В некоторых вариантах реализации восстановление может быть проведено с гидридом диизобутилалюминия (DIBAL-H). Подходящие растворители включают галогенированные углеводородные растворители, такие как дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан, тетрахлорэтан и т.п. В некоторых вариантах реализации восстановление может быть проведено при температуре около комнатной температуры, например, от около -80 °C до около 30 °C, от около -78 °C до около 0 °C, от около 0 °C до около 30 °C или от около 25 °C до около 30 °C.

20 В некоторых вариантах реализации указанную обработку проводят в галогенированном углеводородном растворителе.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный галогенированный углеводородный растворитель представляет собой дихлорметан.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный восстанавливающий агент представляет собой гидрид диизобутилалюминия.

В некоторых вариантах реализации указанное соединение Формулы F14 получают по способу, включающему защиту соединения Формулы F13:



F13

одним или более независимо выбранными аминозащитными агентами с получением соединения Формулы F14.

Защитная группа R^1 в F14 может быть выбрана из различных аминозащитных групп, известных в данной области техники (*supra*). В некоторых вариантах реализации аминозащитный агент представляет собой аллилбромид или 4-метоксибензилхлорид.

В некоторых вариантах реализации указанные один или более аминозащитных агентов выбраны из аллилбромид и 4-метоксибензилхлорида.

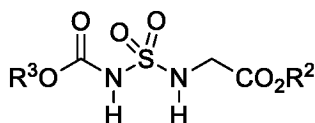
В некоторых вариантах реализации защиту проводят в присутствии основания.

В некоторых вариантах реализации указанное основание представляет собой карбонат калия.

В некоторых вариантах реализации указанную защиту проводят в компоненте растворителя, содержащем ацетонитрил.

В некоторых вариантах реализации получение соединения F13 может быть проведено обработкой хлорсульфонилизотиоцианата спиртом R^3OH (где R^3 определен выше) и сложным эфиром глицина $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{R}^2$, где R^2 представляет собой C_{1-4} алкил. В некоторых вариантах реализации указанную стадию J проводят в присутствии органической кислоты (такой как уксусная кислота, бензойная кислота, трифторуксусная кислота). Подходящие растворители для указанной стадии включают дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан, тетрахлорэтан и т.п.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено соединение Формулы F13:



F13

где:

R^2 представляет собой C_{1-4} алкил; и

R^3 представляет собой C_{1-6} алкил или бензил.

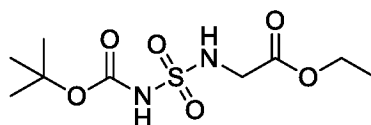
В некоторых вариантах реализации R^2 представляет собой метил.

В некоторых вариантах реализации R^2 представляет собой этил.

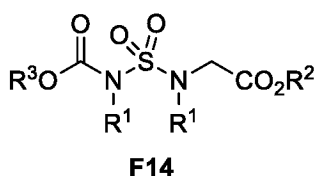
В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой C_{1-6} алкил.

5 В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой *трет*-бутил.

В некоторых вариантах реализации соединение Формулы F13 представляет собой этил-2-((N-(*трет*-бутоксикарбонил)сульфамоил)амино)ацетат:



10 В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения дополнительно предложено соединение Формулы F14:



где:

каждый R^1 независимо представляет собой аминозащитную группу;

R^2 представляет собой C_{1-4} алкил; и

15 R^3 представляет собой C_{1-6} алкил или бензил.

В некоторых вариантах реализации изобретения R^1 представляет собой C_{2-4} алкенил- C_{1-3} алкил или фенил- C_{1-3} алкил, где указанный фенил- C_{1-3} алкил необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными C_{1-4} алкоксигруппами.

В некоторых вариантах реализации изобретения R^1 представляет собой аллил.

20 В некоторых вариантах реализации R^1 представляет собой 4-метоксибензил.

В некоторых вариантах реализации R^2 представляет собой метил.

В некоторых вариантах реализации R^2 представляет собой этил.

В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой C_{1-6} алкил.

В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой *трет*-бутил.

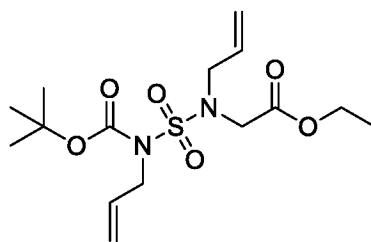
25 В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой C_{1-4} алкил.

В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой бутил.

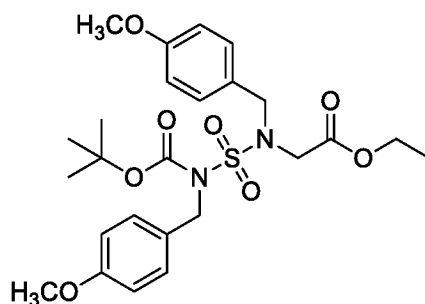
В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой C_{1-4} алкил.

В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой бутил.

30 В некоторых вариантах реализации соединение Формулы F14 представляет собой этил-2-(аллил(N-аллил-N-(*трет*-бутоксикарбонил)сульфамоил)амино)ацетат:

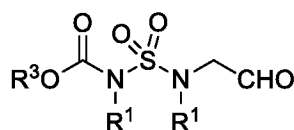


В некоторых вариантах реализации соединение Формулы F14 представляет собой этил-2-(4-метоксибензил(N-4-метоксибензил-N-(*трет*-бутоксикарбонил)сульфамоил)амино)ацетат:



5

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено соединение Формулы F15:

**F15**

где:

10 R^3 представляет собой C_{1-6} алкил или бензил; и
каждый R^1 независимо представляет собой аминозащитную группу.

В некоторых вариантах реализации изобретения R^1 представляет собой C_{2-4} алкенил- C_{1-3} алкил или фенил- C_{1-3} алкил, где указанный фенил- C_{1-3} алкил необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными C_{1-4} алкоксигруппами.

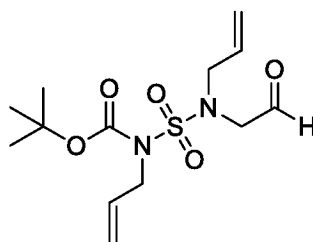
15 В некоторых вариантах реализации изобретения R^1 представляет собой аллил.

В некоторых вариантах реализации R^1 представляет собой 4-метоксибензил.

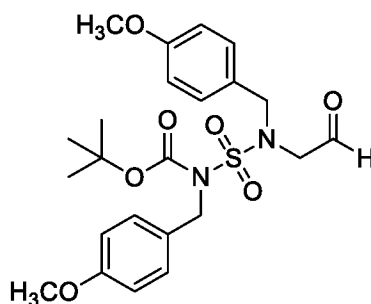
В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой C_{1-6} алкил.

В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой *трет*-бутил.

20 В некоторых вариантах реализации соединение Формулы F15 представляет собой *трет*-бутилаллил{[аллил(2-оксоэтил)амино]сульфонил}карбамат:

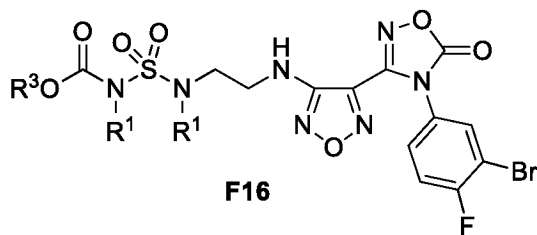


В некоторых вариантах реализации соединение Формулы F15 представляет собой *трет*-бутил(4-метоксибензил){[(4-метоксибензил)(2-оксоэтил)амино]сульфонил}карбамат:



5

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложено соединение Формулы F16:



F16

10

где R^3 представляет собой C_{1-6} алкил или бензил, и каждый R^1 независимо представляет собой аминозащитную группу.

В некоторых вариантах реализации изобретения R^1 представляет собой C_{2-4} алкенил- C_{1-3} алкил или фенил- C_{1-3} алкил, где указанный фенил- C_{1-3} алкил необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными C_{1-4} алкоксигруппами.

В некоторых вариантах реализации изобретения R^1 представляет собой аллил.

15

В некоторых вариантах реализации R^1 представляет собой 4-метоксибензил.

В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой C_{1-6} алкил.

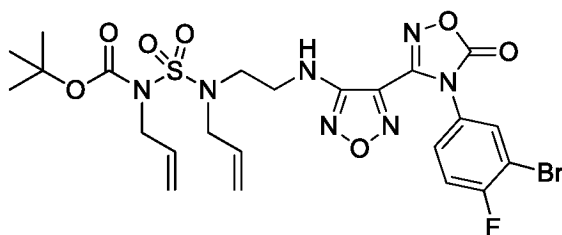
В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой *трет*-бутил.

В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой C_{1-4} алкил.

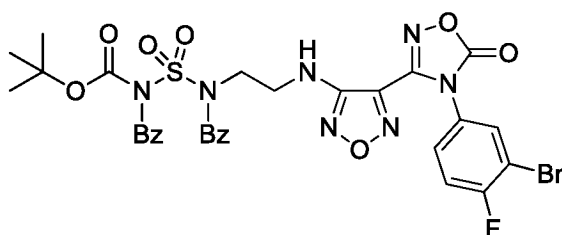
В некоторых вариантах реализации R^3 представляет собой бутил.

20

В некоторых вариантах реализации соединение Формулы F16 представляет собой *трет*-бутилаллил(*N*-аллил-*N*-(2-(4-(4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил)-1,2,5-оксадиазол-3-иламино)этил)сульфамойл)карбамат:

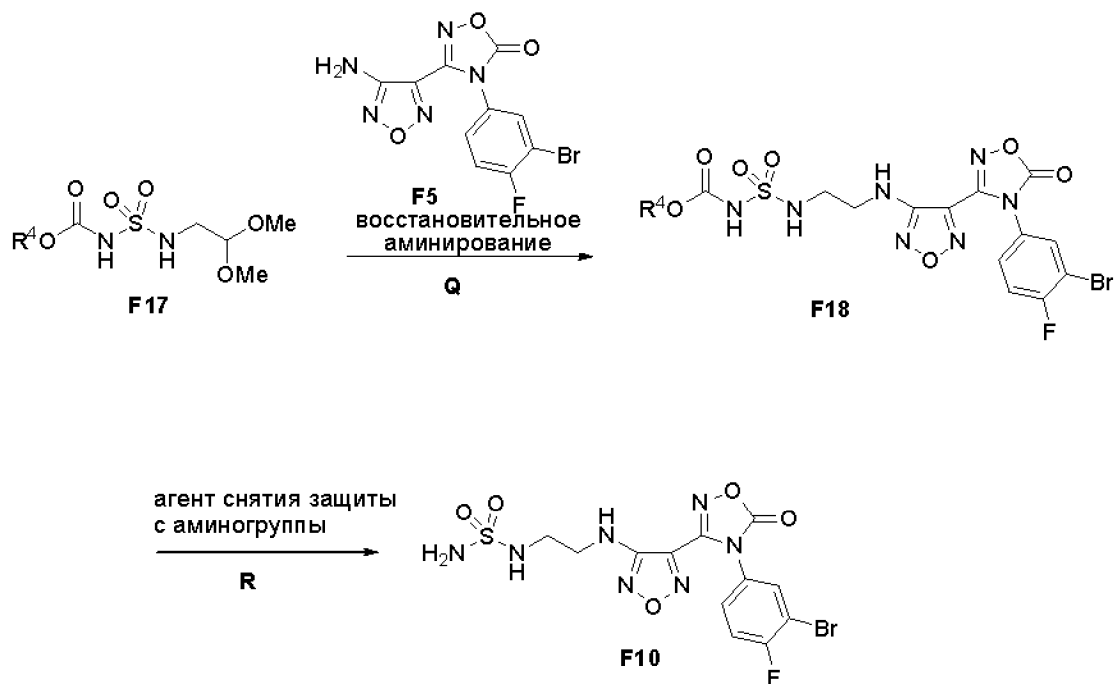


В некоторых вариантах реализации соединение Формулы F16 представляет собой *трет*-бутил-(4-метоксибензил)-(N-(4-метоксибензил)-N-(2-(4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил)-1,2,5-оксадиазол-3-иламино)этил)сульфамойл)карбамат:

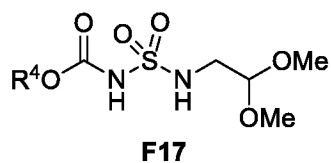


На Схеме 5 представлен альтернативный путь для получения соединения Формулы F10.

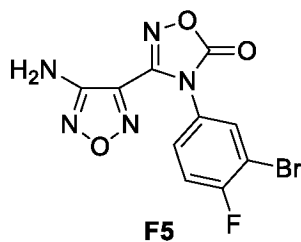
Схема 5



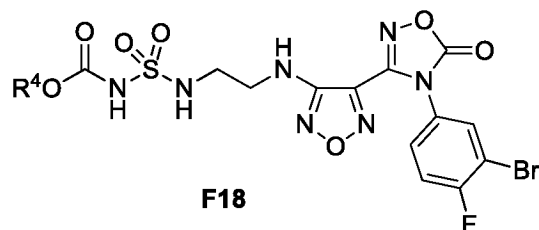
В настоящей заявке предложен также способ, включающий приведение в контакт
5 соединения Формулы F17:



где R⁴ представляет собой C₁₋₆ алкил, C₁₋₆ галогеналкил, бензил или 9H-флуорен-9-илметил, с соединением Формулы F5:



10 с получением соединения Формулы F18:



В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой *трет*-бутил.

В некоторых вариантах реализации R^4 представляет собой бензил.

В некоторых вариантах реализации R^4 представляет собой этил.

В некоторых вариантах реализации R^4 представляет собой C_{1-3} галогеналкил.

В некоторых вариантах реализации R^4 представляет собой 2,2,2-трихлорэтил.

5 В некоторых вариантах реализации R^4 представляет собой 9*H*-флуорен-9-илметил.

На указанной стадии Q соединения F18 могут быть получены, в некоторых вариантах реализации, путем взаимодействия F17 с аминным соединением Формулы F5 в присутствии восстанавливающего агента.

10 В некоторых вариантах реализации указанное приведение в контакт проводят в присутствии восстанавливающего агента.

Восстанавливающий агент может представлять собой любое соединение, способное восстанавливать органическое соединение до более низкой степени окисления, например, с применением органосилана, такого как три(C_{1-3} алкил)силан (например, триэтилсилан); элементарного водорода или с применением гидридного реагента (такого 15 как $NaB(OAc)_3H$, $NaBH_4$, $LiAlH_4$ и т.п.); с применением трифенилфосфина; или с применением комбинации йодида натрия, хлортриметилсилана и метанола. В некоторых вариантах реализации указанная стадия может быть проведена в присутствии кислоты, такой как трифторуксусная кислота. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются ими, галогенированные углеводородные растворители (например, 20 дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан или тетрахлорэтан). В некоторых вариантах реализации изобретения галогенированный углеводородный растворитель представляет собой 1,2-дихлорэтан.

В некоторых вариантах реализации указанный восстанавливающий агент представляет собой органосилан.

25 В некоторых вариантах реализации указанный восстанавливающий агент представляет собой три(C_{1-3} алкил)силан.

В некоторых вариантах реализации указанный восстанавливающий агент представляет собой триэтилсилан.

30 В некоторых вариантах реализации указанное приведение в контакт проводят в присутствии органической кислоты.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанная органическая кислота представляет собой трифторуксусную кислоту.

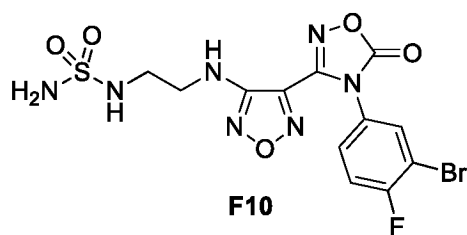
В некоторых вариантах реализации указанная органическая кислота представляет собой метансульфоновую кислоту.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное приведение в контакт проводят в компоненте растворителя, содержащем галогенированный углеводородный растворитель.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный галогенированный углеводородный растворитель представляет собой дихлорметан.

В некоторых вариантах реализации указанный галогенированный углеводородный растворитель представляет собой 1,2-дихлорэтан.

В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает снятие защиты с указанного соединения Формулы F18 с получением соединения Формулы F10:



В некоторых вариантах реализации способы снятия конкретных аминозащитных групп (таких как карбаматы) известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в книге Wuts и Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^{oe} изд., сс. 696-926, John Wiley & Sons: Нью-Йорк, 2006. Например, *tert*-бутоксикарбонильная группа (например, если R⁴ представляет собой *tert*-бутил) может быть удалена (например, гидролизована) с атома азота, например, обработкой кислотой (такой как хлористоводородная кислота, трифторуксусная кислота, толуолсульфоновая кислота и т.п.); комбинацией реагентов (например, смесью ацетилхлорида и метанола), которые, как известно, образуют кислоту; или кислотой Льюиса (например, BF₃·Et₂O).

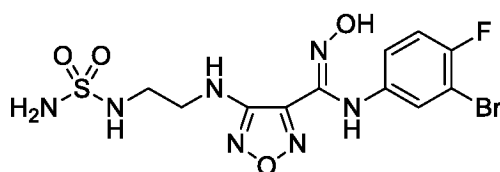
Бензилоксикарбонильная группа (например, если R⁴ представляет собой бензил) может быть удалена (например, гидролизована) с атома азота, например, обработкой водородом и катализатором (таким как палладий на углеводе). Метоксикарбонильные и этоксикарбонильные группы (т.е. если R⁴ представляет собой метил или этил) могут быть удалены обработкой неорганическим основанием (таким как KOH или K₂CO₃); комбинацией реагентов (например, смесью ацетилхлорида, йодида натрия и ацетонитрила); или обработкой кислотой (например, HBr, AcOH). 2,2,2-Трихлорэтоксикарбонильная группа может быть удалена, например, обработкой катализатором (например, Zn/AcOH или Cd/AcOH). Подходящие растворители для указанной стадии включают, но не ограничиваются ими, метанол или тетрагидрофуран (ТГФ), ацетонитрил и т.п. В некоторых вариантах реализации обработку проводят при

температуре от около 30 °C до около 90 °C, например, от около 50 °C до около 100 °C или от около 60 °C до около 80 °C.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное снятие защиты включает приведение в контакт соединения Формулы F18 с цинком в присутствии уксусной кислоты.

В некоторых вариантах реализации указанное снятие защиты проводят в компоненте растворителя, содержащем тетрагидрофуран.

В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает приведение в контакт указанного соединения Формулы F10 с основанием с получением соединения Формулы I:



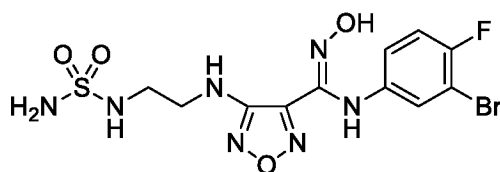
I.

В некоторых вариантах реализации указанное основание содержит гидроксид щелочного металла.

В некоторых вариантах реализации указанный гидроксид щелочного металла представляет собой гидроксид натрия.

В некоторых вариантах реализации указанное приведение в контакт проводят в компоненте растворителя, содержащем тетрагидрофуран, воду и этанол.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает превращение указанного соединения Формулы F18 в соединение Формулы I:



I,

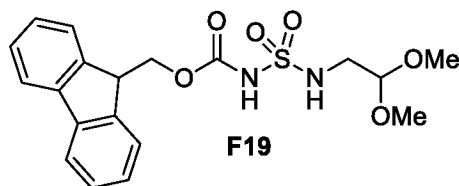
где указанное превращение включает объединение соединения Формулы F18 с основанием с получением первой смеси. В некоторых вариантах реализации основание представляет собой N,N-бис(2-аминоэтил)этан-1,2-диамин.

В некоторых вариантах реализации превращение дополнительно включает добавление кислоты к первой смеси. В некоторых вариантах реализации указанная кислота представляет собой водную сильную кислоту. В некоторых вариантах реализации указанная водная сильная кислота представляет собой водную хлористоводородную кислоту.

В некоторых вариантах реализации указанное превращение проводят в компоненте растворителя, содержащем тетрагидрофуран и этилацетат.

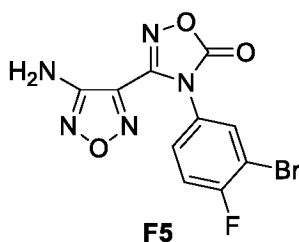
В настоящей заявке предложен также способ, включающий:

i) приведение в контакт соединения Формулы F19:

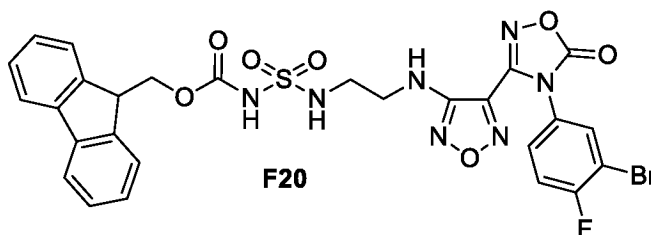


5

с соединением Формулы F5:



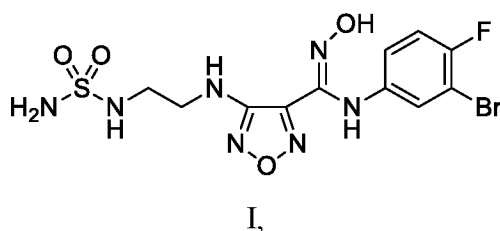
в присутствии триэтилсилана и метансульфоновой кислоты с получением соединения Формулы F20:



10

и

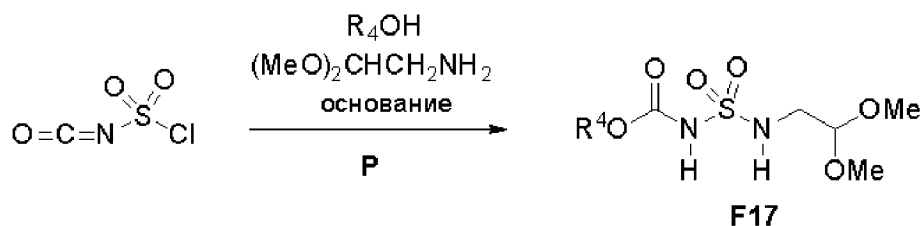
ii) превращение указанного соединения Формулы F20 в соединение Формулы I:



15 где указанное превращение включает объединение указанного соединения Формулы F20 с *N,N*-бис(2-аминоэтил)этан-1,2-диамином. В некоторых вариантах реализации указанное превращение дополнительно включает добавление водной хлористоводородной кислоты после указанного объединения.

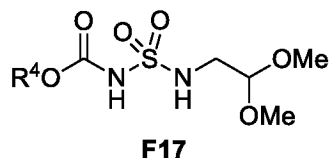
20 Соединение F17 может быть получено одностадийным способом (стадия Р) из хлорсульфонилоцианата, как показано на Схеме 6.

Схема 6



В некоторых вариантах реализации изобретения получение соединения Формулы F17 может быть проведено посредством обработки хлорсульфонилоцианата 2,2-диметоксиэтанамином и спиртом R⁴OH (R⁴ определен выше), необязательно в растворителе (например, галогенированном углеводородном растворителе, таком как дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан, тетрахлорэтан). В некоторых вариантах реализации указанную стадию проводят в присутствии основания. Основание может представлять собой органическое основание, такое как ациклический амин (например, триэтиламин, диизопропилэтиламин (DIPEA) и т.д.) или циклический амин (например, пирролидин, пиперидин и т.д.); или неорганическое основание, такое как щелочь (например, NaOH, LiOH, KOH, Mg(OH)₂ и т.д.). У некоторых вариантов реализации изобретения реакцию проводят в растворителе, например, в галогенированном углеводородном растворителе, таком как дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан или тетрахлорэтан.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки дополнительно предложено соединение Формулы F17:



где R⁴ представляет собой C₁₋₆ алкил, C₁₋₆ галогеналкил или бензил.

В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой *трет*-бутил.

В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой бензил.

В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой этил.

В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой C₁₋₃ галогеналкил.

В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой 2,2,2-трихлорэтил.

В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой 9*H*-флуорен-9-илметил.

В некоторых вариантах реализации соединение Формулы F17 представляет собой *трет*-бутил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамойлкарбамат.

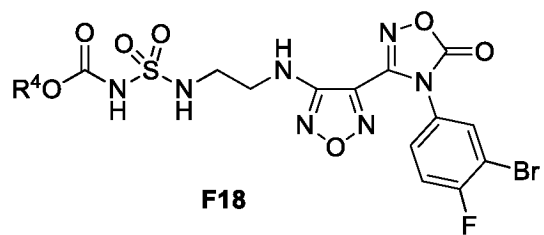
В некоторых вариантах реализации соединение Формулы F17 представляет собой бензил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамойлкарбамат.

В некоторых вариантах реализации соединения Формулы F17 представляет собой этил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамоилкарбамат.

В некоторых вариантах реализации соединения Формулы F17 представляет собой 2,2,2-трихлорэтил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамоилкарбамат.

5 В некоторых вариантах реализации соединения Формулы F17 представляет собой (9H-флуорен-9-ил)метил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамоилкарбамат.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки дополнительно предложено соединение Формулы F18:



10 где R⁴ представляет собой C₁₋₆ алкил, C₁₋₆ галогеналкил или бензил.

В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой *трет*-бутил.

В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой бензил.

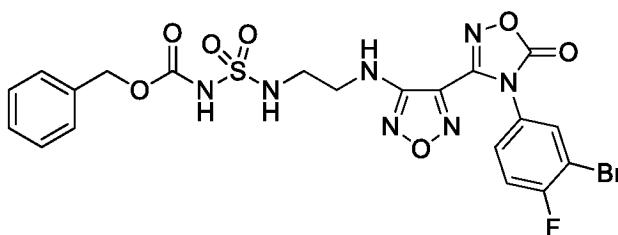
В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой этил.

В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой C₁₋₃ галогеналкил.

15 В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой 2,2,2-трихлорэтил.

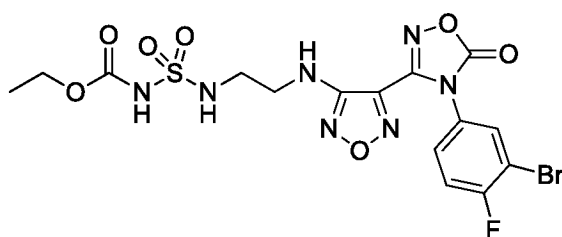
В некоторых вариантах реализации R⁴ представляет собой 9H-флуорен-9-илметил.

В некоторых вариантах реализации соединения Формулы F18 представляет собой бензил-([2-([4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]амино)сульфонил)карбамат:

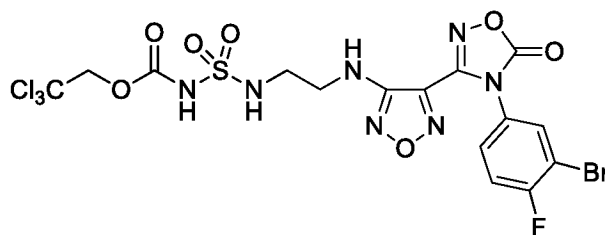


20

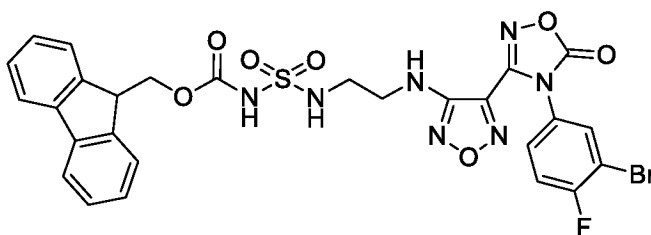
В некоторых вариантах реализации соединения Формулы F18 представляет собой этил-([2-([4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]амино)сульфонил)карбамат:



В некоторых вариантах реализации соединения Формулы F18 представляет собой 2,2,2-трихлорэтил-({[2-({[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]амино}сульфонил)карбамат:



- 5 В некоторых вариантах реализации соединения Формулы F18 представляет собой (9H-флуорен-9-ил)метил-N-(2-((4-(4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил)-1,2,5-оксадиазол-3-ил)амино)этил)сульфамоилкарбамат:



- 10 В данном контексте термин «алкил», используемый самостоятельно или вместе с терминами дополнительного фрагмента, относится к линейной или разветвленной насыщенной углеводородной группе, имеющей от 1 до 6 атомов углерода, от 1 до 4 атомов углерода или от 1 до 3 атомов углерода. Примеры алкильных групп включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил и т.п.

- 15 В данном контексте «алкенил» относится к алкильной группе, имеющей одну или более двойных углерод-углеродных связей. В некоторых вариантах реализации указанная алкильная группа имеет от 2 до 6 атомов углерода, от 2 до 4 атомов углерода или от 2 до 3 атомов углерода. Иллюстративные алкенильные группы включают этенил (винил), пропенил и т.п.

- 20 В данном контексте «алкенилалкил» относится к группе формулы -алкил-алкенил. В некоторых вариантах реализации изобретения алкенилалкильная группа представляет собой аллил.

- 25 В данном контексте термин «галогеналкил», используемый самостоятельно или вместе с дополнительным фрагментом, относится к алкильной группе, замещенной одним или более атомами галогена, независимо выбранными из F, Cl, Br и I. Иллюстративные галогеналкильные группы включают CF₃, CHF₂, CH₂CF₃ и т.п.

В контексте настоящего документа термин «алкокси» относится к группе -О-алкил. В некоторых вариантах реализации алкильная группа имеет от 1 до 6 атомов углерода, от

1 до 4 атомов углерода или от 1 до 3 атомов углерода. Иллюстративные алкоксигруппы включают метокси, этокси, пропокси (*например*, н-пропокси и изопропокси), трет-бутокси и т.п.

5 В данном контексте «триалкиламин» относится к атому азота, замещенному тремя независимо выбранными алкильными группами. В некоторых вариантах реализации изобретения каждая алкильная группа имеет от 2 до 6 атомов углерода, от 2 до 4 атомов углерода или от 2 до 3 атомов углерода. Иллюстративные триалкиламинные группы включают триметиламин, триэтиламин и т.п.

10 В контексте настоящего документа термин «алкоксикарбонил» относится к группе формулы -C(O)-O-алкил. В некоторых вариантах реализации алкильная группа имеет от 2 до 6 атомов углерода, от 2 до 4 атомов углерода или от 2 до 3 атомов углерода. Иллюстративные алкоксикарбонильные группы включают этоксикарбонил, *трет*-бутоксикарбонил (Boc) и т.п.

15 Галогенированные углеводородные растворители относятся к галогенированным алканам, таким как дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан или тетрахлорэтан, где указанный алкан может быть разветвленным или линейным, имеющим от 1 до 12 атомов углерода, от 1 до 6 атомов углерода или от 1 до 4 атомов углерода с одним или более атомами галогена. В некоторых вариантах реализации галогенированный углеводородный растворитель представляет собой хлорированный алкан, содержащий от 1 до 12 атомов углерода, от 1 до 6 атомов углерода или от 1 до 4 атомов углерода.

В различных местах настоящего описания заместители соединений согласно настоящему изобретению могут быть описаны в группах или рядах. В частности, предполагается, что настоящее изобретение включает каждую отдельную субкомбинацию членов таких групп или рядов.

25 Предполагается, что соединения согласно настоящему изобретению являются стабильными. В данном контексте «стабильное» относится к соединению, которое является достаточно прочным, чтобы выдерживать выделение из реакционной смеси до подходящей степени чистоты и предпочтительно к соединению, которое может быть составлено в композицию эффективного терапевтического агента.

30 Кроме того, понятно, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в различных вариантах реализации изобретения, также могут быть объединены в один вариант реализации изобретения. С другой стороны, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в одном варианте реализации изобретения, также могут быть представлены отдельно или в любой подходящей субкомбинации.

Предполагается также, что соединения согласно настоящему изобретению включают все возможные геометрические изомеры. Описаны цис и транс геометрические изомеры соединений, и они могут быть выделены в виде смеси изомеров или в виде отдельных изомерных форм.

5 Соединения согласно настоящему изобретению включают также таутомерные формы. Таутомерные формы возникают вследствие обмена одинарной связи с соседней двойной связью и сопутствующего перехода протона.

Соединения согласно настоящему изобретению могут также содержать все изотопы атомов, которые встречаются в промежуточных или конечных соединениях.

10 Изотопы включают те атомы, которые имеют одинаковый атомный номер, но различные массовые числа. Например, изотопы водорода включают тритий и дейтерий.

В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению и их соли являются по существу выделенными. «По существу выделены» означает, что соединение является по меньшей мере частично или по существу выделенным из среды, в которой оно было получено или обнаружено. Частичное выделение может включать, например, композиции, обогащенные соединениями согласно настоящему изобретению. Значительное выделение может включать композиции, содержащие по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97% или по меньшей мере около 99% по массе соединения согласно настоящему изобретению или его соли. Способы выделения соединений и их солей известны в данной области техники.

Настоящая заявка включает также соли соединений, описанных в настоящем документе. В данном контексте «соли» относится к производным описанных соединений, в которых исходное соединение модифицировано путем превращения существующего кислотного или основного фрагмента в его солевую форму. Примеры солей включают, но не ограничиваются ими, соли минеральных кислот (таких как HCl, HBr, H₂SO₄) или органических кислот (таких как уксусная кислота, бензойная кислота, трифторуксусная кислота) с основными остатками, такими как амины; соли щелочей (таких как Li, Na, K, Mg, Ca) или органических оснований (таких как триалкиламмоний) с кислотными остатками, такими как карбоновые кислоты; и т.п. Соли согласно настоящей заявке могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, с помощью обычных химических способов. Как правило, такие соли могут быть получены путем взаимодействия данных соединений в свободной кислотной или основной формах со стехиометрическим количеством подходящего основания или

кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси; в целом предпочтительнее неводная среда, такая как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил (ACN).

Настоящая заявка включает также фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в настоящем документе. «Фармацевтически приемлемые соли» включают подмножество «солей», описанных выше, которые представляют собой обычные нетоксичные соли исходного соединения, полученные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Список подходящих солей представлен в *Remington, Pharmaceutical Sciences*, 17^{oe} изд., Mack Publishing Company, Истон, штат Пенсильвания, 1985, с. 1418, и в *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2 (1977), полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном описании для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые с медицинской точки зрения, являются подходящими для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно с разумным соотношением пользы/риска.

Способы, описанные в настоящем документе, можно контролировать в соответствии с любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, за образованием продукта можно следить с помощью спектроскопии, такой как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (например, ^1H или ^{13}C), инфракрасная спектроскопия, спектрофотометрия (например, УФ и видимой области) или масс-спектрометрия; или с помощью хроматографии, такой как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или тонкослойная хроматография. Соединения, полученные в реакциях, могут быть очищены любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, хроматографией (среднего давления) на подходящем адсорбенте (например, силикагеле, оксиде алюминия и т.п.), ВЭЖХ или препаративной тонкослойной хроматографией; дистилляцией; сублимацией; растиранием или перекристаллизацией. Чистоту соединений, в целом, определяют физическими методами, такими как измерение температуры плавления (в случае твердого вещества), получение ЯМР спектра или выполнение ВЭЖХ разделения. При снижении температуры плавления, при снижении нежелательных сигналов в ЯМР спектре или при устранении посторонних пиков при ВЭЖХ обнаружении, можно сказать, что соединение очищено. В некоторых вариантах реализации изобретения соединения являются по существу очищенными.

Получение соединений может включать защиту и снятие защиты с различных химических групп. Специалистом в данной области без труда может быть установлена необходимость в защите или снятии защиты, а также осуществлен выбор подходящих защитных групп. Химия защитных групп описана, например, в книге Wuts и Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^{ое} изд., John Wiley & Sons: Нью-Йорк, 2006, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Реакции способов, описанных в настоящем документе, могут быть выполнены в подходящих растворителях, которые специалист в области органического синтеза может легко подобрать. Подходящие растворители должны быть по существу инертными по отношению к исходным веществам (реагентам), промежуточным соединениям или продуктам при температурах проведения реакций, т.е. при температурах, которые могут быть в интервале от температуры замерзания растворителя до температуры кипения растворителя. Данная реакция может быть выполнена в одном растворителе или в смеси более чем одного растворителя. В зависимости от стадии реакции может быть выбран подходящий растворитель(-и) для определенной стадии реакции. Подходящие растворители включают воду, алканы (такие как пентаны, гексаны, гептаны, циклогексан и т.д. или их смесь), ароматические растворители (такие как бензол, толуол, ксилол и т.д.), спирты (такие как метанол, этанол, изопропанол и т.д.), простые эфиры (такие как диалкилэфиры, метил-*трет*-ббутиловый эфир (МТБЭ), тетрагидрофуран (ТГФ), диоксан и т.д.), сложные эфиры (такие как этилацетат, бутилацетат и т.д.), галогенированные углеводородные растворители (такие как дихлорметан (ДХМ), хлороформ, дихлорэтан, тетрахлорэтан), диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО), ацетон, ацетонитрил (ACN), гексаметилфосфрамид (НМРА) и N-метилпирролидон (NMP). Такие растворители могут быть использованы либо во влажной, либо в безводной форме.

Разделение рацемических смесей соединений может быть проведено любым из многочисленных способов, известных в данной области техники. Иллюстративный способ включает фракционную перекристаллизацию с использованием «хиральной разделяющей кислоты», которая является оптически активной солеобразующей органической кислотой. Подходящие разделяющие агенты для способов фракционной перекристаллизации включают, например, оптически активные кислоты, такие как D и L формы винной кислоты, диацетилвинной кислоты, дибензоилвинной кислоты, миндальной кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты или различных оптически активных камфорсульфоновых кислот. Разделение рацемических смесей также может быть проведено элюированием на колонке, содержащей оптически активный разделяющий

агент (например, динитробензоилфенилглицин). Специалист в данной области техники может определить подходящий состав растворителей для элюирования.

Способы применения

5 Соединения Формулы I могут ингибировать активность фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). Например, соединение Формулы I может быть использовано для ингибирования активности IDO в клетке или у пациента, нуждающегося в модулировании фермента, посредством введения ингибирующего количества соединения Формулы I.

10 Соединения Формулы I могут быть использованы в способах ингибирования разрушения триптофана в системе, содержащей клетки, экспрессирующие IDO, такой как ткань, живой организм или клеточная культура. В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены способы изменения (*например*, повышения) внеклеточных уровней триптофана у млекопитающего посредством введения эффективного количества соединения Формулы I. Способы измерения уровней триптофана и разрушения
15 триптофана известны в данной области техники.

Соединения Формулы I могут быть использованы в способах ингибирования подавления иммунитета, такого как IDO-опосредованное подавление иммунитета, у пациента посредством введения пациенту эффективного количества соединения Формулы I. IDO-опосредованное подавление иммунитета может быть связано, например, с раком,
20 ростом опухоли, метастазом, вирусной инфекцией, вирусной репликацией и т.д.

Соединения Формулы I также могут быть использованы в способах лечения заболеваний, связанных с активностью или экспрессией, включая патологическую активность и/или сверхэкспрессию, IDO у индивидуума (*например*, пациента), путем введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного
25 количества или дозы соединения Формулы I или его фармацевтической композиции. Примеры заболеваний могут включать любое заболевание, расстройство или патологическое состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью фермента IDO, включая сверхэкспрессию или патологическую активность. Заболевание, связанное с IDO, может также включать любое заболевание, расстройство
30 или патологическое состояние, которое можно предотвратить, улучшить или вылечить модулированием активности фермента. Примеры заболеваний, связанных с IDO, включают рак, вирусную инфекцию, такую как инфекция ВИЧ, инфекция ВГС, депрессия, нейродегенеративные расстройства, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона, травма, возрастные катаракты, трансплантация органа (*например*,
35 отторжение трансплантата органа) и аутоиммунные заболевания, включая астму,

ревматоидный артрит, рассеянный склероз, аллергическое воспаление, воспалительную болезнь кишечника, псориаз и системную красную волчанку. Примеры раковых заболеваний, которые можно лечить по способам, описанным в настоящем документе, включают рак толстой кишки, поджелудочной железы, молочной железы, предстательной железы, легких, головного мозга, яичников, шейки матки, яичек, почек, головы и шеи, лимфому, лейкоз, меланому и т.п. Соединение Формулы I также может быть использовано при лечении ожирения и ишемии.

В данном контексте «клетка» относится к клетке, которая находится *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах реализации *ex vivo* клетка может представлять собой часть образца ткани, вырезанной из организма, такого как млекопитающее. В некоторых вариантах реализации *in vitro* клетка может представлять собой клетку в клеточной культуре. В некоторых вариантах реализации *in vivo* клетка представляет собой клетку, живущую в организме, таком как млекопитающее.

В данном контексте термин «приведение в контакт» относится к объединению указанных фрагментов в системе *in vitro* или в системе *in vivo*. Например, «приведение в контакт» фермента IDO с соединением Формулы I включает введение соединения Формулы I индивидууму или пациенту, такому как человек, имеющему IDO, а также, например, введение соединения Формулы I в образец, содержащий клеточный или очищенный препарат, содержащий фермент IDO.

В данном контексте термины «индивидуум» или «пациент», используемые взаимозаменяемо, относятся к любому животному, включая млекопитающих, предпочтительно мышей, крыс, других грызунов, кроликов, собак, кошек, свиней, крупный рогатый скот, овец, лошадей или приматов, и наиболее предпочтительно к людям.

В данном контексте выражение «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного соединения или фармацевтического агента, которое вызывает биологический или медицинский отклик в ткани, системе, животном, индивидууме или человеке, необходимый исследователю, ветеринару, врачу или другому клиницисту.

В данном контексте термин «лечить» или «лечение» относится к 1) предупреждению заболевания; например, к предупреждению заболевания, патологического состояния или расстройства у индивидуума, который может быть предрасположен к заболеванию, патологическому состоянию или расстройству, но еще не испытывает или не демонстрирует патологии или симптоматологии заболевания; 2) ингибированию заболевания; например, к ингибированию заболевания, патологического состояния или расстройства у индивидуума, который испытывает или демонстрирует

патологию или симптоматологию заболевания, патологического состояния или расстройства (*т.е.*, к остановке дальнейшего развития патологии и/или симптоматологии) или 3) ослаблению заболевания; например, к ослаблению заболевания, патологического состояния или расстройства у индивидуума, который испытывает или демонстрирует

5 патологию или симптоматологию заболевания, патологического состояния или расстройства (*т.е.*, реверсирование патологии и/или симптоматологии).

Комбинированная терапия

Один или более дополнительных фармацевтических агентов или методов лечения, таких как, например, противовирусные агенты, химиотерапевтические или другие

10 противораковые агенты, иммуноукрепляющие агенты, иммуноподавляющие агенты, облучение, противоопухолевые и противовирусные вакцины, терапия цитокинами (*например*, IL2, GM-CSF, и *т.д.*), и/или ингибиторы тирозинкиназы, могут быть использованы в комбинации с соединением Формулы I для лечения заболеваний,

15 расстройств или патологических состояний, связанных с IDO. Указанные агенты могут быть скомбинированы с соединением Формулы I в одной лекарственной форме, или указанные агенты могут быть введены одновременно или последовательно в виде отдельных лекарственных форм.

Подходящие противовирусные агенты, предусмотренные для применения в комбинации с соединением Формулы I, могут включать нуклеозидные и нуклеотидные

20 ингибиторы обратной транскриптазы (NRTI), нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI), ингибиторы протеазы и другие противовирусные лекарства.

Примеры подходящих NRTI включают зидовудин (AZT); диданозин (ddI); залцитабин (ddC); ставудин (d4T); ламивудин (3TC); абакавир (1592U89); адефовир

25 дипивоксил [бис(РОМ)-РМЕА]; лобукавир (BMS-180194); BCH-10652; эмитрицитабин [(-)-FTC]; бета-L-FD4 (также называемый бета-L-D4C и имеющий название бета-L-2', 3'-диклеокси-5-фторцитиден); DAPD, ((-)-бета-D-2,6,-диаминопурин диоксолан); и лоденозин (FddA). Типичные подходящие NNRTI включают невирапин (BI-RG-587); делавирадин (BHAP, U-90152); эфавиренц (DMP-266); PNU-142721; AG-1549; MKC-442

30 (1-(этоксиметил)-5-(1-метилэтил)-6-(фенилметил)-(2,4(1H,3H)-пиримидиндион); и (+)-каланолид А (NSC-675451) и В. Типичные подходящие ингибиторы протеазы включают саквинавир (Ro 31-8959); ритонавир (ABT-538); индинавир (МК-639); нелфинавир (AG-1343); ампренавир (141W94); лазинавир (BMS-234475); DMP-450; BMS-2322623; ABT-378; и AG-1 549. Другие противовирусные агенты включают гидроксимочевину,

35 рибавирин, IL-2, IL-12, пентафузид и Yissum Project № 11607.

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые агенты включают, например, алкилирующие агенты (включая, без ограничения, азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены), такие как урациловый иприт, хлорметин, циклофосфамид (CytoxanTM), ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилентioфосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

При лечении меланомы подходящие агенты для применения в комбинации с соединением Формулы I включают: дакарбазин (DTIC), необязательно вместе с другими химиотерапевтическими лекарствами, такими как кармустин (BCNU) и цисплатин; «Дартмутский режим», который состоит из DTIC, BCNU, цисплатина и тамоксифена; комбинацию цисплатина, винбластина и DTIC; или темозоломид. При лечении меланомы соединения согласно настоящему изобретению также могут быть скомбинированы с иммунотерапевтическими лекарствами, включая цитокины, такие как интерферон альфа, интерлейкин 2 и фактор некроза опухоли (TNF).

При лечении меланомы соединение Формулы I также может быть использовано в комбинации с вакцинной терапией. Антимеланомные вакцины несколько похожи на противовирусные вакцины, которые используют для предупреждения заболеваний, вызванных вирусами, такими как вирусы полиомиелита, кори и свинки. Ослабленные клетки меланомы или части клеток меланомы, называемые антигенами, могут быть введены пациенту посредством инъекции для стимулирования иммунной системы организма для разрушения клеток меланомы.

Меланомы, ограниченные руками и ногами, также можно лечить комбинацией агентов, содержащей соединение Формулы I, с использованием технологии изолированной гипертермической перфузии конечностей. Такой протокол лечения временно отделяет кровоток в пораженной конечности от остального тела и обеспечивает инъекцию высоких доз химиотерапевтического агента в артерию, снабжающую конечность, что создает высокие дозы в области опухоли без воздействия указанных доз на внутренние органы, что может в противном случае вызывать тяжелые побочные эффекты. Как правило, жидкость нагревают до 102°-104° F. Мелфалан представляет собой лекарство, которое чаще всего используют в указанной химиотерапевтической процедуре. Он может быть введен с другим агентом, называемым фактором некроза опухоли (TNF) (см. раздел, посвященный цитокинам).

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые агенты включают, например, антиметаболиты (включая, без ограничения, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндезаминазы), такие как

метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, фосфат флударабина, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые агенты дополнительно включают, например, некоторые природные продукты и их производные (например, алкалоиды барвинка, противоопухолевые антибиотики, ферменты, лимфокины и эпиподофиллотоксины), такие как винбластин, винкристин, виндезин, блеомицин, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, ага-С, паклитаксел (TAXOLTM), митрамицин, деоксикоформицин, митомицин-С, L-аспарагиназа, интерфероны (особенно IFN-а), этопозид и тенипозид.

Другие цитотоксические агенты включают навелбен, СРТ-11, анастразол, летразол, капецитабин, релоксафин, циклофосфамид, ифосфамид и дролоксафин.

Также подходящими являются цитотоксические агенты, такие как эпидофиллотоксин; антинеопластический фермент; ингибитор топоизомеразы; прокарбазин; митоксантрон; координационные комплексы платины, такие как цисплатин и карбоплатин; модификаторы биологического ответа; ингибиторы роста; антигормональные терапевтические агенты; лейковорин; тегафур; и гематопоетические факторы роста.

Другой противораковый агент(-ы) включает терапевтические агенты с антителами, такие как трастузумаб (Herceptin), антитела к костимулирующим молекулам, такие как CTLA-4, 4-1BB и PD-1, или антитела к цитокинам (IL-10, TGF- β и т.д.).

Другие противораковые агенты включают также агенты, которые блокируют миграцию иммунных клеток, такие как антагонисты к рецепторам хемокина, включая CCR2 и CCR4.

Другие противораковые агенты включают также агенты, которые укрепляют иммунную систему, такие как адъюванты или адаптивный перенос Т-клеток.

Противораковые вакцины включают дендритные клетки, синтетические пептиды, ДНК вакцины и рекомбинантные вирусы.

Способы безопасного и эффективного введения большинства из указанных химиотерапевтических агентов известны специалистам в данной области техники. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических агентов описано в книге "Physicians' Desk Reference" (PDR, например, издания 1996 года, Medical Economics Company, Монтвал, штат Нью-Джерси), полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, как если бы оно было изложено в настоящем документе в полном объеме.

Фармацевтические составы и лекарственные формы

При применении в качестве фармацевтических средств, соединение Формулы I может быть введено в форме фармацевтических композиций, которые представляют собой комбинацию соединения Формулы I и фармацевтически приемлемого носителя.

- 5 Указанные композиции могут быть получены при помощи способов, хорошо известных в фармацевтической области, и могут быть введены различными способами, в зависимости от того, необходимо местное или системное лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может быть местным (включая офтальмологическое и в слизистые оболочки, включая интраназальную, вагинальную и ректальную доставку), пульмональным
- 10 (*например*, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью распылителя; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным или трансдермальным), окулярным, пероральным или парентеральным. Способы окулярной доставки могут включать местное введение (глазные капли), субконъюнктивальное, периокулярное или интравитреальное введение инъекции или введение с помощью
- 15 баллонного катетера или офтальмологических вставок, хирургическим путем устанавливаемых в конъюнктивальном мешке. Парентеральное введение включает внутривенное, внутриартериальное, подкожное, внутрибрюшинное или внутримышечное введение инъекции или инфузии; или интракраниальное, например, интратекальное или интравентрикулярное введение. Парентеральное введение может быть в форме одной
- 20 болюсной дозы или может быть, например, осуществлено непрерывно с помощью перфузионного насоса. Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Необходимыми или желательными являются традиционные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные
- 25 основы, загустители и тому подобное.

- Фармацевтические композиции, содержащие соединение Формулы I, могут быть получены в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. При получении композиций согласно настоящему изобретению активный ингредиент обычно смешивают со вспомогательным веществом, разбавляют вспомогательным
- 30 веществом или включают в носитель в форме, например, капсулы, саше, бумажного пакета или другого контейнера. Если вспомогательное вещество служит разбавителем, оно может быть твердым, полутвердым или жидким веществом, которое служит наполнителем, носителем или средой для активного компонента. Таким образом, композиции могут быть в форме таблеток, пилюль, порошков, пастилок, саше,
- 35 крахмальных капсул, настоев, суспензий, эмульсий, растворов, сиропов, аэрозолей

(твердых или в жидкой среде), мазей, содержащих, например, до 10% масс. активного соединения, мягких и твердых желатиновых капсул, суппозиториев, стерильных инъекционных растворов или стерильных упакованных порошков.

Для получения препаратов активное соединение можно размалывать, чтобы обеспечить подходящий размер частиц, до объединения с другими компонентами. Если активное соединение практически нерастворимо, его можно размалывать до получения частиц размером менее 200 меш. Если активное соединение хорошо растворяется в воде, размер частиц можно регулировать размалыванием, чтобы обеспечить практически однородное распределение в препарате, например, около 40 меш.

Некоторые примеры подходящих вспомогательных веществ включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмалы, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, патоку и метилцеллюлозу. Составы могут дополнительно содержать: смазывающие агенты, такие как тальк, стеарат магния и минеральное масло; смачивающие агенты; эмульгирующие и суспендирующие агенты; консерванты, такие как метил- и пропилгидроксибензоат; и подсластители; и ароматизаторы. Композиции согласно настоящему изобретению могут быть составлены так, чтобы обеспечивать быстрое, длительное или замедленное высвобождение активного ингредиента после введения пациенту с использованием способов, известных в данной области техники.

Композиции могут быть составлены в виде единичной лекарственной формы, каждая доза содержит от около 5 до около 100 мг, более часто от около 10 до около 30 мг активного ингредиента. Термин «единичные лекарственные формы» относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве однократной дозы для людей и других млекопитающих, каждая единица содержит предварительно определенное количество активного материала, рассчитанное так, чтобы обеспечивать требуемый терапевтический эффект, в сочетании с подходящим фармацевтическим вспомогательным веществом.

Активное соединение может быть эффективным в широком диапазоне доз, и его обычно вводят в фармацевтически эффективном количестве. Однако следует понимать, что фактически вводимое количество соединения обычно определяет врач в соответствии с релевантными обстоятельствами, включая патологическое состояние, подлежащее лечению, выбранный способ введения, фактически вводимое соединение, возраст, массу и отклик конкретного пациента, тяжесть симптомов пациента и т.п.

Для получения твердых композиций, таких как таблетки, главный активный компонент смешивают с фармацевтическими вспомогательными веществами с получением предварительной композиции, содержащей гомогенную смесь соединения Формулы I. Если указано, что предварительная композиция является гомогенной, понимают, что активный компонент, как правило, диспергирован равномерно по всей композиции, так что композиция может быть легко разделена на равноэффективные единичные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли и капсулы. Затем полученную твердую предварительную композицию разделяют на единичные лекарственные формы описанного выше типа, содержащие, например, от 0,1 до около 500 мг активного ингредиента согласно настоящей заявке.

Таблетки или пилюли, содержащие соединение Формулы I, могут быть покрыты или компаундированы другим способом для получения лекарственной формы, обладающей преимуществом пролонгированного действия. Например, таблетка или пилюля может содержать внутренний компонент дозы и внешний компонент дозы, причем последний в форме оболочки вокруг первого. Два компонента могут быть разделены энтеросолюбильным слоем, который препятствует разложению в желудке и обеспечивает возможность прохождения внутреннего компонента в неизменном виде в двенадцатиперстную кишку или его отсроченного высвобождения. Для указанных энтеросолюбильных слоев или покрытий могут быть использованы различные материалы, такие как материалы, содержащие множество полимерных кислот и смесей полимерных кислот с такими материалами как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Жидкие формы, в состав которых могут быть включены соединения и композиции согласно настоящему изобретению, для перорального введения или инъекции включают водные растворы, специально ароматизированные сиропы, водные или масляные суспензии и ароматизированные эмульсии с пищевыми маслами, такими как хлопковое масло, кунжутное масло, кокосовое масло или арахисовое масло, а также настои и подобные фармацевтические среды.

Композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях или их смесях, и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, описанные supra. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции вводят перорально или в дыхательные пути через нос для местного или системного эффекта. Композиции можно распылять, используя инертные газы. Распыленный раствор можно вдыхать непосредственно из устройства для распыления, или устройство для распыления можно присоединить к

дыхательной маске или дыхательному аппарату с периодическим положительным давлением. Растворы, суспензии или порошковые композиции можно вводить перорально или через нос, используя устройства, которые доставляют препарат соответствующим образом.

5 Количество соединения или композиции, вводимое пациенту, варьируется в зависимости от вводимого препарата, цели введения, как, например, профилактика или терапия, состояния пациента, способа введения и т.п. Для терапевтических целей композиция может быть введена пациенту, уже имеющему заболевание, в количестве, достаточном для лечения или по меньшей мере частичного ослабления симптомов

10 заболевания и его осложнений. Эффективные дозы зависят от патологического состояния, подлежащего лечению, а также в соответствии с заключением лечащего врача, в зависимости от таких факторов, как тяжесть заболевания, возраст, масса и общее состояние пациента и т.п.

 Композиции, вводимые пациенту, могут быть в форме фармацевтических

15 композиций, описанных выше. Композиции могут быть стерилизованы с применением традиционных способов стерилизации или с помощью стерилизующего фильтра. Водные растворы могут быть упакованы для применения в неизменном виде или лиофилизированы, причем лиофилизированные препараты объединяют со стерильным водным носителем перед введением. рН препаратов с соединениями, как правило,

20 составляет от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 и наиболее предпочтительно от 7 до 8. Следует понимать, что использование некоторых из вышеупомянутых вспомогательных веществ, носителей или стабилизаторов будет приводить к образованию фармацевтических солей.

 Терапевтическая доза соединения Формулы I может варьироваться в соответствии,

25 например, с конкретной целью, для которой осуществляется лечение, способом введения соединения, состоянием здоровья и заболеванием пациента и заключением лечащего врача. Доля или концентрация соединения Формулы I в фармацевтической композиции может варьироваться в зависимости от ряда факторов, в том числе дозы, химических характеристик (например, гидрофобности) и способа введения. Например, соединение

30 Формулы I может быть представлено в водном физиологическом буферном растворе, содержащем от около 0,1 до около 10 масс./об. % соединения для парентерального введения. Некоторые типичные диапазоны доз составляют от около 1 мкг/кг до около 1 г/кг массы тела в сутки. В некоторых вариантах реализации диапазон доз составляет от около 0,01 мг/кг до около 100 мг/кг массы тела в сутки. Доза может зависеть от таких

35 переменных, как тип и степень развития заболевания или расстройства, общее состояние

здоровья конкретного пациента, относительная биологическая эффективность выбранного соединения, состав вспомогательных веществ и способ введения. Эффективные дозы могут быть экстраполированы по кривым зависимости эффекта от дозы, полученных из *in vitro* или тестовых модельных систем на животных.

5 Соединение Формулы I также может быть составлено в комбинацию с одним или более дополнительными активными ингредиентами, которые могут включать любые фармацевтические агенты, такие как противовирусные агенты, вакцины, антитела, иммуноукрепляющие агенты, иммуноподавляющие агенты, противовоспалительные агенты и т.п.

10 Настоящая заявка включает также фармацевтические наборы, подходящие, например, для лечения или предупреждения заболеваний или расстройств, связанных с ИДО, ожирения, диабета и других заболеваний, указанных в настоящем документе, которые содержат один или более контейнеров, содержащих фармацевтическую композицию, которая содержит терапевтически эффективное количество соединения

15 Формулы I. Такие наборы могут дополнительно содержать, при необходимости, один или более различных традиционных компонентов для фармацевтических наборов, как, например, емкости с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, дополнительные емкости и т.д., что очевидно для специалистов в данной области техники. Также в набор могут быть включены инструкции, либо в виде вкладыша, либо в виде

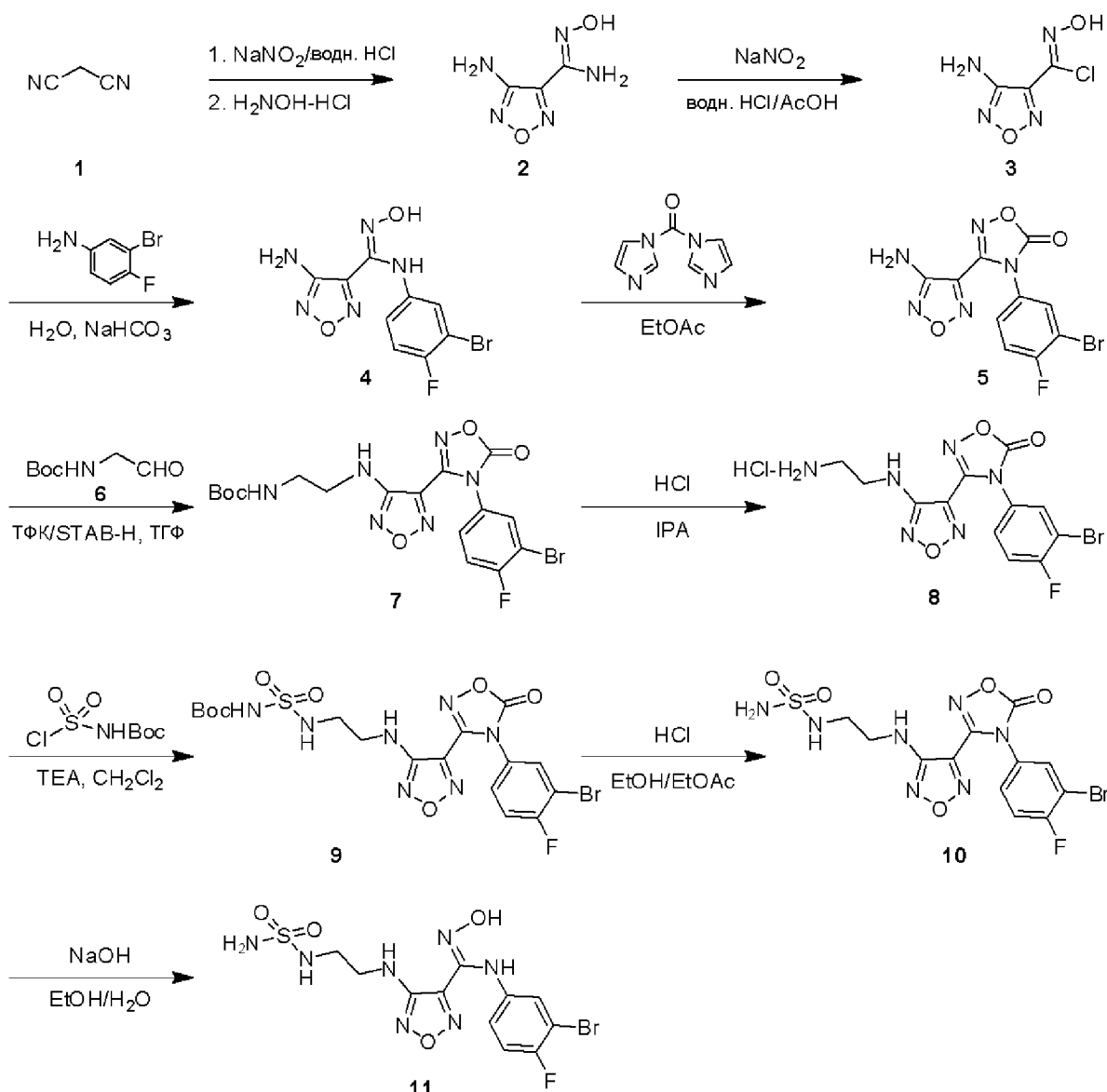
20 этикетки, с указанием количества компонентов, которые нужно принять, указаниями по приему и/или указаниями по смешиванию компонентов.

ПРИМЕРЫ

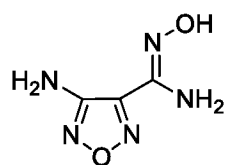
Настоящее изобретение будет более подробно описано на конкретных примерах.

25 Следующие примеры служат для целей наглядности, и никоим образом не ограничивают настоящее изобретение. Специалистам в данной области понятны различные некритичные параметры, которые могут быть изменены или модифицированы для получения практически таких же результатов.

30 **Пример 1. Синтез 4-({2-[(аминосульфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимида**



Стадия А: 4-Амино- N' -гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамид (2)



- Малононитрил [Aldrich, продукт № M1407] (320,5 г, 5 моль) добавили к воде (7 л),
- 5 предварительно нагретой до 45 °С, и перемешивали при 45 °С в течение 5 минут. Полученный раствор охладил в ледяной бане и добавили нитрит натрия (380 г, 5,5 моль, 1,1 экв.). По достижении температуры 10 °С, добавили 6 н. раствор хлористоводородной кислоты (55 мл). Протекала реакция с умеренным экзотермическим эффектом с повышением температуры до 16 °С. Через 15 минут холодную баню убрали и
- 10 перемешивали реакционную смесь в течение 1,5 часов при 16-18 °С. Реакционную смесь охладил до 13 °С и одной порцией добавили 50% водный раствор гидроксиламина

гидрохлорида (990 г, 15 моль, 3,0 экв.). Температура повысилась до 26 °С. После ослабления экзотермической реакции холодную баню убрали и продолжали перемешивание в течение 1 часа при 26-27 °С, затем медленно довели до кипения с обратным холодильником. Кипячение с обратным холодильником продолжали в течение 2

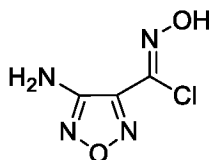
5 часов, затем реакционную смесь оставили постепенно остывать в течение ночи.

Реакционную смесь перемешивали в ледяной бане и частями добавляли 6 н. раствор хлористоводородной кислоты (800 мл) в течение 40 минут, чтобы довести pH до 7,0.

Перемешивание продолжали в ледяной бане при 5 °С. Осадок собрали фильтрацией, тщательно промыли водой и высушили в вакуумной печи (50 °С) с получением

10 требуемого продукта (644 г, 90%) в виде грязновато-белого твердого вещества. ¹³С ЯМР (75 МГц, CD₃OD): δ 156,0, 145,9, 141,3; C₃H₅N₅O₂ (Мол. масса 143,10), ЖХМС (EI) *m/e* 144,0 (M⁺ + H).

Стадия В: 4-Амино-N-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидохлорид (3)



15 4-Амино-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамид (422 г, 2,95 моль) добавили к смеси воды (5,9 л), уксусной кислоты (3 л) и 6 н. раствора хлористоводородной кислоты (1,475 л, 3,0 экв.) и перемешивали суспензию при 42-45 °С до получения прозрачного раствора. Добавили хлорид натрия (518 г, 3,0 экв.) и перемешивали полученный раствор на бане изо льда/воды/метанола. Добавляли раствор

20 нитрита натрия (199,5 г, 0,98 экв.) в воде (700 мл) в течение 3,5 часов, поддерживая температуру ниже 0 °С. После завершения добавления продолжали перемешивание в ледяной бане в течение 1,5 часов, а затем оставили реакционную смесь нагреваться до 15 °С. Осадок собрали фильтрацией, тщательно промыли водой, растворили в этилацетате (3,4 л), обработали безводным сульфатом натрия (500 г) и перемешивали при комнатной

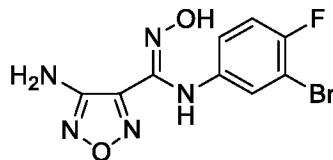
25 температуре в течение 1 часа. Суспензию отфильтровали через сульфат натрия (200 г) и концентрировали фильтрат на ротационном испарителе. Остаток растворили в метил-*трет*-бутиловом эфире (5,5 л), обработали активированным углем (40 г), перемешивали при комнатной температуре в течение 40 минут и отфильтровали через целит.

Растворитель удалили на ротационном испарителе, а полученный продукт высушили в

30 вакуумной печи (45 °С) с получением требуемого продукта (256 г, 53,4%) в виде грязновато-белого твердого вещества. ¹³С ЯМР (100 МГц,

CD₃OD) δ 155,8, 143,4, 129,7; C₃H₃ClN₄O₂ (Мол. масса 162,53), ЖХМС (EI) m/e 163/165 (M⁺ + H).

Стадия С: 4-Амино-*N*-(3-бром-4-фторфенил)-*N'*-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамид (4)

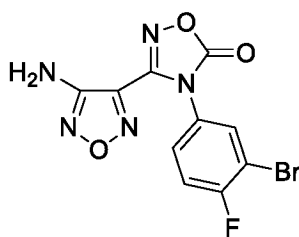


5

4-Амино-*N*-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамид (33,8 г, 208 ммоль) смешали с водой (30 мл). При 60 °С к суспензии добавляли 3-бром-4-фторанилин (Sigma-Aldrich) (43,6 г, 229 ммоль, 1,1 экв.) при перемешивании в течение 10 минут. В течение 15 минут добавляли раствор бикарбоната натрия (26,3 г, 313 ммоль, 1,5 экв.) в воде (300 мл) при перемешивании при 60 °С. После перемешивания в течение 20 минут ЖХМС показала завершение реакции. Затем реакционную смесь охладдили до комнатной температуры и экстрагировали этилацетатом (2 x 300 мл). Объединенный этилацетатный раствор высушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением требуемого продукта (65 г, 99%) в виде грязновато-белого твердого вещества, которое использовали в следующей реакции без дополнительной очистки. C₉H₇BrFN₅O₂ (Мол. масса 316,09), ЖХМС (EI) m/e 316/318 (M⁺ + H).

15

Стадия D: 3-(4-Амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-он (5)



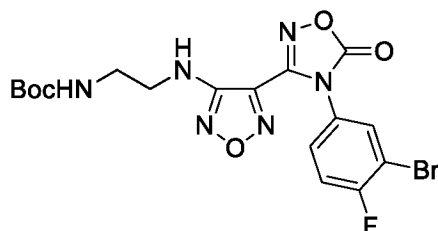
20

Смесь 4-амино-*N*-(3-бром-4-фторфенил)-*N'*-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамида (65,7 г, 208 ммоль), *N,N*-карбонилдимидазола (Sigma-Aldrich) (50,6 г, 312 ммоль, 1,5 экв.) и этилацетата (750 мл) нагревали до 60 °С и перемешивали в течение 20 минут. ЖХМС показала завершение реакции. Реакционную смесь охладдили до комнатной температуры, промыли 1 н. раствором хлористоводородной кислоты (2 x 750 мл), высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный продукт растерли со смесью дихлорметана, этилацетата и диэтилового эфира с получением требуемого продукта (60,2 г, 85%) в виде грязновато-белого твердого вещества. ¹H ЯМР

25

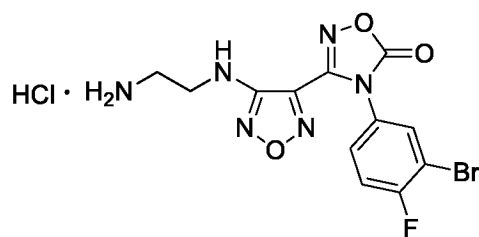
(300 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,05 (м, 1H), 7,69 (м, 1H), 7,57 (т, 1H, $J = 8,7$ Гц), 6,58 (с, 2H); $C_{10}H_5BrFN_5O_3$ (Мол. масса 342,08), ЖХМС (EI) m/e 342/344 ($M^+ + H$).

Стадия E: трет-Бутил-[2-(4-[2-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-2,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]карбамат (7)



К раствору трифторуксусной кислоты (20,0 мл) и тетрагидрофурана (10,0 мл) частями добавляли триацетоксиборгидрид натрия (10,59 г, 49,97 ммоль, 10,0 экв.), перемешивая в атмосфере азота. Смесь перемешивали в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем охладили до -5 °C. По каплям добавляли раствор 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-она (1,71 г, 5,0 ммоль) и трет-бутил-(2-оксоэтил)карбамата (Sigma-Aldrich) (1,99 г, 12,5 ммоль, 2,5 экв.) в ТГФ (15,0 мл) в течение 30 минут при перемешивании, поддерживая температуру ниже 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при температуре от -5 до 0 °C и по каплям добавляли дополнительные порции трет-бутил-(2-оксоэтил)карбамата (0,20 г, 1,2 ммоль, 0,24 экв.) в ТГФ (1,0 мл) с интервалами 20 минут, 40 минут и 4 часа. ВЭЖХ показала завершение реакции через 5,25 часа. Реакционную смесь вылили в ледяной раствор бикарбоната натрия (500 мл) и перемешивали полученный раствор при комнатной температуре в течение ночи. Осадок собрали фильтрацией и промыли насыщенным соевым раствором. Полученный остаток смешали с гептаном (40 мл) и диэтиловым эфиром (40 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 5 часов. Осадок собрали фильтрацией, промыли диэтиловым эфиром и высушили в вакуумной печи с получением требуемого продукта (1953 мг, 80,5%) в виде грязновато-белого твердого вещества. 1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,08 (м, 1H), 7,71 (м, 1H), 7,59 (т, 1H, $J = 8,7$ Гц), 6,94 (м, 1H), 6,52 (м, 1H), 3,32 (м, 2H), 3,15 (м, 2H), 1,36 (с, 9H); $C_{17}H_{18}BrFN_6O_5$ (Мол. масса 485,26); ЖХМС (EI) m/e 507/509 ($M^+ + Na$).

Стадия F: 3-{4-[2-(Аминоэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-она гидрохлорид (8)



Способ А (получение из трет-бутил-[2-({4-[2-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-2,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]карбамата; стадия Е):

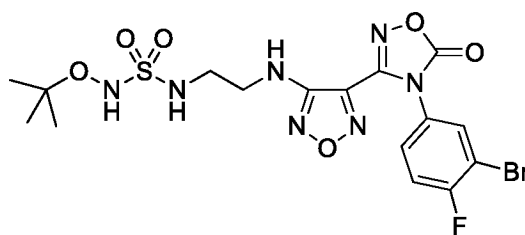
В колбу объемом 500 мл загрузили трет-бутил-[2-({4-[2-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-2,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]карбамат (20 г, 41,2 ммоль) и изопропанол (255 мл). Суспензию перемешивали при комнатной температуре. К суспензии добавляли газообразный хлористый водород (7,55 г, 207 ммоль, 5,0 экв.) с помощью подповерхностной стеклянной трубки в течение 16 минут. Затем к смеси добавили этилацетат (111 мл) и нагревали реакционную смесь до 43 °С, и перемешивали в течение 7,5 часов. Смесь охладил до 19 °С и добавили этилацетат (44 мл). Суспензию отфильтровали, а полученный остаток промыли этилацетатом (2 x 55 мл). Выделенное твердое вещество высушивали под пониженным давлением при 45 °С в течение 15 часов с получением требуемого продукта (16,61 г, выход 95,5%) в виде твердого вещества от грязновато-белого до белого цвета. ¹Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8,11 (шс, 3Н), 7,78 (м, 1Н), 7,73 (м, 1Н), 7,59 (т, 1Н, *J* = 8,7 Гц), 6,74 (т, 1Н, *J* = 6,1 Гц), 3,50 (м, 2Н), 3,02 (м, 2Н); C₁₂H₁₁BrClFN₆O₃, (Мол. масса 421,61; C₁₂H₁₀BrFN₆O₃ для свободного основания, мол. масса MW 385,15), ЖХМС (EI) *m/e* 385/387 (M⁺ + H).

Способ В (получение напрямую из 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4Н)-она; стадия D):

Триацетоксиборгидрид натрия (2,33 г, 11,0 ммоль, 11,0 экв.) смешали с трифторуксусной кислотой (12,0 мл, 155,8 ммоль, 155,8 экв.). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Раствор 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4Н)-она (**5**, 0,342 г, 1,0 ммоль) и трет-бутил-(2-оксоэтил)карбамата (Sigma-Aldrich) (1,04 г, 6,51 ммоль, 6, 5экв.) в дихлорметане (10,0 мл) и ацетонитриле (6,0 мл) перемешивали в атмосфере N₂. Раствор охладил до -5 °С и по каплям добавляли раствор триацетоксиборгидрида натрия и трифторуксусной кислоты в течение 5 минут. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. ВЭЖХ и ЖХ-МС (M⁺ - Вос + H: 385/387, бромидная структура) показали, что соотношение требуемого продукта к исходному материалу составило 4 к 1. Смесь концентрировали и разбавили дихлорметаном (10 мл).

Раствор охладили до 0 °С и медленно добавляли 4 н. раствор гидроксида натрия, поддерживая температуру при 0-5 °С, чтобы довести pH до 8-9. Водный слой экстрагировали дихлорметаном (3 x 10 мл). Объединенный дихлорметановый раствор промыли раствором бикарбоната натрия и насыщенным соевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Затем растворили неочищенный остаток в дихлорметане (6,0 мл) и охладили полученный раствор до 0 °С. По каплям добавляли 4 н. раствор хлористоводородной кислоты в диоксане (3,0 мл) при 0-5 °С. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. Осадок собрали фильтрацией, промыли диэтиловым эфиром и высушили в вакууме с получением требуемого продукта (289 мг, 54%) в виде грязновато-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*₆) 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); C₁₂H₁₁BrClFN₆O₃, (Мол. масса 421,61; C₁₂H₁₀BrFN₆O₃ для свободного основания, мол. масса MW 385,15), ЖХМС (EI) *m/e* 385/387 (M⁺ + H).

Стадия G: трет-Бутил-({[2-(4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил]амино)этил]амино}сульфонил)карбамат (9)



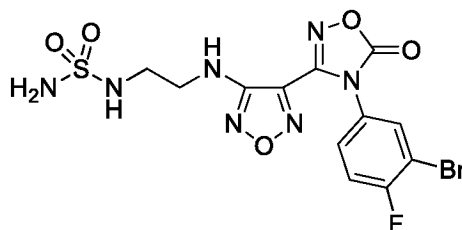
В стеклянный реактор объемом 20 л загрузили 3-{4-[(2-аминоэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-она гидрохлорид (1200 г, 2,846 моль) и дихлорметан (6,5 л) при комнатной температуре. К смеси в течение 7 минут добавляли триэтиламин (950 г, 9,39 моль, 3,3 экв.). Затем смесь охладили до -14,6 °С.

В круглодонную колбу объемом 5 л загрузили *трет*-бутанол (253 г, 3,41 моль, 1,2 экв.) и дихлорметан (2,6 л). Раствор охладили до 0,9 °С. К полученному раствору в течение 43 минут добавляли хлорсульфонилоцианат (463 г, 3,27 моль, 1,15 экв.), поддерживая температуру смеси ниже 10 °С. Полученный раствор *трет*-бутил(хлорсульфонил)карбамата выдерживали при 3 - 5 °С в течение 1 часа.

В реактор в течение 73 минут добавляли раствор *трет*-бутил(хлорсульфонил)карбамата, поддерживая температуру смеси ниже 0 °С. Затем смесь

нагрели до 10 °С за 1 час, а затем перемешивали при 10 - 14 °С в течение 1 часа. В реакционную смесь добавили воду (4,8 л) и перемешивали погашенную реакционную смесь при комнатной температуре в течение 14,5 часов. Смесь оставили оседать и разделили фазы. Дихлорметановый раствор находился в реакторе обособлено, и в него в течение 25 минут добавляли уксусную кислоту (513 г) для осаждения продукта. Полученную суспензию перемешивали при 20 °С в течение 2,5 часов. Продукт выделили фильтрацией и промыли дихлорметаном (1,8 л). Продукт высушивали при пониженном давлении (-30 дюймов рт.ст.) при 45 °С в течение 16 часов с получением требуемого продукта (1342 г, выход 83,5%) в виде белого твердого вещества. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 10,90 (с, 1 Н), 8,08 (дд., *J* = 6,2, 2,5 Гц, 1 Н), 7,72 (м, 1 Н), 7,59 (т, *J* = 8,6 Гц, 1 Н), 6,58 (т, *J* = 5,7 Гц, 1 Н), 3,38 (дд, *J* = 12,7, 6,2 Гц, 2 Н), 3,10 (дд, *J* = 12,1, 5,9 Гц, 2 Н), 1,41 (с, 9 Н). C₁₇H₁₉BrFN₇O₇S (Мол. масса 564,34), ЖХМС (EI) *m/e* 585,9/587,9 (M⁺ + Na).

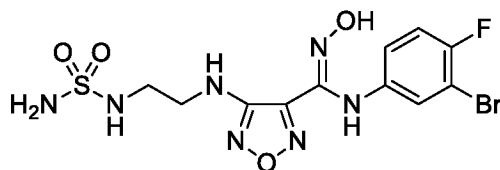
Стадия Н: *N*-[2-({4-[4-(3-Бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]сульфамид (10)



В колбу объемом 20 л, содержащую *трет*-бутил-([2-({4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]амино)сульфонил)карбамат (1200 г, 2,126 моль), добавили этанол (12 л) при 20 °С. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре и насытили газообразным хлористым водородом (472 г, 12,9 моль, 6,07 экв.). Смесь нагрели до 50 °С и поддерживали температуру в течение 3 часов до завершения реакции. Растворитель удалили вакуумной перегонкой при 33 - 39 °С и собрали 6 кг дистиллята. К смеси добавили этилацетат (6,8 л, 6,1 кг) и перегоняли, собрав 5,1 кг дистиллята. К смеси добавили этилацетат (7,2 л, 6,48 кг) и перегоняли, собрав 5,1 кг дистиллята. К смеси добавили этилацетат (2,4 л, 2,14 кг), чтобы отрегулировать соотношение растворителей. ¹Н ЯМР показал молярное соотношение этилацетата к этанолу 1,0: 0,1. Раствор нагрели до 65 °С. *n*-Гептан (4,1 кг) добавляли к раствору при 60 - 65 °С в течение 43 минут. Полученную суспензию перемешивали при 65 °С в течение 1 часа. Суспензию охладили до 20 °С за 2,5 часа и перемешивали при указанной температуре в течение 15 часов.

Продукт собрали фильтрацией и промыли *n*-гептаном (2,42 л). Продукт высушивали при пониженном давлении при 45 °С в течение 65 часов с получением требуемого продукта (906 г, выход 91,8%) в виде грязновато-белого твердого вещества. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8,08 (дд, *J* = 6,2) 7,72 (м, 1 Н), 7,59 (т, *J* = 8,7 Гц, 1 Н), 6,67 (т, *J* = 5,9 Гц, 1Н), 6,55 (с, 2Н) 6,52 (т, *J* = 6,0 Гц, 1 Н), 3,38 (дд, *J* = 12,7, 6,3 Гц, 2 Н), 3,11 (дд, *J* = 12,3, 6,3 Гц, 2Н); C₁₂H₁₁BrFN₇O₅S (Мол. масса 464,23), ЖХМС (EI) *m/e* 485,8/487,8 (M⁺ - C₅H₈O₂ + Na).

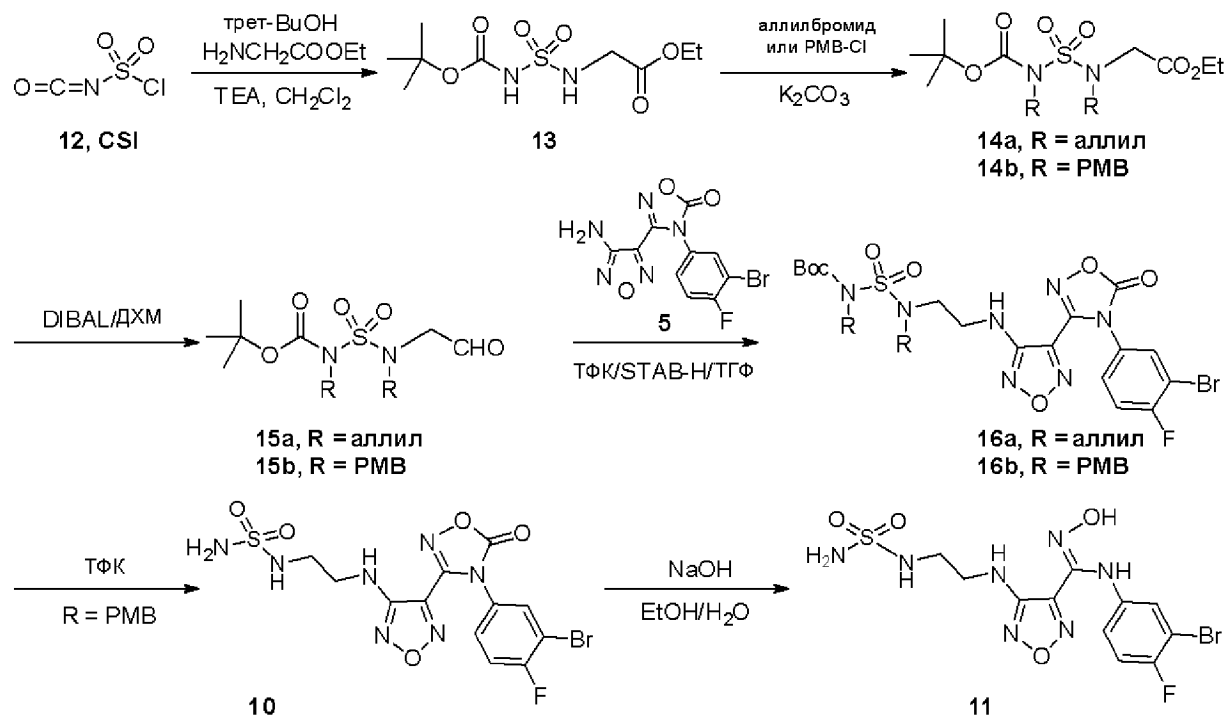
Стадия I: 4-(2-[(Аминосульфонил)амино]этил)амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамид (11)



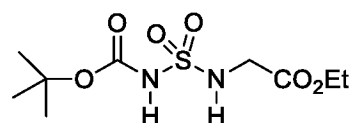
В стеклянный реактор объемом 20 л добавили *N*-[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]сульфамид (799,4 г, 1,72 моль) и ТГФ (3,2 л). Полученный раствор перемешивали при 20 °С в течение 7 минут, а затем добавили воду (1,6 л). Смесь охладили до 2 °С и добавили 30 масс. % раствор гидроксида натрия (475 мл, 666,4 г, 4,99 моль, 2,9 экв.) за 8 минут. Смесь нагрели до 20 °С и поддерживали температуру в течение 16 часов. Затем в смесь добавили метил-*трет*-бутиловый эфир (8,0 л) за 23 минуты. Добавили воду (2,7 л) и охладили смесь до температуры около 0 °С. Затем в смесь добавили 85масс. % фосфорную кислоту (370,7 г, 3,22 моль, 1,9 экв.) за 9 минут. Смесь нагрели до 20 °С и перемешивали в течение 1 часа. Смесь оставили оседать и разделили фазы. Органический слой оставили в реакторе и добавили воду (2,9 л) и 85 масс. % фосфорную кислоту (370,7 г, 3,22 моль) и перемешивали при 20 °С в течение 1 часа. Смесь оставили оседать и разделили фазы. Органический слой оставили в реакторе и добавили воду (3,2 л) и перемешивали при 20 °С в течение 1 часа. Смесь оставили оседать и разделили фазы. Органический раствор оставили в реакторе и дистиллировали при пониженном давлении при 20 °С для удаления 3,4 кг дистиллята. К смеси добавили этанол (4,8 л) и перегоняли смесь до объема 3,2 л. Процесс перегонки повторили еще один раз. К смеси добавили этанол (0,6 л) для доведения объема смеси до 4 л. Смесь перемешивали при 20 °С в течение 16 часов, а затем добавили воду (6,39 л). Полученную суспензию перемешивали при 20 °С в течение 5 часов. Продукт собрали фильтрацией и два раза промыли смесью этанола (529 мл) и воды (1059 мл). Продукт высушивали при пониженном давлении при 45 °С в течение 65 часов с получением требуемого продукта (719,6 г, 95,4%) в виде белого твердого вещества. ¹Н

ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 11,51 (с, 1 H), 8,90 (с, 1 H), 7,17 (т, *J* = 8,8 Гц, 1 H), 7,11 (дд, *J* = 6,1, 2,7 Гц, 1 H), 6,76 (м, 1 H), 6,71 (т, *J* = 6,0 Гц, 1 H), 6,59 (с, 2 H), 6,23 (т, *J* = 6,1 Гц, 1 H), 3,35 (дд, *J* = 10,9, 7,0 Гц, 2 H), 3,10 (дд, *J* = 12,1, 6,2 Гц, 2 H); C₁₁H₁₃BrFN₇O₄S (Мол. масса 438,23), ЖХМС (EI) *m/e* 437,9/439,9 (M⁺ + H).

5 **Пример 2. Альтернативный способ получения N-[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]сульфамида**



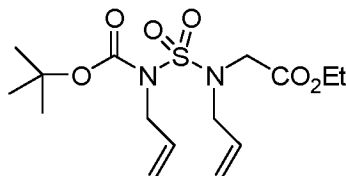
Стадия 1: Этил-{{(трет-бутоксикарбонил)амино}сульфонил}аминоацетат (13)



10 Раствор хлорсульфонилизотиоцианата (Sigma-Aldrich) (5,0 мл, 57,4 ммоль) в дихлорметане (100 мл) охладили до 0 °С. Трет-бутиловый спирт (4,26 г, 57,4 ммоль, 1,0 экв.) и дихлорметан (100 мл) добавили через капельную воронку. Полученный раствор перемешивали при 0 °С в течение 30 минут. Добавили гидрохлорид этилового эфира глицина (8,82 г, 63,2 ммоль, 1,1 экв.), затем по каплям добавили триэтиламин (20,0 мл, 144 ммоль, 2,5 экв.) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Реакционную смесь разбавили дихлорметаном (100 мл) и промыли 0,1 н. раствором хлористоводородной кислоты и насыщенным соевым раствором. Органический слой высушили над сульфатом натрия и концентрировали с получением 20 требуемого продукта (13,2 г, 81,4%) в виде неочищенного грязновато-белого твердого

вещества, которое использовали в следующей реакции без дополнительной очистки. ^1H ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) 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).

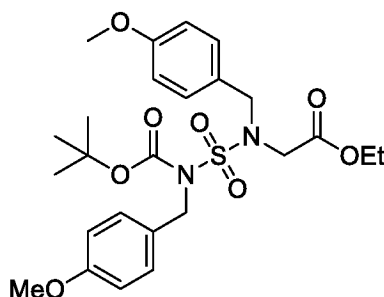
5 Стадия 2а. Этил(аллил{[аллил(трет-бутоксикарбонил)амино]сульфонил}амино)ацетат (14а)



Этил({[(трет-бутоксикарбонил)амино]сульфонил}амино)ацетат (1,0 г, 3,54 ммоль) смешали с карбонатом калия (2,45 г, 17,7 ммоль, 5,0 экв.) и ацетонитрилом (23,0 мл) в атмосфере N_2 при комнатной температуре. По каплям добавили аллилбромид (1,84 мл, 21,2 ммоль, 6,0 экв.). Реакционную смесь нагрели до 70°C и перемешивали при указанной температуре в течение 14 часов. ВЭЖХ и ЖХМС показали завершение реакции. Реакционную смесь отфильтровали и концентрировали фильтрат. Остаток растворили в дихлорметане и промыли раствором бикарбоната натрия и насыщенным соевым раствором. Органический слой высушили над сульфатом натрия и концентрировали с получением требуемого продукта (1,11 г, 87%) в виде неочищенного грязновато-белого твердого вещества, которое использовали в следующей реакции без дополнительной очистки. ^1H ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) 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).

20

Стадия 2б. Этил{[[(трет-бутоксикарбонил)(4-метоксибензил)амино]сульфонил}(4-метоксибензил)амино}ацетат (14б)

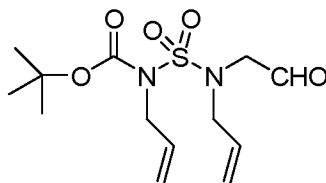


Этил({[(трет-бутоксикарбонил)амино]сульфонил}амино)ацетат (1,00 г, 4,0 ммоль) смешали с N,N -диметилформамидом (ДМФА, 6,0 мл) и перемешивали при комнатной температуре. К смеси добавили йодид натрия (0,01 г, 0,1 ммоль, 0,025 экв.), карбонат калия (2,40 г, 20 ммоль, 5,0 экв.) и *para*-метоксибензилхлорид (2,64 мл, 19,5 ммоль, 4,875

25

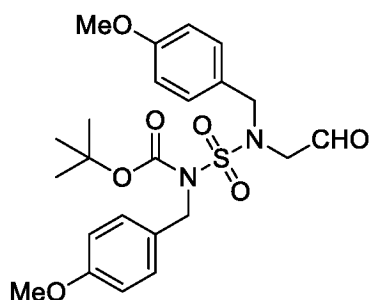
экв.). Реакционную смесь нагрели до 80 °С и перемешивали при 80 °С в течение 2 часов. ЖХМС показала завершение реакции. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры и отфильтровали через целит. Слой целита промыли дихлорметаном и концентрировали объединенные органические фильтраты. Концентрированный остаток
 5 растворили в дихлорметане (20 мл) и промыли раствором бикарбоната натрия (5 x 12 мл) и насыщенным соевым раствором. Органический слой высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очистили на силикагеле (градиентное элюирование, 0 - 40% этилацетата в гексане) с получением требуемого продукта (1,39 г, 80%) в виде грязновато-
 10 белого твердого вещества. ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*₆) 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, 2H), 3,72 (с, 3H), 3,71 (с, 3H), 1,39 (с, 9H), 1,14 (т, 3H, *J* = 7,1 Гц).

Стадия 3а. трет-Бутилаллил{[аллил(2-оксоэтил)амино]сульфонил}карбамат (15а)



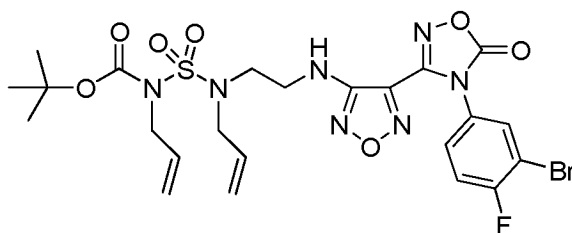
15 Раствор этил(аллил{[аллил(*tert*-бутоксикарбонил)амино]сульфонил}амино)ацетата (1,11 г, 3,05 ммоль) и дихлорметане (15 мл) при -78 °С в атмосфере N₂ обрабатывали 1,0 М раствором гидрида диизобутилалюминия в дихлорметане (3,66 мл, 3,66 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь перемешивали при -78 °С в течение 1 часа, а затем погасили метанолом (1,5 мл) и обработали насыщенным раствором тартрата натрия-калия (65 мл).
 20 Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем экстрагировали водный слой дихлорметаном (3 x 20 мл). Объединенный дихлорметановый раствор промыли насыщенным соевым раствором, высушили над сульфатом натрия, отфильтровали и концентрировали с получением требуемого продукта (0,62 г, 64%) в виде неочищенного густого бесцветного маслянистого вещества,
 25 которое использовали в следующей реакции без дополнительной очистки. ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 9,45 (с, 1H), 5,76 (м, 2H), 5,18 (м, 4H), 4,15 (м, 4H), 3,72 (м, 2H), 1,43 (с, 9H).

Стадия 3б. трет-Бутил(4-метоксибензил){[(4-метоксибензил)(2-оксоэтил)амино]сульфонил}карбамат (15б)



Раствор этил[{(трет-бутоксикарбонил)(4-метоксибензил)амино]сульфонил}(4-метоксибензил)амино]ацетата (5,30 г, 10 ммоль) в дихлорметане (20,0 мл) при -78 °С в атмосфере N₂ обрабатывали 1,0 М раствором гидрида диизобутилалюминия в
 5 дихлорметане (12,2 мл, 12,2 ммоль, 1,22 экв.). Реакционную смесь перемешивали при -78 °С в течение 3 часов. Затем реакцию погасили метанолом (3 мл) и обработали дихлорметаном (100 мл) и насыщенным раствором тартрата натрия-калия (150 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем экстрагировали водный слой дихлорметаном (3 x 20 мл). ж Объединенный дихлорметановый раствор
 10 промыли насыщенным солевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Затем остаток очистили на силикагеле (градиентное элюирование, 0-30% этилацетата в гексане) с получением требуемого продукта (3,45 г, 71%) в виде грязновато-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 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, 15 9H).

Стадия 4а. трет-Бутилаллил(N-аллил-N-(2-(4-(4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил)-1,2,5-оксадиазол-3-иламино)этил)сульфамойл)карбамат (16а)

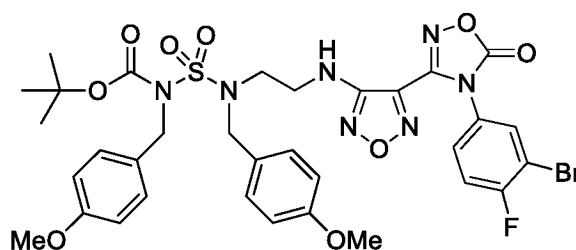


В колбу объемом 50 мл добавили триацетоксиборгидрид натрия (1,06 г, 5,0 ммоль, 1,0 экв.), трифторуксусную кислоту (ТФК, 2,0 мл, 26 ммоль) и тетрагидрофуран (ТГФ, 1,0 мл) при комнатной температуре. Полученную смесь охладили до -5 °С в атмосфере N₂ и перемешивали при 0-5 °С в течение 10 минут. К раствору по каплям добавляли 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-он (0,171 г, 5,0 ммоль; стадия D) и трет-бутилаллил{[аллил(2-оксоэтил)амино]сульфонил}карбамат (0,398 г, 2,5 ммоль, 0,5 экв.) в ТГФ (1,5 мл) при 0-5 °С в течение 5 минут. Полученную

реакционную смесь перемешивали в атмосфере N_2 при 0-5 °С. Через 20 минут, 40 минут и 2,5 часа по каплям добавляли раствор *трет*-бутилаллил{[аллил(2-оксоэтил)амино]сульфонил}карбамата (0,040 г, 0,125 ммоль, 0,25 экв.) в ТГФ (0,20 мл) при 0-5 °С. Через 2,5 часа добавили раствор триацетоксиборгидрида натрия (0,211 г, 1,0 ммоль, 0,2 экв.) в трифторуксусной кислоте (ТФК, 1,5 мл, 9,5 ммоль) при 0-5 °С.

Реакционную смесь нагрели до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Затем реакционную смесь вылили в ледяной насыщенный раствор карбоната натрия (50 мл) и экстрагировали дихлорметаном (3 x 20 мл). Объединенные дихлорметановые экстракты промыли насыщенным солевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Затем остаток очистили на силикагеле (градиентное элюирование, 0-75% этилацетата в гексане) с получением требуемого продукта (0,239 г, 74,2%) в виде грязновато-белого твердого вещества. 1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,07 (м, 1H), 7,71 (м, 1H), 7,58 (т, 1H, $J = 8,7$ 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); $C_{23}H_{27}BrFN_7O_7S$ (Мол. масса 644,47), ЖХМС (EI) m/e 544/546 ($M^+ - \text{Вос} + H$).

Стадия 4b. *трет*-Бутил-*N*-(2-(4-(4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил)-1,2,5-оксадиазол-3-иламино)этил)-*N*-(4-метоксибензил)сульфамонил(4-метоксибензил)карбамат (16b)



В колбу объемом 50 мл добавили триацетоксиборгидрид натрия (0,50 г, 2,37 ммоль, 4,74 экв.), трифторуксусную кислоту (ТФК, 1,0 мл, 13 ммоль) и тетрагидрофуран при комнатной температуре. Смесь охладили до 0-5 °С в атмосфере N_2 и перемешивали при 0-5 °С в течение 10 минут. К полученному раствору добавили *трет*-бутил-(4-метоксибензил){[(4-метоксибензил)(2-оксоэтил)амино]сульфонил}карбамат (0,40 г, 0,84 ммоль, 1,68 экв.) и 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-он (0,17 г, 0,50 ммоль; стадия D) в тетрагидрофуране (ТГФ, 1,50 мл) при 0-5 °С. Реакционную смесь перемешивали при 0-5 °С в течение 45 минут и затем добавили раствор *трет*-бутил-(4-метоксибензил){[(4-метоксибензил)(2-оксоэтил)амино]сульфонил}карбамата (0,12 г, 0,20 ммоль, 0,4 экв.) в ТГФ (0,50 мл) при 0-5 °С. После перемешивания при 0-5 °С в течение 1 часа реакционную смесь постепенно

нагревали до комнатной температуры при перемешивании. Через 2,5 часа и 4,5 часа добавляли трифторуксусную кислоту (0,25 мл). Через 5 часов добавили раствор *трет*-бутил(4-метоксибензил){[(4-метоксибензил)(2-оксоэтил)амино]сульфонил}карбамата (0,060 г, 0,1 ммоль, 0,2 экв.) в ТГФ (0,20 мл). Через 6,5 часов добавили раствор

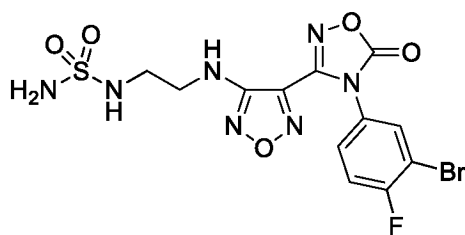
5 триацетоксиборгидрида натрия (0,060 г, 0,24 ммоль, 0,48 экв.) в трифторуксусной кислоте (0,25 мл). ВЭЖХ показала, что осталось приблизительно 4% исходного материала, 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4*H*)-она (со стадии D). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ВЭЖХ показала завершение реакции. Реакционную смесь вылили в ледяной насыщенный

10 раствор карбоната натрия (50 мл) и экстрагировали смесь дихлорметаном (3 x 20 мл). Объединенные дихлорметановые экстракты промыли насыщенным солевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Затем остаток очистили на силикагеле (градиентное элюирование, 0-30% этилацетата в гексане) с получением требуемого продукта (0,33 г, 82,5%) в виде грязновато-белого твердого вещества. ¹H ЯМР

15 (300 МГц, ДМСО-*d*₆) 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); C₃₃H₃₅BrFN₇O₉S (Мол. масса 804,64), ЖХМС (EI) *m/e* 826/828 (M⁺ - Вос + Na).

Стадия 5: *N*-[2-({4-[4-(3-Бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]сульфамид (10)

20



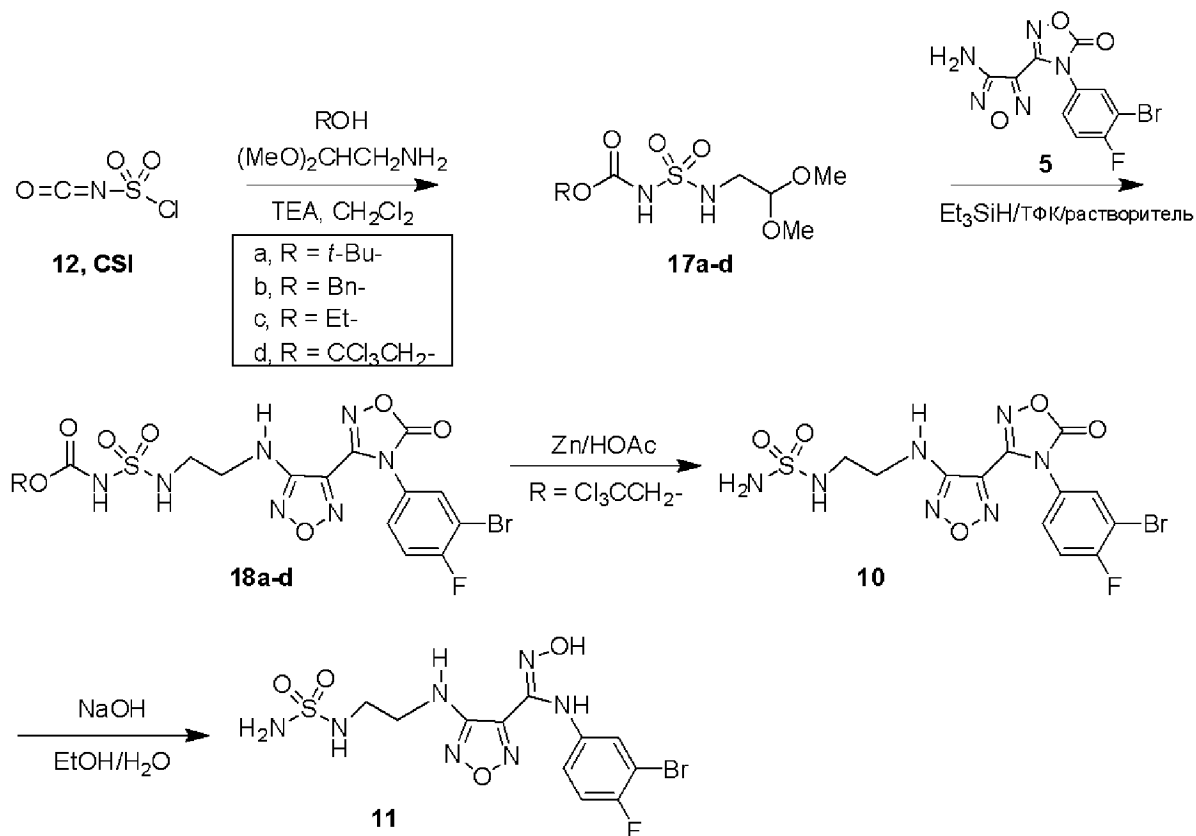
В колбу объемом 25 мл *трет*-бутил{[[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил](4-метоксибензил)амино]сульфонил}(4-метоксибензил)карбамат (40,2 мг, 0,050 ммоль) в

25 трифторуксусной кислоте (ТФК, 0,50 мл, 6,5 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали до 70 °С в атмосфере N₂ и перемешивали в течение 1 часа. ВЭЖХ показала завершение реакции. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры и выпарили ТФК. Остаточную ТФК удалили обработкой дихлорметаном (3 x 10 мл), затем выпариванием в вакууме. Затем растерли остаток с дихлорметаном и

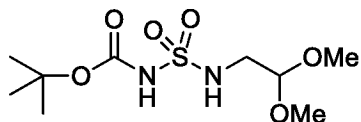
30 метанолом с получением требуемого продукта (20 мг, 87%) в виде неочищенного

грязновато-белого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) 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); $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{BrFN}_7\text{O}_5\text{S}$ (Мол. масса 464,23), ЖХМС (EI) m/e 487,8/489,8 ($\text{M}^+ + \text{Na}$).

5 **Пример 3. Альтернативный способ получения *N*-[2-(4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил)амино)этил]сульфида**



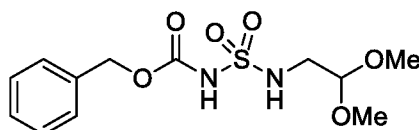
Стадия 1а. *трет*-Бутил-*N*-(2,2-диметоксиэтил)сульфамоилкарбамат (17а)



10 Раствор хлорсульфонилоцианата (11,32 г, 80 ммоль) в дихлорметане (120 мл) охладил
до 0 °С. Через капельную воронку добавили *трет*-бутиловый спирт (7,65 мл, 80,0 ммоль,
1,0 экв.). Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1,5 часов. К полученной смеси по
каплям, через капельную воронку добавляли раствор аминокетальдегида диметилацеталь
15 (8,76 мл, 80,0 ммоль, 1,0 экв.) и триэтиламина (ТЕА, 33,4 мл, 240 ммоль, 3,0 экв.) в
метиленхлориде (ДХМ, 120,0 мл). Реакционную смесь нагрели до комнатной температуры
и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь обработали 0,1 н. раствором

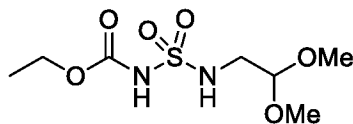
хлористоводородной кислоты и промыли органический слой насыщенным соевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали с получением требуемого продукта (15,6 г, 68,5%) в виде неочищенного грязновато-белого твердого вещества, которое использовали для следующей реакции без дополнительной очистки: ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 10,84 (с, 1H), 7,62 (т, 1H, $J = 6,0$ Гц), 4,38 (т, 1H, $J = 5,5$ Гц), 3,24 (с, 6H), 2,96 (дд, 2H, $J = 5,8$ Гц), 1,41 (с, 9H).

Стадия 1b. Бензил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамойлкарбамат (17b)



Раствор хлорсульфонилизотиоцианата (16,26 г, 114,9 ммоль) в дихлорметане (100 мл) охладил до 0 °С. Через капельную воронку добавили бензиловый спирт (12,44 г, 115,0 ммоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 0 °С в течение 0,5 часа. К полученной смеси по каплям, через капельную воронку добавляли смесь аминокетальдегида диметилацеталь (13,25 г, 126,0 ммоль, 1,1 экв.) и триэтиламина (ТЕА, 17,4 г, 172 ммоль, 1,5 экв.) при температуре ниже 15 °С. Реакционную смесь нагрели до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь обработали 0,5 н. раствором хлористоводородной кислоты (100 мл), а собранную органическую фазу промыли насыщенным соевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением требуемого продукта (23,5 г, 64,3%) в виде неочищенного грязновато-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 11,29 (с, 1H), 7,90 (т, 1H, $J = 6,0$ Гц), 7,37 (м, 5H), 5,12 (с, 2H), 4,35 (т, 1H, $J = 5,5$ Гц), 3,21 (с, 6H), 2,97 (дд, 2H, $J = 5,8$ Гц).

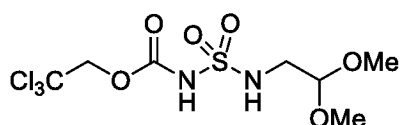
Стадия 1с. Этил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамойлкарбамат (17с)



Раствор хлорсульфонилизотиоцианата (11,32 г, 80 ммоль) в дихлорметане (120 мл) охладил до 0 °С. Через капельную воронку добавили этанол (4,67 мл, 80,0 ммоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1,5 часов. К смеси добавили раствор аминокетальдегида диметилацеталь (8,76 мл, 80,0 ммоль, 1,0 экв.), триэтиламина (ТЕА, 33,4 мл, 240 ммоль, 3,0 экв.) в дихлорметане (ДХМ, 120,0 мл), по каплям, через капельную воронку, при 0 °С. Реакционную смесь нагрели до комнатной температуры и

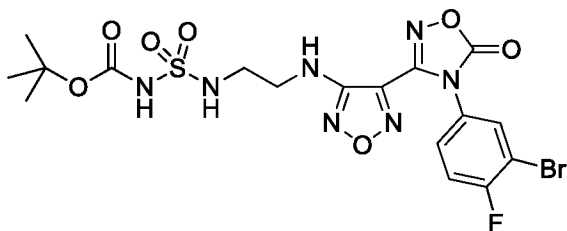
перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь обработали 0,1 н. раствором хлористоводородной кислоты, а собранную органическую фазу промыли насыщенным соевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением требуемого продукта (11,2 г, 55%) в виде неочищенного грязновато-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 11,13 (с, 1H), 7,81 (т, 1H, $J = 6,0$ Гц), 4,37 (т, 1H, $J = 5,5$ Гц), 4,09 (к, 2H, $J = 7,1$ Гц), 3,23 (с, 6H), 2,97 (дд, 2H, $J = 5,8$ Гц), 1,19 (т, 3H, $J = 7,1$ Гц).

Стадия 1d. 2,2,2-Трихлорэтил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамонилкарбамат (17d)



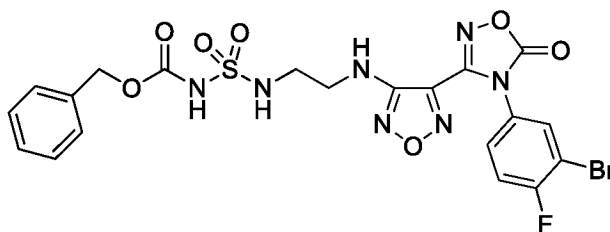
Раствор хлорсульфонилизотиоцианата (6,96 мл, 80 ммоль) в дихлорметане (120 мл) охладил до 0 °С. Через капельную воронку добавили 2,2,2-трихлорэтанол (7,67 мл, 80,0 ммоль, 1,0 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1,5 часов. Затем к смеси по каплям, через капельную воронку добавили раствор аминокетальдегида диметилацеталь (8,76 мл, 80,0 ммоль, 1,0 экв.) и триэтиламина (ТЕА, 33,4 мл, 240 ммоль, 3,0 экв.) в дихлорметане (ДХМ, 120,0 мл) при 0 °С. Реакционную смесь нагрели до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь обработали 0,1 н. раствором хлористоводородной кислоты, а собранную органическую фазу промыли насыщенным соевым раствором, высушили над Na_2SO_4 и концентрировали с получением требуемого продукта (28,01 г, 97%) в виде неочищенного грязновато-белого твердого вещества, которое использовали в следующей реакции без дополнительной очистки. ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 11,79 (с, 1H), 8,08 (т, 1H, $J = 5,9$ Гц), 4,90 (с, 2H), 4,37 (т, 1H, $J = 5,5$ Гц), 3,23 (с, 6H), 3,00 (дд, 2H, $J = 5,7$ Гц).

Стадия 2a. Трет-бутил-({[2-({[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]амино}сульфонил)карбамат (18a)



Смесь 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4*H*)-она (103 мг, 0,302 ммоль, 1,5 экв.; стадия D) и *трет*-бутил-*N*-(2,2-диметоксиэтил)сульфамойлкарбамата (57,2 мг, 0,201 ммоль) в дихлорметане (1,0 мл) перемешивали в атмосфере N₂ при комнатной температуре. К полученной смеси по каплям добавили трифторуксусную кислоту (0,50 мл, 6,5 ммоль) и триэтилсилан (80,2 мкл, 0,502 ммоль, 2,5 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. ВЭЖХ показала приблизительно 30% превращение. Реакционную смесь охладдили до 0 °С и погасили насыщенным раствором бикарбоната натрия до pH ~ 8. Смесь экстрагировали в этилацетате (3 x 10 мл). Объединенные органические экстракты промыли насыщенным солевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очистили препаративной ТСХ (50% этилацетата в гексане) с получением требуемого продукта (27,5 мг, 29,5%) в виде грязновато-белого твердого вещества. ¹H NMR (DMSO-d₆, 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, 2H), 3,10 (дд, *J* = 12,1, 5,9 Гц, 2H), 1,41 (с, 9H). C₁₇H₁₉BrFN₇O₇S (Мол. масса 564,34), ЖХМС (EI) *m/e* 485,8/487,8 (M⁺ - C₅H₈O₂ + Na).

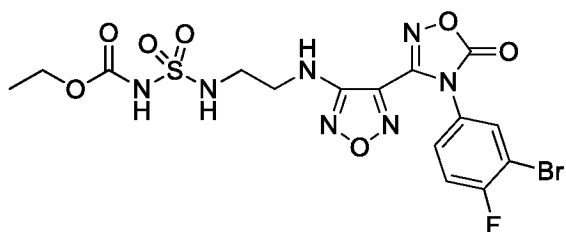
Стадия 2b. Бензил({[2-(4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил}амино}сульфонил)карбамат (18b)



Смесь 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4*H*)-она (68 мг, 0,20 ммоль; со стадии D) и бензил{[(2,2-диметоксиэтил)амино]сульфонил}карбамата (191 мг, 0,60 ммоль, 3,0 экв.) в 1,2-дихлорэтане (3,0 мл) охладдили до 0 °С. К смеси по каплям добавили трифторуксусную кислоту (1,0 мл, 13,0 ммоль) и триэтилсилан (105 мкл, 0,66 ммоль, 3,3 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 2 часов. ВЭЖХ показала завершение реакции. Реакционную смесь охладдили до 0 °С и погасили насыщенным раствором бикарбоната натрия до pH ~ 8, и погашенную реакционную смесь экстрагировали EtOAc (3 x 10 мл). Объединенные органические экстракты промыли насыщенным солевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Затем перемешивали остаток в смеси гептана и диэтилового эфира в течение ночи. Твердые вещества собрали

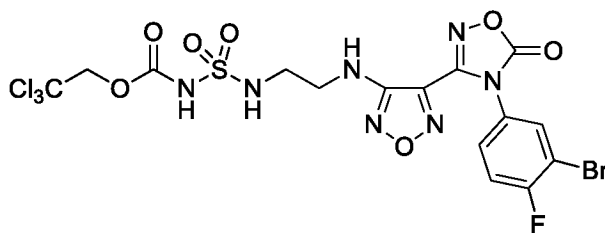
фильтрацией, промыли гептаном и высушили в вакууме с получением требуемого продукта (125 мг, 99%) в виде неочищенного грязновато-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 11,31 (с, 1H), 8,05 (м, 1H), 7,87 (м, 1H), 7,68 (м, 1H), 7,56 (м, 1H), 7,32 (м, 5H), 6,54 (м, 1H), 5,07 (с, 2H), 3,29 (м, 2H), 3,09 (м, 2H); $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{BrFN}_7\text{O}_7\text{S}$ (Мол. масса 598,36), ЖХМС m/e 598/600 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Стадия 2с. Этил({[2-(4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этиламино}сульфонил)карбамат (18с)



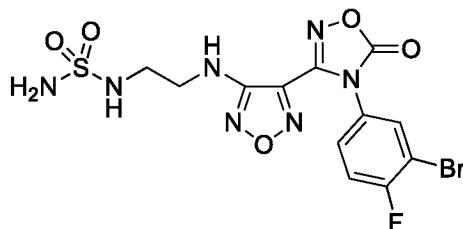
Смесь 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-она (68 мг, 0,20 ммоль; со стадии D) и этил{[(2,2-диметоксиэтил)амино]сульфонил}карбамата (154 мг, 0,600 ммоль, 3,0 экв.) в 1,2-дихлорэтано (2,50 мл, 31,7 ммоль) перемешивали при 0 °С. К смеси добавили трифторуксусную кислоту (1,00 мл, 13,0 ммоль) и триэтилсилан (105 мкл, 0,66 ммоль, 3,3 экв.) = по каплям. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 3 часов. ВЭЖХ показала 97,5% превращение в требуемый продукт. Реакционную смесь охладили до 0 °С и погасили насыщенным раствором бикарбоната натрия до pH ~ 8. Смесь экстрагировали в этилацетате (3 x 10 мл). Объединенные органические экстракты промыли насыщенным соевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток перемешивали в смеси гептана и диэтилового эфира в течение ночи. Твердые вещества собрали фильтрацией, промыли гептаном с получением требуемого продукта (95 мг, 88%) в виде неочищенного грязновато-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 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); $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{BrFN}_7\text{O}_7\text{S}$ (Мол. масса 536,29), ЖХМС (EI) m/e 536/538 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Стадия 2d. 2,2,2-Трихлорэтил({[2-(4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]амино}сульфонил)карбамат (18d)



Суспензию 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-она (**5**, 0,680 г, 1,99 ммоль) и 2,2,2-трихлорэтил{[(2,2-диметоксиэтил)амино]сульфонил}карбамата (**17d**, 2,22 г, 6,17 ммоль, 3,1 экв.) в дихлорометане (ДХМ, 6,0 мл) перемешивали при комнатной температуре. К смеси добавили триэтилсилан (1,27 мл, 7,95 ммоль, 4,0 экв.) и раствор трифторуксусной кислоты (ТФК, 3,0 мл, 39,0 ммоль) в дихлорометане (ДХМ, 2,0 мл), поддерживая температуру реакционной смеси ниже 30 °С. Реакционная смесь стала однородной через 5 минут встряхивания при комнатной температуре, и ее перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. ВЭЖХ показала завершение реакции. Реакционную смесь отфильтровали и суспендировали осадок в смеси дихлорометана и гептана (соотношение дихлорометана к гептану составило 1 к 9 по объему). Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Осадок собрали фильтрацией и промыли 10% раствором дихлорометана в гептане, и высушили в вакууме с получением требуемого продукта (1,15 г, 90,4%) в виде грязновато-белого твердого вещества, которое использовали в следующей реакции без дополнительной очистки. ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*₆) 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); C₁₅H₁₂BrCl₃FN₇O₇S (Мол. масса 639,62), ЖХМС (EI) *m/e* 638/640/642 (M⁺ + H).

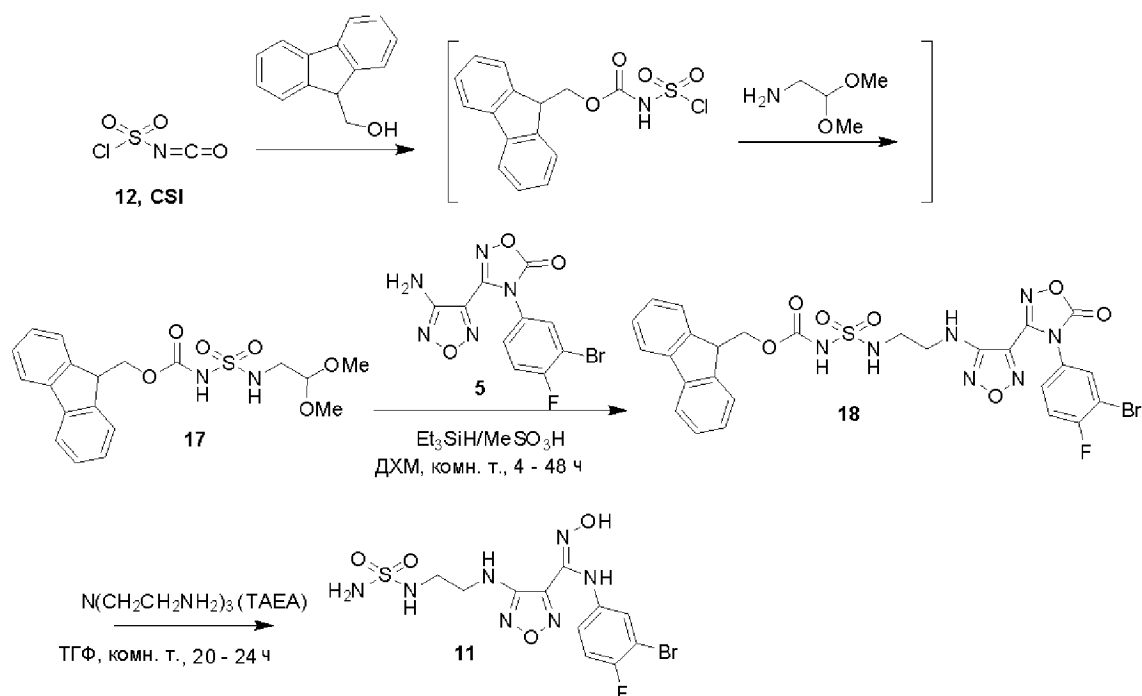
Стадия 3. *N*-[2-({4-[4-(3-Бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]сульфамид (**10**)



Раствор 2,2,2-трихлорэтил({[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]амино}сульфонил)карбамата (320 мг, 0,50 ммоль; со стадии Q, способ D) в тетрагидрофуране (ТГФ, 4,0 мл) перемешивали при комнатной температуре. Последовательно добавили уксусную кислоту (0,30 мл, 5,3 ммоль) и цинковые пластинки (160 мг, 2,5 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную

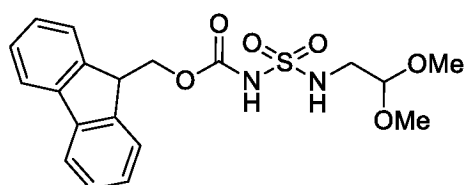
смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. ВЭЖХ показала завершение реакции. Реакционную смесь отфильтровали через целит и промыли целит ТГФ. Объединенный фильтрат концентрировали в вакууме и растворили полученный остаток в этилацетате (20 мл). Этилацетатный раствор промыли насыщенным раствором карбоната натрия и насыщенным солевым раствором, высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный материал кристаллизовали из этилацетата и диэтилового эфира с получением требуемого продукта (147 мг, 63%) в виде грязновато-белого твердого вещества.

10 **Пример 4. Альтернативный способ получения 4-({2-[(аминосulьфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимида**



Стадия 1. (9H-Флуорен-9-ил)метил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамоилкарбамат

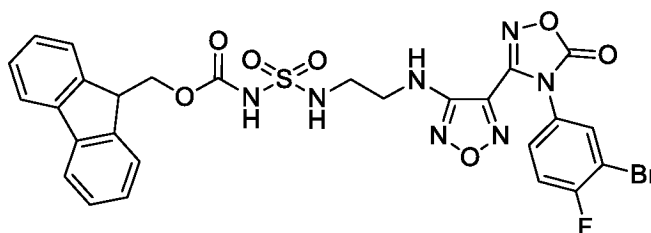
15



20 В высушенную в печи 4-горлую круглодонную колбу объемом 2 л загрузили 9-флуоренилметанол (50,0 г, 255 ммоль) и безводный ДХМ (382 мл) при комнатной температуре. Полученную суспензию охладил в ледяной бане до температуры около 0-5

°C. К суспензии через капельную воронку по каплям добавляли раствор хлорсульфонилизотиоцианата (CSI, 23,0 мл, 264 ммоль) в безводном ДХМ (127 мл) в течение 22 минут, поддерживая температуру реакционной смеси < 5 °C. Полученную смесь перемешивали при 0-5 °C в течение 1,75 часа с получением густой белой суспензии. К смеси добавляли раствор аминокетальдегида диметилацетата (27,9 мл, 255 ммоль) в безводном ДХМ (382 мл) и 4-метилморфолин (84,0 мл, 764 ммоль) при температуре около 0-5 °C в течение 71 минуты. Затем полученную реакционную смесь перемешивали в ледяной бане в течение 1,5 часов. Когда ВЭЖХ показала завершение реакции, реакционную смесь подкислили, добавляя по каплям 1,0 М раствор фосфорной кислоты (H₃PO₄, водн., 640 мл) в течение 22 минут до pH 1-2. Затем добавили воду (300 мл), EtOAc (2150 мл) и гептан (250 мл) и перемешивали полученную смесь в течение 10 минут. Разделили две фазы и последовательно промыли органическую фазу водой (500 мл), гептаном (300 мл) и водой (2 x 500 мл), и высушили над MgSO₄. Фильтрат концентрировали под вакуумом досуха. Полученные твердые вещества повторно растворили в EtOAc (600 мл) при 65 °C и отфильтровали теплый раствор в чистую круглодонную колбу объемом 3 л. Фильтрат охладили до комнатной температуры и перемешивали в течение 2,5 часов, затем добавили гептан (1200 мл) *via* капельную воронку за 80 минут. После перемешивания при комнатной температуре смесь охлаждали в ледяной бане в течение 1 часа. Полученные твердые вещества собрали фильтрацией, промыли 25% EtOAc в гептане (250 мл) и высушивали в течение ночи при температуре около 40-45 °C под вакуумом с получением 9H-флуорен-9-илметил-{[(2,2-диметоксиэтил)амино]сульфонил}карбамата (91,3 г, выход 88%) в виде белого порошка. ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 11,43 (с, 1H), 7,98 – 7,85 (м, 3H), 7,76 (д, *J* = 7,5 Гц, 2H), 7,43 (т, *J* = 7,2 Гц, 2H), 7,33 (тд, *J* = 7,4, 1,1 Гц, 2H), 4,44 – 4,33 (м, 3H), 4,33 – 4,22 (м, 1H), 3,23 (с, 6H), 2,99 (т, *J* = 5,8 Гц, 2H) м.д.

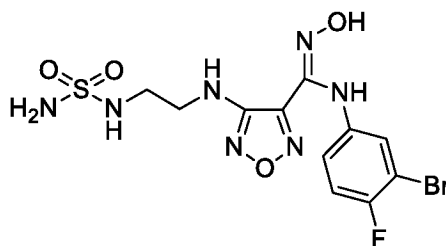
Стадия 2. 9H-Флуорен-9-илметил({[2-(4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]амино}сульфонил)карбамат



К перемешиваемой суспензии 3-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-она (10,00 г, 29,23 ммоль) в ДХМ (160 мл) добавляли

метансульфоновую кислоту (MeSO_3H , 8,46 г, 88,04 ммоль) и триэтилсилан (Et_3SiH , 8,37 г, 71,96 ммоль) при комнатной температуре за 10 минут с получением суспензии. Частями добавляли твердый 9*H*-флуорен-9-илметил{[(2,2-диметоксиэтил)амино]сульфонил}карбамат (12,25 г, 30,14 ммоль) (1 г/3-4 мин.; в течение 1 часа), поддерживая внутреннюю температуру ниже около 20 °С с помощью водяной бани. После добавления полученную смесь перемешивали при температуре около 13-22 °С в течение 3 дней. Добавили дополнительное количество триэтилсилана (Et_3SiH , 0,1755 г, 1,51 ммоль) и 9*H*-флуорен-9-илметил{[(2,2-диметоксиэтил)амино]сульфонил}карбамата (0,3082 г, 0,76 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре еще 23 часа. Добавили изопропиловый спирт (IPA, 15 мл) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавили гептан (100 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре еще 2 часа. Твердые вещества собрали фильтрацией, промыли IPA/гептаном (1/5; 2 x 30 мл) и гептаном (2 x 30 мл) и высушили под вакуумом с получением 9*H*-флуорен-9-илметил({[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]амино}сульфонил)карбамата в виде белого твердого вещества (18,30 г, выход 91,1%). ^1H ЯМР (500 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) 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); ^{13}C ЯМР (126 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 159,03 (д, $J = 248,7$ 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.; ^{19}F ЯМР (376 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ -103,99 – -107,39 (м) м.д.

Стадия 3. 4-({2-[(Аминосульфонил)амино]этил}амино)-*N*-(3-бром-4-фторфенил)-*N'*-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамид



В 4-горлую круглодонную колбу объемом 1 л загрузили 9*H*-флуорен-9-илметил({[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-

1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]амино}сульфонил)карбамат (25,0 г, 36,4 ммоль) и безводный ТГФ (250 мл) при комнатной температуре с получением однородного раствора. Затем раствор охладили до 0-5 °С в ледяной бане, затем по каплям добавляли *N,N*-бис(2-аминоэтил)этан-1,2-диамин (114 мл, 728 ммоль) в течение 35 минут *via* капельную воронку. Капельную воронку промыли безводным ТГФ (50 мл) и добавили промывочный раствор к реакционной смеси. Охлаждающую баню убрали и постепенно нагрели реакционную смесь до комнатной температуры, и перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 часов. Добавили EtOAc (400 мл) и перенесли полученную смесь в 4-горлую круглодонную колбу объемом 2 л, и охладили до температуры около 0-5 °С в ледяной бане. По каплям добавляли 2,0 М водный раствор HCl (400 мл, 800,0 ммоль) *via* капельную воронку, поддерживая внутреннюю температуру ниже 10 °С. Две фазы разделили и экстрагировали водную фазу EtOAc (200 мл). Органические фракции объединили и охладили до температуры около 6-7 °С. К холодной органической фракции по каплям добавляли 2,0 М водный раствор HCl (200,0 мл, 400,0 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 10 °С. Две фазы разделили и промыли органическую фазу водой (2 x 400 мл), высушили над MgSO₄ и концентрировали при пониженном давлении до светло-желтого сиропообразного вещества. Сиропообразное вещество растворили в EtOAc (60,0 мл) с получением однородного раствора. К раствору по каплям добавили раствор ДХМ (250,0 мл) и метил-*трет*-бутилового эфира (МТБЭ, 100,0 мл). Полученную суспензию перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем охлаждали в ледяной бане в течение 1 часа. Твердые вещества собрали фильтрацией, промыли 250 мл холодного раствора ДХМ (150 мл) и МТБЭ (100 мл), и высушили под вакуумом с получением 14,4 г неочищенного требуемого продукта в виде белого твердого вещества.

Неочищенный продукт растворили в EtOAc (140,0 мл) при 60 °С и отфильтровали теплый раствор. Фильтрат охладили до комнатной температуры, затем по каплям добавляли гептан (100,0 мл) в течение 55 мин. Затем перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение ночи. Твердые вещества собрали фильтрацией, промыли 2:1 смесью гептана и EtOAc (75 мл) и высушили под вакуумом при 40-50 °С до постоянной массы с получением 4-({2-[(аминосulфонил)амино]этил}амино)-*N*-(3-бром-4-фторфенил)-*N'*-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимида (12,9 г, выход 81%) в виде белого твердого вещества.

Пример А: Ферментный анализ человеческой индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO)

Человеческую индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO) с N-концевой меткой His экспрессировали в *E.coli* и очистили до однородности. IDO катализирует окислительное

расщепление пиррольного кольца индольной центральной структуры триптофана с образованием *N*⁷-формилкинуруенина. Анализы проводили при комнатной температуре, как описано в литературных источниках, используя 95 нМ IDO и 2 мМ D-Тр в присутствии 20 мМ аскорбата, 5 мМ метиленового синего и 0,2 мг/мл каталазы в 50 мМ фосфатно-калиевом буфере (рН 6,5). Непрерывно записывали исходную скорость реакции по повышению поглощения при 321 нм в результате образования *N*⁷-формилкинуруенина (см.: Sono, M., *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255, 1339-1345). Соединение Формулы I испытывали в анализе Примера А и обнаружили, что оно имеет IC₅₀ < 200 нМ.

10 **Пример В: Определение ингибирующей активности индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO)/кинуруенина в анализе на клетках HeLa**

Клетки HeLa (№CCL-2) приобрели в Американской коллекции тканевых культур (ATCC, Манассас, штат Вирджиния) и обычным образом выдерживали в минимальной необходимой среде (Игла) с 2 мМ L-глутамина и сбалансированным солевым раствором Эрла (Earle BSS), содержащим 1,5 г/л бикарбоната натрия, 0,1 мМ заменимых аминокислот, 1 мМ пирувата натрия и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (все производства Invitrogen). Клетки выдерживали при 37 °С в увлажненном инкубаторе с 5% СО₂. Анализ проводили следующим образом: Клетки HeLa высевали в 96-луночный культуральный планшет при плотности 5 × 10³ на лунку и выращивали в течение ночи. На следующий день в клетки добавляли IFN-γ (конечная концентрация 50 нг/мл) и серийные разбавления соединений (в общем объеме 200 мкл культуральной среды). Через 48 часов инкубирования в каждую лунку нового 96-луночного планшета перенесли 140 мкл надосадочной жидкости. 10 мкл 6,1 н. трихлоруксусной кислоты (№T0699, Sigma) смешали с каждой лункой и инкубировали при 50 °С в течение 30 минут для гидролиза *N*-формилкинуруенина, образованного действием индоламин-2,3-диоксигеназы на кинуруенин. Затем реакционную смесь центрифугировали в течение 10 минут при 2500 об./мин. для удаления осадка. 100 мкл надосадочной жидкости на лунку перенесли в другой 96-луночный планшет и смешали с 100 мкл 2% (масс./об.) *n*-диметиламинобензальдегида (№15647-7, Sigma-Aldrich) в уксусной кислоте. Желтый цвет, обусловленный кинуруенином, измеряли при 480 нм, используя микропланшет-ридер SPECTRAmax 250 (Molecular Devices). В качестве стандарта использовали L-кинуруенин (№K8625, Sigma). Стандартные образцы (240, 120, 60, 30, 15, 7,5, 3,75, 1,87 мМ) получали в 100 мкл культуральной среды и смешивали с равным объемом 2% (масс./об.) *n*-диметиламинобензальдегида. Определяли процентное ингибирование при отдельных

концентрациях и получали средние значения для двух экземпляров. Данные анализировали, используя нелинейную регрессию, с получением значений IC₅₀ (Prism Graphpad). См.: Takikawa O, *et al.*, 1988, *J. Biol. Chem.*, 263(4): 2041-8.

5 **Пример С: Определение влияния ингибиторов IDO на пролиферацию Т-клеток, подавленную IDO-экспрессирующими дендритными клетками**

Моноциты собирали из мононуклеарных клеток периферической крови человека с помощью лейкофореа. Затем моноциты высевали при плотности 1×10^6 клеток на лунку в 96-луночный планшет, используя среду RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 2 mM L-глутамина (все производства Invitrogen). Адгезивные клетки остались на планшете после выращивания в течение ночи при 37 °C. Затем адгезивные моноциты стимулировали в течение 5-7 дней с помощью 100 нг/мл GM-CSF (№ 300-03, PeproTech) и 250 нг/мл IL-4 (№200-04, PeproTech), затем активировали с помощью 5 мкг/мл LPS из *Salmonella typhimurium* (№437650, Sigma) и 50 нг/мл IFN-γ (№ 285-IF, R&D Systems) в течение еще 2 дней для созревания дендритных клеток.

После активации дендритных клеток среду заменили на дополненную RPMI 1640 с добавлением 100-200 Е/мл IL-2 (№CYT-209, ProSpec-Tany TechnoGene) и 100 нг/мл анти-CD3 антитела (№555336, PharMingen), Т-клеток ($2-3 \times 10^5$ клеток на лунку) и серийных разбавлений соединений IDO. После инкубации в течение еще 2 дней, измеряли пролиферацию Т-клеток с помощью анализа внедрения BrdU, используя набор для колориметрического иммуноферментного анализа (ELISA) клеточной пролиферации по инструкциям производителя (№1647229, Roche Molecular Biochemicals). Клетки непрерывно выращивали в течение 16-18 часов в присутствии 10 μM раствора метки BrdU. Затем удалили среду с меткой и добавили к клеткам 200 μл FixDenat на лунку, и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Раствор FixDenat удалили и добавили 100 μл на лунку рабочего раствора анти-BrdU-POD антитела. Реакцию проводили в течение 90 минут при комнатной температуре. Затем удалили конъюгат антитела и три раза промыли клетки 200 μл на лунку промывочного раствора. Наконец, добавили 100 μл на лунку раствора субстрата и получили результаты с помощью микропланшет-ридера (Spectra Max PLUS, Molecular Devices) при проявлении цвета. В различных точках времени получали несколько значений, чтобы данные попадали в линейный диапазон. Данные были получены обычным образом при многократном проведении экспериментов, включены также соответствующие контрольные значения. См.: Terness P, *et al.* 2002, *J. Exp. Med.*, 196(4): 447-57; и Hwu, P, *et al.* 2000, *J. Immunol.*, 164(7): 3596-9.

Пример D: *In vivo* испытание противоопухолевой активности ингибиторов IDO

In vivo противоопухолевая эффективность может быть испытана с помощью модифицированных протоколов аллотрансплантата/ксенотрансплантата опухоли.

- 5 Например, в литературных источниках описано, что ингибирование IDO может иметь синергетическое действие с цитотоксической химиотерапией у иммунокомпетентных мышей (Muller, A.J., *et al.* 2005, *Nat. Med.* 11:312-319). Зависимость синергии от Т-клеток была показана посредством сравнения синергетического эффекта исследуемого ингибитора IDO в мышинных моделях ксенотрансплантата опухоли (например, B16 и
- 10 родственные варианты, CT-26, LLC), развивавшейся у иммунокомпетентных сингенных мышей, с эффектом, наблюдаемым у сингенных мышей, обработанных нейтрализующими анти-CD4 антителами, или с ростом таких же опухолей у мышей с подавленным иммунитетом (например, nu/nu).

- Концепция дифференциального противоопухолевого действия у
- 15 иммунокомпетентных мышей по сравнению с мышами с подавленным иммунитетом также может обеспечивать возможность испытания исследуемых ингибиторов IDO как агентов монотерапии. Например, опухоли LLC хорошо развиваются в их сингенном штамме-хозяине, C57Bl/6. Однако если указанных мышей обрабатывают ингибитором IDO 1-MT (в сравнении с плацебо), то образование опухолей заметно замедляется,
- 20 позволяя сделать вывод, что ингибирование IDO имеет эффект подавления роста (Friberg, M., *et al.* 2002, *Int. J. Cancer* 101:151-155). Следуя такой логике, может быть исследована эффективность ингибирования IDO в модели ксенотрансплантата опухоли LLC, развившейся у иммунокомпетентных мышей C57Bl/6, которая может быть сравнена с эффектом ингибиторов IDP на рост опухоли LLC у «голых» мышей или мышей SCID (или
- 25 мышей C57Bl/6, обработанных антителами, которые нейтрализуют активность Т-клеток). Поскольку эффект выявления иммуноподавляющей активности IDO, опосредованной опухолью, вероятно будет отличаться в зависимости от иммуногенного потенциала различных опухолевых моделей, то клетки опухоли могут быть подвергнуты генетическим модификациям для повышения их иммуногенного потенциала. Например,
- 30 экспрессия GM-CSF в клетках B16.F10 повышает их иммуногенный потенциал (Dranoff, G., *et al.* 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:3539-3543). Следовательно, в некоторых опухолевых моделях (например, B16.F10) могут быть созданы [поли]клоны, которые экспрессируют иммуностимулирующие белки, такие как GM-CSF, и может быть испытан эффект подавления роста ингибиторов IDO против опухолей, возникших из указанных

опухолевых клетках у иммунокомпетентных мышей и у мышей с подавленным иммунитетом.

Третье направление для оценки эффективности ингибиторов IDO *in vivo* основано на использовании «предварительной иммунизации» мышинных моделей

- 5 аллотрансплантата/ксенотрансплантата опухоли. В указанных моделях иммунокомпетентных мышей сенсibilизируют к определенному антигену или антигенам опухоли для имитации терапевтической противоопухолевой вакцинации. Это дает возможность возникновения противоопухолевого отклика у мышей, опосредованного иммунной системой, если мыши были достаточно сенсibilизированы мышинными
- 10 опухолевыми клеточными линиями (имеющими такие же антигены опухоли, как были использованы для иммунизации) в экспериментах ксенотрансплантата. Было показано, что экспрессия IDO притупляет противоопухолевый отклик и обеспечивает возможность более быстрого роста ксенотрансплантатов. Важно, что рост опухолей в данной модели ингибируют ингибитором IDO 1-MT (Uyttenhove, C., *et al.* 2003, *Nat. Med.* 9:1269-1274).
- 15 Указанная модель является особенно привлекательной, поскольку активность IDO допускает рост опухоли P815 и, следовательно, специфическое ингибирование IDO будет ингибировать рост.

Наконец, для оценки влияния ингибиторов *in vivo* может быть использована терапевтическая иммунизация. Например, с помощью клеток B16-BL6 было

- 20 продемонстрировано, что можно сенсibilизировать мышей Blk/6 внутривенной инъекцией опухолевых клеток с последующей обработкой хорошо известным иммуногенным пептидом (например, TRP-2), экспрессируемым клетками опухоли (Ji, *et al.*, 2005, *J. Immunol.* 175: 1456-63). Важно, что модификаторы иммунной системы, такие как анти-CTL-4 антитела, могут улучшать ответ на такую терапевтическую иммунизацию.
- 25 Влияние ингибиторов IDO может быть проверено таким же образом - иммунизацией опухолевым пептидом с ингибитором IDO и без него. Эффективность представляет собой оценку выживания животных (время до гибели) или измерение метастазов опухоли в легкие и/или другие органы в определенные точки времени.

В любых/всех описанных выше моделях можно также прямо и/или косвенно

- 30 измерять количество и/или активность реактивных иммунных к опухоли клеток. Способы измерения количества и/или активности реактивных иммунных к опухоли клеток хорошо изучены и могут быть осуществлены с помощью технологий, знакомых специалистам в данной области техники (Current Protocols in Immunology, том. 4, Coligan, J. E., *et al.*; *Immunotherapy of Cancer*, Human Press, 2006, Disis, M.L. и ссылки, приведенные в нем).
- 35 Концептуально, снижение иммуноподавляющего эффекта IDO может приводить к

повышению количества или реактивности опухолеспецифичных иммунных клеток. Кроме того, ингибирование IDO может дополнительно увеличивать количество или реактивность реактивных иммунных к опухоли клеток при объединении с другими терапевтическими агентами, например, химиотерапевтическими агентами и/или иммуномодуляторами (например, анти-CTLA4 антитело).

Все эксперименты с аллотрансплантатами/ксенотрансплантатами могут быть проведены с помощью стандартных технологий работы с опухолями (обзор Corbett, *et al.*, в *Cancer Drug Discovery and Development: Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*, 2^{ое} изд. Teicher, B.A. и Andrews, P.A., Humana Press Inc.: Тотова, штат Нью-Джерси, 2004). Клонирование и внедрение генов (например, IDO, GM-CSF) в опухолевые клеточные линии может быть проведено с помощью технологий, известных специалистам в данной области техники (обзор Sambrook, J. и Russel, D., *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (3^е издание), Cold Spring Harbor Laboratory Press: Колд Спринг Харбор, штат Нью-Йорк, 2001).

Пример Е: *In vivo* испытание ингибиторов IDO в модели энцефалита с вирусом иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1)

1. Выделение клеток и вирусная инфекция

Моноциты и PBL могут быть получены противоточным элютиационным центрифугированием лейкофрезных пакетов, полученных от серонегативных доноров с ВИЧ-1, 2 и гепатитом В. Моноциты выращивали в суспензионной культуре, используя тефлоновые колбы в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM, Sigma-Aldrich), с добавлением 10% инактивированной нагреванием смешанной сыворотки человека, 1% глутамина, 50 мкг/мл гентамицина, 10 мкг/мл ципрофлоксацина (Sigma) и 1000 Е/мл рекомбинантного человеческого макрофагального колониестимулирующего фактора высокой очистки. Через семь дней в культуре MDM инфицировали ВИЧ-1_{ADA} с множественностью заражения 0,01.

*2. Мыши *Hu-PBL-NOD/SCID HIVE**

Самцы мышей NOD/C.B-17 SCID возрастом четыре недели могут быть закуплены (Jackson Laboratory). Животных выдерживали в стерильных клетках-микроизоляторах в безмикробных условиях. Всем животным вводили внутрибрюшинную инъекцию крысиных анти-CD122 (0,5 мг/мышь) за три дня до трансплантации PBL и два раза кроличьих асиало-GM1 антител (0,2 мг/мышь) (Wako) за один день до и через три дня после инъекции PBL (20×10^6 клеток/мышь). ВИЧ-1_{ADA}-инфицированные MDM (3×10^5

клеток в 10 μ л) вводили интракраниальной инъекцией (i.c.) через восемь дней после воспроизведения PBL с получением мышей hu-PBL-NOD/SCID HIVE. Сразу после i.c. инъекции ВИЧ-1 инфицированных MDM мышам hu-PBL-NOD/SCID HIVE вживляли подкожный (s.c) имплантат с контролем (носителем) или гранулами соединения

5 (медленное высвобождение в течение 14 или 28 дней, Innovative Research).

Первоначальные эксперименты предназначены для подтверждения индукции вирус-специфических CTL у животных hu PBL-NOD/SCID HIVE, обработанных IDO соединениями. Это подтверждали тетрамерным окрашиванием и нейрпатологическими анализами элиминирования MDM из ткани головного мозга. Кроме того, эксперимент

10 предназначен для анализа воспроизведения человеческих лимфоцитов, гуморального иммунного ответа и нейрпатологических изменений. В указанных экспериментах животных обескровливали на 7 день и усыпляли на 14 и 21 день после i.c. инъекции человеческого MDM. Кровь, собранную в пробирки, содержащие ЭДТК, использовали для проточной цитометрии, а плазму использовали для обнаружения ВИЧ-1 p24 с помощью

15 иммуноферментного твердофазного анализа (Beckman Coulter™). Специфичные к ВИЧ-1 антитела обнаруживали с помощью испытаний вестерн-блоттинга по инструкциям производителя (набор для вестерн-блоттинга ВИЧ-1 Cambridge Biotech, Calypte Biomedical). У контрольных животных и у животных, обработанных соединением, обнаруживали одинаковое количество специфичных к вирусу антител. В целом, может

20 быть проведено три независимых эксперимента с использованием трех разных доноров лейкоцитов человека.

3. FACSscan периферической крови и селезенки у мышей hu PBL-NOD/SCID HIVE

Двухцветный анализ FACS может быть проведен на периферической крови через

25 1-3 недели и на спленоцитах через 2 и 3 недели после i.c. инъекции человеческого MDM. Клетки выращивали с флуорофор-конъюгированным моноклональным Abs (mAbs) к человеческому CD4, CD8, CD56, CD3, IFN- γ (eBioscience) в течение 30 мин. при 4 °C. Для оценки клеточного иммунного ответа проводили IFN- γ внеклеточное окрашивание в комбинации с античеловечьим CD8 и FITC-конъюгированным антимышиным CD45 для

30 исключения мышиных клеток. Для определения Ag-специфичного CTL, проводили окрашивание аллофикоцианин-конъюгированного тетрамера для ВИЧ-1^{gag} (p17 (aa77-85) SLYNTVATL, SL-9) и ВИЧ-1^{pol} [(aa476-485) ILKEPVHGV, IL-9] на спленоцитах, стимулированных фитогемаггулинином/интерлейкином-2 (PHA/IL-2)-. Клетки окрашивали по рекомендациям NIH/Национального института аллергии и инфекционных

35 заболеваний, National Tetramer Core Facilities. Данные анализировали с помощью FACS

Calibur™, используя программное обеспечение CellQuest (иммуноцитометрическая система Becton Dickinson).

4. Гистопатология и анализ изображений

5 Ткань головного мозга собирали на 14 и 21 день после i.c. инъекции MDM, фиксировали в 4% параформальдегиде с фосфатным буфером и заделывали в парафин или замораживали при -80 °C для дальнейшего использования. Из залитых блоков нарезали коронарные срезы для определения места инъекции. Для каждой мыши вырезали 30-100 (толщиной 5-µм) серийных сегментов из участка инъекции человеческого MDM и

10 анализировали 3-7 слайдов (отстоящих друг от друга на 10 сегментов). Срезы головного мозга депарафинизировали ксилолом и гидратировали в спиртовом градиенте. Иммуногистохимическое окрашивание проводили в соответствии с базовым косвенным протоколом, используя демаскировку антигена путем нагревания до 95 °C в 0,01 моль/л цитратном буфере в течение 30 минут для демаскировки антигена. Для определения

15 человеческих клеток в головном мозге мышей использовали mAb к виментину (1:50, клон 3B4, Dako Corporation), который идентифицирует все человеческие лейкоциты. Человеческий MDM и лимфоциты CD8⁺ обнаруживали с помощью антител CD68 (разбавление 1:50, клон KP 1) и CD8 (разбавление 1:50, клон 144B), соответственно. Инфицированные вирусом клетки метили с помощью mAb к ВИЧ-1 p24 (1:10, клон Kal-1,

20 все производства Dako). Реактивные мышинные микроглиальные клетки обнаруживали с антителом Iba-1 (1:500, Wako). Экспрессию человеческой IDO (huIDO) визуализировали с помощью антител, приобретенных в Отделе клеточной фармакологии Центрального исследовательского института, Высшая медицинская школа, Университет Хоккайдо, Саппоро, Япония. Первичные антитела обнаруживали с подходящими

25 биотинилированными вторичными антителами и визуализировали с комплексами авидина-биотина (набор Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories) и пероксидазой хрена (HRP), связанной с полимером декстрана (EnVision, Dako Corporation). Иммуноокрашенные срезы докрашивали гематоксилином Майера. В качестве

30 контрольных образцов использовали срезы, из которых удалено первичное антитело или в которые внедрен нерелевантный изотип IgG. Два независимых наблюдателя слепым образом подсчитывали количество лимфоцитов CD8⁺, CD68⁺ MDM и ВИЧ-1 p24⁺ клеток в каждом срезе от каждой мыши. Исследование в световом микроскопе проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse 800 (Nikon Instruments Inc). Полуколичественный анализ Iba1 (процент площади, занятой иммуноокрашиванием) проводили с помощью

компьютерного анализа изображения (Image-Pro®Plus, Media Cybernetics), как описано ранее.

5. Статистический анализ

- 5 Данные могут быть проанализированы с помощью Prism (Graph Pad) *t*-критерием Стьюдента для проведения сравнений и дисперсионного анализа. *P*-значения < 0,05 считали значимыми.

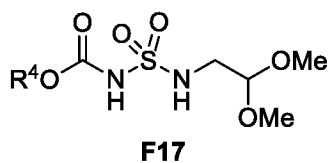
6. Ссылка

- 10 Poluektova LY, Munn DH, Persidsky Y и 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.

- 15 Для специалистов в данной области из предыдущего описания будут очевидны различные модификации изобретения, в дополнение к описанным в данном документе. Предполагается, что такие модификации также входят в рамки прилагаемой формулы изобретения. Каждое упоминание, включая все патенты, патентные заявки и публикации, цитируемые в настоящей заявке, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

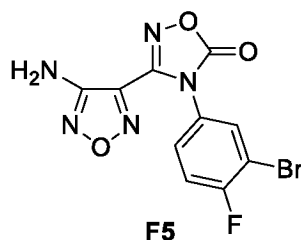
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ, включающий взаимодействие соединения Формулы F17:

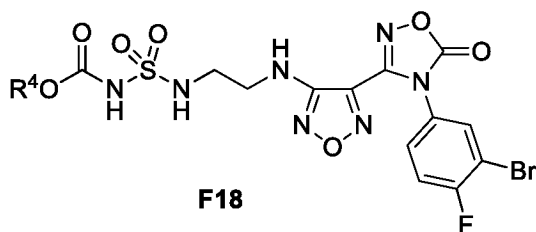


где R⁴ представляет собой C₁₋₆ алкил, C₁₋₆ галогеналкил, бензил или 9H-флуорен-9-илметил,

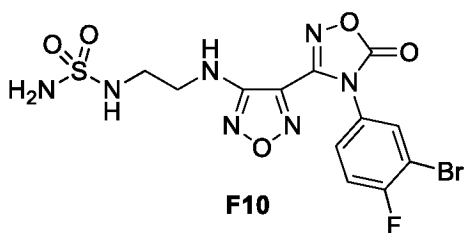
с соединением Формулы F5:



с получением соединения Формулы F18:

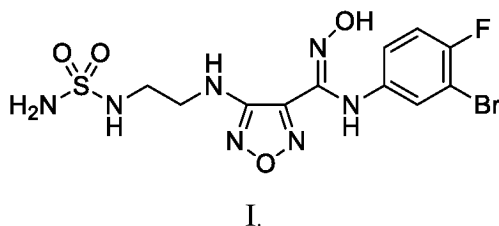


2. Способ по п.1, где R⁴ представляет собой *трет*-бутил.
3. Способ по п.1, где R⁴ представляет собой бензил.
4. Способ по п.1, где R⁴ представляет собой этил.
5. Способ по п.1, где R⁴ представляет собой 2,2,2-трихлорэтил.
6. Способ по любому из п.п.2-5, где указанное взаимодействие проводят в присутствии восстанавливающего агента.
7. Способ по п.6, где указанный восстанавливающий агент представляет собой триэтилсилан.
8. Способ по п.6 или 7, где указанное взаимодействие проводят в присутствии органической кислоты.
9. Способ по п.8, где указанная органическая кислота представляет собой трифторуксусную кислоту.
10. Способ по любому из п.п.2-9, дополнительно включающий снятие защиты с указанного соединения Формулы F18 с получением соединения Формулы F10:



11. Способ по п.10, где указанное снятие защиты включает взаимодействие соединения Формулы F18 с цинком в присутствии уксусной кислоты.

12. Способ по п.10 или 11, дополнительно включающий взаимодействие указанного соединения Формулы F10 с основанием с получением соединения Формулы I:



13. Способ по п.12, где указанное основание представляет собой гидроксид натрия.

14. Способ по п.1, где R⁴ представляет собой 9H-флуорен-9-илметил.

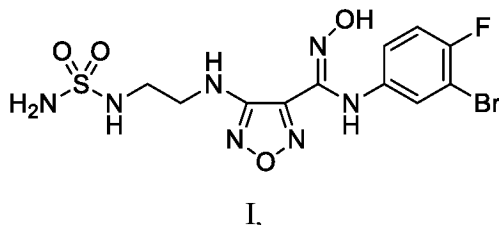
15. Способ по п.14, где указанное взаимодействие проводят в присутствии восстанавливающего агента.

16. Способ по п.15, где указанный восстанавливающий агент представляет собой триэтилсилан.

17. Способ по п.15 или 16, где указанное взаимодействие проводят в присутствии органической кислоты.

18. Способ по п.17, где указанная органическая кислота представляет собой метансульфоновую кислоту.

19. Способ по любому из п.п.14-18, дополнительно включающий превращение указанного соединения Формулы F18 в соединение Формулы I:

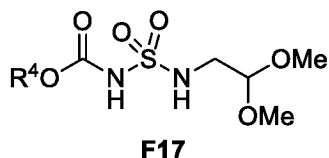


причем указанное превращение включает объединение соединения Формулы F18 с основанием с получением первой смеси.

20. Способ по п.19, где указанное основание представляет собой *N,N*-бис(2-аминоэтил)этан-1,2-диамин.

21. Способ по любому из п.п.19-20, где указанное превращение дополнительно включает добавление водного раствора хлористоводородной кислоты к указанной первой смеси.

22. Соединение Формулы F17:



где R⁴ представляет собой C₁₋₆ алкил, C₁₋₆ галогеналкил, бензил или 9*H*-флуорен-9-илметил.

23. Соединение по п.22, которое представляет собой трет-бутил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамоилкарбамат.

24. Соединение по п.22, которое представляет собой бензил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамоилкарбамат.

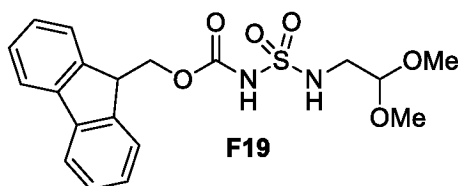
25. Соединение по п.22, которое представляет собой этил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамоилкарбамат.

26. Соединение по п.22, которое представляет собой 2,2,2-трихлорэтил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамоилкарбамат.

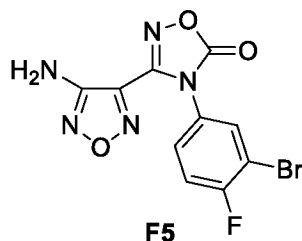
27. Соединение по п.22, которое представляет собой (9*H*-флуорен-9-ил)метил-N-(2,2-диметоксиэтил)сульфамоилкарбамат.

28. Способ, включающий:

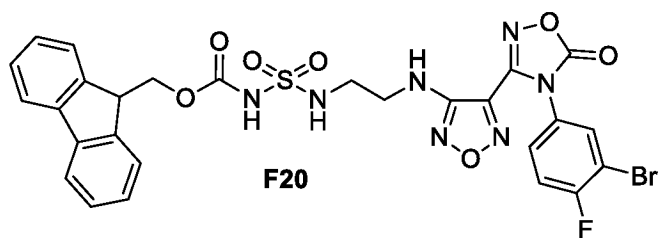
i) взаимодействие соединения Формулы F19:



с соединением Формулы F5:

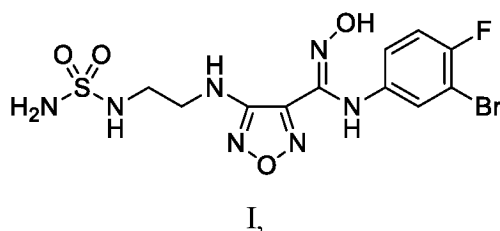


в присутствии триэтилсилана и метансульфоновой кислоты с получением соединения Формулы F20:



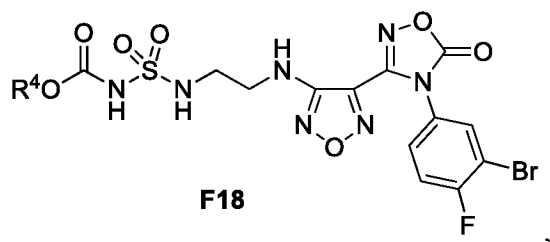
и

ii) превращение указанного соединения Формулы F20 в соединение Формулы I:



причем указанное превращение включает объединение указанного соединения Формулы F20 с N,N-бис(2-аминоэтил)этан-1,2-диамином.

29. Соединение Формулы F18:



где R⁴ представляет собой бензил, этил, C₁₋₃ галогеналкил, 2,2,2-трихлорэтил или 9H-флуорен-9-илметил.

30. Соединение по п.29, где R⁴ представляет собой бензил.

31. Соединение по п.29, где R⁴ представляет собой этил.

32. Соединение по п.29, где R⁴ представляет собой C₁₋₃ галогеналкил.

33. Соединение по п.29, где R⁴ представляет собой 2,2,2-трихлорэтил.

34. Соединение по п.29, где R⁴ представляет собой 9H-флуорен-9-илметил.

По доверенности

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 20443-291 WO1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2014/064531	International filing date (<i>day/month/year</i>) 7 November 2014 (07-11-2014)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 8 November 2013 (08-11-2013)
Applicant INCYTE CORPORATION		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐

With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐

Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

☐

as suggested by the applicant

☐

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐

none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/064531

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D271/08 C07D413/04 A61K31/4245 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NICOLAU, K. C. ET AL.: "A new method for the synthesis of nonsymmetrical sulfamides using Burgess-type reagents", ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, vol. 41, no. 20, 2002, pages 3866-3870, XP002735263, VCH VERLAG, WEINHEIM; DE ISSN: 0570-0833, DOI: 10.1002/1521-3773(20021018)41:20<3866::AID-ANIE3866>3.0.CO;2-T scheme 1; page 3866 page 3868; table 4; compound 55 ----- -/--	36-38, 60-65



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 2015

Date of mailing of the international search report

11/02/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoepfner, Wolfgang

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/064531

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/005958 A2 (INCYTE CORP [US]; COMBS ANDREW P [US]; YUE EDDY W [US]; SPARKS RICHARD) 14 January 2010 (2010-01-14) cited in the application page 1, line 7 - line 9 example 3	1-66
A	----- WO 2006/122150 A1 (INCYTE CORP [US]; COMBS ANDREW P [US]; YUE EDDY W [US]) 16 November 2006 (2006-11-16) page 1, line 9 - line 10 page 4; compound I scheme 6; page 28 page 29, line 27 -----	1,18,39, 66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/064531

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010005958	A2	14-01-2010	
		AR 072490 A1	01-09-2010
		AU 2009268739 A1	14-01-2010
		AU 2014210662 A1	28-08-2014
		CA 2743975 A1	14-01-2010
		CL 2014000363 A1	01-08-2014
		CN 102164902 A	24-08-2011
		CN 104042611 A	17-09-2014
		CO 6341622 A2	21-11-2011
		CR 11871 A	30-03-2011
		DK 2315756 T3	13-10-2014
		EA 201170161 A1	30-08-2011
		EC SP11010798 A	31-03-2011
		EP 2315756 A2	04-05-2011
		EP 2824100 A1	14-01-2015
		ES 2524266 T3	04-12-2014
		HR P20141094 T1	16-01-2015
		JP 5465720 B2	09-04-2014
		JP 2011527686 A	04-11-2011
		JP 2014114299 A	26-06-2014
		KR 20110031971 A	29-03-2011
		NZ 590268 A	30-11-2012
		PE 03082011 A1	10-06-2011
		PT 2315756 E	16-12-2014
		SG 192485 A1	30-08-2013
		SI 2315756 T1	31-12-2014
		SM T201400179 B	15-01-2015
		TW 201006827 A	16-02-2010
		US 2010015178 A1	21-01-2010
		US 2012058079 A1	08-03-2012
		US 2014023663 A1	23-01-2014
		US 2014315962 A1	23-10-2014
		WO 2010005958 A2	14-01-2010
WO 2006122150	A1	16-11-2006	
		AR 054271 A1	13-06-2007
		AU 2006244068 A1	16-11-2006
		BR PI0608604 A2	26-01-2010
		CA 2606783 A1	16-11-2006
		CN 101212967 A	02-07-2008
		CN 103130735 A	05-06-2013
		CR 9485 A	20-02-2008
		DK 1879573 T3	25-02-2013
		EA 200702455 A1	28-04-2008
		EP 1879573 A1	23-01-2008
		EP 2559690 A1	20-02-2013
		ES 2401482 T3	22-04-2013
		HK 1117392 A1	09-08-2013
		HR P20130220 T1	30-04-2013
		IL 186957 A	30-04-2014
		JP 4990270 B2	01-08-2012
		JP 2008540548 A	20-11-2008
		JP 2012140450 A	26-07-2012
		KR 20080005954 A	15-01-2008
		KR 20130109263 A	07-10-2013
		NZ 562919 A	29-04-2011
		PT 1879573 E	25-03-2013
		RS 52711 B	30-08-2013
		SG 161310 A1	27-05-2010
		SG 195607 A1	30-12-2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/064531

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		SI 1879573 T1	30-04-2013
		TW I377060 B	21-11-2012
		UA 99897 C2	25-10-2012
		US 2006258719 A1	16-11-2006
		US 2011311479 A1	22-12-2011
		US 2013123246 A1	16-05-2013
		US 2014377292 A1	25-12-2014
		WO 2006122150 A1	16-11-2006
		ZA 200709698 A	26-11-2008
