

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037419**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.25

(21) Номер заявки
201892479

(22) Дата подачи заявки
2017.05.31

(51) Int. Cl. **C07D 405/06** (2006.01)
A61K 31/4045 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **СОЕДИНЕНИЯ 1-ТЕТРАГИДРОПИРАНИЛКАРБОНИЛ-2,3-ДИГИДРО-1Н-ИНДОЛА
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **62/348,457**

(32) **2016.06.10**

(33) **US**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/US2017/035097**

(87) **WO 2017/213919 2017.12.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Бастиян Жоли Анн, Чэнь Цзехэо,
Коэн Джеффри Дэниел, Генри Джеймс
Роберт, Макмиллен Уильям Томас,
Риман Брэдли Эрл, Рубио Алмудена,
Солл Дэниел Джон, Чжао Гайин (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина
Е.М., Глухарёва А.О., Строкова О.В.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Осипенко
Н.В., Лебедев В.В., Парамонова К.В.,
Николаева О.А. (RU)**

(56) UTE F. RÖHRIG ET AL.:
"Challenges in the Discovery of Indoleamine 2,3-
Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitors", JOURNAL
OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 58,
no. 24, 13 May 2015 (2015-05-13), pages
9421-9437, XP055286739, ISSN: 0022-2623, DOI:
10.1021/acs.jmedchem.5b00326, the whole document
AMY B. DOUNAY ET AL.: "Challenges
and Opportunities in the Discovery of New
Therapeutics Targeting the Kynurenine Pathway",
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol.
58, no. 22, 24 July 2015 (2015-07-24), pages
8762-8782, XP055390536, ISSN: 0022-2623, DOI:
10.1021/acs.jmedchem.5b00461, the whole document

(57) Изобретение относится к некоторым новым соединениям 2,3-дигидро-1Н-индола, фармацевтическим композициям, содержащим соединения, и к способам использования соединений для лечения рака, в частности для лечения рака, выбранного из группы, состоящей из меланомы, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака яичников, карциномы фаллопиевых труб, первичной перитонеальной карциномы, рака шейки матки, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, глиомы, неходжкинской лимфомы и лимфомы Ходжкина.

B1**037419****037419 B1**

Данное изобретение относится к новым соединениям 2,3-дигидро-1H-индола, которые ингибируют превращение триптофана в кинуренин, для некоторых из которых было подтвержден факт связывания с индоламин 2,3-диоксигеназой (IDO1). Данное изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим данные соединения, и способам использования данных соединений для лечения физиологических расстройств, более конкретно для лечения рака, такого как меланома, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, почечно-клеточная карцинома, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, карцинома фаллопиевых труб, первичная перитонеальная карцинома, рак шейки матки, рак желудка, рак печени, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, глиома, неходжкинская лимфома и лимфома Ходжкина.

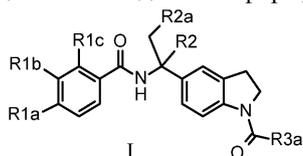
Триптофан представляет собой незаменимую аминокислоту, необходимую для биосинтеза белка, роста клеток, генерации нейроактивных метаболитов, таких как серотонин (5-гидрокситриптамиин), мелатонин и кофермент никотинамидадениндинуклеотид (НАД). Триптофан катаболизируется с помощью индоламин 2,3-диоксигеназы (IDO1), гем-зависимым ферментом, который катализирует первую и ограничивающую скорость стадию катаболизма триптофана до N-формилкинуренина, который затем деформируется для получения кинуренина. В ходе инфекции экспрессия IDO1 индуцируется интерфероном гамма, вызывая локальное истощение триптофана, который ингибирует рост триптофан-зависимых внутриклеточных патогенов, таких как *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii* и вирусы. Кроме того, IDO1 играет роль в предотвращении окислительного повреждения в клетках, нескольких невропатологиях, регуляции иммунной системы и рака. Хотя активность IDO1 является критическим компонентом иммунного ответа на патогены, длительная активность приводит к истощению внеклеточного триптофана при сопутствующей выработке кинуренина, оба из которых являются иммуносупрессивными. Экспрессия IDO1 в раке хорошо задокументирована и происходит как посредством внутренней активации экспрессии гена IDO1, так и/или посредством активации оси IFN- γ -to-IDO1, что является результатом активации иммунных клеток. Кроме того, врожденные иммунные клетки, такие как дендритные клетки, моноциты и макрофаги, которые рекрутируются в очаги воспаления и микроокружение опухоли, являются иммуносупрессорными, когда они экспрессируют IDO1. Вместе с IDO1-зависимым истощением триптофана и продуцированием кинуренина было связано подавление активации и пролиферации Т-клеток и NK-клеточной функции. Кроме того, истощение триптофана и производство кинуренина имеют решающее значение для образования регуляторных Т-клеток (Treg) и миелоидных супрессорных клеток (MDSC), функцией которых является ослабление активации иммунных клеток. Эти IDO1-зависимые иммуносупрессивные механизмы являются компонентами, которые позволяют опухолям обходить иммунную систему.

Потенциальные ингибиторы продуцирования кинуренина с помощью ингибирования IDO1 в литературе уже известны; см., например, международный патент 2010005958, международный патент 2012142237 и международный патент 2014150646 и *Journal of Medicinal Chemistry* (2016), 59 (1), 419-430. В данной области техники известны определенные соединения 2,3-дигидро-1H-индола; см., например, регистрационный номер CAS 1359420-19-1, 1358912-57-8, 1358648-68-6, 1357815-05-4, 1359035-89-4 и 1359002-77-9.

Существует потребность в новых способах лечения рака. В частности, существует необходимость в новых способах лечения рака для меланомы, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, почечно-клеточной карциномы, рака молочной железы, рака легких, рака яичников, карциномы фаллопиевых труб, первичной перитонеальной карциномы, рака шейки матки, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, глиомы, неходжкинской лимфомы и лимфомы Ходжкина. Сохраняется необходимость в обеспечении альтернативных ингибиторов выработки кинуренина, полезных при лечении рака. Предпочтительно такие соединения обладают свойствами, которые обеспечивают возможность введения оптимальной дозы, необходимой для максимального ингибирования роста опухолевой клетки, в то же время обладающей приемлемой переносимостью для пациента. Предпочтительно такие соединения также должны быть перорально биодоступными. Предпочтительно такие соединения также обладают способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и, таким образом, воздействуют на мозг. Предпочтительно такие соединения также обладают способностью потенциально преодолевать резистентность к существующим ингибиторам кинуренина с помощью альтернативного механизма действия.

В данном изобретении предложены некоторые новые соединения 2,3-дигидро-1H-индола, которые являются ингибиторами выработки кинуренина. Специалисту в данной области будет понятно, что ингибиторы выработки кинуренина могут иметь клиническое применение в качестве монотерапии или в сочетании с другими противораковыми средствами для лечения различных видов рака и, в частности, меланомы, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, почечно-клеточной карциномы, рака молочной железы, рак легкого, рак яичников, карциномы фаллопиевых труб, первичной перитонеальной карциномы, рака шейки матки, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, глиомы, неходжкинской лимфомы и лимфомы Ходжкина.

В данном изобретении также предложено соединение формулы



где R1a представляет собой водород, метил, этенил, циано, фтор, хлор, фторметил или дифторметил;

R1b представляет собой водород, фтор или хлор;

R1c представляет собой водород, гидроксигруппу, фтор, бензилокси или гидроксиэтиламиногруппу;

R2 представляет собой водород или метил;

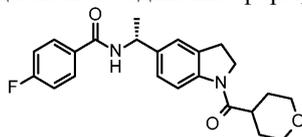
R2a представляет собой водород или метил и

R3a представляет собой тетрагидропиранил.

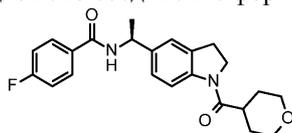
В данном изобретении предложено соединение формулы



В данном изобретении также предложено соединение формулы

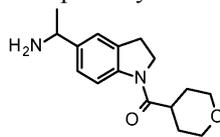


В данном изобретении также предложено соединение формулы



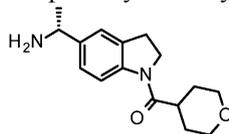
В данном изобретении также предложено соединение, которое представляет собой 4-фтор-N-((1R)-1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этил}бензамид. Предпочтительно соединение представляет собой 4-фтор-N-((1R)-1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этил}бензамид в кристаллической форме. Предпочтительно соединение представляет собой 4-фтор-N-((1R)-1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этил}бензамид, характеризующееся порошковой рентгеновской дифракцией (источник излучения Cu, λ -1,54060 Å), имеющей по меньшей мере один пик при 17.38° в сочетании с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 12,51, 15,65, 16,37, 17,56, 21,48 и 25.23° ($20 \pm 0.2^\circ$).

В данном изобретении также предложен промежуточный продукт или его соль формулы



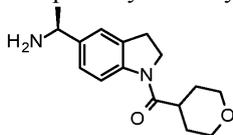
полезный в способе получения определенных соединений по данному изобретению.

Данное изобретение также относится к промежуточному продукту или его соли формулы



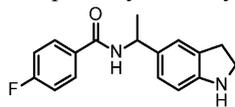
полезному в способе получения определенных соединений по данному изобретению.

Данное изобретение также относится к промежуточному продукту или его соли формулы



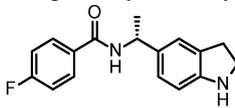
полезному в способе получения определенных соединений по данному изобретению.

Данное изобретение также относится к промежуточному продукту формулы



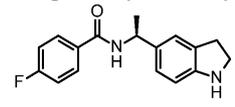
полезному в способе получения определенных соединений по данному изобретению.

Данное изобретение также относится к промежуточному продукту формулы



полезному в способе получения определенных соединений по данному изобретению.

Данное изобретение также относится к промежуточному продукту формулы



полезному в способе получения определенных соединений по данному изобретению.

В данном изобретении предложена также фармацевтическая композиция, содержащая соединение согласно данному изобретению с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, носителем или разбавителем. Предпочтительно соединение представляет собой 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид.

Данное изобретение относится к способу лечения пациента, больного раком, выбранным из группы, состоящей из меланомы, острого гранулоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, почечно-клеточной карциномы, рака молочной железы, рака легких, рака яичников, рака фаллопиевых труб, первичной перитонеальной карциномы, рака шейки матки, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, глиомы, неходжкинской лимфомы и лимфомы Ходжкина, включающего введение пациенту эффективного количества соединения по данному изобретению. Предпочтительно рак представляет собой меланому. Предпочтительно рак представляет собой колоректальный рак. Предпочтительно рак представляет собой почечно-клеточную карциному. Предпочтительно рак представляет собой рак молочной железы. Предпочтительно рак представляет собой рак легких, в частности немелкоклеточный рак легких. Предпочтительно рак представляет собой рак яичников. Предпочтительно рак представляет собой глиому. Предпочтительно соединение представляет собой 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид. В данном изобретении также предложено соединение согласно данному изобретению для применения в терапии. Кроме того, данное изобретение обеспечивает соединение по данному изобретению для использования при лечении рака, выбранного из группы, состоящей из меланомы, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, карциномы почек, рака молочной железы, рака легких, рака яичников, карцинома маточной артерии, первичной перитонеальной карциномы, рака шейки матки, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, глиомы, неходжкинской лимфома и лимфомы Ходжкина. Предпочтительно рак представляет собой меланому. Предпочтительно рак представляет собой колоректальный рак. Предпочтительно рак представляет собой почечно-клеточную карциному, предпочтительно рак представляет собой рак молочной железы. Предпочтительно рак представляет собой рак легких, в частности немелкоклеточный рак легких. Предпочтительно рак представляет собой рак яичников. Предпочтительно рак представляет собой глиому. Предпочтительно соединение представляет собой 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид. Предпочтительно соединение представляет собой 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид.

Данное изобретение также предусматривает комбинацию, содержащую соединение по данному изобретению и LY3300054 для одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении рака, выбранного из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легких и рака толстой кишки. Предпочтительно рак представляет собой немелкоклеточный рак легких. Предпочтительно рак представляет собой рак толстой кишки. Предпочтительно соединение представляет собой 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид. Предпочтительно соединение представляет собой 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, а рак представляет собой немелкоклеточный рак легких. Предпочтительно соединение представляет собой 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, а рак представляет собой рак толстой кишки.

В следующих параграфах описаны предпочтительные классы формулы I:

- R1a представляет собой водород, метил, циано, фтор или хлор;
- R1b представляет собой водород, фтор или хлор;

- c) R1c представляет собой водород или гидроксид;
- d) R2 представляет собой водород или метил;
- e) R2a представляет собой водород или метил;
- f) R3a представляет собой тетрагидропиранил; а также
- g) R1a представляет собой фтор, R1b представляет собой водород, R1c представляет собой водород, R2 представляет собой водород, R2a представляет собой водород и R3 представляет собой тетрагидропиранил.

Некоторые из соединений по данному изобретению являются кристаллическими. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности дифракционных пиков могут варьироваться вследствие предпочтительной ориентации, обусловленной такими факторами, как морфология и структура кристалла. При наличии эффектов предпочтительной ориентации интенсивности пиков варьируются, но положения характеристических пиков полиморфной формы остаются неизменными; см., например, The U. S. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35 Chapter <941> Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official May 1, 2015. Кроме того, в области кристаллографии также хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы угловые положения пиков могут незначительно варьироваться. Например, положения пиков могут смещаться вследствие колебаний температуры или влажности, при которых анализируют образец, вследствие сдвига образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае варибельность положения пика $\pm 0,2$ 2θ учитывает указанные возможные отклонения, не препятствуя однозначной идентификации указанной кристаллической формы. Кристаллическая форма может быть подтверждена на основании любой уникальной комбинации характеристических пиков (в единицах 2θ), обычно более выраженных пиков. Диаграммы дифракции кристаллической формы, записанные при температуре окружающей среды и относительной влажности, корректировали по стандартным пикам NIST 675 при 8,85 и 26,77 градусах 2-тета.

Термины "лечить", "лечащий" или "лечение", в контексте данного документа, относятся к сдерживанию, замедлению, остановке или регрессии прогрессирования или тяжести существующего симптома или расстройства.

Термин "пациент", в контексте данного документа, относится к теплокровному животному, такому как млекопитающее, в частности человеку, который страдает от определенного заболевания, расстройства или состояния.

Специалисту в данной области техники понятно, что соединения и определенные промежуточные соединения по данному изобретению могут существовать в таутомерных формах. При упоминании в настоящей заявке одного из конкретных таутомеров соединений согласно данному изобретению следует понимать, что оно включает обе таутомерные формы, а также их смеси.

Некоторые промежуточные соединения или соединения согласно данному изобретению могут содержать один или более хиральных или стереогенных центров. Рассматриваются все отдельные стереоизомеры, энантиомеры и диастереомеры, а также смеси энантиомеров и диастереомеров всех указанных выше соединений или промежуточных соединений по данному изобретению, включая рацематы. Предпочтительные соединения или промежуточные соединения согласно данному изобретению, раскрытому в данном документе, содержащие по меньшей мере один хиральный центр, существуют в виде отдельных энантиомеров или диастереомеров. Отдельные энантиомеры или диастереомеры могут быть получены исходя из хиральных реагентов или методами стереоселективного или стереоспецифического синтеза (как проиллюстрировано в способах синтеза и примерах). Альтернативно, отдельные энантиомеры или диастереомеры могут быть выделены из смесей стандартными методами хиральной хроматографии (как проиллюстрировано в способах синтеза и примерах) или методами кристаллизации. Специалистам в данной области техники будет понятно, что в некоторых случаях последовательность элюирования энантиомеров или диастереомеров может быть разной вследствие различных хроматографических колонок и подвижных фаз.

Обозначение "изомер 1" в названии соединения означает, что соответствующее промежуточное соединение или соединение по данному изобретению является первым из двух элюируемых энантиомеров в случае, если смесь пары энантиомеров разделяют с помощью хиральной хроматографии. Обозначение "изомер 2" в названии соединения означает, что соответствующее промежуточное соединение или соединение по данному изобретению является вторым из двух элюируемых энантиомеров в случае, если смесь пары энантиомеров разделяют с помощью хиральной хроматографии.

Обозначение "изомер А" в названии соединения означает, что соответствующее промежуточное соединение или соединение по данному изобретению представляет собой единственный изомер из хирального синтеза неизвестной абсолютной конфигурации.

Термин "LY3300054" в контексте данного документа представляет собой антитело, связывающееся с PD-L1 человека (И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 1) и содержащее легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), при этом легкая цепь содержит варибельный участок легкой цепи (LCVR), а тяжелая цепь содержит варибельный участок тяжелой цепи (HCVR), и при этом LCVR содержит определяющие компле-

ментарность области легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой SGSSSNIGSNTVN (И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 5), аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой YGNSNRPS (И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 6) и аминокислотная последовательность LCDR3 представляет собой QSYDSSLGSGV (И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 7) соответственно, и при этом HCVR содержит определяющие комплементарности области тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой KASGGTFSSYAIS (И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 2), аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой GIPIFGTANYAQKFQG (И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 3) и аминокислотная последовательность LCDR3 представляет собой ARSPDYSPYYYYGMDV (И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 4) соответственно.

В некоторых вариантах осуществления LY3300054, LY3300054 связывается с PD-L1 человека и содержит легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), при этом легкая цепь содержит варибельный участок легкой цепи (LCVR), а тяжелая цепь содержит варибельный участок тяжелой цепи (HCVR), при этом аминокислотная последовательность LCVR представляет собой И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 9, аминокислотная последовательность HCVR представляет собой И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 8. В некоторых вариантах осуществления LY3300054, LY3300054 связывается с PD-L1 человека, включающим легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), где аминокислотная последовательность LC представляет собой И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 10, и HC имеет аминокислотную последовательность, приведенную в И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 11. В одном варианте осуществления LY3300054, LY3300054 содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, при этом каждая легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, указанную в И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 11, а каждая тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, указанную в И.Н. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 10.

Термин "варибельная область легкой цепи", в контексте данного документа, или "LCVR" означает часть легкой цепи молекулы антитела, которая включает аминокислотные последовательности CDR и FR.

Термин "варибельный участок тяжелой цепи", в контексте данного документа, "HCVR" означает часть тяжелой цепи молекулы антитела, которая включает аминокислотные последовательности CDR и FR.

Термины "гиперварибельный участок", в контексте данного документа, и "CDR" означают пересекающиеся сайты, связывающие антиген, находящиеся в варибельной области LC и HC полипептидов антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Данные конкретные участки были описаны другими исследователями, включая Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-93 (1971); Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); MacCallum, et al., J. Mol. Biol., 262: 732-745 (1996) и North, et al., J. Mol. Biol., 406, 228-256 (2011), где определение включает перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом.

CDR чередуются с областями, являющимися более консервативными областями, называемыми каркасными областями ("FR"). Каждая LCVR и HCVR состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Три CDR легкой цепи называются "LCDR1, LCDR2 и LCDR3", а три CDR тяжелой цепи называются "HCDR1, HCDR2 и HCDR3". CDR содержат большую часть остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном. Нумерация и позиционирование аминокислотных остатков CDR в областях LCVR и HCVR соответствует известным общепринятым нормам (например, Kabat (1991), Chothia (1987) и/или North (2011)). В различных вариантах осуществления изобретения FR LY3300054 могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественным или искусственным образом модифицированы.

Термин " K_D " в контексте данного документа означает равновесную константу диссоциации конкретного комплекса антитело-антиген или взаимодействия фрагмента антитело-антиген.

Термин "связывает" в контексте данного документа означает сродство антитела к PD-1 человека, подразумевает, если не указано иное, K_D менее около 1×10^{-6} М, предпочтительно менее около 1×10^{-9} М, как определено общепринятыми способами, известными в данной области техники, в том числе с использованием биосенсорного поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при 37°C, по существу, как описано в настоящем документе.

Следующие термины в контексте данного документа имеют указанные значения: "ACN" относится к ацетонитрилу; "APCI" относится к химической ионизации при атмосферном давлении; "БТИ" относится к [бис-(трифторацетокси)иод]бензолу; "CDI" относится к карбонилдиимидазолу; "ДХМ" относится к дихлорметану; "ДМСО" относится к диметилсульфоксиду; "ДМФА" относится к N,N-диметилформамиду; "DPBS" относится к фосфатно-солевому буферу Дульбекко; "ES" относится к электропротонной ионизации; "EtOAc" относится к этилацетату; "EtOH" относится к этанолу; "FBS" относится к фетальной бычьей сыворотке; "ВЭЖХ" относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии; "изо-PrOH" относится к изопропанолу; "ЖХ/МС/МС" относится к жидкостной хроматогра-

фии/тандемной масс-спектрометрии; "L-кинуренин-d4" относится к (2S)-2-амино-4-(2-амино-3,4,5,6-тетрагидроиндол-4-ил)-4-оксобутановой кислоте; "MES" относится к 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоте; "MS" относится к масс-спектрологии; "MeOH" относится к метанолу; "PBS" относится к натрий-фосфатному буферу; "ТФУ" относится к трифторуксусной кислоте; "ТЭА" относится к триэтиламину; "ТГФ" относится к тетрагидрофурану; "СФХ" относится к сверхкритической жидкостной хроматографии; и "длина волны УФ" относится к ультрафиолетовой длине волны.

Соединения по данному изобретению могут быть получены в соответствии со следующими схемами, способами синтеза и примерами способов, хорошо известными и признанными в данной области техники. Подходящие условия реакции для этапов данных способов синтеза и примеров хорошо известны в данной области техники, и подходящие замены растворителей и со-реагентов находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Специалистам в данной области техники также будет понятно, что синтетические промежуточные продукты могут быть выделены и/или очищены с помощью различных хорошо известных способов, которые необходимы или желательны, к тому же часто могут быть использованы различные промежуточные продукты непосредственно на последующих стадиях синтеза с низкой степенью очистки или без очистки. Кроме того, специалистам в данной области техники будет понятно, что в некоторых случаях порядок введения фрагментов не имеет решающего значения. Конкретный порядок стадий, необходимых для получения соединения согласно данному изобретению, зависит от конкретного синтезируемого соединения, исходного соединения и относительной подвижности замещенных фрагментов, что хорошо понятно специалистам в области химии. Все заместители, если не указано иное, являются такими, как определено ранее, и все реагенты являются общеизвестными и принятыми в данной области техники.

Соединения по данному изобретению могут быть синтезированы, как показано в следующих схемах, где R1a, R1b, R1c, R2, R2a и R3a являются такими, как определено ранее.

Схема 1. Синтез соединений формулы I

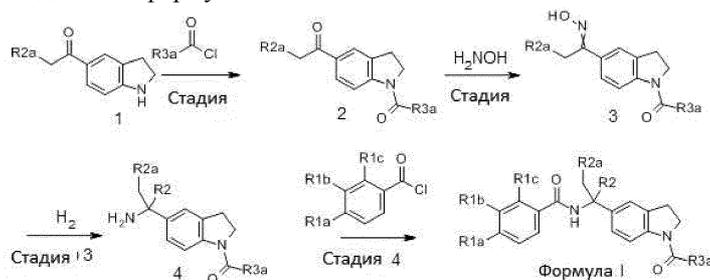


Схема 1 иллюстрирует общий синтез соединений формулы I, R2 представляет собой H. На стадии 1 2,3-дигидро-1H-индол (соединение 1) приводят в контакт с соответствующей активированной карбоновой кислотой, такой как хлорангидрид кислоты, в присутствии подходящего основания, такого как ТЭА, и в подходящем растворителе, таком как ДХМ или дихлорэтан (ДХЭ), при соответствующей температуре, такой как от 0°C до температуры кипения. Специалисту в данной области техники будет понятно, что существует множество активированных карбоновых кислот и множество способов активировать карбоновые кислоты *in situ* для осуществления реакции стадии 1. Полученный кетон (соединение 2) на стадии 1 затем обрабатывают гидроксиламином в полярном протонном растворителе, таком как EtOH, при соответствующей температуре, такой как от комнатной температуры до температуры кипения для получения оксима в виде смеси изомеров E и Z (соединение 3). Стадия 3 иллюстрирует восстановление оксима (соединение 3) до амина (соединение 4). Специалисту в данной области техники будет понятно, что существует множество способов, влияющих на данное превращение. Например, оксим (соединение 3) приводят в контакт с соответствующим катализатором, таким как никель Ренея, в подходящем растворителе, таком как MeOH или EtOH, в соответствующем реакторе, таком как шейкер Парра. Затем смесь подвергают воздействию давления водорода, такого как 100-500 кПа, при соответствующей температуре, такой как от комнатной температуры до 50°C, в течение подходящего периода времени, например от одного до 24 ч. Схема 1, стадия 4 описывает образование амида из амина (соединение 4) и соответствующей активированной карбоновой кислоты, такой как хлорангидрид кислоты, в присутствии подходящего основания, такого как ТЭА, и в подходящем растворителе, таком как ДХМ или ДХЭ, при соответствующей температуре, такой как от 0°C до температуры кипения с получением соединения формулы I. Специалисту в данной области будет понятно, что существует множество активированных карбоновых кислот и множество способов для активации карбоновых кислот *in situ* для осуществления реакции стадии 4. Специалисту в данной области также будет понятно, что на схемах 1, 3 и 4 приводятся продукты с хиральными центрами. Отдельные энантиомеры могут быть выделены или разделены специалистами в данной области техники в любой удобной точке синтеза соединений согласно данному изобретению при помощи таких способов, как техника селективной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, и E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994).

Схема 2. Синтез соединений формулы I

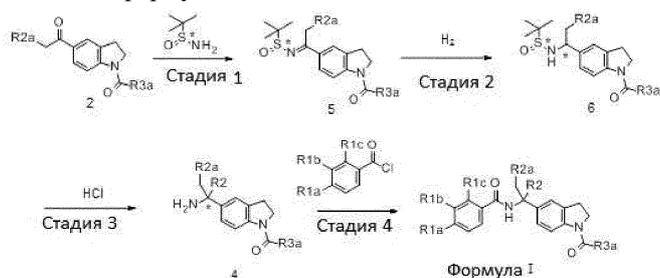


Схема 2 иллюстрирует альтернативный общий синтез соединений формулы I, R2 представляет собой H. На стадии 1 кетон (соединение 2) приводят в контакт с соответствующим хиральным сульфинамидом в присутствии подходящей кислоты Льюиса, такой как этоксид титана(IV), в подходящем растворителе, таком как ТГФ, при соответствующей температуре, такой как от комнатной температуры до температуры кипения в течение подходящего периода времени, например от одного до 24 ч, с получением хирального этилиденсульфинамида (соединение 5). Специалисту в данной области техники будет понятно, что реагенты доступны для получения любого энантиомера сульфинамида (соединение 5). Хиральное восстановление изображено на стадии 2 для получения этилсульфинамида (соединение 6) из этилидинсульфинамида (соединение 5), а звездочки используются для ясности обозначения хиральных центров. Например, соответствующий катализатор предварительно готовят путем смешивания соответствующего рутенийсодержащего реагента, такого как димер дихлор (п-цимен)рутения(II) с соответствующим аминоэтанолом, таким как 2-амино-2-метил-1-пропанол, в соответствующем растворителе, таком как изо-PrOH, в присутствии улавливателя воды, такого как молекулярные сита 4Å, при соответствующей температуре, такой как от комнатной температуры до температуры кипения в течение подходящего периода времени, например от 5 мин до примерно 1 ч. Предварительно образованный катализатор охлаждают до соответствующей температуры, такой как от комнатной температуры до 50°C, и обрабатывают этилиденсульфинамидом (соединение 5) и соответствующим основанием, таким как трет-бутоксид калия. Реакцию поддерживают при соответствующей температуре, такой как от комнатной температуры до 50°C, в течение подходящего периода времени, например от 1 до 24 ч. Специалисту в данной области техники будет понятно, что существует множество каталитических и стехиометрических способов, которые будут влиять на одно и то же превращение, и что эти способы могут приводить к диастереомерному обогащению в зависимости от природы субстратов и используемых реагентов вплоть до образования единственного диастереомера. Гидролиз этилсульфинамида (соединение 6) в кислой среде может быть проведен обработкой соответствующей кислотой, такой как хлористоводородная кислота (HCl), в подходящем растворителе, таком как диоксан, изо-PrOH, EtOAc или MeOH при соответствующей температуре, такой как от 0°C до комнатной температуры в течение подходящего периода времени, например от 1 до 8 ч, с получением амина (соединение 4). Специалисту в данной области техники будет понятно, что существует множество способов выделения, и это может привести к выделению либо соли, либо свободного основания амина (соединение 4). Стадия 4 описывает образование амидной связи между амином (соединение 4) и соответствующей активированной карбоновой кислотой, аналогичной описанной выше схеме 1, стадии 4, с получением соединения формулы I.

Схема 3. Синтез соединений формулы I

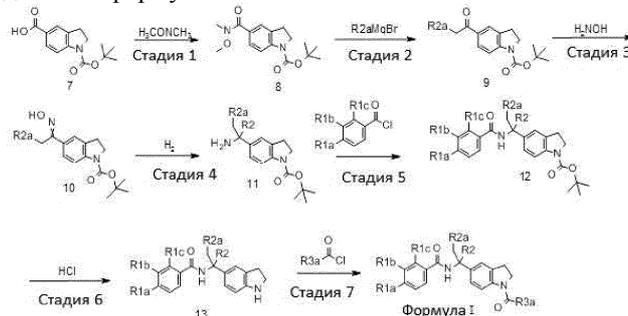
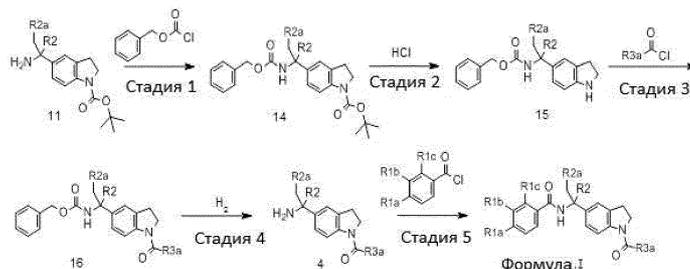


Схема 3 изображает альтернативный общий способ синтеза соединения формулы I, R2 представляет собой H. Стадия 1 изображает образование амидной связи между карбоновой кислотой (соединение 7) и гидрохлоридом N,N-диметилгидроксиламина с получением амида Вайнреба (соединение 8). Специалисту в данной области будет понятно, что существует множество способов воздействия на это превращение. Например, карбоновая кислота (соединение 7) может быть обработана подходящим реагентом для реакций сочетания, таким как гексафторфосфат 1-[бис-(диметиламино)метил]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиный-3-оксид (НАТУ) в присутствии соответствующего основания, такого как N,N-диизопропилэтиламин, в подходящем растворителе, таком как ДМФ, в течение подходящего периода времени, такого как от 5 до 10 мин. Затем смесь обрабатывают гидрохлоридом N,N-

диметилгидроксиламина и смесь перемешивают при соответствующей температуре, такой как от комнатной температуры до 100°C, в течение подходящего периода времени, например от 3 до 18 ч. Полученный в результате амид Вайнреба (соединение 8) затем обрабатывают подходящим реагентом Гриньяра, алкиллитием или алкилцинком, на стадии 2 с получением кетона (соединение 9). Специалисту в данной области техники будет понятно, что существует большое количество способов, влияющих на это превращение. Например, амид Вейнреба (соединение 8) в подходящем растворителе, таком как ТГФ, при соответствующей температуре, такой как от 0 до -78°C, обрабатывают подходящим алкилметаллом, таким как этилмагнийбромид. После добавления реакцию продолжают в течение подходящего периода времени, такого как от одного до 18 ч, с получением кетона (соединение 9). Для наглядности представлены этапы 3, 4 и 5 схемы 3. Способы аналогичны способам, представленным на схемах 1, 2, 3 и 4 соответственно. Специалисту в данной области техники будет понятно, что соединение 11 содержит хиральный центр, и соединение 11 может быть очищено с помощью хиральной очистки, или рацемическая смесь может быть использована на следующей стадии без разделения, а разделение может быть выполнено после любой из последующих стадий. Стадия 6 изображает удаление защитной группы трет-бутоксикарбонил карбата (соединение 12) с получением амина (соединение 13). Специалисту в данной области техники будет понятно, что это превращение может быть проведено в кислых, щелочных или термических условиях. Например, карбамат (соединение 12) приводят в контакт с подходящей кислотой, такой как HCl, в подходящем растворителе, таком как диоксан или ДХМ, или их смеси, при соответствующей температуре, такой как от 0°C до температуры кипения в течение подходящего периода времени, такого как от 1 до 18 ч с получением амина (соединение 13). Специалисту в данной области техники будет понятно, что существуют способы выделения амина в виде соли или свободного основания. Стадия 7 изображает образование амидной связи между амином (соединение 13) и активированной карбоновой кислотой с получением соединения формулы I. Условия аналогичны условиям, представленным на схеме 1, стадия 1.

Схема 4. Синтез соединений формулы I



На схеме 4 показан альтернативный общий способ синтеза соединения формулы I. На стадии 1 показано проведение стадии защиты амина (соединение 11) бензилкарбаматной защитной группой с получением карбата (соединение 14). Специалисту в данной области техники будет понятно, что существует множество доступных защитных групп для аминогруппы, которые будут ортогональными защитными группами к трет-бутоксикарбонильной группе в соединении 11. В иллюстративной процедуре амин (соединение 11) в подходящем растворителе, таком как ДХМ, и в присутствии подходящего основания, такого как N,N-диизопропилэтиламин, приводят в контакт с бензилоксихлорформиатом при соответствующей температуре, такой как от 0°C до комнатной температуры в течение подходящего периода времени, например от 1 до 18 ч. трет-Бутоксикарбонильную защитную группу соединения 14 селективно снимают с получением амина (соединение 15), используя способы, аналогичные способам, описанным для схемы 3, стадии 6. Полученный амин (соединение 15) затем подвергают реакции амидного сочетания с активированной карбоновой кислотой способами, аналогичными способам на схеме 1, стадия 1, с получением амида (соединение 16). На стадии 4 проиллюстрировано снятие бензилоксикарбамат защитной группы соединения 16 с получением амина (соединение 4). Специалисту в данной области будет понятно, что существует множество способов воздействия на это превращение. Например, соединение 16 подвергают каталитическому гидрированию с помощью подходящего катализатора, такого как гидроксид палладия, в подходящем растворителе, таком как EtOH, при соответствующем давлении водорода, таком как 100-500 кПа, в течение подходящего периода времени, такого как от 1 до 8 ч, с получением амина (соединение 4). Наконец, превращение амина (соединение 4) в соединение формулы I является таким, как описано на схеме 1, стадия 4.

Схема 5. Синтез соединений формулы I

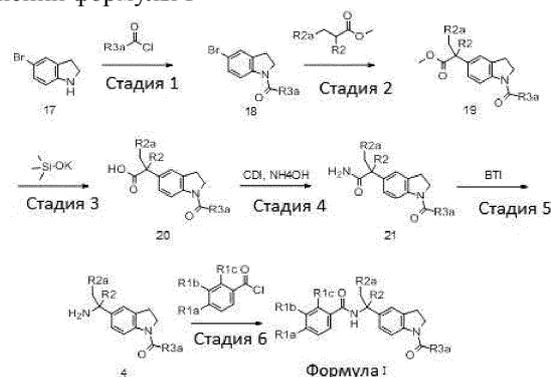


Схема 5 изображает альтернативный общий способ синтеза соединения формулы I. Стадия 1 изображает образование амидной связи между амином (соединение 17) и активированной карбоновой кислотой с получением амида (соединение 18). Условия аналогичны условиям, представленным на схеме 1, стадия 1. Стадия 2 изображает образование альфа-арилового эфира (соединение 19) посредством каталитического кросс-сочетания бромида (соединение 18) с эфиром энولات. Специалисту в данной области будет понятно, что существует широкий диапазон условий влияющих на это превращение. Например, раствор подходящего диалкиламина, такого как дициклогексиламин, в подходящем растворителе, таком как толуол, обрабатывают соответствующим литийсодержащим основанием, таким как *n*-бутиллитий, при соответствующей температуре, такой как от 0 до -78°C в течение подходящего периода времени, например от 10 мин до 1 ч. Этот раствор обрабатывают раствором подходящего сложного эфира, такого как метил-2-метилпропаноат, в подходящем растворителе, таком как толуол, и полученную смесь перемешивают в течение подходящего периода времени, например от 10 мин до 1 ч при соответствующей температуре, такой как от 0 до -40°C. Полученную смесь затем обрабатывают соответствующим палладиевым катализатором, таким как ди- μ -бромбис-(три-трет-бутилфосфин)дипалладий (I), и смесь перемешивают при соответствующей температуре, такой как от 0°C до комнатной температуры в течение подходящего периода времени, такого как от одного до 18 ч, с получением альфа-арилового эфира (соединение 19). Сложный эфир (соединение 19) может быть гидролизован до кислоты (соединение 20) способами, хорошо известными в данной области техники. Например, сложный эфир (соединение 19) приводят в контакт с подходящим основанием, таким как триметилсиланолат калия, в подходящем растворителе, таком как ТГФ, при соответствующей температуре, такой как от комнатной температуры до температуры кипения в течение подходящего периода времени, такого как от одного до семи дней. Стадия 4 изображает образование амидной связи между карбоновой кислотой (соединение 20) и аммиаком с получением карбоксиамида (соединение 21). Специалист в данной области техники оценит множественные способы, доступные для активации карбоновой кислоты, а также источники аммиака. Например, карбоновую кислоту (соединение 20) приводят в контакт с 1,1'-карбонилдиимидазолом в подходящем растворителе, таком как ДХМ или ДМФА, или их смеси, при соответствующей температуре, такой как от 0°C и до кипения в течение подходящего периода времени, такого как от 30 мин до 8 ч. К смеси добавляли гидроксид аммония и перемешивание продолжали в течение дополнительного времени, например от 1 до 18 ч. Стадия 21 изображает перегруппировку Гофмана карбоксиамида (соединение 21) в амин (соединение 4). Специалист в данной области техники оценит широкий спектр реагентов и условий, которые могут иметь воздействие на это превращение. Например, раствор карбоксиамида (соединение 21) в подходящем растворителе, таком как смесь АСН и воды, обрабатывают [бис-(трифторацетокси)иод]бензолом при соответствующей температуре, такой как от комнатной температуры до температуры кипения в течение соответствующего периода времени, такого как от 1 до 18 ч. Наконец, превращение амина (соединение 4) в соединение формулы I описано на схеме 1, стадии 4.

Синтез 1. Синтез 1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этанона.

К смеси 1-индолин-5-илэтанона (20,0 г, 124,1 ммоль) в ДХМ (496 мл) добавляли ТЭА (51,9 мл, 372,2 ммоль) и тетрагидропиран-4-карбонилхлорид (22,1 г, 148,9 ммоль). Перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (500 мл) и промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (300 мл). Органический слой выделяли и дважды экстрагировали водный слой ДХМ (500 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали фильтрат, получая указанное в заголовке соединение количественно в виде светло-желтого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 274,0 (M+H).

Альтернативная методика выделения.

Продукт обрабатывали гептаном и упаривали. Обработку повторяли и упаривали во второй раз. Обрабатывали гептаном и охлаждали до 0-5°C. Продукт фильтровали, промывали гептаном, и сушили, получая указанное в заголовке соединение.

Синтез 2. Синтез [5-(N-гидроксиэтанамидоил)-2,3-дигидро-1H-индол-1-ил](тетрагидро-2H-пиран-4-ил)метанона.

К раствору 1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этанона (синтез 1) (33,9 г, 124,0 ммоль) в EtOH (1240 мл) добавляли гидроксилламин (50 мас.% в воде, 22,8 мл, 372 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение трех дней. Реакционную смесь упаривали, получая указанное в заголовке соединение в виде смеси изомеров E/Z с количественным выходом. ЭС/МС (m/z): 289,0 (M+H).

Синтез 3. Синтез рацемического [5-(1-аминоэтил)-2,3-дигидро-1H-индол-1-ил](тетрагидро-2H-пиран-4-ил)метанона.

В шейкер Парра объемом 2250 мл добавляли никель Ренея (суспензия в EtOH, 60 г) и продували азотом. Добавляли 2 М раствор аммиака в MeOH (700 мл), а затем раствор [5-(N-гидроксиэтанамидоил)-2,3-дигидро-1H-индол-1-ил](тетрагидро-2H-пиран-4-ил)метанона (синтез 2) (35,8 г, 124,0 ммоль) в 2 М аммиаке в MeOH (700 мл). Потенциально экзотермическую смесь охлаждали до комнатной температуры, если необходимо, герметично закрывали, продували азотом, а затем водородом. Перемешивали в атмосфере водорода (60 фунтов на квадратный дюйм или 414 кПа) в течение 4 ч при комнатной температуре. Образовавшееся твердое вещество отфильтровывали и фильтрат упаривали *in vacuo*. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле с 7-26% (7 М аммиака в MeOH) в EtOAc, получая указанное в заголовке соединение (26,5 г, 78%) в виде не совсем белого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 275,0 (M+H).

Синтез 4А и В.

Разделение [5-(1-аминоэтил)-2,3-дигидро-1H-индол-1-ил](тетрагидро-2H-пиран-4-ил)метанона, изомер 1 и [5-(1-аминоэтил)-2,3-дигидро-1H-индол-1-ил](тетрагидро-2H-пиран-4-ил)метанона, изомер 2.

Рацемический [5-(1-аминоэтил)-2,3-дигидро-1H-индол-1-ил](тетрагидро-2H-пиран-4-ил)метанон (синтез 3) очищали с помощью хиральной СФХ с получением элюирующего первым энантиомера (изомер 1). ЭС/МС (m/z): 275,0 (M+H). Условия очистки: колонка CHIRALPAK® AD-H, 50×150 см; Подвижная фаза: 40% EtOH (содержащая 0,5% N,N-диметилэтиламин) в CO₂; температура колонки: 40°C; скорость потока: 300 г/мин; длина волны УФ: 260 нм. Энантиомерное обогащение изомером 1 подтверждали хиральной аналитической СФХ (> 99% э.и., R_t: 1,35 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм; подвижная фаза: 40% EtOH (содержащая 0,5% N,N-диметилэтиламин) в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 260 нм) или с помощью хиральной аналитической ВЭЖХ (97,4% э.и., R_t: 6,48 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 100% EtOH (содержащий 0,2% изопропиламина), скорость потока: 1 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм).

Вышеуказанная очистка также дает элюирующийся вторым энантиомер (изомер 2). ЭС/МС (m/z): 275,1 (M+H). Энантиомерное обогащение изомером 2 подтверждали хиральной аналитической СФХ (97,2% э.и., R_t: 1,85 мин, колонка CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 40% EtOH (содержащая 0,5% N, N-диметилэтиламин) в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 260 нм) или с помощью хиральной аналитической ВЭЖХ (97,6% э.и., R_t: 5,31 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 100% EtOH (содержащий 0,2% изопропиламина), скорость потока: 1 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм).

Синтез 5. Синтез (R)-2-метил-N-{1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этилиден}пропан-2-сульфинамида.

К смеси 1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этанона (синтез 1) (3,0 г, 11,0 ммоль) и (R)-2-метилпропан-2-сульфинамида (1,6 г, 13,2 ммоль) в ТГФ (43,9 мл) добавляли диоксид титана (IV) (5,0 г, 21,9 ммоль). Полученную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 24 ч. Реакционную смесь оставляли охлаждаться до комнатной температуры. Смесь разбавляли EtOAc (100 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (40 мл), и интенсивно перемешивали в течение 15 мин. Органический слой отделяли и водный слой дважды экстрагировали EtOAc (100 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали *in vacuo*. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле с 10-100% ACN в ДХМ с получением указанного в заголовке соединения (3,7 г, 87%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 377,0 (M+H).

Альтернативная методика выделения.

Вместо охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры ее охлаждали до 10°C, а затем фильтровали. Промывали твердое вещество толуолом и сушили, получая указанное в заголовке соединение.

Синтез 6. Синтез (R)-2-метил-N-{1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этил}пропан-2-сульфинамид, изомер А.

Смесь димера дихлор (п-цимено) рутения (II) (0,021 г, 0,033 ммоль), 2-амино-2-метил-1-пропанола (0,006 г, 0,066 ммоль) и молекулярных сит (4 Å, 0,5 г) в изо-PrOH (2 мл) нагревали до кипения с обратным холодильником, а затем охлаждали до 50°C. Добавляли раствор (R)-2-метил-N-{1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этилиден}пропана -2-сульфинамида (синтез 5) (0,5 г, 1,33 ммоль) в изо-PrOH (8,8 мл) и раствор трет-бутоксидка калия (0,019 г, 0,17 ммоль) в изо-PrOH (1,6

мл). Полученную смесь нагревали при 55°C в течение 2 ч. Затем дополнительную смесь дихлор(п-кумол)рутений димера (II) (0,021 г, 0,033 ммоль), 2-амино-2-метил-1-пропанола (0,06 г, 0,66 ммоль) и молекулярных сит (4 Å, 0,5 г) в изо-PrOH (2 мл) нагревали до кипения с обратным холодильником, охлаждали до 50°C и добавляли к вышеуказанной реакционной смеси. Раствор трет-бутоксид калия (0,019 г, 0,17 ммоль) в изопропиловом спирте (1,6 мл) добавляли к указанной выше реакционной смеси. Нагревали смесь при 55°C в течение 20 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (20 мл) и фильтровали через слой диатомовой земли. Слой промывали 5% MeOH в ДХМ и фильтрат упаривали с получением указанного в заголовке соединения с количественным выходом. ЭС/МС m/z 379,0 (M+H).

Альтернативная методика выделения.

Вместо охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры, ее охлаждали до 28-32°C, а затем фильтровали через диатомовую землю. Промывали диатомовую землю дихлорметаном и упаривали с получением указанного в заголовке соединения.

Синтез 7А и 7В. Синтез [5-(1-аминоэтил)-2,3-дигидро-1Н-индол-1-ил](тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)метанона, изомера 1.

К раствору (R)-2-метил-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}пропан-2-сульфинамида, изомер А (Синтез 6) (503 мг, 1,33 ммоль) в MeOH (6,6 мл) добавляли хлористоводородную кислоту (4 М в 1,4-диоксане, 1,66 мл, 6,64 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Упаривали и остаток очищали хроматографией с обратной фазой (Redisep Rf Gold High Performance C18, колонка с обратной фазой, 0-100% ACN в 10 мМ водном гидрокарбонате аммония). Упаривали с получением указанного в заголовке соединения (265 мг, 73%). Энантиомерное обогащение подтверждали с помощью хиральной аналитической ВЭЖХ (98,8% э.и., R_t: 6,40 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 100% EtOH (содержащая 0,2% изопропиламина), скорость потока: 1 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм). Полученное соединение является соединением 4А, изомер 1. ЭС/МС (m/z): 275,0 (M+H).

Синтез гидрохлорида [5-(1-аминоэтил)-2,3-дигидро-1Н-индол-1-ил](тетрагидро-2Н-пиран-4-ил) метанона, изомера 1.

К суспензии (R)-2-метил-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}пропан-2-сульфинамида, изомера А (162,3 г, 364 ммоль) в EtOAc (1,2 л) по каплям добавляли соляную кислоту (5,5 М в изопропиловом спирте, 400 мл, 2,20 моль) при 5°C с верхним механическим перемешиванием. После добавления 100 мл раствора кислоты охлаждающую баню убирали. Добавление продолжали и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Охлаждали до 3°C и фильтровали. Осадок на фильтре промывали 1-1,5 л EtOAc, пока промывочный раствор не станет прозрачным. Собранные твердые вещества сушили в вакуумной печи при 60°C для получения указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (96,4 г, 82,5%). Энантиомерное обогащение подтверждали хиральной аналитической ВЭЖХ (98% э.и., R_t: 6,45 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 100% EtOH (содержащая 0,2% изопропиламина), скорость потока: 1 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм). Подтверждено, что продукт является продуктом синтеза 4А, изомер 1. ЭС/МС (m/z): 275,0 (M+H). Подтверждено, что продукт является продуктом синтеза 4А, изомер 1. ЭС/МС (m/z): 275,1 (M+H).

Следующие соединения получали, по существу, аналогично способу синтеза 1.

Синт ез №	Химическое название	Физические характеристики
8	[5-бром-2,3-дигидро-1Н-индол-1-ил](тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)метанон	ЭС/МС(m/z, ⁷⁹ Br/ ⁸¹ Br): 310,0/312,0 (M + H)
9	Бензил {1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]пропил}карбамат, изомер А	ЭС/МС m/z 423,2 (M+H).

Синтез 10. Синтез трет-бутил-5-ацетил-2,3-дигидро-1Н-индол-1-карбоксилата.

В раствор 1-индолин-5-илэтанона (1,00 г, 6,02 ммоль) при 100°C в толуоле (12 мл) по каплям добавляли раствор ди-трет-бутилдикарбоната (1,97 г, 9,03 ммоль) в толуоле (12 мл) в течение 20 мин. Смесь продолжали нагревать в течение 30 мин. Реакционную смесь упаривали. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле с градиентом 15-35% (1:1 EtOAc:ДХМ) смеси изомеров гексана с получением указанного в заголовке соединения (1,52 г, 97%) в виде белого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 262,0 (M+H).

Синтез 11. Синтез трет-бутил-5-[метокси(метил)карбамоил]-2,3-дигидро-1Н-индол-1-карбоксилата.

К раствору 1-(трет-бутоксикарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоновой кислоты (14,0 г, 53,2 ммоль) в ДМФА (200 мл) и N,N-диизопропилэтиламина (28,0 мл, 161 ммоль) добавляли гексафторфосфат 1-[бис-(диметиламино)метиле]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксида (23,3 г, 61,1 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавляли гидрохлорид N,O-диметилгидроксиламина (7,26 г, 74,4 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной тем-

пературе в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия. Органический слой выделяли и водный слой дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои дважды промывали водой, добавляли насыщенный водный раствор хлорида натрия для облегчения разделения фаз. Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и фильтрат упаривали при пониженном давлении. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле с использованием 10-32% ацетона в смеси изомеров гексана с получением указанного в заголовке соединения в виде прозрачного бесцветного вязкого масла с количественным выходом. ЭС/МС (m/z): 307,0 (M+H).

Синтез 12. Синтез трет-бутил-5-пропаноил-2,3-дигидро-1H-индол-1-карбоксилата.

Раствор трет-бутил-5-[метокси(метил)карбамоил]-2,3-дигидро-1H-индол-1-карбоновой кислоты (соединение 11) (14,3 г, 46,7 ммоль) охлаждали в ТГФ (311 мл, безводный) до 0°C. По каплям добавляли этилмагнийбромид (3 M в диэтиловом эфире, 39,0 мл, 117 ммоль) в течение 25 мин. После перемешивания при 0°C в течение 1,5 ч реакционную смесь осторожно гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония. Экстрагировали три раза EtOAc. Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и фильтрат упаривали. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле с градиентом 15-30% (1:1 EtOAc:ДХМ) в смеси изомеров гексана с получением указанного в заголовке соединения (11,7 г, 91%) в виде белого твердого вещества. ЭС/МС m/z 276,0 (M+1).

Следующие соединения получали, по существу, аналогично способу синтеза 2, за исключением синтеза 14, при котором нагревание при 70°C увеличивает скорость реакции.

Синтез №	Химическое название	Физические характеристики
13	трет-Бутил-5-(N-гидроксиэтанамидоил)-2,3-дигидро-1H-индол-1-карбоксилат	ЭС/МС m/z 277,0 (M+H).
14	трет-Бутил-5-(N-гидроксипропанамидоил)-2,3-дигидро-1H-индол-1-карбоксилат	ЭС/МС m/z 291,0 (M+H).

Способ синтеза следующих соединений по существу аналогичен способу синтеза 3.

Синтез №	Химическое название	Физические характеристики
15	Рацемический трет-бутил-5-[1-аминоэтил]-2,3-дигидро-1H-индол-1-карбоксилат	ЭС/МС(m/z): 246,0 (M-NH ₂) ⁺
16	Рацемический трет-бутил-5-[1-аминопропил]-2,3-дигидро-1H-индол-1-карбоксилат	ЭС/МС(m/z): 260,1 (M-NH ₂) ⁺

Синтез 17А и В. Разделение трет-бутил-5-[1-аминопропил]-2,3-дигидро-1H-индол-1-карбоксилата, изомер 1 и трет-бутил-5-[1-аминопропил]-2,3-дигидро-1H-индола-1-карбоксилата, изомер 2 (для хирального разделения).

Рацемический трет-бутил-5-[1-аминопропил]-2,3-дигидро-1H-индол-1-карбоксилат очищали (синтез 16) с помощью хиральной хроматографии с получением элюирующегося первым энантиомера (изомер 1). МС (m/z): 260,0 (M-NH₂)⁺. Условия очистки: колонка CHIRALPAK® AD, 8×33,5 см; Подвижная фаза: 100% MeOH (содержащая 0,2% N,N-диметилэтиламин); скорость потока: 400 мл/мин; длина волны УФ: 240 нм. Энантиомерное обогащение изомером 1 подтверждали хиральной аналитической ВЭЖХ (> 99% э.и., R_t: 9,2 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 100% MeOH (содержащая 0,2% N,N-диметилэтиламин), скорость потока: 0,6 мл/мин, длина волны УФ: 280 нм).

Вышеуказанная очистка также дает элюирующийся вторым энантиомер (изомер 2). ЭС/МС (m/z): 260,0 (M-NH₂)⁺. Энантиомерное обогащение изомером 2 подтверждали хиральной аналитической ВЭЖХ (99% э.и., R_t: 14,7 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 100% MeOH (содержащая 0,2% N,N-диметилэтиламин), скорость потока: 0,6 мл/мин, длина волны УФ: 280 нм).

Синтез 18. Синтез рацемического трет-бутил-5-{1-[(4-фторбензоил)амино]этил}-2,3-дигидро-1H-индол-1-карбоксилата.

К раствору рацемического трет-бутил-5-[1-аминоэтил]-2,3-дигидро-1H-индол-1-карбоксилата (синтез 15) (3,00 г, 11,4 ммоль) в ДХМ (57 мл) добавляли N,N-диизопропилэтиламин (4,0 мл, 57,2 ммоль). Добавляли 4-фторбензоилхлорид (1,52 мл, 12,6 ммоль) и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали водой и добавляли насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия. Слои разделяли и дважды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и фильтрат упаривали. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле с градиентом 50-75% (10% ацетон в ДХМ) в смеси изомеров гексана с получением указанного в заголовке соединения (4,29 г, 98%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ЭС/МС(m/z): 407,0 (M+Na)⁺, 383,0 (M-H)⁻.

Способ синтеза следующих соединений по существу аналогичен способу синтеза 18.

Синтез №	Химическое название	Физические характеристики
19	Рацемический трет-бутил 5-{1-[(4-фторбензоил)амино]пропил}-2,3-дигидро-1Н-индол-1-карбоксилат	ЭС/МС(m/z): 421,0 (M+Na) ⁺ , 397,2 (МН) ⁻

Синтез 20. Синтез трет-бутил-5-[1-{{(бензилокси) карбонил}амино}пропил]-2,3-дигидро-1Н-индол-1-карбоксилата, изомер А.

К раствору трет-бутил-5-[1-аминопропил]-2,3-дигидро-1Н-индол-1-карбоксилата, изомера 2 (получение 17В) (3,25 г, 11,8 ммоль) в ДХМ (47,0 мл) добавляли при комнатной температуре N,N-диизопропилэтиламин (4,53 мл, 25,9 ммоль). Добавляли бензилхлорформиат (2,12 мл, 14,1 ммоль) и перемешивали в течение ночи. В реакционную смесь добавляли дополнительное количество N,N-диизопропилэтиламина (2,06 мл, 11,8 ммоль) и бензилхлорформиата (0,707 мл, 4,70 ммоль). Перемешивали в течение 30 мин. Реакционную смесь гасили водой и добавляли насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия. Слои разделяли и водный слой экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и фильтрат упаривали. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя градиентом 5-35% ацетона в смеси изомеров гексана с получением указанного в заголовке соединения (4,47 г, 93%) в виде белой пены. ЭС/МС(m/z): 433,2 (M+Na)⁺, 409,0 (МН)⁻.

Синтез 21. Синтез рацемического N-[1-(2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил)этил]-4-фторбензамида.

К смеси рацемического трет-бутил-5-{1-[(4-фторбензоил)амино]этил}-2,3-дигидро-1Н-индол-1-карбоксилата (синтез 18) (4,29 г, 11,2 ммоль) в ДХМ (112 мл) добавляли 4 М раствор соляной кислоты в 1,4-диоксане (27,9 мл, 112 ммоль). Полученную смесь нагревали при 40°C в течение 2 ч. Нейтрализовали 2N водным раствором NaOH. Добавляли 4:1 CHCl₃:ИПС для растворения смолистых твердых веществ и слои разделяли. Органический слой промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и фильтрат упаривали. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя градиентом 30-60% (25% ацетона в ДХМ) в смеси изомеров гексана с получением указанного в заголовке соединения (2,48 г, 78%) в виде не совсем белой пены. ЭС/МС (m/z): 285,0 (M+H).

Способ синтеза следующих соединений по существу аналогичен способу синтеза 21.

Синтез №	Химическое название	Физические характеристики
22	Рацемический N-[1-(2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил)пропил]-4-фторбензамид	ЭС/МС m/z 299,0 (M+H).
23	Бензил[1-(2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил)пропил]карбамат, изомер А	ЭС/МС m/z 311,2 (M+H).

Синтез 24А и В. Разделение N-[1-(2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил)этил]-4-фторбензамида, изомер 1 и N-[1-(2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил)этил]-4-фторбензамид, изомер 2 (для хирального разделения).

Рацемический N-[1-(2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил)этил]-4-фторбензамид (синтез 21) очищали с помощью хиральной СФХ с получением элюирующегося первым энантиомера (изомер 1). ЭС/МС (m/z): 285,0 (M+H). Условия очистки: колонка CHIRALPAK® AS-H, 5×15 см; Подвижная фаза: 15% изо-PrOH в CO₂; температура колонки: 40°C; скорость потока: 300 г/мин; длина волны УФ: 250 нм. Энантиомерное обогащение изомером 1 подтверждали хиральной аналитической СФХ (> 99% э.и., R_t: 1,47 мин, колонка: CHIRALPAK® AS-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 25% изо-PrOH в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 300 нм).

Вышеуказанная очистка также дает элюирующийся вторым энантиомер (изомер 2). ЭС/МС (m/z): 285,0 (M+H). Энантиомерное обогащение изомером 2 подтверждали хиральной аналитической СФХ (98,5% э.и., R_t: 2,08 мин, колонка: CHIRALPAK® AS-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 25% изо-PrOH в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ 300 нм).

Синтез 25. Синтез {5-[1-аминопропил]-2,3-дигидро-1Н-индол-1-ил}(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)метанона, изомера А.

К продутой азотом суспензии 20% гидроксида палладия на углероде (2,12 г) в EtOH (35 мл) в шейкере Парра добавляли раствор бензил{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]пропил}карбамата, изомера А (получение 9) (2,12 г, 5,02 ммоль) в EtOH (35 мл). Герметично закрывали, продували азотом, а затем водородом. Встряхивали в атмосфере водорода при 414 кПа (60 фунтов на квадратный дюйм) в течение 3,6 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь фильтровали через диатомовую землю и фильтрат упаривали, получая указанное в заголовке соединения (1,36 г, 94%) в виде серовато-белого твердого вещества. ЭС/МС m/z 289,2 (M+H).

Синтез 26. Синтез метил-2-метил-2-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]пропаноата.

К перемешиваемому раствору дициклогексиламина (1,9 мл, 9,6 ммоль) в толуоле (25 мл) в атмо-

сфере азота добавляли *n*-бутиллитий (3,6 мл, 8,9 ммоль, 2,2 М в смеси изомеров гексана) при 0°C и перемешивали в течение 20 мин. К предварительно приготовленной смеси добавляли по каплям раствор метилизобутирата (0,83 г, 8,2 ммоль) в толуоле (5 мл) и перемешивали в течение 30 мин при 0°C. Добавляли [5-бром-2,3-дигидро-1*H*-индол-1-ил](тетрагидро-2*H*-пиран-4-ил) метанон (синтез 8) (2,3 г, 7,4 ммоль) и дегазировали полученную смесь азотом. Добавляли ди- μ -бромбис(три-трет-бутилфосфин)дипалладий (I) (50 мг, 0,06 ммоль) и давали полученной смеси нагреться до комнатной температуры в атмосфере азота. Через 2 ч добавляли вторую порцию ди- μ -бромбис(три-трет-бутилфосфин)дипалладия (I) (50 мг, 0,06 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение ночи. Разбавляли EtOAc и водным раствором 1 N HCl, и перемешивали в течение 10 мин. Фильтровали и промывали твердые вещества EtOAc. Слои фильтрата разделяли и промывали органический слой насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия и хлорида натрия.

Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и фильтрат упаривали при пониженном давлении. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле с 20-60% EtOAc в смеси изомеров гексана с получением указанного в заголовке соединения (2,3 г, выход 94%, чистоту 89%) в виде белого твердого вещества. ЭС/МС (*m/z*): 332,2 (M+H).

Синтез 27. Синтез 2-метил-2-[1-(тетрагидро-2*H*-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1*H*-индол-5-ил]пропановой кислоты.

Растворяли метил-2-метил-2-[1-(тетрагидро-2*H*-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1*H*-индол-5-ил]пропионовую кислоту (синтез 26) (2,2 г, 6,6 ммоль) в ТГФ (66 мл) и добавляли триметилсиланолат калия (1,1 г, 8,6 ммоль). Перемешивали при комнатной температуре в течение четырех дней. Твердые вещества отфильтровывали и промывали ТГФ. Твердые вещества растворяли в воде и подкисляли водным раствором 5 N HCl. Охлаждали в холодильнике в течение 30 мин. Фильтрат собирали для получения указанного в заголовке соединения (1,20 г, 57%) в виде белого твердого вещества. ЭС/МС (*m/z*): 318,0 (M+H).

Синтез 28. Синтез 2-метил-2-[1-(тетрагидро-2*H*-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1*H*-индол-5-ил]пропанамид.

К перемешиваемому раствору 2-метил-2-[1-(тетрагидро-2*H*-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1*H*-индол-5-ил]пропионовой кислоты (синтез 27) (202 мг, 0,636 ммоль) в ДХМ (6,4 мл) добавляли 1,1'-карбонилдимидазол (126 мг, 0,763 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 45 мин. Добавляли гидроксид аммония (1 мл, 9,55 ммоль, 25% мас./об. в воде) и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 90 мин. Добавляли ДМФА (3 мл) для обеспечения растворимости и продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 2 ч. Упаривали и очищали колоночной хроматографией на силикагеле с 0-10% EtOH в ДХМ с получением указанного в заголовке соединения (180 мг, 89%) в виде белого твердого вещества. ЭС/МС (*m/z*): 317,0 (M+H).

Синтез 29. Синтез [5-(1-амино-1-метилэтил)-2,3-дигидро-1*H*-индол-1-ил](тетрагидропиран-4-ил)метанона.

Добавляли [бис-(трифторацетокси)йод]бензол (115 мг, 0,26 ммоль) к перемешиваемой смеси 2-метил-2-[1-(тетрагидро-2*H*-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1*H*-индол-5-ил]пропанамид (синтез 28) (81 мг, 0,26 ммоль) в ACN (0,25 мл) и воде (0,25 мл) и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение ночи. Упаривали с получением указанного в заголовке соединения (140 мг, 94%, 50% чистого вещества) в виде светло-розового твердого вещества. ЭС/МС *m/z* 289,2 (M+H).

Синтез 30. Синтез метил-4-фтор-2-[(2-гидроксиэтил)амино]бензоата.

Смесь нагревали метил-2-амино-4-фторбензоата (2,81 г, 15,9 ммоль) и 2-йодэтанола (0,879 мл, 11,2 ммоль) до 90°C в течение 6 ч, затем охлаждали до комнатной температуры. Чистую смесь растворяли в EtOAc, промывали три раза водным раствором 1N NaOH, затем насыщенным раствором хлорида натрия. Сушили органический слой над безводным сульфатом магния, фильтровали и фильтрат упаривали, получая 2,94 г светло-коричневого масла. Добавляли 2-йодэтанола (1,26 мл, 15,9 ммоль) и смесь нагревали при 100°C в течение ночи. Добавляли дополнительное количество 2-йодэтанола (0,314 мл, 3,99 ммоль) и продолжали нагревание при 100°C в течение 2 ч. Охлаждали до комнатной температуры. Чистую смесь растворяли в EtOAc, промывали три раза водным раствором 1 N NaOH, затем насыщенным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и фильтрат упаривали, получая 2,50 г коричневого твердого вещества. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле с градиентом 20-40% EtOAc в смеси изомеров гексана с получением указанного в заголовке соединения (1,12 г, 33%) в виде белого твердого вещества. ЭС/МС (*m/z*): 214,0 (M+H).

Синтез 31. Синтез 4-фтор-2-[(2-гидроксиэтил)амино]бензойной кислоты.

К перемешиваемому раствору метил-4-фтор-2-[(2-гидроксиэтил)амино]бензоата (синтез 30) (104 мг, 0,488 ммоль) в 1,4-диоксане (2,4 мл) добавляли гидроксид натрия (0,49 мл, 2,4 ммоль, 5 М в воде). Перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем нагревали до 70°C в течение 2 ч. Упаривали и подкисляли примерно до pH 1-2 водной 1N HCl, дважды экстрагировали ДХМ. Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и фильтрат упаривали, полу-

чая указанное в заголовке соединение (89 мг, 92%) в виде коричневых твердых веществ. ЭС/МС (m/z): 200,0 (M+H).

Контрольный способ синтеза 1. Синтез 1-(2,4-дифторфенил)-3-(2,3-дигидро-1H-индол-5-илметил)мочевини.

Смесь трет-бутил-5-(аминометил) индолин-1-карбоксилата (4,1 г, 17 ммоль) и 2,4-дифтор-1-изоцианатобензола (3 мл, 24 ммоль) в ДХМ (100 мл) перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь гасили MeOH и водой, и упаривали. Остаток растворяли в ДХМ (30 мл) и добавляли ТФУ (15 мл) и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 2 ч. Упаривали и добавляли насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия. Смесь экстрагировали MeOH/ДХМ (1/5, об./об.). Органический слой сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и фильтрат упаривали при пониженном давлении. Перекристаллизовывали из EtOH, получая две фракции. Фракции объединяли с получением указанного в заголовке соединения (3,5 г, 68%). ЭС/МС m/z 304,0 (M+H).

Контрольный способ синтеза 2. Синтез 1-(2,4-дифторфенил)-3-[-(3,4,5-трибромбензоил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]метил}мочевина.

Раствор 1-(2,4-дифторфенил)-3-(2,3-дигидро-1H-индол-5-илметил)мочевини (эталонный препарат 1) (70 мг, 0,23 ммоль), 3,4,5-трибромбензойной кислоты (170 мг, 0,24 ммоль) и гексафторфосфата 3-оксида 1-[бис-(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния (134 мг, 0,35 ммоль) в ДМФА (2 мл) дегазировали (N₂). Добавляли ТЭА (0,08 мл, 0,6 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь непосредственно очищали путем очистки с обратной фазой (колонка: Redisep Rf Gold Высокоэффективная колонка с обратной фазой C18, элюент: А: 10 мМ гидрокарбоната аммония в воде с 5% MeOH (pH 10), В: ACN, градиент: 40% В в течение 5 мин, затем 40-95% В в течение 15 мин, скорость потока 60 мл/мин, длина волны УФ 219/254 нМ) и продукт выделяли лиофилизацией с получением указанного в заголовке соединения (149 мг, 54%). ЭС/МС(m/z, ⁷⁹Br/⁸¹Br): 644,0/646,0 (M+H).

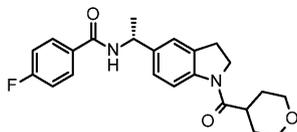
Пример 1. Рацемический 4-фтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этил}бензамид



Рацемический [5-(1-аминоэтил)-2,3-дигидро-1H-индол-1-ил](тетрагидро-2H-пиран-4-ил)метанон (синтез 3) (420 мг, 1,53 ммоль) и 4-фторбензойную кислоту (257 мг, 1,84 ммоль) добавляли в ДХМ (15 мл). К перемешиваемому раствору добавляли N,N-диизопропилэтиламин (534 μL, 3,06 ммоль) и 1-[бис-(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксид-гексафторфосфат (890 мг, 2,30 ммоль). Перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 16 ч. Выпаривали растворитель и очищали колоночной хроматографией с обратной фазой (Redisep Rf Gold Высокоэффективная колонка с обратной фазой C18, 25-100% ACN в 10 мМ водном гидрокарбонате аммония) с получением указанного в заголовке соединения (372 мг, 61%). ЭС/МС m/z 397,2 (M+H). ¹H ЯМР (DMCO-d₆) δ 8,73 (д, J=8 Гц, 1H), 7,98 (д, J=8 Гц, 1H), 7,93-7,89 (м, 2H), 7,28-7,23 (м, 2H), 7,22 (с, 1H), 7,12 (д, J=8 Гц, 1H), 5,07 (квин, J=8 Гц, 1H), 4,14 (т, J=8 Гц, 2H), 3,85 (м, 2H), 3,36 (м, 2H), 3,09 (т, J=8 Гц, 2H), 2,80 (м, 1H), 1,57-1,66 (м, 4H), 1,41 (д, J=7 Гц, 3H).

Пример 1А. 4-Фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этил}бензамид.

Способ синтеза 1



Рацемический 4-фтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этил}бензамид (пример 1) очищали с помощью хиральной СФХ для получения элюирующегося первым энантиомера в качестве указанного в заголовке соединения. ЭС/МС m/z 397,0 (M+H). Условия очистки: колонка CHIRALPAK® AD-H, 21×150 мм; Подвижная фаза: 40% MeOH в CO₂; температура колонки: 40°C; скорость потока: 70 г/мин; длина волны УФ: 225 нм. Энантиомерное обогащение изомером 1 подтверждали хиральной аналитической СФХ (> 99% э.и., R_t: 1,72 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 40% MeOH в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм). ¹H ЯМР (DMCO-d₆) δ 8,73 (д, J=8 Гц, 1H), 7,98 (д, J=8 Гц, 1H), 7,93-7,89 (м, 2H), 7,28-7,23 (м, 2H), 7,22 (с, 1H), 7,12 (д, J=8 Гц, 1H), 5,07 (квин, J=8 Гц, 1H), 4,14 (т, J=8 Гц, 2H), 3,85 (м, 2H), 3,36 (м, 2H), 3,09 (т, J=8 Гц, 2H), 2,80 (м, 1H), 1,57-1,66 (м, 4H), 1,41 (д, J=7 Гц, 3H).

Способ синтеза 2.

К раствору [5-(1-аминоэтил)-2,3-дигидро-1H-индол 1-ил](тетрагидро-2H-пиран-4-ил)метанола, изо-

мер 1 (синтез 4А) (9,65 г, 35,2 ммоль) в ДХМ (176 мл) при 0°C добавляли ТЭА (9,8 мл, 70,3 ммоль), а затем 4-фторбензоилхлорид (5,85 г, 36,9 ммоль). Смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (300 мл), фильтровали через слой силикагеля и промывали EtOAc. Фильтрат упаривали и очищали колоночной хроматографией на силикагеле с градиентом от 25 до 30% ACN в ДХМ с получением указанного в заголовке соединения (9,4 г, 67,1%) в виде не совсем белого твердого вещества. МС (m/z) 397,2 [M+H]. Энантиомерное обогащение подтверждали хиральной аналитической СФХ (> 99% э.и., R_t: 1,74 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 40% MeOH в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ: 225 нм). ¹H ЯМР (DMCO-d₆) δ 8,73 (д, J=8 Гц, 1H), 7,98 (д, J=8 Гц, 1H), 7,93-7,89 (м, 2H), 7,28-7,23 (м, 2H), 7,22 (с, 1H), 7,12 (д, J=8 Гц, 1H), 5,07 (квин, J=8 Гц, 1H), 4,14 (т, J=8 Гц, 2H), 3,85 (м, 2H), 3,36 (м, 2H), 3,09 (т, J=8 Гц, 2H), 2,80 (м, 1H), 1,57-1,66 (м, 4H), 1,41 (д, J=7 Гц, 3H).

Способ синтеза 3.

К смеси [5-(1-аминоэтил)-2,3-дигидро-1H-индол-1-ил](тетрагидро-2H-пиран-4-ил) метанола, изомер 1 (синтез 7В) (70 г, 225 ммоль) в ДХМ (700 мл) при температуре 0-5°C добавляли ТЭА (65 мл, 468 ммоль). По каплям добавляли хлорид 4-фторбензоила (37,85 г, 239 ммоль). Смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Добавляли воду по каплям с такой скоростью, чтобы температуру поддерживать ниже 30°C и смесь перемешивали при 20-30°C в течение 1 ч. Слои разделяли и органический слой промывали насыщенным водным раствором H₂SO₄. Слои разделяли, а органический слой промывали водой. Слои разделяли, а затем пропускали органический раствор через угольный фильтр. Раствор обрабатывали SI-Thiol (7 г) и смесь нагревали до 40°C. Полученную смесь перемешивали в течение 12 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через диатомовую землю. Органический слой упаривали до 200 мл (~3 об.). Добавляли ацетон (140 мл, 2 объема) и полученную смесь упаривали до 200 мл (~3 об.). Обрабатывали дополнительным количеством ацетона (280 мл, 4 об.) и водой (280 мл, 4 объема). Нагревали при 65°C в течение 2 ч, пока реакционная смесь не станет прозрачным раствором. Медленно охлаждали до 30°C в течение 3 ч. Перемешивали при 30°C в течение 1 ч. По каплям добавляли воду (140 мл, 2 объема) и продолжали перемешивание при 30°C в течение 1 ч. Медленно охлаждали до 3-8°C в течение примерно 2 ч. Перемешивали при этой температуре в течение 6 ч. Фильтровали и промывали твердые вещества водой (140 мл, 2 об.). Твердые вещества сушили при 55°C в течение 4-6 ч. Желаемый продукт получали в виде белого твердого вещества (55 г, 61,6%).

Методика получения порошковой рентгеновской дифрактограммы для примера 1А.

ПРД кристаллических твердых веществ записывали на дифрактометре рентгеновской порошковой дифракции Bruker D4 Endeavor, оснащенном источником CuKα (λ=1,54060 Å) и детектором Vantec, работающая при 35 кВ и 50 мА. Образец сканировали от 4 до 40° 2θ с размером шага 0,0087° 2θ и скоростью сканирования 0,5 с/шаг, и с щелью расходимости 0,6 мм, с неподвижной антирассеивающей щелью 5,28 мм и щелью детектора 9,5 мм. Сухой порошок упаковывали на кварцевый держатель образца и создавали гладкую поверхность с помощью предметного стекла. Диаграммы дифракции кристаллической формы получали при температуре и относительной влажности окружающей среды.

Методика получения рентгеновской порошковой дифрактограммы для 1А способ 3.

Приготовленный образец примера 1А (синтетический способ 3) характеризовали с помощью ПРД с использованием излучения CuKα, как имеющего дифракционные пики (значения 2-тета), как описано в табл. 1 ниже. В частности, диаграмма содержала пик при 17,38° в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 12,51, 15,65, 16,37, 17,56, 21,48 и 25,23° с допуском для углов дифракции 0,2 градуса (2θ±0.2°).

Таблица 1

Пики порошковой рентгеновской дифракции примера 1А способ 3

Пик	Угол (2-тета °)	Интенсивность (%)
1	9,99	13
2	12,51	73
3	15,65	90
4	16,37	57
5	17,38	100
6	17,56	62
7	18,79	25
8	19,81	38
9	21,48	56
10	23,38	43
11	24,41	21
12	24,70	17
13	25,23	64
14	25,46	28
15	27,69	15

Определение абсолютной конфигурации для соединения примера 1А.

Получали монокристалл 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамида суспендированием 10 мг 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамида в 1:1 ЕтОН/гептан (1,75 мл) и перемешивали на орбитальном шейкере в течение трех дней. Использовали бесцветный пластинчатый образец 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамида, приближенные размеры 0,020×0,080×0,300 мм, для рентгеноструктурного анализа. Измеряли данные интенсивности рентгеновских лучей, используя источник излучения μ , CuK ($\lambda=1.54178 \text{ \AA}$) и 3-кружный гониометр дифрактометра Bruker D8 Venture оснащенный детектором области Photon 100 SL. Собирали в общей сложности 8840 сканов. Комбинировали сканы с использованием программного обеспечения Bruker SAINT с использованием узкокадрового алгоритма. Интегрирование данных с использованием моноклинной элементарной ячейки приводило в общей сложности к 7242 отражений до максимального θ -угла $68,28^\circ$ (разрешение $0,83 \text{ \AA}$), из которых 3059 независимы (средняя избыточность 2,367, полнота=95,9%, $R_{int}=5,83\%$ $R_{sig}=6,58\%$) и 2893 (94,57%) больше, чем 2σ (F_2). Конечные константы ячейки $a=5,5831$ (13) \AA , $b=5,1082$ (9) \AA , $c=35,013$ (6) \AA , $\beta=90,578$ (17) $^\circ$, объем=998,5 (3) \AA^3 , основаны на уточнение XYZ-центроидов 6280 отражений выше $20 \sigma(I)$ с $10,09^\circ < 2\theta < 136,8^\circ$. Исправляли данные для эффектов поглощения с использованием метода многосканирования (SADABS). Соотношение минимальной и максимальной видимой передачи составляло 0,784. Рассчитанные минимальные и максимальные коэффициенты передачи (на основе размера кристалла) составляют 0,8020 и 0,9850. Решали и уточняли структуру, используя программный пакет Bruker SHELXTL, используя пространственную группу P21, с $Z=2$ для единицы формулы, C23 H25 FN2O3. Окончательное анизотропное полномасштабное уточнение наименьших квадратов на F_2 с 264 переменными сходится при $R_1=9,17\%$, для наблюдаемых данных и $wR_2=23,48\%$ для всех данных. Критерий согласности составляет 1,141. Наибольший пик в окончательной разностной электронной плотности составляет $0,506 \text{ e-/\AA}^3$, а наибольшее отверстие составляет $-0,388 \text{ e-/\AA}^3$ с среднеквадратичным отклонением $0,088 \text{ e-/\AA}^3$. На основе конечной модели расчетная плотность составляет $1,319 \text{ г/см}^3$ и $F(000)$, 420e-. Уточняли значение параметра абсолютной структуры $0,12(16)$, проверяя стереохимию хирального центра. Абсолютная конфигурация определяется как R-конфигурация в стереоцентре.

Пример 1В. 4-Фтор-N-{(1S)-1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, изомер 2

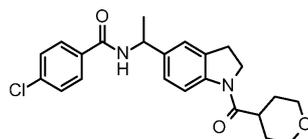


Рацемический 4-фтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид (пример 1) очищали с помощью хиральной хроматографии для получения элюирующегося вторым энантиомера в качестве указанного в заголовке соединения. ЭС/МС m/z 397,0 ($M+H$). Условия очистки: Колонка: CHIRALPAK® AD-H, 21×150 мм; Подвижная фаза: 40% MeOH в CO_2 ; температура колонки: $40^\circ C$; скорость потока: 70 г/мин; длина волны УФ: 225 нм. Энантиомерное обогащение изомером 2 подтверждали хиральной аналитической СФХ (98,3% э.и., R_t : 2,37 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 40% MeOH в CO_2 , скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм). 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ 8.73 (д, $J=8$ Гц, 1H), 7.98 (д, $J=8$ Гц, 1H), 7.93-7.89 (м, 2H), 7.28-7.23 (м, 2H), 7.22 (с, 1H), 7.12 (д, $J=8$ Гц, 1H), 5.07 (квин, $J=8$ Гц, 1H), 4.14 (т, $J=8$ Гц, 2H), 3.85 (м, 2H), 3.36 (м, 2H), 3.09 (т, $J=8$ Гц, 2H), 2.80 (м, 1H), 1.57-1.66 (м, 4H), 1.41 (д, $J=7$ Гц, 3H).

Соединение примера 2 получали по существу аналогично соединению примера 1, используя исходный материал из синтеза 3.

Прим. №	Химическое название	Структура	Физические характеристики
2	Рацемический 4-хлор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид		ЭС/МС (m/z): 413,0 ($M+H$).

Примеры 2А и 2В. 4-Хлор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, изомер 1 и 4-хлор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, изомер 2



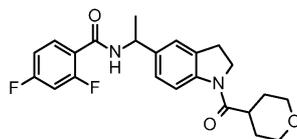
Рацемический 4-хлор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид (пример 2) очищали с помощью хиральной СФХ для получения элюирующегося первым энантиомера (изомер 1). ЭС/МС (m/z): 413,0 (M+H). Условия очистки: CHIRALPAK® AD-H, 21×150 мм; Подвижная фаза: 40% изо-PrOH в CO₂; скорость потока: 70 г/мин; длина волны УФ: 260 нм. Энантиомерное обогащение изомером 1 подтверждали хиральной аналитической СФХ (> 99% э.и., R_t = 1,97 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 40% изо-PrOH в CO₂, температура колонки: 40°C, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм).

Вышеуказанная очистка также дает элюирующийся вторым энантиомер (изомер 2). ЭС/МС (m/z): 413,0 (M+H). Энантиомерное обогащение изомером 2 подтверждали хиральной аналитической СФХ (> 99% э.и., R_t: 3,04 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 40% изо-PrOH в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм).

Соединения примеров 3-9 получали по существу аналогично соединению примера 1, используя исходные вещества из синтеза 3.

Пример №	Химическое название	Структура	Физические характеристики
3	Рацемический 4-циано-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид		ЭС/МС (m/z): 404,4 (M+H).
4	Рацемический N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид		ЭС/МС (m/z): 379,4 (M+H).
5	Рацемический 4-метил-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид		ЭС/МС (m/z): 393,4 (M+H).
6	Рацемический 4-хлор-3-фтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид		ЭС/МС (m/z): 431,4 (M+H).
7	Рацемический 3-хлор-4-фтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид		ЭС/МС (m/z): 431,4 (M+H).
8	Рацемический 4-этилен-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид		ЭС/МС (m/z): 405,4 (M+H).
9	Рацемический 2,4-дифтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид		ЭС/МС (m/z): 415,0 (M+H).

Пример 9А и В. 2,4-Дифтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, изомер 1 и 2,4-дифтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, изомер 2



Рацемический 2,4-дифтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил) -2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид (пример 9) очищали с помощью хиральной СФХ для получения элюирующегося первым энантиомера (изомер 1). ЭС/МС (m/z): 415,0 (M+H). Условия очистки: колонка CHIRALPAK® AD-H, 21×150 мм; Подвижная фаза: 40% MeOH в CO₂; температура колонки: 40°C; скорость потока: 70 г/мин; длина волны УФ: 225 нм. Энантиомерное обогащение изомером 1 подтверждали хиральной аналитической СФХ (98,6% э.и., R_t: 1,72 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 40% MeOH в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм).

Вышеуказанная очистка также дает элюирующийся вторым изомер 2. ЭС/МС (m/z): 415,2 (M+H). Энантиомерное обогащение изомером 2 подтверждали хиральной аналитической СФХ (98,5% э.и., R_t: 2,60 мин, колонка: CHIRALPAK® AD-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 40% MeOH в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм).

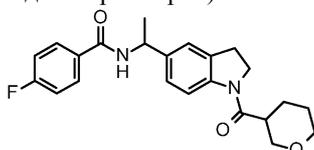
Соединения примеров 10-13 получали по существу аналогично соединению примера 1, используя исходный материал из синтеза 7.

Пример №	Химическое название	Структура	Физические характеристики
10	4-(Диформетил)-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, изомер А		ЭС/МС (m/z): 429,0 (M+H).
11	4-(Форметил)-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, изомер А		ЭС/МС m/z 411,2 (M+H).
12	2-(Бензилокси)-4-(фтор)-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, Изомер А		ЭС/МС m/z 503,2 (M+H).
13	4-Фтор-2-[(2-гидроксиэтил)амино]-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, изомер А		ЭС/МС m/z 456,2 (M+H).

Соединения примеров 14 и 15, получали по существу аналогично соединению примера 1А, используя исходный синтетический способ 2.

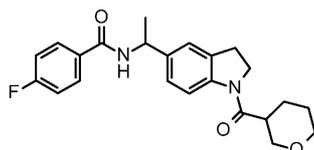
Пример №	Химическое название	Структура	Физические характеристики
14	4-Фтор-N-{2-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]пропан-2-ил}бензамид		ЭС/МС m/z 411,2 (M+H).
15	4-Циано-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]пропил}бензамид, изомер А		ЭС/МС m/z 418,2 (M+H).

Пример 16. Диастереомерный 4-фтор-N-[1-{1-[тетрагидро-2Н-пиран-3-илкарбонил]-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил}этил]бензамида (смесь 2 диастереомеров)



Смесь N-[1-(2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил) этил]-4-фторбензамида, изомер 1 (Синтез 24А) (150 мг, 0,528 ммоль), рацемической тетрагидропиран-3-карбоновой кислоты (100 мг, 0,739 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (0,277 мл, 1,58 ммоль) в ДХМ (5,28 мл) обработали 1-[бис-(диметиламино)метил]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксид гексафторфосфатом (304 мг, 0,791 ммоль). Перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Разбавляли реакционную смесь ДХМ (10 мл). Добавляли воду и насыщенный водный раствор бикарбоната натрия. Слои разделяли и водный слой экстрагировали ДХМ. Пропускали объединенный органический слой через гидрофобную мембрану (картридж для сепаратора фазы ISOLUTE®) и сконцентрировали фильтрат. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя градиентом 20-55% ацетона в гексанах с получением указанного в заголовке соединения (184 мг, 88%) в виде белого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 397,2 (M+H).

Пример 16А и В. 4-Фтор-N-[1-{1-[тетрагидро-2Н-пиран-3-илкарбонил]-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил}этил]бензамид, изомер 1 и 4-фтор-N-[1-{1-[тетрагидро-2Н-пиран-3-илкарбонил]-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил}этил]бензамид, изомер 2



Очищали диастереомерный 4-фтор-N-[1-{1-[тетрагидро-2Н-пиран-3-илкарбонил]-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил}этил]бензамид (пример 16) с помощью хиральной хроматографии с получением элюирующегося первым диастереомера (изомер 1). МС (m/z) 397,2 [M+H]. Условия очистки: CHIRALCEL® OJ-H, 30×250 мм; Подвижная фаза: 100% MeOH; скорость потока: 30 мл/мин; длина волны УФ: 225 нм. Энантиомерное обогащение изомером 1 подтверждали хиральной аналитической ВЭЖХ (> 99% de, R_t: 3,42 мин, колонка CHIRALCEL® OJ-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 100% MeOH (содержащий 0,2% изопропиламина), скорость потока: 1 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм).

Вышеуказанная очистка также дает элюирующийся вторым (изомер 2). ЭС/МС m/z 397,2 (M+H). Энантиомерное обогащение изомером 2 подтверждали хиральной аналитической ВЭЖХ (97,8% de, R_t: 4,66 мин, колонка CHIRALCEL® OJ-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 100% MeOH (содержащая 0,2% изопропиламина), скорость потока: 1 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм).

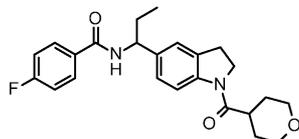
Пример 17. 4-Фтор-2-гидрокси-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил}бензамид, изомер А



К продукту азотом раствору 2-(бензилокси)-4-фтор-N-[1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]этил]бензамида, изомера А (пример 12) (96,0 мг, 0,19 ммоль) в этаноле (2

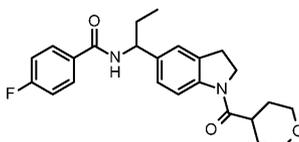
мл) добавляли 10% Pd/C (10 мг) и гидрировали 1 атм (101 кПа) водорода при комнатной температуре в течение 1 ч. Фильтровали через диатомовую землю и концентрировали фильтрат, получая требуемое соединение (66 мг, 84%) в виде белого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 413,0 (M+H).

Пример 18. Рацемический 4-фтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]пропил}бензамид



К смеси рацемического N-[1-(2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил)пропил]-4-фторбензамида (препарат 22) (200 мг, 0,650 ммоль) в ДХМ (6,5 мл) добавляли N, N-диизопропилэтиламин (0,228 мл, 1,30 ммоль). Добавляли тетрагидропиран-4-карбонилхлорид (110 мг, 0,715 ммоль) и перемешивали в течение 30 мин. Разбавляли реакционную смесь ДХМ (10 мл). Добавляли воду и насыщенный водный раствор бикарбоната натрия. Слои разделяли и водный слой экстрагировали ДХМ. Пропускали объединенный органический слой через гидрофобную мембрану (картридж для сепаратора фазы ISOLUTE®) и сконцентрировали фильтрат. Очищали с помощью хроматографии на колонке с силикагелем, элюируя градиентом 20-60% ацетона в смеси изомеров гексана с получением указанного в заголовке соединения в виде пены персикового цвета (244 мг, 91%). ЭС/МС m/z 411,2 (M+H).

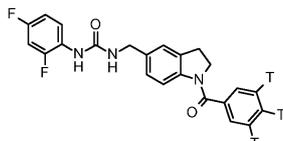
Пример 18А и В. 4-Фтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]пропил}бензамид, изомер 1 и 4-фтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]пропил}бензамид, изомер 2



Рацемический 4-фтор-N-{1-[1-(тетрагидро-2Н-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]пропил}бензамид (пример 18) очищали с помощью хиральной СФХ для получения элюирующегося первым энантиомера (изомер 1). ЭС/МС m/z 411,2 (M+H). Условия очистки: CHIRALPAK® AS-H, колонка 21×150 мм; Подвижная фаза: 25% MeOH в CO₂; температура колонки: 40°C; скорость потока: 80 г/мин; длина волны УФ: 260 нм. Энантиомерное обогащение изомером 1 подтверждали хиральной аналитической СФХ (> 99% э.и., R_t: 0,92 мин, колонка: CHIRALPAK® AS-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 25% MeOH в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм).

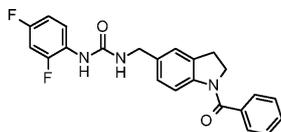
Вышеуказанная очистка также дает элюирующийся вторым энантиомер (изомер 2). ЭС/МС m/z 411,2 (M+H). Энантиомерное обогащение изомером 2 подтверждали хиральной аналитической СФХ (> 99% э.и., R_t: 1,53 мин, колонка: CHIRALPAK® AS-H, 4,6×150 мм, подвижная фаза: 25% MeOH в CO₂, скорость потока: 5 мл/мин, длина волны УФ: 225 нм).

Ссылочный пример 1. 1-(2,4-Дифторфенил)-3-{[1-(3,4,5-трибромбензоил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]метил}мочевина



В колбе для тритирования перемешивали 1-(2,4-дифторфенил)-3-{[1-(3,4,5-трибромбензоил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]метил}мочевину (3 мг, 0,005 ммоль), палладий (10% на угле, 3 мг) и N,N-диизопропилэтиламин (10 мкл, 0,06 ммоль) в ДМФ (1 мл) при 3 Ки трития в течение 3 ч. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат упаривали совместно с EtOH для удаления лабильного трития. Остаток растворяли в EtOH и очищали хроматографией на колонке с обратной фазой (колонка: GEMINI® C18 250×10 мм, подвижная фаза: А: вода/ТФУ (1000:1), В: АСН/ТФУ (1000: 1), градиент: 20-70% в течение 60 мин, скорость потока 3 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения, которое растворяли в EtOH. МС: 414,19 (M+H) и 74 Ки/ммоль.

Ссылочный пример 2. 1-(2,4-Дифторфенил)-3-{[1-(фенилкарбонил)-2,3-дигидро-1Н-индол-5-ил]метил}мочевина



1-(2,4-Дифторфенил)-3-(2,3-дигидро-1Н-индол-5-илметил)мочевину (300 мг, 0,99 ммоль) в ДХМ (20 мл) растворяли и добавляли бензоилхлорид (0,13 мл, 1,1 ммоль) и ТЭА (0,27 мл, 1,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Концентрировали и очищали оста-

ток на колонке с обратной фазой (колонка: Rf Gold High Performance C18 Reverse Phase Column, подвижная фаза: А: 0,1% муравьиная кислота в воде, В: АСN, градиент: 0-80% В в течение 30 мин; скорость потока: 60 мл/мин, длина волны УФ: 219/254 нм) и выделяли продукт лиофилизацией с получением указанного в заголовке соединения (403 мг, 79%). ЭС/МС (m/z): 408,2 (M+H).

Иммунная система является критической контрольной точкой, которая сдерживает развитие опухоли. Таким образом, рак развил много механизмов, чтобы уклоняться, подавлять или иным образом подорвать иммунную систему. В то время как триптофан абсолютно необходим для роста раковых клеток, его деградация селективна в широком спектре раковых образований путем экспрессии индоламин 2,3-диоксигеназы (IDO1) либо самой раковой клеткой (внутренней), либо клетками в микроокружении или опухолевыми дренирующими лимфатическими узлами (TDLN) (внешние). Селективная активация IDO1 в микроокружении опухоли в сочетании с быстрым ростом клеток обеспечивает опухоль эффективной стратегией, позволяющей избежать иммунного надзора, критической контрольной точки при развитии рака и устойчивости к терапии. Иммунодепрессивная активность IDO1 является прямым результатом локального источника триптофана и сопутствующего продуцирования кинуренина, оба из которых являются иммунодепрессивными.

Иммунодепрессивная роль активности IDO1 влияет на несколько типов клеток, включая подавление клеток [Т-клетки (Frumento, et al. (2002) *J Exp Med* 196 (4): 459-468; Terness, et al. (2002) *J Exp Med* 196 (4): 447-457) и NK-клетки (Delia Chiesa, et al. (2006) *Blood* 108 (13): 4118-4125)], развитие клеток [регуляторные Т-клетки (Sharma, et al. (2007) *J Clin Invest* 117 (9): 2570-2582; Chen, et al. (2008) *J Immunol* 181(8): 5396-5404; Baban, et al. (2009) *J Immunol* 183 (4): 2475-2483)] и супрессивные антигенпредставляющие клетки [супрессивные дендритные клетки и макрофаги (Munn, et al. (2004) *J Clin Invest* 114 (2): 280-290; Munn, et al. (2005) *Immunity* 22(5): 633-642; Sharma, et al. (2007) *J Clin Invest* 117 (9): 2570-2582)], а также рекрутинг и расширение [миелоидные супрессорные клетки (Yu, et al. (2014) *J Immunol* 193 (5): 2574-2586; Holmgaard, et al. (2015) *Cell Rep* 13 (2): 412-424)]. Активность IDO1 проявляет эти эффекты за счет истощения триптофана и сопутствующего увеличения кинуренина в опухоли, микроокружении опухоли и TDLN.

Как местное истощение триптофана, так и продуцирование кинуренина с помощью экспрессии IDO1 в микроокружении опухоли или в TDLN поддерживают развитие и активацию Tregs (Sharma et al. (2007) *J Clin Invest* 117 (9): 2570-2582), MDSCs (Holmgaard, et al. (2015) *Cell Rep* 13 (2): 412-424) и регуляторных дендритных клеток (Sharma, et al. (2007) *J Clin Invest* 117 (9): 2570-2582), все из которых играют иммуносупрессивные роли, которые поддерживают рост опухоли. Истощение триптофана поддерживает развитие Treg посредством активации стресс реагирующей киназы GCN2, которая стимулируется в ответ на накопление незаряженных tРНК. Т-клетки, лишённые GCN2, не восприимчивы к опосредованному IDO1 ингибированию пролиферации или индукции аневрического фенотипа (Munn, et al. (2005) *Immunity* 22(5): 633-642). В дополнение к истощению триптофана активность IDO1 приводит к высоким концентрациям нижестоящего в цепи метаболита кинуренина, важной иммуносупрессивной молекулы. Подобно истощению триптофана, активация ариловодородного рецептора (AHR) кинуренином необходима для образования регуляторных Т-клеток (Mezrich, et al. (2010) *J Immunol* 185 (6): 3190-3198), а повышенное производство кинуренина и экспрессия AHR коррелируют с плохим прогнозом в раке мозга человека (Opitz, et al. (2011) *Nature* 478(7368): 197-203). Кинуренин блокирует пролиферацию Т-клеток и NK-клеток (Boyland, et al. (1956) *Biochem J* 64 (3): 578-582) и является агонистом рецептора AHR (Mezrich, et al. (2010) *J Immunol* 185 (6): 3190-3198; Opitz, et al. (2011) *Nature* 478 (7368): 197-203), транскрипционного фактора, который регулирует врожденное иммуноопосредованное производство цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6 и IL-21, и сверхэкспрессируется в нескольких видах рака, где это считается облегчает прогрессирование опухоли и ее резистентность к терапии (Julliard, et al. (2014) *Front Immunol* 5: 458). Фактически, внутренняя экспрессия IDO1 в раке регулируется, частично, опосредованной кинуренином активацией сигнальной петли AHR-IL-6-STAT3, которая обеспечивает экспрессию IDO1 и ингибирует пролиферацию Т-клеток. Экспрессия этой сигнальной оси IDO1 связана с уменьшением выживаемости без рецидива у пациентов с раком легкого (Litzenburger, et al. (2014) *Oncotarget* 5 (4): 1038-1051). IDO1-опосредованное образование IL-6 также играет важную роль в поддержке развития проракковых MDSC и нарушения выработки IL-6 с уменьшением IDO1, ослабленной MDSC-подавляющей активностью, замедлением роста опухоли и повышенной выживаемостью в модели рака легких, индуцированного KRAS (Smith, et al. (2012) *Cancer Discov* 2 (8): 722-735). Связь между зависимым от IDO1 истощением триптофана и зависящей от кинуренина активацией AHR обеспечивает основополагающий фактор, объясняющий, почему катаболизм триптофана тесно связан с ускользанием от иммунного ответа, критической контрольной точкой, которая сдерживает прогрессирование рака. Регулирование экспрессии IDO1 в микроокружении опухолей является комплексным. IDO1 был первым открытым регулируемым геном IFN- γ (Yoshida, et al. (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (1): 129-132). Фактически, существует сильная корреляция между экспрессией IFN- γ и IDO1 во всех гистологиях рака (<http://cancergenome.nih.gov/>). Кроме того, экспрессия IDO1 активируется интерферонами I типа, лигандами TLR, TNF, IL-1, CTLA-4, CD200, GITR, CD40 и TGF- β , все из которых играют важную роль в им-

мунной системе и развитие рака, прогрессирование и ответ на терапию. Высокая активность IDO1, измеряемая экспрессией IDO1, истощением триптофана и/или увеличением кинуренина, связана с плохими прогнозами, снижением выживаемости и увеличением метастатического потенциала широкого спектра типов опухолей. Таким образом, увеличение уровня кинуренина в сыворотке с одновременным снижением триптофана подтверждается в раке молочной железы, колоректальном раке, раке головы и шеи, раке легкого и простаты (Liu, et al. (2010) *Blood* 115 (17): 3520-3530). Кроме того, IDO1 хронически активирован у больных раком (Schrocksnadel, et al. (2006) *Clin Chim Acta* 364 (1-2): 82-90), связанный с обширным заболеванием (Huang, et al. (2002) *Br J Cancer* 86 (11): 1691-1696), плохим результатом и/или устойчивостью к стандартной химиотерапии при нескольких раковых заболеваниях, включая меланому (Weinlich, et al. (2007) *Dermatology* 214(1): 8-14), острый миелоидный лейкоз (Chamuleau, et al. (2008) *Haematologica* 93 (12): 1894-1898; Corm, et al. (2009) *Leuk Res* 33 (3): 490-494), рак груди и шейки матки (Inaba, et al. (2010) *Gynecol Oncol* 117 (3): 423-428; Yu, et al. (2011) *Clin Dev Immunol* 2011: 469135; Yu, et al. (2013) *J Immunol* 190 (7): 3783-3797; Chen, et al. (2014) *Breast Cancer Res* 16(4): 410); *Clin Cancer Res*. 2007 Dec 1;13(23):6993-7002; Trott, et al. (2016). *Oncotarget*, 7 (41), 66540-66557, колоректальный рак, карциному почек, кожную меланому, диффузную большую В-клеточную лимфому, рак эндометрия, рак желудка, глиому, гепатоцеллюлярную карциному, лимфому Ходжкина, плоскоклеточную карциному гортани, рак легких, множественную миелому, неходжкинскую лимфому, пищеводная и ротовой полости плоскоклеточную карциному, остеосаркому, рак яичников, проточную карциному поджелудочной железы, лейкоз Т-клеток и карциному щитовидной железы. IFN- γ является критическим эффекторным цитокином, секретируемым в активированных NK и Т-клеток. В данное время отрицательные регуляторы, которые задействованы в ограничении активности Т-клеток либо системно (CTLA-4), либо локально (PD-L1 /L2), одобрены для использования в качестве противораковых агентов, где они усиливают торможение роста опухоли, опосредованное Т-клетками. Генетические нокауты контрольных точек, таких как CTLA-4, PD-1 или PD-L1, приводят к заметному усилению выработки IFN- γ (Latchman, et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (29): 10691-10696; Pandiyan, et al. (2007) *J Immunol* 178 (4): 2132-2140), который может взаимодействовать с иммуносупрессивной осью IFN- γ -to-IDO1. Ингибирование внутренней экспрессии IDO1 с помощью 1-метилтриптофана в модели меланомы мыши значительно улучшало эффективность Ипилимумаба, блокирующего CTLA-4 антитела (Holmgaard, et al. (2013) *J Exp Med* 210 (7): 1389-1402). Эта повышенная эффективность Ипилимумаба ассоциировалась с увеличением эффекторных клеток CD8 и уменьшением Tregs. Эти наблюдения были распространены на другие антитела, нацеленные на PD1, PD-L1 и GITR, где ингибирование IDO1 усиливало их противораковую активность. Было показано, что механистически IDO1 препятствует эффективности этих ингибиторов контрольных точек через индукцию Tregs с последующим рекрутированием MDSC, создающим иммуносупрессирующую среду в опухоли (Holmgaard et al. (2015) *Cell Rep* 13 (2): 412-424). Иммунотерапевтические подходы к лечению рака, такие как сам IFN- γ , врожденные иммунные активаторы, такие как CpG-ODN, анти-4-1BB (CD137), анти-OX40, анти-PD-1/PD-L1/PD-L2, CTLA 4 все имеют возможность активировать экспрессию IDO1, сдерживая их долгосрочную эффективность в клинике. Следовательно, может быть достигнут значительный терапевтический потенциал при сочетании ингибиторов IDO1 с этими агентами. В частности, комбинация ингибиторов IDO1 с анти-PD1-антителами (пидилизумаб, ниволумаб, пембролизумаб), анти-PD-L1 антителами (дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб), анти-CTLA-4 антителами (ипилимумаб), анти-OX40 антителами (MEDI6469, KHK4083) и анти-4-1BB (CD137) антителом (PF-05082566) обладает значительным терапевтическим потенциалом в широком диапазоне типов опухолей.

В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что ингибиторы истощения триптофана и сопутствующей выработки кинуренина, такие как ингибиторы IDO1, могут быть полезны в качестве одного агента или в комбинации во множестве типов рака как у пациентов не поддававшихся лечению, так и у пациентов с типами рака устойчивыми к лечению. Таковая полезность была продемонстрирована известными ингибиторами IDO1, такими как эпикадостат (INCB024360) и NLG919. Известно, что эпикадостат связывается с IDO1 и блокирует катаболизм триптофана и последующую выработку кинуренина как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, эпикадостат продемонстрировал эффективность в качестве единственного агента в доклинических моделях у мышей, CT26 и PAN02, эффект, который зависит от наличия Т-клеток. (Yue, et al. (2009) *J Med Chem* 52 (23): 7364-7367; Koblisch, et al. (2010) *Mol Cancer Ther* 9 (2): 489-498; Liu, et al. (2010) *Blood* 115 (17): 3520-3530; Jochems, et al. (2016) *Oncotarget*, Advance Publications). Доклиническая эффективность эпикадостата была перенесена в результаты клинических испытаний на человеке (NCT01195311).

Результаты следующих анализов демонстрируют, что соединения, примеры которых представлены в настоящем документе, пригодны в качестве ингибиторов IDO1 и могут быть применимы при лечении рака. Кроме того, результаты следующих анализов показывают, что некоторые примеры соединений связываются с IDO1 и что все примеры соединений ингибируют превращение триптофана в кинуренин в раковых клетках как *in vitro*, так и *in vivo*.

Анализ связывания с IDO1.

Целью этого анализа является демонстрация того, что некоторые примеры соединений связываются

с IDO1 *in vitro*. В частности, этот анализ оценивает способность тестируемых соединений конкурировать с молекулой тритированной 1-(2,4-дифторфенил)-3-[[1-(3,4,5-тритритибензоил)индолин-5-ил]метил]мочевины и позволяет рассчитывать аффинность связывания IC_{50} .

Конкурентное связывание 1-(2,4-дифторфенил)-3-[[1-(3,4,5-тритритибензоил)индолин-5-ил]метил]мочевины с IDO1.

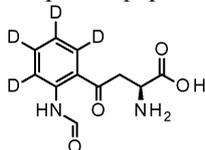
Помещали 300 нМ His₆-IDO1 (Proteros, SwissProtID P14902, кат.№ PR-0278, партия 19/59, 98 мг/мл в 25 мМ MES pH 6,5, 150 мМ KCl, чистота >95%), разбавленный в DPBS в каждую лунку с никелевым покрытием (Sigma, кат.№ S5563) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Удаляли несвязанные белки, промывая планшет 300 мкл DPBS четыре раза в BIOTEK® Microplate Washer. Добавляли 100 мкл блокирующего буфера (0,05% TWEEN® 20/DPBS) в лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре для уменьшения неспецифического связывания. В то время пока пластины блокируются, готовили 50 нМ 1-(2,4-дифторфенил)-3-[[1-(3,4,5-тритритибензоил)индолин-5-ил]метил]мочевины (Biosair, кат. № TRQ41455) разбавлением в DPBS и серийным разбавлением немеченого исходного раствора в 2,5 раза в ДМСО для получения кривой разбавления с одинадцатью точками. Добавляли 5 мкл серийных разбавленных немеченых соединений к 95 мкл 50 нМ 1-(2,4-дифторфенил)-3-[[1-(3,4,5-тритритибензоил)индолин-5-ил]метил]мочевины, добавляли смесь в лунки в планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 4 ч с осторожным встряхиванием. Для определения максимального замещения меченой тритием молекулы (1-(2,4-дифторфенил)-3-[[1-(3,4,5-тритритибензоил)индолин-5-ил]метил]мочевина), добавляли избыточное количество немеченой 1-(2,4-дифторфенил)-3-[[1-(фенилкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]метил]мочевины (ChemDiv, Кат. № G714-0242) 100 мкМ к 50 нМ 1-(2,4-дифторфенил)-3-[[1-(3,4,5-тритритибензоил)индолин-5-ил]метил]мочевины и добавляли к неспецифическим связующим контрольным лункам в планшете. После 4-часовой инкубации лунки аспирировали, используя MultiMek96, и планшет единожды быстро промывали 300 мкл ледяного DPBS с использованием промывателя Microplate BIOTEK®. Добавляли 100 мкл 100 мМ имидазола в PBS pH 7,5 в каждую лунку и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, чтобы вытеснить комплекс IDO1-лиганд из пластины с никелевым покрытием. Переносили вытесненный комплекс IDO1-лиганд в 96-луночную белую пластину с прозрачным дном (Costar, Кат. № 3632), содержащую 200 мкл Microscint-20 (Perkin Elmer, Кат. № 6013621), на лунку с использованием MultiMek96. Количественно определяли суммарное связывание и неспецифическое связывание (NSB) 1-(2,4-дифторфенил)-3-[[1-(3,4,5-тритритибензоил)индолин-5-ил]метил]мочевинного лиганда с использованием счетчика Trilux Microbeta. Использовали значения общей привязки и NSB для вычисления IC_{50} для немеченого соединения с использованием нелинейного регрессионного анализа в GraphPad Prism. Результаты этого анализа показывают, что некоторые примеры соединений связываются с IDO1. Например, примеры 1A и 1B демонстрируют значения IC_{50} менее 1,5 мкМ. Конкретно, IC_{50} для примера 1A составляет 0,033 мкМ $M \pm 0,0028$ (n=2).

Анализ выработки кинуренина (SKOV3).

Целью этого анализа является оценка ингибирования выработки кинуренина, N-формилкинуренина и делеции триптофана в экспрессирующих IDO1 раковых клетках и оценка того, являются ли соединения явно токсичными для этих клеток. Примерные соединения тестировали на ингибирование активности IDO1 в SKOV3 (ATCC, Кат. № HTB-77), клеточной линии рака яичников, которая экспрессирует IDO1. Из-за экспрессии IDO1 клетки SKOV3 деградируют триптофан с сопутствующей выработкой кинуренина, и соединения тестировали на их способность ингибировать образование кинуренина, N-формилкинуренина и делецию триптофана. Необязательно явная токсичность соединений может быть оценена путем мониторинга жизнеспособности клеток.

Синтез внутренних стандартов. Синтез N-формила L-кинуренина-d4.

(2S)-2-Амино-4-оксо-4-(2,3,4,5-тетрадейтерио-6-формаминофенил)бутановая кислота



Добавляли предварительно полученную смесь уксусного ангидрида (0,026 мл, 0,244 ммоль) в муравьиной кислоте (0,052 мл, 1,32 ммоль) к смеси L-кинуренина-d4 (56 мг, 0,244 ммоль) в муравьиной кислоте (0,132 мл). Перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 2 ч. Разбавляли реакционную смесь ACN и концентрировали в потоке азота. Очищали остаток с помощью ВЭЖХ с обратной фазой (колонка: PHENOMENEX® LUNA® 5 мкм C18 (2) 100Å AXIA, 30×75 мм, элюент: А: 0,1% муравьиная кислота/вода, В: 0,1 % муравьиной кислоты/ACN, градиент: 0% В в течение 2 мин, затем градиент до 22% В в течение 5 мин, поток: 85 мл/мин при длине волны УФ 231/214 нм) с получением 29 мг указанного в заголовке соединения в виде пушистого белого твердого вещества после лиофилизации. ЭС/МС (m/z): 241,0 (M+H).

Обработка клеток соединением и жизнеспособность клеток.

Помещали SKOV3 клетки, экспрессирующую IDO1 клеточную линию клеток яичников, 20 000 клеток на лунку в 100 мкл среды McCoys 5A (Gibco, Кат. № 16600-082), дополненной незаменимыми аминокислотами (Gibco, Кат. № 11140-050), 1 mM пирувата натрия (Gibco, Кат. № 11360-070) и 10% фетальной бычьей сыворотки, полной средой, в 96-луночный планшет для культивирования тканей (BD Biosciences). Затем инкубировали клетки в течение 16 ч в инкубаторе с температурой 37°C с 5% CO₂. Готовили серийные разведения соединения из 10 mM исходных растворов тестируемых соединений в ДМСО. Последовательно разбавляли исходный раствор 3 раза в ДМСО и переносили 5 мкл раствора соединений на промежуточный дозирующий планшет, содержащий 95 мкл полной среды, чтобы получить десятиточечную кривую разбавления с конечными концентрациями соединений в пределах от 1 мкМ до 0,5 пМ или от 10 мкМ до 0,5 нМ. Декантировали среду с планшета, содержащего клетки, и промакивали на бумажные полотенца. Пластину промывали дважды с помощью 90 мкл полной среды на лунку и заменяли окончательную промывку 90 мкл полной среды. После промывки добавляли 10 мкл серийных разбавленных соединений из промежуточного дозирующего планшета в каждую лунку планшета(-ов) и инкубировали в течение 18 ч в инкубаторе с температурой 37°C с 5% CO₂. Конечная концентрация ДМСО в анализе составляла 0,5%. В конце 18-часовой инкубации переносили 50 мкл среды из каждой лунки в 96-луночный планшет v-образным дном (Thermo Scientific), запечатывали планшет и хранили его при -80°C для последующего масс-спектрометрического измерения количества кинуренина, N-формилкинуренина и триптофана. По желанию, возвращали исходный планшет(ы) в инкубатор еще на 24 ч и измеряли жизнеспособность клеток, добавив равный объем CELLTITER-GLO® (Promega) и измеряли люминесценцию в считывающем устройстве PERKIN ELMER® EnVision.

Масс-спектрометрическое (МС) измерение количества триптофана, N-формилкинуренина и кинуренина.

Образцы, собранные из анализа на основе клеток SKOV3, размораживали на льду, и очищали от продуктов клеточного распада с помощью центрифугирующего планшета при 3220×g в течение 1 мин при 4°C. Добавляли 12,5 мкл внутренних стандартов, состоящих из 2,5 мкг/мл L-триптофана-2',4',5',6',7'-d₅ (CDN-изотопы, Кат. № D-1522), L-кинуренинсульфата-d₄,3,3-d₂ (Cambridge Isotope Laboratories, Кат. № DLM-7842-0.01) и полученного на месте N-формил L-кинуренина-d₄. Нагревали все пластины с помощью Easy Peel (ThermoScientific) и перемешивали путем встряхивания в течение 1-2 мин, а затем центрифугировали в течение 1 мин при 3220×g при 4°C. Готовили стандартные калибровочные растворы для количественного определения кинуренина и N-формилкинуренина путем растворения каждого в воде с получением конечной концентрации 1 мг/мл. Отбирали аликвоту 20,8 мкл кинуренина и 23,6 мкл N-формилкинуренина из их соответствующего количества исходного 1 мг/мл раствора и разбавляли до 1 мл с использованием среды McCoys 5A, получая конечную концентрацию для каждого стандарта 100 мкМ. Серийно разбавляли калибровочный раствор в 2 раза в полной среде для получения 5-точечной стандартной кривой с конечными концентрациями от 5 мкМ до 0,313 мкМ (кинуренин) и от 2 до 0,125 мкМ (N-формилкинуренин). Вводили 1 мкл образца среды (неизвестный) или стандартного калибровочного раствора в систему ЖХ/МС-МС, состоящую из системы ВЭЖХ SHIMADZU® Prominence 30A и тройного квадрупольного масс-спектрометра AB SCIEX® 5500. Разделяли аналиты на колонке XBridge™ C18, 2,1×50 мм, 3,5 мкм (Waters, Кат. № 186003021), поддерживая температуру при 35°C, со скоростью потока 0,7 мл/мин. Подвижная фаза А представляет собой 0,1% муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В представляет собой MeOH. Профиль градиента: 0 мин, 0,5% В; 0,8 мин, 98% В; 1-10 мин, 98% В; 1,11 мин, 0,5% В; 1,7 мин, а затем остановка. Масс-спектрометр находился в положительном режиме контроля множественной реакции АРСІ. Использовали данные из стандартных образцов кривой и создавали линейную калибровочную кривую для каждого аналита с помощью программного обеспечения MultiQuan™. Использовали стандартную кривую, полученную для расчета концентраций аналита для неизвестных.

Расчитывали значения IC₅₀ для соединений с помощью масс-спектрометрического измерения количества кинуренина в среде, содержащей 500 мкМ эталонного стандартного количества, в качестве сто процентов ингибирования, и с отсутствием соединения, но с присутствием ДМСО, в качестве нулевого процента ингибирования. Измерения количеств N-формилкинуренина и триптофана использовали для оценки достоверности данных, полученных путем выявления прямой зависимости между образованием кинуренина и N-формилкинуренина с одновременным снижением уровня триптофана. Результаты этого анализа показывают, что все приведенные в качестве примеров соединений ингибируют выработку кинуренина и N-формилкинуренина в IDO1 экспрессирующих клетках рака значениях IC₅₀ для ингибирования как выработки кинуренина и N-формилкинуренина менее 0,9 мкМ. и значениях жизнеспособности клеток, для соединений, которые тестировались (примеры 1-9), показывающих, что все соединения не являются явно токсичными для клеток по крайней мере до 1 мкМ. Например, IC₅₀ для ингибирования выработки кинуренина и N-формилкинуренина для соединения примера 1A составляет 0,007 мкМ ± 0,002 (n=6) и 0,007 мкМ ± 0,002 (n=6) соответственно. Кроме того, пример 1A не ингибирует клеточную пролиферацию до 10 мкМ.

Тест на ингибирование мишени *in vivo*.

Целью этого анализа является оценка ингибирования образования кинуренина и делеции триптофана в раковых клетках *in vivo*. SKOV3X (Исследовательский и технологический центр Университета штата Индиана), линия клеток рака яичников, экспрессирующая IDO1 и легко образующая опухоли в брюшной полости мышей Athymic Nude-Foxn1^{nu} (Harlan). В результате экспрессии IDO1 опухоли SKOV3X локально уменьшают количество триптофана с сопутствующим образованием высоких уровней кинуренина в микроокружении опухоли. Целью этого анализа является измерение способности тестируемых соединений ингибировать IDO1, о чем свидетельствует четкое снижение уровней кинуренина в опухоли.

Живая фаза.

Культивировали SKOV3X в средах McCoy's 5A (Gibco, Кат. № 16600-082), дополненных незаменимыми аминокислотами (Gibco, Кат. № 11140-050), 1 mM пирувата натрия (Gibco, Кат. № 11360-070) и 10% FBS и инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Трипсинизировали и изолировали клетки из культуры и ресуспендировали их в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS). Имплантировали 2×10⁶ клеток SKOV3X во внутрибрюшинную полость каждой мыши Athymic Nude-Foxn1^{nu} (Harlan). Примерно через три недели после имплантации пальпировали животных для подтверждения образования опухолей и рандомизировали мышей с опухолями в группы контроля и группы для обработки соединением. Вводили соединения, сформулированные в растворе носителя, содержащем 1% гидроксипропилцеллюлозы (HEC) и 0,025% TWEEN® 80 и 0,05% противовспенивателя или лишь носитель с помощью перорального зонда. Генерировали кривую зависимости время-ингибирование с помощью введения животным с опухолями разовой дозы соединения, и собирали образцы плазмы, печени и опухолей в 2, 4, 8, 12 и 24 ч после введения. Собирали кровь в ЭДТА-содержащие трубки для сбора крови (Greiner bio-one, Кат. № 450474) и центрифугировали при 2365×g, изолировали плазму и замораживали при -80°C. Изолировали фрагменты печени и опухоли, регистрировали вес и мгновенно замораживали и хранили при -80°C.

Генерирование стандартной кривой, обработка тканей и ингибирование мишени.

Готовили калибровочные стандарты для L-кинуренина и L-триптофана, сначала создавая соответствующие матрицы, которые представляют собой плазменные и тканевые гомогенаты, обедненные L-кинуренином и L-триптофаном с помощью диализа. Затем добавляли в разделенные матрицы известные количества L-кинуренина и L-триптофана. Получали разделенную плазму мыши путем добавления 10 мл мышечной плазмы, обработанной ЭДТА (BioreclamationIVT, Кат. № MSEPLEDTA3), в SPECTRA/POR® FLOAT-A-LYZER® G2 (Spectrum Labs, Кат. № G235063) и помещали это в диализное устройство в 1000 мл забуференный фосфатом физиологический раствор и диализировали в течение ночи. После этого перенесли это устройство в свежий 1000 мл забуференный фосфатом физиологический раствор и повторяли диализ. Перенесли разделенную плазму мыши в чистый контейнер и хранили при -20°C для будущего использования. Готовили контрольный гомогенат печени, добавив 3 мл смеси MeOH/вода (1:1, об./об.) на каждый грамм печени мыши из контрольной группы и гомогенизировали с помощью ультразвука. Готовили гомогенат опухолевого контроля таким же образом, за исключением использования тканевой мельницы для гомогенизации ткани опухоли. Добавляли 10 мл гомогенатов контрольной ткани, печени и опухоли, на разделительные устройства SPECTRA/POR® FLOAT-A-LYZER® G2 и диализировали в течение ночи в 1000 мл MeOH/вода (1:1, об./об.), затем перенесли каждый в свежую смесь 1000 мл MeOH/вода (1:1, об./об.) и повторяли диализ. Перенесли разделенные гомогенизаты тканей в отдельные контейнеры и хранили при -20°C для дальнейшего использования.

Готовили стандартные исходные растворы L-кинуренин-сульфата (Sigma Aldrich, Кат. № K3750), растворенного в смеси ACN/вода (1:1, об./об.) и L-триптофана (Sigma Aldrich), растворенного в смеси N-метил-2-пирролидон/вода (4:1, об./об.) с получением конечных концентраций свободного основания 1 мг/мл. Отбирали аликвоту 50 мкл соответствующих исходных растворов и разбавляют смесью MeOH/вода (1:1, об./об.), получая объединенный рабочий раствор 50 мкг/мл. Готовили шесть дополнительных калибровочных рабочих растворов в MeOH/вода (1:1, об./об.) путем серийного разбавления раствора 50 000 нг/мл для получения 7-точечной калибровочной кривой с конечными концентрациями от 25 нг/мл до 50 мкг/мл.

Смешивали образцы печени, полученные от испытуемых со смесью MeOH/вода (1:1, об./об.) в пропорции 1 г ткани на 3 мл растворителя и гомогенизировали с помощью ультразвука. Гомогенизировали образцы опухолей с той же пропорцией MeOH/вода (1:1, об./об.) с использованием тканевой мельницы. Размораживали образцы плазмы от испытуемых и перемешивали их для гомогенности.

Выполняли извлечение калибровочных рабочих растворов, 7-точечную серию разбавления L-кинуренина и L-триптофана, перенося по 25 мкл каждого образца в отдельную лунку 96-луночного планшета и добавляя 25 мкл соответствующей разделительной контрольной матрицы (плазмы, гомогената печени или опухоли) в эти лунки в зависимости от ткани происхождения образцов. Добавляли 25 мкл MeOH/вода (1:1, об./об.) в отдельные лунки лунок, а затем 25 мкл соответствующих образцов для испытаний. Затем добавляли 180 мкл смеси ACN/MeOH (1:1, об./об.), содержащей 250 нг/мл L-триптофана-2',4',5',6',7'-d5 (Sigma Aldrich, Кат. № 615862) и L-кинуренин сульфата-d4,3,3-d2 (Cambridge Isotope Laboratories, Кат. № DLM-7842-0.005) ко всем лункам и перемешивали для осаждения белков в образцах.

Центрифугировали 96-луночный планшет для осаждения осажденного белкового материала, затем разбавляли порцию каждого супернатанта по меньшей мере в 10 раз водой/ТФУ (100:2, об./об.). Вводили 10 мкл каждого экстрагированного образца и калибровочного стандарта в систему ЖХ/МС-МС, состоящую из контроллера SHIMADZU® SCL-10A с насосами ВЭЖХ SHIMADZU® LC-10AD vp, автосамплером CTC-PAL и тройным квадрупольным АВ SCIEX® 4000 масс-спектрометром. Разделяли аналиты на колонке Advantage™ Echelon™ C18, 2,1×20 мм, 4 мкм (аналитическая продажа и обслуживание, Кат. № Sprite AE1822), поддерживаемая при температуре и давлении окружающей среды со скоростью потока подвижной фазы 1,5 мл/мин. Подвижная фаза А представляет собой воду/ТФУ/1М бикарбонат аммония (1000:4:1, об./об./об.), и подвижная фаза В представляет собой АСН/ТФУ/1М бикарбонат аммония 1000:4:1, об./об./об.). Профиль градиента: 0 мин, 0,3% В; 0,03-0,2 мин, 7% В; 0,3-0,4 мин, 36% В; 0,41 мин, 98% В, а затем остановка на 0,7 мин, чтобы вернуться к исходным условиям. Масс-спектрометр находился в положительном режиме контроля множественной реакции TURBOIONSPRAY®. Использовали данные из калибровочной кривой стандартов и создавали квадратичную калибровочную кривую для каждого аналита с использованием программного обеспечения Analyst™. Использовали стандартную кривую, полученную для расчета концентраций аналита для исследуемых образцов.

Использовали концентрацию кинуренина в печени у животных без опухоли, которые получали носитель в качестве концентрации максимального ингибирования или в качестве наинижшего уровня кинуренина. Использовать концентрацию кинуренина в опухолях SKOV3X у животных с опухолями получавших носитель в качестве минимального ингибирования или в качестве самого высокого уровня кинуренина. Рассчитывали процентное ингибирование для групп, получавших соединение, относительно минимального ингибирования IDO1 в опухоли, обработанной носителем. Результаты этого анализа показывают, что пример 1А ингибирует выработку кинуренина и N-формил-кинуренина в IDO1 экспрессирующих раковых клетках *in vivo*. Конкретно, пример 1А, дозированный при 75, 25 и 5 мг/кг, приводил к 79, 59 и 37% ингибированию соответственно через 12 ч после введения.

Противоопухолевое действие примера 1А в сингенной модели с линией клеток рака Colon26 мыши для рака толстой кишки и в сочетании с LY3300054 в установленной L55 гуманизированной модели мыши.

Сингенная модель с линией клеток рака Colon26 мыши.

Выращивали клетки линии рака толстого кишечника мыши BALB/c-derived Colon26 в среде RPMI 1640, дополненной 10 мМ HEPES, 1 нМ пирувата натрия и 10% фетальной бычьей сывороткой. Собирали суб-конфлюентные клетки трипсином и дважды промывали полной средой для роста без сыворотки. Инициировали подкожные опухоли путем инъекции 1×10^6 клеток, ресуспендированных в HBSS в затылок иммунокомпетентных мышей BALB/c (Envigo, Indianapolis, IN). Через шесть дней после имплантации опухоли рандомизировали животных на основе массы тела и помещали их в соответствующие группы лечения, используя количество животных на группу, как указано.

L55 гуманизированная опухолевая модель, hPBMC стимуляция и лечение.

Выращивали клеточную линию НМРЛ человека, L55, в среде RPMI 1640, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой. Собирали суб-конфлюентные клетки трипсином и дважды промывали средой для роста без сыворотки. Инициировали рост подкожных опухолей путем инъекции 5×10^6 в смеси 1:1 HBSS и MATRIGEL® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) в затылок NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ мышей чаще известных как мышей NOD с кнокаутом scid гамма-цепи (NSG) (Лаборатория Джексона, Бар-Харбор, штат Мэн), у которых нет Т-клеток, В-клеток, НК-клеток и недостаточна передача сигналов цитокинов. Когда средний объем опухоли достигает приблизительно 200-300 мм³, рандомизировали животных по размеру опухоли и массе тела и помещали их в соответствующие группы лечения, как указано. После рандомизации стимулировали иммунный ответ у мышей с опухолями инъекцией с PBS (без РВМС) или с PBS, содержащим 1×10^7 человеческого РВМС в хвостовую вену реципиентов.

Сбор данных, составы соединения и контрольные носители (в обоих моделях).

Измерьте размер опухоли и массу тела с помощью измерителя. Оцените объем опухоли (V), используя формулу: $V = 0,536 \times \text{БВД} \times \text{МИД}^2$, где БВД=большой измеренный диаметр и МИД=меньший перпендикулярный диаметр. Преобразуйте данные объема опухоли в логарифмическую величину, чтобы уравнивать дисперсию во времени и группах лечения. Данные объема опухоли анализировали через 35 дней с помощью двухпараметрического анализа повторных измерений вариантности по времени и лечению с применением процедур MIXED в программном обеспечении SAS (версия 9.2). Коррелировали модель для повторных измерений в Spatial Power. Сравнивали обработанные группы с контрольной группой в каждый момент времени. Использовали процедуру MIXED также отдельно для каждой группы лечения для расчета средних значений и стандартных ошибок в каждый момент времени. Оба анализа учитывают автокорреляцию внутри каждого животного и потерю данных, которые происходят, когда животные с большими опухолями удаляются из исследования на ранней стадии. Вычисляли относительные изменения объема опухоли (% T/C) с использованием измерений объема опухоли, полученных ближе всего к последнему дню дозирования примера 1А, с использованием формулы $\% T/C = 100 \times \Delta T / \Delta C$, где T=средний объем опухоли в группе, получавшей соединение, ΔT =средний объем опухоли в группе, по-

лучавшей соединении, за вычетом среднего объема опухоли в базовый день, C = средний объем опухоли в контрольной группе (группе, которой вводили носитель), и ΔC = средний объем опухоли в контрольной группе за вычетом среднего объема опухоли в базовый день. Если $\Delta T < 0$, то значение регрессии опухоли рассчитывает вместо % T/C , как % регрессии = $100 \times \Delta T / T_{\text{начальный}}$, где $T_{\text{начальный}}$ = средний объем опухоли в базовый день.

Оценивали эффективность противоопухолевого действия соединения примера 1А и LY3300054 отдельно или в комбинации путем измерения объема опухоли трехмерным штангельциркулем дважды в неделю в течение исследования. Измеряли массу тела два раза в неделю в течение исследования, как общий показатель переносимости.

Составы соединения примера 1А и LY3300054: состав соединения примера 1А готовили еженедельно в 1% HES/0,25% Tween 80/0,05% антивспенивателя и хранили при 4°C. Растворяли LY3300054 в забуференном фосфатом физиологическом растворе и хранили при 4°C.

Контрольная группа (группы).

Для исследования эффективности одного агента, вводили носитель для соединения примера 1А. Для комбинированных исследований применяли оба носителя, для соединения примера 1А и LY3300054, в соответствии с тем же графиком что и для каждого соединения соответственно. Для групп монотерапии в комбинированных исследованиях эффективности, вводили животным желаемое соединение и носитель для соединения, которое не дозируется в соответствии с графиком для не дозированного соединения.

Сингенная модель с линией клеток рака Colon26 мыши, лечение и результаты.

Монотерапия соединением примера 1А.

Мышам BALB/c ($n=10$) с опухолями линии клеток Colon26 вводили соединение примера 1А два раза в день в течение 21 дня с помощью перорального зонда в дозах 10, 50 и 100 мг/кг. Начинали введение соединения примера 1А через шесть дней после имплантации опухоли и контролировали рост опухоли и массу тела два раза в неделю в течение всего периода лечения.

Результаты.

Введение 10, 50 и 100 мг/кг соединения примера 1А приводило к дозозависимому эффекту на рост опухоли, с дозами 50 и 100 мг/кг, которые показали статистически значимое ($p < 0,001$) ингибирование роста на 20-й день. Изменения объема опухоли (% T/C), наблюдавшиеся на 20-й день, составили 17,5%, 31,2% и 62,6% для доз 10, 50 и 100 мг/кг соответственно. Не было значительных проблем с переносимостью при любой дозе, испытываемого соединения примера 1А, относительно изменений массы тела в течение курса лечения по сравнению с мышами, получавшими носитель. Потеря массы тела измерялась как процентное изменение от средних значений массы тела, зарегистрированных на исходном уровне через 6 дней после имплантации опухоли для каждой группы. На 20-й день, среднестатистическая мышшь получавшая носитель, продемонстрировала снижение массы тела на 5,5% по сравнению с исходным уровнем с дозами 10, 50 и 100 мг/кг в группах, на 2,5, 8 и 2,5% соответственно. Хотя наблюдалась зависящая от дозы тенденция к потере массы тела, она не была статистически отлична от группы мышей получавших носитель.

L55 Гуманизированная опухолевая модель, лечение и результаты.

Эффект hPBMC на рост опухоли L55.

Линия клеток рака человека LLC HMPJL по своей природе устойчива к алло-реакции, связанной с инъекцией hPBMC. Целью этих исследований является оценка способности соединений потенцировать алло-реакцию, позволяющую Т-клеткам человека нацеливаться на и ограничивать рост опухолей человека L55 у мыши, у которой отсутствует адаптивная иммунная система (мышшь NSG). Чтобы оценить вклад hPBMCs в ингибирование роста опухолей L55, контрольным мышам NSG с установленными опухолями L55 ($n=10$), которые достигли приблизительно 250 мм³ вводили PBS, не имеющий hPBMC, или PBS, содержащий 1×10^7 hPBMC. Измеряли объем опухоли и массу тела два раза в неделю в течение всего периода лечения.

Результаты.

Статистически значимое ингибирование роста опухоли L55 не наблюдалось по сравнению с животными, которые не получали hPBMC в течение исследования. При инъекции человеческих PBMC в течение исследования не наблюдалось существенных проблем с переносимостью, о чем свидетельствует отсутствие значительной потери веса по сравнению с исходным уровнем, которая на 41 день была на 0,1% ниже, чем в начале исследования.

Монотерапия соединением примера 1А.

Для оценки способности соединения примера 1А усиливать ингибирование роста опухоли L55, опосредованного hPBMCs, мышам NSG с установленными опухолями L55 ($n=10$), которые достигли приблизительно 250 мм³ вводили PBS, не имеющий hPBMC, а другой группе ($n=10$) вводили PBS, содержащий 1×10^7 hPBMC. Обеим группам вводили соединение примера 1А 75 мг/кг посредством перорального зонда два раза в день в течение 21 дня. Измеряли объем опухоли и массу тела два раза в неделю в течение всего периода лечения.

Результаты.

В отсутствие hPBMC лечение опухолей L55 с помощью соединения примера 1A не приводило к значительному ингибированию роста опухоли в течение курса лечения по сравнению лишь с носителем без PBMC. Введение животным с опухолью L55 соединения примера 1A в присутствии hPBMC приводило к ингибированию роста опухоли по сравнению с контрольной группой, без hPBMC. Статистически значимое подавление роста опухоли было наиболее очевидным в более поздние моменты времени % T/C 47,6% на 41 день ($P < 0,001$). В ходе исследования не наблюдалось существенных проблем с переносимостью при использовании hPBMCs, соединения примера 1A или их комбинации, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимого снижения массы тела по сравнению с исходными измерениями.

Монотерапия LY3300054.

Чтобы оценить способность LY3300054 усилить ингибирование роста опухоли L55, опосредованное hPBMC, двум группам мышей NSG с установленными опухолями L55 ($n=10$ /группа), которые достигли приблизительно 250 мм^3 вводили PBS, содержащий hPBMC. Одной группе вводили 10 мг/кг IgG-эффторного нулевого (IgG-EN) контрольного антитела, а другой 10 мг/кг LY3300054 с помощью внутрибрюшинной инъекции один раз в неделю в течение 4 недель. Измеряли объем опухоли и массу тела два раза в неделю в течение всего периода лечения.

Результаты.

Лечение мышей с опухолью L55, которым вводили hPBMC с IgG-EN 10 мг/кг , не влияло на рост или прогрессирование опухоли по сравнению с носителем только с или без hPBMC. Лечение животных с опухолью L55, которым вводили hPBMC с 10 мг/кг LY3300064, приводило к статистически значимому ингибированию роста опухоли по сравнению с контрольными животными которым вводили носитель, с или без hPBMC. Изменение объема опухоли (% T/C), наблюдаемое в конце периода дозирования, по сравнению с одним только носителем, не имеющим PBMC (день 37), составляло 75,7%. В ходе исследования не наблюдалось существенных проблем с переносимостью при использовании LY3300054, с или без hPBMC, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимого снижения массы тела по сравнению с исходными измерениями.

Комбинация соединения примера 1A и LY3300054.

Мышам NSG ($n=10$), с опухолями L55, которые достигали приблизительно 250 мм^3 вводили hPBMC и соединение примера 1A 75 мг/кг два раза в день с помощью перорального зонда в течение 21 дня и 10 мг/кг LY3300054 с помощью внутрибрюшинной инъекции один раз в неделю в течение 4 недель. Измеряли объем опухоли и массу тела два раза в неделю в течение всего периода лечения.

Результаты.

Комбинированная терапия 75 мг/кг соединения примера 1A и 10 мг/кг LY3300054 приводила к улучшенной эффективности против опухоли по сравнению с одной только монотерапией. Объемы опухоли были значительно ниже, чем у группы, которой вводили носитель, без PBMC, либо с hPBMC ($P < 0,001$ при всех измерениях). Объемы опухолей в дни 30, 34, 37 и 41 составили 9,6% T/C, 19,8% T/C, 13,3% T/C и 27,3% T/C соответственно. Различия в эффективности противоопухолевых средств между группами монотерапии по сравнению с группой комбинации было статистически значимым ($p < 0,001$). Чтобы оценить, была ли комбинация аддитивной или синергетической, данные анализируются по существу следующим образом:

Статистический анализ (обе модели).

Статистический анализ данных объема опухоли начинается с преобразования данных в логарифмические значения для выравнивания дисперсии по времени и группам лечения. Данные объема опухоли анализировали через 35 дней с помощью двухпараметрического анализа повторных измерений вариантности по времени и лечению с применением процедур MIXED в программном обеспечении SAS (версия 9.3). Коррелировали модель для повторных измерений в Spatial Power. Группы, получавшие лечение, сравнивали с контрольной группой в каждый момент времени. Процедуру MIXED также использовали отдельно для каждой группы лечения для расчета скорректированных средних значений и стандартных ошибок в каждый момент времени. Оба анализа учитывают автокорреляцию внутри каждого животного и потерю данных, которые происходят, когда животные с большими опухолями удаляются из исследования на ранней стадии. Скорректированные средние значения и стандартные ошибки (C.O.) отображали для каждой группы лечения в зависимости от времени.

Способ комбинированного анализа (независимость Bliss для исследований IVEF).

По результатам анализа повторных измерений контрастные утверждения используются для проверки эффекта взаимодействия в каждый момент времени, сравнивая среднее значение группы, получавшей носитель и комбинацию со средним значением для двух групп отдельных агентов. Это эквивалентно методу независимости Bliss для тестирования аддитивности. Ожидаемый аддитивный отклик (EAR) для комбинации рассчитывается по шкале объема опухоли как $\text{EAR} = V_1 \times V_2 / V_0$, где V_0 , V_1 и V_2 - оценочные средние объемы опухолей для носителя, только лечение 1 и только лечение 2 соответственно. Если тест взаимодействия является значительным, эффект комбинации объявляется статистически более чем аддитивным или менее чем аддитивным, в зависимости наблюдаемого среднего объема комбинации, который является меньше или превышает объем EAR соответственно. В противном случае статистиче-

ский вывод является аддитивным.

Используя этот способ анализа, ингибирование роста опухоли было не лучше, чем аддитивным, до дней 34 и 37, где ингибирование роста опухоли было синергичным с $P < 0,008$ и $p < 0,001$ соответственно. В ходе исследования не было выявлено существенных проблем с переносимостью комбинации соединения примера 1A и LY3300054, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимого снижения массы тела по сравнению с исходными измерениями.

Соединения данного изобретения предпочтительно составляют в фармацевтические композиции, которые вводят различными способами. Наиболее предпочтительно такие композиции предназначены для перорального или внутривенного введения. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, L.V. Troy, et al., eds., 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

Термин "эффективное количество" в контексте данного документа относится к количеству или дозе соединения согласно данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, которое при однократном или многократном введении пациенту обеспечивает требуемый эффект у пациента, подлежащего диагностике или лечению.

Эффективное количество может быть легко определено лечащим врачом-диагностом как специалистом в данной области техники, с применением известных приемов и путем наблюдения результатов, полученных в аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для пациентов лечащий врач-диагност учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: вид вскармливающего; его массу, возраст и общее состояние здоровья; конкретное рассматриваемое заболевание или расстройство; степень или вовлечение в заболевание или расстройство; ответ конкретного пациента; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему лечения; применение сопутствующих лекарственных препаратов и другие релевантные обстоятельства.

Соединения согласно данному изобретению, в целом, являются эффективными в широком диапазоне доз. Например, суточные дозы обычно входят в суточный диапазон около 0,05-1000 мг. Предпочтительно такие дозы входят в суточный диапазон 0,1-500 мг. Более предпочтительно такие дозы входят в суточный диапазон 1-200 мг. В некоторых случаях могут быть более целесообразны уровни доз ниже нижнего предела вышеуказанных диапазонов, а в других случаях могут быть использованы более высокие дозы, не вызывающие какого-либо вредного побочного эффекта, и, таким образом, указанные выше диапазоны доз никоим образом не предназначены для ограничения объема данного изобретения. Следует понимать, что количество фактически введенного соединения определяет врач с учетом релевантных обстоятельств, включая подлежащее лечению патологическое состояние, выбранный способ введения, фактически вводимое соединение или соединения, возраст, массу и ответ конкретного пациента, а также тяжесть симптомов пациента.

Перечень последовательностей
Аминокислотные и нуклеотидные последовательности

И.Н. Последовательности: 1 (PD-L1 человека)
 MRIFAVFIFMTYWHLNFAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIV
 YWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDA
 GVIYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTCQAEGYPKA
 EVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENH
 TAELVIPELPLAHPNERHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQD
 TNSKKQSDTHLEET

И.Н. Последовательности: 2 (HCDR1 LY3300054)
 KASGGTFSSY AIS

И.Н. Последовательности: 3 (HCDR2 LY3300054)
 GIPIFGTANYAQKFQG

И.Н. Последовательности: 4 (HCDR3 LY3300054)
 ARSPDYSPYYYYGMDV

И.Н. Последовательности: 5 (LCDR1 LY3300054)
 SGSSNIGSNTVN

И.Н. Последовательности: 6 (LCDR2 LY3300054)
 YGNSNRPS

И.Н. Последовательности: 7 (LCDR3 LY3300054)
 QSYDSSLG SV

И.Н. Последовательности: 8 (HCVR LY3300054)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
 GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSPDYSPYYYYG
 MDVWGQGT TTVTVSS

И.Н. Последовательности: 9 (LCVR LY3300054)
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
 SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLG SVFVGGGIKLTVLG

И.Н. Последовательности: 10 (HC LY3300054)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
 GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSPDYSPYYYYG
 MDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
 KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

CKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

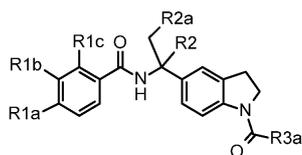
И.Н. Последовательности: 11 (LC LY3300054)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEADYCYQSYDSSLGSGSVFGGGKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC

И.Н. Последовательности: 12 (ДНК HC LY3300054)
CAGGTCCAGCTGGTCCAGTCAGGGGCCGAGGTCAAAAAGCCAGGGTCATCTG
TCAAAGTGTCTTGTAAAGGCATCCGGGGCACATTTCCAGCTACGCTATCTCC
TGGGTGAGACAGGCACCAGGGCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCGGAATCATTC
CCATCTTCGGGACCGCAACTACGCTCAGAAGTTTCAGGGAAGGGTCACTATT
ACCGCCGACAAAAGCACATCTACTGCTTATATGGAGCTGTCTAGTCTGAGGTC
TGAAGATACCGCAGTGTACTATTGCGCCCGGAGTCCCGACTATAGCCCTTACT
ATTAATATGGCATGGATGTCTGGGGCCAGGGAACACAGTGACAGTCTCATC
CGTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCCAAGAGCA
CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCCTCAGCAGCGTGGTGC
CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC
AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA
AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGCACCCGTC
AGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAA
GTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCC
TGCACCAAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCATCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGA
ACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCTC
CCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATTCCAAGCTCACCGTGGGA
CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA

И.Н. Последовательности: 13 (ДНК LC LY3300054)
CAGTCCGTCCTGACACAGCCACCCCTCAGCCTTGCCACCCCTGGGCAGCGAGT
GACAATCTCTTGTCTGGGAGTTCCTCAAATATTGGTAGTAACACCGTGAATT
GGTACCAGCAGCTGCCCAGCACAGCACCTAAGCTGCTGATCTATGGAACTC
AAATAGGCCATCCGGAGTCCCCGACCGGTTCTCTGGTAGTAAATCAGGCACTT
CCGCCAGCCTGGCTATTAGCGGGCTGCAGTCTGAGGACGAAGCCGATTA
TTGCCAGTCTTACGATTCAGCCTGTCTGGAAGTGTGTTGGCGGAGGGATCA
AGCTGACCGTCTGGGCCAGCCTAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCG
CCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAG
TGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCC
GTCAAGGCAGGAGTGGAGACCACACCCCTCAAACAAGCAACAACAAG
TACGCGGCCAGCAGTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACA
GAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAG
TGGCCCTGCAGAATGCTCT

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



где R1a представляет собой водород, метил, этенил, циано, фтор, хлор, фторметил или дифторметил;

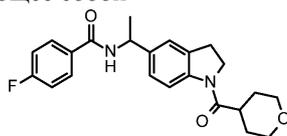
R1b представляет собой водород, фтор или хлор;

R1c представляет собой водород, гидроксиль, фтор, бензилокси или гидроксиэтиламино;

R2 представляет собой водород или метил;

R2a представляет собой водород или метил и
R3a представляет собой тетрагидропиранил.

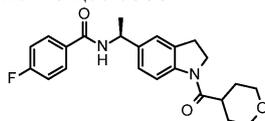
2. Соединение по п.1, представляющее собой



3. Соединение по п.1 или 2, представляющее собой



4. Соединение по п.1 или 2, представляющее собой



5. Соединение по любому из пп.1-3, представляющее собой кристаллический 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этил} бензамид.

6. Соединение по п.5, представляющее собой кристаллический 4-фтор-N-{(1R)-1-[1-(тетрагидро-2H-пиран-4-илкарбонил)-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил]этил} бензамид, характеризующееся порошковой рентгеновской дифракцией (источник излучения Cu, λ -1,54060 Å), имеющей по меньшей мере один пик при 17,38° в сочетании с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 12,51, 15,65, 16,37, 17,56, 21,48 и 25,23° (20±0,2°).

7. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая соединение по любому из пп.1-6 с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, носителями или разбавителями.

8. Применение соединения по любому из пп.1-6 в производстве лекарственного препарата для лечения рака.

9. Применение по п.8, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей из меланомы, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, почечно-клеточной карциномы, рака молочной железы, рака легкого, рака яичников, карциномы фаллопиевых труб, первичной перитонеальной карциномы, рака шейки матки, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, глиомы, неходжкинской лимфомы и лимфомы Ходжкина.

10. Применение соединения по любому из пп.1-6 для лечения рака.

11. Применение по п.10, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей из меланомы, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, почечно-клеточной карциномы, рака молочной железы, рака легких, рака яичников, карциномы фаллопиевых труб, первичной перитонеальной карциномы, рака шейки матки, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, глиомы, неходжкинской лимфомы и лимфомы Ходжкина.

