



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109677** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)
C07D 498/04 (2006.01)
A61K 31/424 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2013 06158	(72) Винахідник(и):	Коутс Дейвід Ендрю (US), Гілмор Раймонд (US), Мартін Хосе Альфредо (ES), Мартін де ла Нава Ева Марія (ES)
(22) Дата подання заявки:	17.11.2011	(73) Власник(и):	ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.09.2015	(74) Представник:	Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	10382329.0, 61/439,151	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2009017822 A2, 05.02.2009 WO 2004014900 A1, 19.02.2004 WO 2007016392 A2, 08.02.2007 WO 2005075478 A1, 18.08.2005 WO 0162756 A1, 30.08.2001
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	03.12.2010, 03.02.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.11.2013, Бюл.№ 21		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.09.2015, Бюл.№ 18		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/US2011/061099, 17.11.2011		

(54) СПОЛУКИ ОКСАЗОЛ[5,4-Ь]ПІРИДИН-5-ІЛУ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ У ЛІКУВАННІ РАКУ

(57) Реферат:

Цей винахід пропонує сполуки оксазол[5,4-Ь]піридин-5-ілу, придатні для лікування раку.

UA 109677 C2

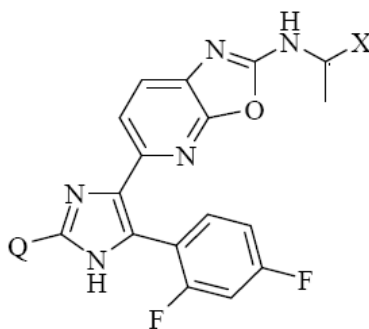
p38 MAP-кіназа являє собою мітоген-активовану протеїнкіназу (MAP), яка належить до суперродини серин/треонінкіназ. Ця кіназа активується позаклітинними стресами, такими як тепло, ультрафіолетове випромінювання і осмотичний стрес, а також запальними стимулами, такими як ліпополісахариди. Після активації p38 MAP-кіназа фосфорилює внутрішньоклітинні білкові субстрати, які регулюють біосинтез прозапальних цитокінів фактор некрозу пухлин α (TNF α), інтерлейкін-1 β (IL-1 β), інтерлейкін-6 (IL-6) та інтерлейкін-8 (IL-8). Припускають причетність цих цитокінів до патології ряду хронічних запальних захворювань. Хронічне запалення є ключовим фактором ризику для розвитку раку. Наприклад, каскад реакцій p38 MAP-кінази є мішенню асоційованого із саркомою Капоші (KSHV) вірусу герпесу, що призводить до хронічного запалення і розвитку саркоми. Крім того, припускають причетність цитокінів, регульованих p38 MAP-кіназою, наприклад, IL-8, до стимулювання ангіогенезу, пов'язаного з ростом пухлин. Фосфорилована форма мітоген-активованої протеїнкінази протеїнкіназа 2 (або pMAPKAPK2) також є кіназою у каскаді реакцій p38 MAP-кінази і може безпосередньо активуватись p38 MAP-кіназою. Дослідження на мишах з нокаутною MAPKAPK2 демонструють зниження продукування цитокінів, що дозволяє висунути припущення про те, що MAPKAPK2 може бути ключовим регулятором запальної реакції, а також може бути потенційною мішенню для протизапальної і/або ракової терапії (WO2005120509).

Як відомо, для застосування у лікуванні запальних захворювань сполуки азабензотіазолілу були розкриті як інгібітори p38 MAP-кінази (наприклад, WO2007016392). Крім того, як відомо для застосування у лікуванні раку сполуки азабензімідазолілу були розкриті як інгібітори p38 MAP-кінази (наприклад, WO2005075478). У WO200917822 розкриті сполуки імідазолілоксазолу і оксазол[4,5-b]піридин-6-ілу, що є придатними як інгібітори кінази PI3.

Однак деякі інгібітори p38 MAP-кінази або інгібітори цитокінів можуть мати проблеми з біологічною доступністю і абсорбуванням, які обмежують їх *in vivo* вплив і терапевтичне застосування. Крім того, деякі інгібітори p38 MAP-кінази можуть вчиняти негативні токсичні впливи на пацієнта (особливо шлунково-кишкову токсичність) і спричиняють ризик негативної взаємодії лікарських речовин. Таким чином, існує потреба в альтернативних лікарських засобах для пригнічення цитокінів. За варіантом, якому віддають перевагу, такі сполуки здатні з підвищеною ефективністю пригнічувати p38 MAP-кіназу і мають більшу біологічну доступність. За варіантом, якому віддають перевагу, такі сполуки також мають поліпшений токсикологічний профіль (особливо шлунково-кишкової токсичності) і знижують ризик негативної взаємодії лікарських речовин.

Даний винахід пропонує нові сполуки оксазол[5,4-b]піридин-5-ілу, які можуть мати клінічне застосування як окремий агент для лікування раку і, зокрема, раку яєчників і/або множинної мієломи. Крім того, цей винахід пропонує нові сполуки оксазол[5,4-b]піридин-5-ілу, які можуть мати клінічне застосування в комбінації з іншим терапевтичним агентом, таким як сунітиніб (sunitinib), для лікування раку і, зокрема, раку нирок. Крім того, сполуки за цим винаходом є ефективними інгібіторами p38 MAP-кінази (передачі сигналів MAP-кіназ p38 α , p38 β і p38 в ракових клітинах), і можуть мати поліпшений токсикологічний профіль (особливо шлунково-кишкової токсичності) і знижений рівень ризику негативної взаємодії лікарських речовин у порівнянні з певними раніше відомими інгібіторами p38 MAP-кінази.

Даний винахід пропонує сполуки Формули I:



Формула I

де:

X – метоксиетил або етоксиметил;

Q – циклопропіл, 2-метилпропанол-2-іл, 3-метилоксетан-3-іл, 1-гідроксиметил-1-циклопропіл;

або їх фармацевтично прийнятну сіль.

Цей винахід також пропонує кристалічний 2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол, який характеризується порошковою рентгенограмою (випромінювання Cu-анода, $\lambda=1,54060$ Е), що містить пік при 15,06 і один або декілька піків при 19,94, 10,31 і 20,78 ($2\theta \pm 0,2^\circ$).

Цей винахід також пропонує кристалічний 2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол, який характеризується порошковою рентгенограмою (випромінювання Cu-анода, $\lambda=1,54060$ Е), що містить пік при 13,73 і один або декілька піків при 16,54, 22,87 і 18,57 ($2\theta \pm 0,2^\circ$).

Цей винахід пропонує сполуку, яка являє собою 2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол, або її фармацевтично прийнятну сіль.

Цей винахід пропонує сполуку, яка являє собою 5-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]-N-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]оксазол[5,4-b]піридин-2-амін, або її фармацевтично прийнятну сіль.

Цей винахід пропонує сполуку, яка являє собою 5-[5-(2,4-дифторфеніл)-2-(3-метилоксетан-3-іл)-1H-імідазол-4-іл]-N-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]оксазол[5,4-b]піридин-2-амін, або її фармацевтично прийнятну сіль.

Цей винахід пропонує сполуку, яка являє собою [1-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-2-етокси-1-метилетил]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]циклопропіл]метанол, або її фармацевтично прийнятну сіль.

Цей винахід пропонує спосіб лікування раку яєчників у ссавця, що включає введення ссавцю, який потребує такого лікування, ефективною кількістю сполуки або солі за цим винаходом.

Цей винахід пропонує спосіб лікування множинної мієломи у ссавця, що включає введення ссавцю, який потребує такого лікування, ефективною кількістю сполуки або солі за цим винаходом.

Цей винахід пропонує спосіб лікування раку, зокрема раку нирок, у ссавця, що включає введення ссавцю, який потребує такого лікування, ефективною кількістю сполуки або солі за цим винаходом в одночасній, роздільній або послідовній комбінації з сунітинібом.

Цей винахід також пропонує фармацевтичні композиції, що містять сполуку або сіль за цим винаходом в комбінації з одним(-ією) або декількома фармацевтично прийнятними носіями, розріджувачами або допоміжними речовинами. За конкретним варіантом здійснення винаходу згадана композиція також містить один або декілька інших терапевтичних агентів. Більш конкретно, згаданим іншим терапевтичним агентом є сунітиніб.

Цей винахід також пропонує сполуку або сіль за цим винаходом для застосування в терапії. Винахід також пропонує сполуку або сіль за цим винаходом для застосування у лікуванні раку. Крім того, цей винахід пропонує застосування сполуки або солі за цим винаходом для застосування у лікуванні раку. Зокрема, цим раком є рак яєчників. Крім того, цим раком є множинна мієлома.

Цей винахід також пропонує сполуку за цим винаходом або її фармацевтично прийнятну сіль і сунітиніб у вигляді комбінованої фармацевтичної композиції для одночасного, роздільного або послідовного застосування в терапії.

Цей винахід також пропонує сунітиніб для застосування в одночасній, роздільній або послідовній комбінації зі сполукою за цим винаходом або її фармацевтично прийнятною сіллю у лікуванні раку. Альтернативно, цей винахід пропонує сполуку за цим винаходом або її фармацевтично прийнятну сіль для застосування в одночасній, роздільній або послідовній комбінації з сунітинібом у лікуванні раку. Більш конкретно, вказаним раком є рак нирок.

Фахівцям в цій галузі буде зрозуміло, що сполуки Формули I можуть утворювати солі. Сполуки за цим винаходом містять основні гетероцикли і, відповідно, реагують з будь-якою з цілого ряду неорганічних і органічних кислот з утворенням фармацевтично прийнятних солей, які одержують шляхом додання кислоти. Такі фармацевтично прийнятні солі, які одержують шляхом додання кислоти, і загальна методика їх одержання є добре відомими у цій галузі. Дивись, наприклад, P. Stahl, et al., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2008); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 66, No. 1, January 1977.

Фахівцю в цій галузі буде зрозуміло, що сполуки за цим винаходом містять щонайменше один хіральний центр. У цьому винаході розглядаються всі індивідуальні енантіомери або діастереомери, а також суміші енантіомерів і діастереомерів вказаних сполук, в тому числі

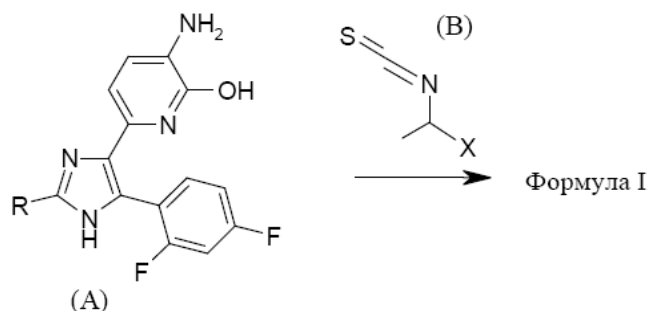
рацемати. За варіантом, якому віддають перевагу, сполуки за цим винаходом, які містять щонайменше один хіральний центр, існують у вигляді окремих енантіомерів або діастереомерів. Окремі енантіомери або діастереомери можуть бути одержані, починаючи з хіральних реагентів або за допомогою методів стереоселективного або стереоспецифічного синтезу.

Альтернативно, окремі енантіомери або діастереомери можуть бути виділені із сумішей стандартними хроматографічними методами із застосуванням "хіральних" колонок або кристалізаційними методами.

Сунітиніб, наявний у продажу під торгівельною маркою SUTENT[®], являє собою дрібномолекулярний, багатоцільовий інгібітор тирозинкіназних рецепторів для перорального введення, який був схвалений FDA (Управління з санітарного нагляду за харчовими продуктами і медикаментами (США)) для лікування гіпернефродного раку та стромальних пухлин шлунково-кишкового тракту, стійких до іматинібу (imatinib). Сунітиніб розкритий у WO200160814.

Схема 1

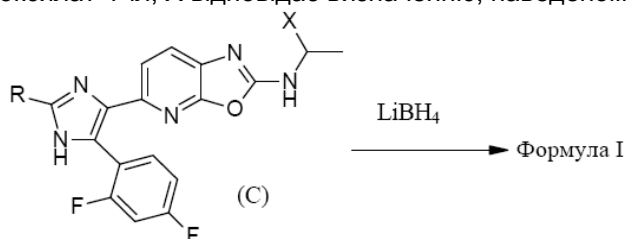
Одержання сполук Формули I, де R – циклопропіл або 3-метилоксетан-3-іл; X відповідає визначенню, наведеному вище.



Орто-гідроксипіридил-3-аміни (А) обробляють ізотіоціанатами (В), які можуть являти собою рацемічну суміш або окремий енантіомер, в етанолі при нагріванні. Для видалення сірководню під час нагрівання періодично додають надлишок N, N'-дизаміщеного-карбодіміду. Наприклад, можуть бути застосовані N, N'-дициклогексилкарбодімід, N, N'-діізопропілкарбодімід або 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіміду гідрохлорид. Синтез ізотіоціанатів (В), які можуть являти собою рацемічну суміш або окремий енантіомер, описаний у наведених нижче препаративних методиках.

Схема II

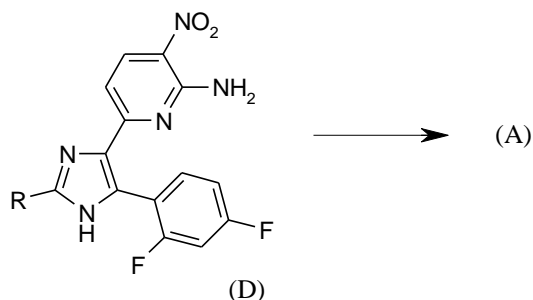
Одержання сполук Формули I, де R – метил-2-метилпропанкарбоксилат-2-іл або метилциклопропанкарбоксилат-1-іл; X відповідає визначенню, наведеному вище.



5-(1H-імідазол-4-іл)оксазол[5,4-b]піридини (C) відновлюють борогідридом літію у простому ефірі з одержанням сполук формули I. Проміжні сполуки (C) аналогічним чином одержують з відповідних гідроксипіридил-3-амінів (A) (Схема I), де R являє собою метил-2-метилпропанкарбоксилат-2-іл або метилциклопропанкарбоксилат-1-іл з ізотіоціанатами (B), як показано на схемі I.

Схема III

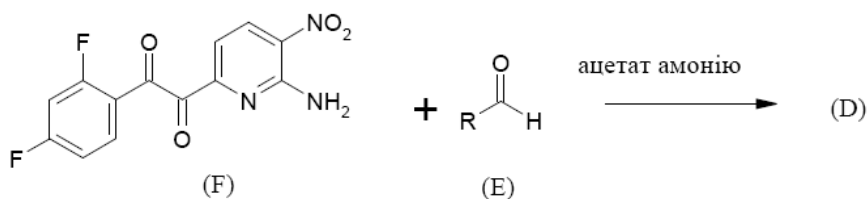
Синтез проміжних хімічних сполук (А), де R – метил-2-метилпропанкарбоксилат-2-іл, метилциклопропанкарбоксилат-1-іл, циклопропіл або 3-метилоксетан-3-іл



На піридиновому кільці 6-(1H-імідазол-4-іл)-3-нітропіридин-2-аміну (D) здійснюють перетворення функціональних груп, що залучають діазотування аміногрупи 2-піридила з швидким припиненням реакції холодною водою, з подальшою гідрогенізацією нітрогрупи 3-піридила з одержанням проміжних хімічних сполук (A).

Схема IV

Синтез проміжних хімічних сполук (D), де R відповідає визначенню, наведеному в описі Схеми III.



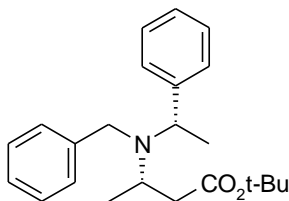
Проміжні сполуки (D) одержують з 1-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-2-(2,4-дифторфеніл)етан-1,2-діону (F) і відомих альдегідів (E) шляхом нагрівання у діоксані з ацетатом амонію. Синтез проміжної сполуки (F) описаний в наведених нижче препаративних методиках.

Сполуки за цим винаходом одержують по суті як показано на Схемах і у наведених нижче Препаративних методиках і Прикладах. Реагенти і вихідні матеріали є легко доступними для фахівця у цій галузі або можуть бути одержані за допомогою способів, які вибирають з-посеред стандартних методів органічної та гетероциклическої хімії, методик, що є аналогічними синтезу відомих структурно подібних сполук, а також методик, описаних у наведених нижче Прикладах, в тому числі будь-яких нових методик. Слід розуміти, що вказані Препаративні методики та Приклади наведені з ілюстративною, а не обмежувальною метою, і що різні модифікації можуть бути здійснені будь-яким фахівцем у цій галузі.

Найменування, що застосовуються у наведених нижче Препаративних методиках та Прикладах, як правило, наводяться за номенклатурою ІЮПАК, представленою у програмі Syntx[®] Draw, версія 3.2.NET.

Препаративна методика 1

Трет-бутил(3S)-3-[бензил-[(1S)-1-фенілетил]аміно]бутаноат



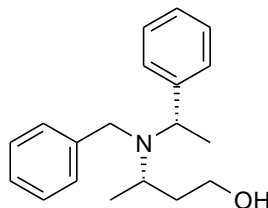
Препаративні методики 1 і 2 були описані в WO 2006/076595 для R, R енантіомеру. Дивись також у Davies, S.G. and Ichihara, O. Tetrahedron: Asymmetry 1991, 2, 183-186 методику для асиметричного синтезу 3-амінобутаноатів з (E)-бут-2-єноатів (кротонатів).

(1S)-N-бензил-1-фенілетанамін (28,53 г, 135 ммоль) розчиняють в безводному тетрагідрофурані (THF), і одержаний розчин охолоджують до температури 0°C в атмосфері аргону. Розчин N-бутиллітію (2,5 М в гексанах, 54 мл, 135 ммоль) додають краплями протягом 30 хв. Реакційну суміш перемішують протягом 20 хв при температурі 0°C, після чого охолоджують до температури -78°C. Розчин трет-бутил-(E)-бут-2-єноату (10 г, 70,32 ммоль) у безводному THF (75 мл) додають до реакційної суміші протягом 20 хв. Через 75 хв реакційну суміш гасять додаванням насиченого розчину NH₄Cl (175 мл) і насиченого водного розчину NaCl (розсолу, 100 мл). Шари відокремлюють, і водний шар екстрагують діетиловим ефіром (2×125 мл). Об'єднані органічні шари сушать безводним MgSO₄, фільтрують, і концентрують до одержання масла жовтого кольору. Неочищений продукт розчиняють у гексанах (250 мл), і

промивають 10 % водним розчином лимонної кислоти (3×75 мл). Органічний шар сушать MgSO_4 , фільтрують, і концентрують до одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді масла жовтого кольору (24,12 г, 97 %). LC-ES/MS m/z 354 ($M+1$).

Препаративна методика 2

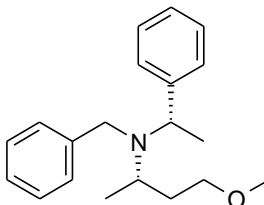
5 (3S)-3-[бензил-[(1S)-1-фенілетил]аміно]бутан-1-ол



трет-бутил(3S)-3-[бензил-[(1S)-1-фенілетил]аміно]бутаноат (24 г, 67,9 ммоль) розчиняють в безводному THF (237 мл), і охолоджують до температури 0°C в атмосфері аргону. 1 М розчин літійалюмінійгідриду в тетрагідрофурані (237 мл, 237 ммоль) додають краплями протягом 10 хв. Реакційну суміш перемішують при температурі 0°C протягом 1 год., і потім при температурі 60°C протягом 1 год. Суміш охолоджують до кімнатної температури (RT), і розбавляють діетиловим ефіром (500 мл). Реакцію гасять сумішшю CELITE® і $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (1:1), яку додають порціями протягом 15 хв. Суміш фільтрують, і концентрують у вакуумі до одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді безбарвного масла (17,54 г, 90 %). LC-ES/MS m/z 284 ($M+1$).

15 Препаративна методика 3

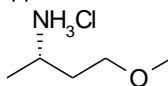
(2S)-N-бензил-4-метокси-N-[(1S)-1-фенілетил]бутан-2-амін



(3S)-3-[бензил-[(1S)-1-фенілетил]аміно]бутан-1-ол (17,54 г, 61,9 ммоль) розчиняють в безводному THF (186 мл), і охолоджують до температури 0°C в атмосфері аргону. Гідрид натрію (4,95 г, 60 % суспензія у мінеральному маслі, 123,8 ммоль) додають порціями протягом 10 хв. Одержану суміш перемішують при температурі 0°C протягом 15 хв, після чого витримують для нагрівання до кімнатної температури. Метилйодид (10,54 г, 74,28 ммоль) додають краплями протягом 30 хв. Після перемішування протягом додаткових 30 хв реакційну суміш гасять додаванням насиченого розчину NH_4Cl у воді. Шари відокремлюють, і водний шар екстрагують діетиловим ефіром (2×100 мл). Об'єднані органічні шари сушать безводним MgSO_4 , концентрують, і неочищений продукт очищають шляхом хроматографування з нормальною фазою (два 120 г силікагелеві картриджі, 10 % розчин метил-трет-бутилового простого ефіру у гексанах) з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді безбарвного масла (14,96 г, 81 %). LC-ES/MS m/z 298 ($M+1$).

30 Препаративна методика 4

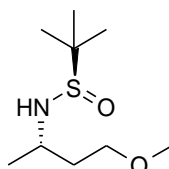
(S)-4-метоксибутан-2-аміну гідрохлорид



(2S)-N-бензил-4-метокси-N-[(1S)-1-фенілетил]бутан-2-амін (14,96 г, 50,29 ммоль) розчиняють в метанолі (400 мл). Розчин дезоксигенують шляхом барботування азоту. До вказаного розчину додають 20 % гідроксид паладію на вуглеці (1,50 г), одержану суспензію насичують воднем, і перемішують в атмосфері водню протягом 16 год. Основним продуктом, присутнім на цей момент, є монодебензилований продукт. Суспензію фільтрують через шар CELITE®, і до одержаного розчину додають 1,1 г 20 % гідроксиду паладію на вуглеці. Суспензію перемішують протягом 24 год. в атмосфері водню. Суспензію фільтрують через шар CELITE®, до суміші додають 2н розчин HCl в діетиловому ефірі (60 мл), і перемішують протягом 30 хв. Розчин концентрують при зниженому тиску до одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини білого кольору (7,01 г, 99 %). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3); δ 1,48 (3H, d, $J=6,8$ Гц), 1,8-1,9 (1H, m), 2,0-2,1 (1H, m), 3,37 (3H, s), 3,5-3,7 (3H, m), 8,3 (3H, br).

45 Препаративна методика 5

(R)-N-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]-2-метилпропан-2-сульфінамід



Наведена нижче методика адаптована з Ellman, J. A. et al J. Org. Chem. 2007, 72, 626-629.

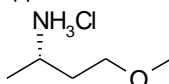
До 1н розчину HCl (7,0 мл, 7,00 ммоль) краплями додають 1,3,3-триметоксибутан (53,19 мл, 337,38 ммоль), одержаний розчин нагрівають до температури 50°C, і перемішують протягом 30 хв. До заздалегідь охолодженої до кімнатної температури вказаної суміші додають спочатку бікарбонат натрію (16,50 г, 196,41 ммоль), потім діетиловий ефір і MgSO₄. Після фільтрування з подальшим випарюванням розчинника одержують кетоефірну проміжну сполуку, 4-метоксибутан-2-он, у вигляді масла жовтого кольору. Вказане масло додають до розчину (R)-(+)-2-метил-2-пропансульфінамід (36,80 г, 303,64 ммоль) і етоксиду титану (IV) (123,14 г, 539,80 ммоль) у THF (482 мл) при температурі 25°C в атмосфері азоту. Одержану суспензію жовтого кольору нагрівають до температури 60°C, і перемішують при цій температурі протягом 16 год. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, і потім до температури -48°C. Краплями додають 1,0 М розчин три(втор-бутил)борогідриду літію в THF (539,80 мл, 539,80 ммоль). Реакційну суміш витримують для нагрівання до кімнатної температури. Через 1 год. реакційну суміш охолоджують до температури 0°C, і додають метанол (1100 мл) з одночасним швидким перемішуванням до припинення виділення газу. Одержану суспензію фільтрують через шар CELITE®, і відфільтрований осад промивають етилацетатом. Фільтрат промивають розсоллом, і шар розсолу двічі екстрагують етилацетатом. Об'єднані органічні шари сушать Na₂SO₄, фільтрують, і упарюють до одержання масла жовтого кольору.

Неочищений продукт адсорбують на силікагелі, і очищають на колонці з силікагелем із застосуванням градієнту гексан/етилацетат (від 7:1 до 100 % етилацетату) з одержанням цільового продукту. Інші фракції, які містять неполярні домішки і цільовий продукт, збирають, і знову очищають хроматографією на силікагелі. неполярні домішки видаляються сумішшю гексан/етилацетат, 4:1. Цільовий продукт елюють сумішшю дихлорметан/метанол, 95:5, з одержанням додаткового матеріалу. Дві порції матеріалу об'єднують з одержанням 38 г (54 %), які, за даними LCMS (рідинна хроматографія/мас-спектрометрія), являють собою суміш цільового/нецільового діастереомерів у співвідношенні приблизно 3:1.

Вказаний матеріал (38 г) змішують з іншою партією матеріалу (23 г), яку одержують за тією ж самою загальною методикою, і діастереомери (3:1, 61 г) розділяють засобами хіральної вискоефективної рідинної хроматографії (Нерухома фаза: OD-H; Розмір колонки: (20 мкм, 80×250 мм); Режим елювання: ізократичний; Рухома фаза: гексан/ізопропанол; Швидкість потоку: 300 мл/хв; УФ-детекція: 215,16 нм; Навантаження: 4 г/6 хв. Перший елюційний пік являє собою мінорний діастереомер, T_R=4,75 хв. Другий елюційний пік являє собою основний діастереомер (вказану в заголовку сполуку), T_R=6,61 хв. Вказану в заголовку сполуку одержують у вигляді масла світло-жовтого кольору (43,5 г) після хіральної хроматографії. ES/MS m/z 208 (M+1); енантіомерний надлишок >98 % ee.

Препаративна методика 6

(S)-4-метоксибутан-2-аміна гідрохлорид

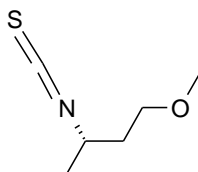


Розчин хлористого водню (4,0 М) в діоксані (110,15 г, 419,61 ммоль) додають до розчину (R)-N-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]-2-метилпропан-2-сульфінамід (43,5 г, 209,80 ммоль) в 1,4-діоксані (109 мл) при температурі 0°C, і перемішують реакційну суміш протягом 1 год. при кімнатній температурі. Розчинник концентрують при зниженому тиску, залишок повторно суспендують в толуолі, і розчинник випарюють під зниженим тиском. Залишок сушать у вакуумі протягом 15 хв. Додають THF, і в осад випадає тверда речовина білого кольору. Вказану тверду речовину відфільтровують, промивають THF, дають висохнути, і збирають з одержанням вказаної в заголовку сполуки (25,4 г, 87 %).

Абсолютна конфігурація аміну може бути підтверджена шляхом дериватизації (S)-(-)-α-метокси-α-трифторметилфенілоцтовою кислотою і порівняння ЯМР з такою ж самою похідною (S)-4-метоксибутан-2-аміну Препаративної методики 4, одержаною з хірального шляху.

Препаративна методика 7

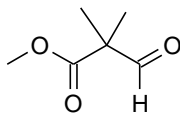
(3S)-3-ізотіоціанат-1-метоксибутан



(S)-4-метоксибутан-2-аміна гідрохлорид (25,4 г, 181,92 ммоль) суспендують у THF (609 мл), і додають триетиламін (TEA, 32,17 мл, 230,78 ммоль). До суспензії білого кольору додають 1,1'-тіокарбонілдіімідазол (46,74 г, 251,76 ммоль) (злегка екзотермічна реакція), і одержану суспензію жовтого кольору перемішують в атмосфері азоту протягом ночі. До вказаної суспензії жовтого кольору додають спочатку етилацетат (500 мл), потім 1н розчин HCl (500 мл). Органічну фазу відокремлюють, і промивають 1н розчином HCl (3×200 мл), водою (200 мл) і розсолем (200 мл), сушать Na₂SO₄, фільтрують, і концентрують при зниженому тиску до одержання вказаної в заголовку сполуки (25,3 г; 83 %) у вигляді масла жовтого кольору. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃); δ 1,37 (3H, d, J=6,6 Гц), 1,83 (2H, q, J=6,6 Гц), 3,35 (3H, s), 3,6-3,4 (2H, m); 3,99 (1H, six, J=6,6 Гц).

Препаративна методика 8

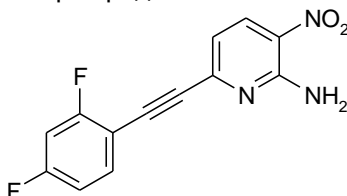
Метил-2,2-диметил-3-оксопропаноат



Метил-3-гідрокси-2,2-диметилпропаноат (52,4 г, 396,49 ммоль) розчиняють у дихлорметані (495 мл), і охолоджують суміш на бані (суміш води з льодом). Порціями додають спочатку трихлорізоціанурову кислоту (101,36 г, 436,14 ммоль), потім 2,2,6,6-тетраметилпіперидин-N-оксид (6,20 г, 39,65 ммоль). Одержану суміш перемішують при температурі 0°C протягом 15 хв, після чого витримують для нагрівання до кімнатної температури, і додатково перемішують протягом 60 хв. Після цього тверду речовину відфільтровують через CELITE®, і промивають дихлорметаном (300 мл). Фільтрат промивають насиченим розчином Na₂CO₃ у воді. Органічну фазу сушать Na₂SO₄, фільтрують, і концентрують при зниженому тиску до одержання вказаної в заголовку сполуки (41,24 г, 80 %) у вигляді масла зеленуватого кольору. Вказаний продукт використовують без подальшого очищення на наступній стадії реакції. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃); δ 1,34 (6H, s), 1,34 (6H, s), 3,74 (3H, s), 9,64 (1H, s).

Препаративна методика 9

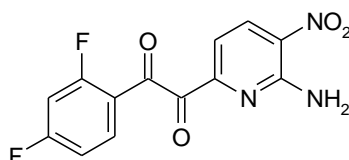
6-[2-(2,4-дифторфеніл)етиніл]-3-нітропіридин-2-амін



6-хлор-3-нітропіридин-2-іламін (1254 г, 7,23 моль), триетиламін (1510 мл, 10,84 ммоль) і ацетонітрил (10 л) завантажують в атмосфері азоту у 20 л 4-горлу круглодонную колбу, споряджену механічною мішалкою. До одержаної суспензії жовтого кольору додають йодид міді (I) (13,9 г, 72,3 ммоль) і хлорид біс(трифенілфосфін)паладію (II) (50,72 г, 72,3 ммоль). Одержану суспензію блідо-оранжевого кольору охолоджують до температури 0-5°C, після чого знегажують азотом протягом 10 хв. Краплями впродовж 60 хв додають розчин 1-етиніл-2,4-дифторбензолу (1100 г, 7,95 моль) в ацетонітрилі (2,5 л). Одержану суміш перемішують при кімнатній температурі (30°C) протягом ночі. Суміш охолоджують до температури 0-5°C. До суспензії додають толуол (6 л), суміш перемішують протягом 45 хв, і фільтрують через пористий скляний фільтр. Тверду речовину промивають толуолом (3×3 л), водою (2×3 л), і сушать протягом ночі у вакуумній печі з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини жовтого кольору (1750 г, 92 %). LC-ES/MS m/z 276 (M+1).

Препаративна методика 10

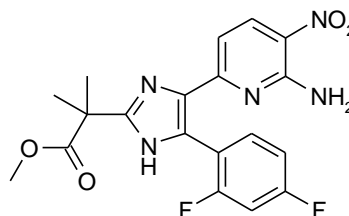
1-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-2-(2,4-дифторфеніл)етан-1,2-діон



- До холодної суспензії (0-10°C) 6-[2-(2,4-дифторфеніл)етиніл]-3-нітропіридин-2-аміну (500 г, 1,82 моль) в ацетоні (10 л) додають холодний буферний розчин [NaH₂PO₄ (0,8 М)/Na₂HPO₄ (0,8 М)=85/15 (в об'ємному відношенні)] (рН=6,0; 0-10°C, 10 л). Підтримують температуру біля 15°C.
- 5 Порціями (3 порції) додають перманганат калію (1035 г, 6,55 моль). Суміш перемішують протягом 4 год. при температурі 15°C. рН доводять до рН 5,0, і підтримують температуру нижчою ніж 15°C. Повільно додають 28 % розчин тіосульфату натрію (2054 мл, 3,64 моль), та підтримують температуру нижчою ніж 15°C і рН нижчим 7,5. До суспензії додають розсіл (7,5 л) і суміш метил-трет-бутилового простого ефіру (3,75 л) і етилацетату (3,75 л). Суміш перемішують
- 10 протягом 15 хв при температурі 13°C. Дві фази розділяють, і водну суспензію брунатного кольору двічі екстрагують метил-трет-бутиловим простим ефіром (3,5 л). Об'єднані органічні шари збирають, і промивають розсолон (2×3 л), сушать Na₂SO₄, фільтрують, і випарюють розчинник при зниженому тиску до одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини (375 г) жовтого кольору. Експеримент повторюють за тих же умов ще два рази.
- 15 Одержані партії об'єднують з одержанням 1080 г. LC-ES/MS m/z 308 (M+1).

Препаративна методика 11

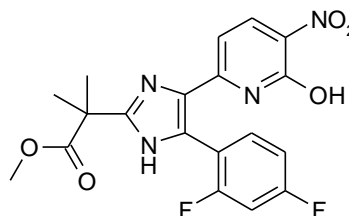
Метил-2-[4-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1Н-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат



- 20 У круглодонну колбу з парціальним конденсатором гарячого зрошення завантажують 1-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-2-(2,4-дифторфеніл)етан-1,2-діон (50 г, 162,75 ммоль), ацетат амонію (126,72 г, 1,63 моль) метил-2,2-диметил-3-оксипропаноат (42,36 г, 325,51 ммоль) і 1,4-діоксан (163 мл). Реакційну суміш нагрівають до температури 80°C протягом 1,5 год. Розчин початкового помаранчевого кольору тьмянішає з підігрівом. Реакційну суміш концентрують при
- 25 зниженому тиску для видалення діоксану, і залишок сушать під високим вакуумом протягом ночі. Залишок повторно розчиняють в етилацетаті (800 мл), і екстрагують 2 М розчином Na₂CO₃ у воді. Органічну фазу сушать MgSO₄, концентрують, і сушать під високим вакуумом протягом ночі з одержанням вказаної в заголовку сполуку у вигляді неочищеної твердої речовини помаранчевого кольору (80 г), яку використовують на наступній стадії без додаткового
- 30 очищення. LC-ES/MS m/z 418 (M+1).

Препаративна методика 12

Метил-2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-(6-гідрокси-5-нітро-2-піридил)-1Н-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат

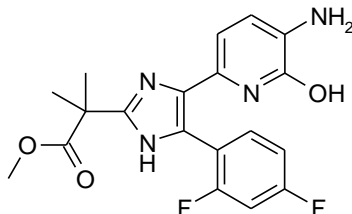


- 35 До розчину метил-2-[4-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1Н-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноату (56 г, 134,17 ммоль) у диметилсульфоксиді (DMSO, 400 мл) і воді (320 мл) краплями додають сірчану кислоту (95-97 %, 80 мл). Потім вказану суміш охолоджують до температури 0°C. До вказаної вище суміші краплями протягом 15 хв при температурі 0°C додають розчин нітриту натрію (18,70 г, 268,35 ммоль) у воді (80 мл). Реакційну суміш
- 40 перемішують протягом 20 хв при вказаній температурі, після чого охолоджувальну баню видаляють з підвищенням температури вказаної суміші до кімнатної. До реакційної суміші додають 0,8 М забуференого водного розчину дигідрофосфату натрію (1200 мл, рН=6).

Одержують суспензію жовтого кольору. Цю суспензію перемішують при кімнатній температурі протягом 1 год. Тверду речовину відфільтровують, промивають водою, і сушать у печі до одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини помаранчевого кольору (49,5 г, 88 %). LC-ES/MS m/z 419 (M+1).

5 Препаративна методика 13

Метил-2-[4-(5-аміно-6-гідрокси-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат

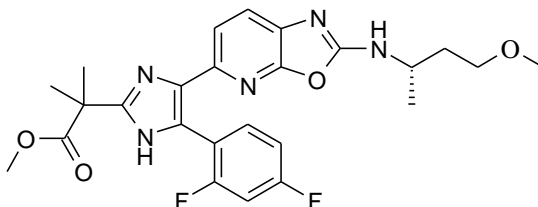


10 Суміш метил-2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-(6-гідрокси-5-нітро-2-піридил)-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноату (49,5 г, 118,32 ммоль) і 5 % (мас.) (по сухій речовині) паладію на активованому вугіллі (4,95 г, 2,33 ммоль) у метанолі (1,18 л) перемішують в атмосфері водню (еластична камера з газом під тиском) при кімнатній температурі протягом ночі. Суспензію фільтрують через CELITE®, промивають метанолом, і концентрують фільтрат при зниженому тиску до одержання неочищеної вказаної в заголовку сполуки (39 г) у вигляді твердої речовини брунатного кольору.

15 Неочищений продукт (90 г, 231,74 ммоль), одержаний здійсненням множини таких самих синтезів, очищають таким чином. Вказаний матеріал суспендують в суміші (1:1) дихлорметану (450 мл) і етилацетату (450 мл). Суспензію перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Відфільтровують суспензію, і тверду речовину промивають сумішшю (1:1) дихлорметан/етилацетат. Твердй речовині брунатного кольору дають висохнути, і збирають з одержанням 67 г вказаної в заголовку сполуки з чистотою >98 %, яку визначали засобами рідинної хроматографії/мас-спектрометрії. LC-ES/MS m/z 389 (M+1).

Препаративна методика 14

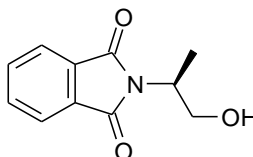
25 Метил-2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат



30 (3S)-3-ізотіоціанат-1-метокси-бутан (24,68 г, 169,94 ммоль) додають до суспензії метил-2-[4-(5-аміно-6-гідрокси-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноату (55 г, 141,62 ммоль) в етанолі (550 мл) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішують із кип'ятінням зі зворотним холодильником протягом ночі і потім охолоджують до температури 50°C. До суміші додають дициклогексилкарбодіімід (37,99 г, 184,10 ммоль), і перемішують одержану суспензію із кип'ятінням зі зворотним холодильником протягом 20 год. Вказану реакційну суміш витримують до досягнення кімнатної температури, і випарюють розчинник при зниженому тиску. Залишок абсорбують на силікагелі, і очищають на колонці з силікагелем (спочатку застосовуючи дихлорметан як елюент для видалення більшості неполярних домішків, потім суміш дихлорметан/метанол (95:5) для елювання цільового продукту) з одержанням вказаної в заголовку сполуки (52 г, 74 %) у вигляді піни темно-брунатного кольору. LC-ES/MS m/z 500 (M+1).

Препаративна методика 15

40 2-[(1S)-2-гідрокси-1-метилетил]ізоіндолін-1,3-діон

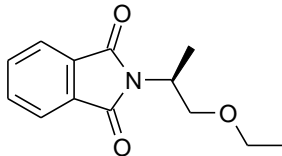


Суміш (2S)-2-амінопропан-1-олу (26 мл, 333 ммоль) і фталевого ангідриду (51,7 г, 349,4 ммоль) нагрівають при температурі 140°C протягом ночі. Протягом цього часу тверда речовина

перетворюється на рідину помаранчевого кольору. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури і розбавляють етилацетатом (10 мл/г). Органічну фазу промивають насиченим розчином NaHCO_3 і 10 % лимонною кислотою, сушать над MgSO_4 , фільтрують, і концентрують до одержання вказаної в заголовку сполуки (68,3 г, 98 %) у вигляді твердої речовини білого кольору, яку використовують без подальшого очищення. LC-ES/MS m/z 206 ($M+1$).

Препаративна методика 16

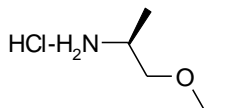
2-[(1S)-2-етокси-1-метилетил]ізоіндолін-1,3-діон



До розчину 2-[(1S)-2-гідрокси-1-метилетил]ізоіндолін-1,3-діону (47 г, 229 ммоль) і йодетану (89,3 г, 572,5 ммоль) у THF (376 мл) однією порцією додають трет-бутоксид калію (64,25 г, 572,5 ммоль). Вказану суміш перемішують в атмосфері азоту протягом 15 год. Суміш розбавляють етилацетатом (200 мл), і промивають розсолон (200 мл). Водну фазу екстрагують етилацетатом (2×100 мл). Об'єднані органічні екстракти сушать MgSO_4 , фільтрують, концентрують при зниженому тиску, і потім сушать під високим вакуумом до одержання вказаної в заголовку сполуки (39,4 г, 74 %) у вигляді твердої речовини помаранчевого кольору, яку використовують без подальшого очищення. LC-ES/MS m/z 234 ($M+1$).

Препаративна методика 17

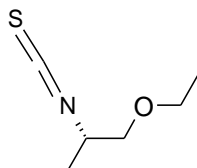
(2S)-1-етоксипропан-2-аміну гідрохлорид



2-[(1S)-2-етокси-1-метилетил]ізоіндолін-1,3-діон (12,84 г, 55 ммоль) розчиняють у метанолі (120 мл). Повільно додають моногідрат гідразину (6,9 мл, 138 ммоль), і перемішують суміш при температурі 40°C протягом 4 год. (утворюється тверда речовина білого кольору). Додають розчин NaOH (1 мл), і pH зростає до 13-14. Тверду речовину відфільтровують, і промивають дихлорметаном. Шари фільтрату розділяють, і водний шар додатково екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні шари сушать MgSO_4 , і фільтрують. До вказаного розчину додають 2н розчин HCl в ефірі (70 мл, 140 ммоль). Суміш перемішують протягом 15 хв, і розчинник випарюють при зниженому тиску з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини білого кольору (6,61 г, 86 %). ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD); δ 1,22 (t, 3H, $J=7,02$ Гц), 1,28 (d, 3H, $J=6,52$ Гц), 3,42 (m, 2H), 3,58 (m, 3H).

Препаративна методика 18

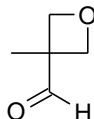
(2S)-1-етокси-2-ізотіоціанатпропан



До розчину (2S)-1-етоксипропан-2-аміна гідрохлориду (2 г, 12,03 ммоль) у диметилформаміді (DMF, 20 мл) і TEA (1,85 мл, 13,24 ммоль) додають 1,1'-тіокарбонілдіімідазол (2,36 г, 13,24 ммоль). Вказану суміш перемішують в атмосфері азоту протягом 16 год. Суміш розбавляють етилацетатом, і ретельно промивають 1н розчином HCl , водою і розсолон, сушать MgSO_4 , і концентрують при зниженому тиску (температура бані не повинна перевищувати 20°C, щоб уникнути випаровування продукту) до одержання неочищеного продукту (1,84 г), що містить вказану в заголовку сполуку, яку використовують без подальшого очищення. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 1,26 (t, 3H, $J=7,13$ Гц), 1,33 (d, 2H, $J=6,63$ Гц), 3,46 (dd, $J=5,86$ Гц, 1,62 Гц, 2H), 3,55 (dd, $J=13,98$ Гц, 6,97 Гц, 2H), 3,93 (m, 1H).

Препаративна методика 19

3-метилоксетан-3-карбальдегід



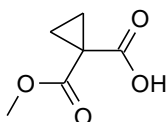
(3-метилоксетан-3-іл)метанол (6,0 г, 58,75 ммоль) розчиняють в дихлорметані (117 мл). Порціями при температурі -5°C додають спочатку трихлорізоціанурову кислоту (13,93 г, 59,92 ммоль), потім 2,2,6,6-тетраметилпіперидин-1-оксил (TEMPO) (0,92 г, 5,87 ммоль). Реакційну суміш перемішують при температурі -5°C протягом 20 хв, витримують для нагрівання до кімнатної температури, і перемішують протягом додаткових 20 хв. Суміш фільтрують через шар CELITE®, розбавляють дихлорметаном (200 мл), і промивають насиченим водним розчином Na₂CO₃ (100 мл), 1н розчином HCl (100 мл) і розсолем (50 мл). Органічну частину концентрують до одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді масла помаранчевого кольору (4,17 г, 71 %), яке використовують без подальшого очищення. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃); δ 1,48 (s, 3H), 4,50 (d, 2H, J=6,34 Гц), 4,88 (d, 2H, J=6,34 Гц), 9,95 (s, 1H).

Альтернативна препаративна методика:

Бромід калію (11,65 г, 0,098 моль) додають до суміші (3-метилоксетан-3-іл)метанолу (200 г, 1,96 моль) і TEMPO (3,06 г, 0,019 моль) у дихлорметані (2 л) при температурі 0°C. Потім до вищевказаного розчину краплями додають водний 10 % розчин гіпохлориту натрію (1,6 л, 2,35 моль), доведеного до pH 9 за допомогою твердого NaHCO₃ (додавання впродовж 3 год. з підтриманням внутрішньої температури <10°C). Одержану суміш перемішують протягом 15 хв, і дві фази розділяють. Водну фазу екстрагують за допомогою 10 % суміші 2-пропанол/дихлорметан до припинення виявлення продукту у водній фазі засобами тонкошарової хроматографії. Об'єднані органічні фази промивають насиченим розчином тіосульфату натрію, сушать MgSO₄, фільтрують, і концентрують з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді масла помаранчевого кольору (114 г, 58 %).

Препаративна методика 20

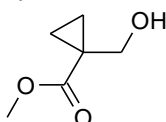
1-метоксикарбонілциклопропанкарбонова кислота



Диметилциклопропан-1,1-дикарбоксилат (26,08 мл, 189,87 ммоль) розчиняють у метанолі (319 мл) і розчин охолоджують до температури 0°C. Краплями додають 1н розчин NaOH (190 мл, 190 ммоль, 1 екв) у воді. Одержану суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчин концентрують при зниженому тиску для видалення метанолу, і одержаний водний розчин промивають дихлорметаном (3×50 мл) і підкислюють 1н розчином HCl (pH=2-3). Після цього розчин екстрагують етилацетатом (5×100 мл) і дихлорметаном (3×50 мл). Об'єднані органічні порції сушать MgSO₄, фільтрують, і концентрують з одержанням вказаної в заголовку сполуки (16,4 г, 60 %). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃); δ 1,9-1,7 (m, 4H), 3,78 (s, 3H).

Препаративна методика 21

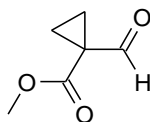
Метил-1-(гідроксиметил)циклопропанкарбоксилат



1-метоксикарбонілциклопропанкарбонову кислоту (16,4 г, 113,89 ммоль), TEA (17,6 мл, 127,55 ммоль) і THF (325 мл) завантажують у круглодонну колбу. Суміш охолоджують до температури -10°C, і краплями додають ізобутилхлороформіат (16,5 мл, 127,55 ммоль). Розчин перемішують протягом 1 год. В окремій колбі борогідрид натрію (13 г, 341,67 ммоль) розчиняють в суміші THF (165 мл) і води (40 мл), і охолоджують на бані з льодом. Нерозчинений матеріал з вказаного першого розчину видаляють фільтруванням. До розчину борогідриду краплями протягом 1,5 год. додають описаний вище розчин 1-метоксикарбонілциклопропанкарбонової кислоти. Одержаний розчин перемішують при тій самій температурі протягом 1 год. Реакційну суміш виливають в охолоджений 20 % водний розчин лимонної кислоти, і екстрагують етилацетатом (3×150 мл). Об'єднані органічні шари промивають розсолем, сушать MgSO₄, фільтрують, і концентрують при зниженому тиску до одержання вказаної в заголовку сполуки (13,5 г, 91 %). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃); δ 0,9-0,8 (m, 2H), 1,3-1,2 (m, 2H), 3,62 (s, 2H) 3,69 (s, 3H).

Препаративна методика 22

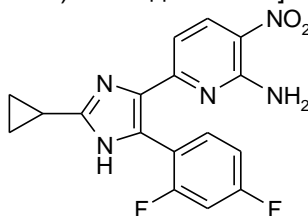
Метил-1-формілциклопропанкарбоксилат



Метил-1-(гідроксиметил)ціклопропанкарбоксилат (16,0 г, 123,07 ммоль) розчиняють у дихлорметані (320 мл), і суміш охолоджують до температури -5°C. Порціями додають трихлорізоціанурову кислоту (29,1 г, 125,5 ммоль) з подальшим доданням TEMPO (1,9 г, 12,3 ммоль). Реакційну суміш перемішують при температурі -5°C протягом 20 хв, витримують для нагрівання до кімнатної температури, і перемішують протягом 20 хв. Суміш фільтрують через шар CELITE®, і розбавляють дихлорметаном (500 мл). Розчин промивають насиченим розчином Na₂CO₃ (300 мл), 1н розчином HCl (300 мл), розсолем (300 мл) і насиченим розчином хлориду амонію (3×200 мл). Органічну частину сушать MgSO₄, фільтрують, і концентрують при зниженому тиску з одержанням 19 г вказаної в заголовку сполуки, яка все ще містить дихлорметан (теоретично 15,75 г). Цей матеріал використовують без будь-якої додаткової обробки на наступній стадії. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃); δ 1,7-1,6 (m, 4H), 3,81 (s, 3H), 10,38 (s, 1H).

Препаративна методика 23

6-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]-3-нітро-піридин-2-амін



До пробірки KIMAX® завантажують 1-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-2-(2,4-дифторфеніл)етан-1,2-діон (5 г, 16,28 ммоль), 1,4-діоксан (50 мл) і ацетат амонію (6,27 г, 81,38 ммоль). Краплями до вказаної суміші додають циклопропанкарбальдегід (3,42 мл, 48,83 ммоль). Одержану суміш продувають азотом, пробірку герметизують, і нагрівають при температурі 80°C протягом ночі, після чого суміш витримують з охолодженням до кімнатної температури. Після цього вказану суміш концентрують досуха при зниженому тиску. Додають етилацетат (700 мл) і насичений водний розчин NaHCO₃. Органічний шар відокремлюють, промивають розсолем (3×250 мл), сушать MgSO₄, і концентрують до одержання неочищеної вказаної в заголовку сполуки (5,5 г), яку використовують на наступній стадії без додаткового очищення. LC-ES/MS m/z 358 (M+1).

Проміжні сполуки, вказані у наведеній нижче таблиці, одержують по суті за методикою, описаною в Препаративній методиці 23, з використанням 1-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-2-(2,4-дифторфеніл)етан-1,2-діону та відповідного альдегіду як вихідних матеріалів.

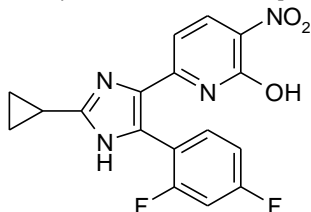
Препаративна методика	Структура	Хімічна назва	LC-ES/MS m/z
24*		6-[5-(2,4-дифторфеніл)-2-(3-метилоксетан-3-іл)-1H-імідазол-4-іл]-3-нітропіридин-2-амін	388 (M+1)
25		метил-1-[4-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-2-іл]ціклопропанкарбоксилат	416 (M+1)

*Реакцію проводять при температурі 90°C протягом 1,5 год. Під час обробки тверда речовина випадає до осаду і збирається з доданням бікарбонату натрію. Одержаний фільтрат

обробляють, як раніше з одержанням масла червоного кольору. Масло обробляють ультразвуком в суміші (4:1) етилацетат/гексан з одержанням суспензії, яку фільтрують.

Препаративна методика 26

6-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]-3-нітропіридин-2-ол



5

6-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]-3-нітропіридин-2-амін (5,51 г, 15,41 ммоль) суспендують у диметилсульфоксиді (DMSO, 32 мл), воді (25 мл) і концентрованій H_2SO_4 (6 мл). Вказану суспензію охолоджують до температури $0^\circ C$, і порціями додають нітрит натрію (2,13 г, 30,81 ммоль) з такою швидкістю, щоб зберігалася температура нижче $5^\circ C$. Одержану суміш перемішують при температурі $0^\circ C$ протягом 30 хв, потім витримують для нагрівання до кімнатної температури і перемішують, доки рідинна хроматографія/мас-спектрометрія (LC/MS) не покаже повного перетворення вихідного матеріалу (1 год.). До вказаної суміші додають 0,8 М водний розчин дигідрофосфату натрію (200 мл). Одержують суспензію жовтого кольору. Після цього додають 1Н водний розчин NaOH, доки pH не збільшиться до 8. Суміш перемішують протягом 30 год., фільтрують, тверду речовину промивають водою, після чого сушать при зниженому тиску з одержанням вказаної в заголовку сполуки (4,53 г, 82 %). LC-ES/MS m/z 358,9 (M+1).

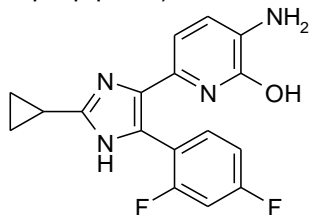
Проміжні сполуки, вказані у наведеній нижче таблиці одержують по суті за методикою, описаною в Препаративній методиці 26, з використанням відповідного 3-нітропіридин-2-аміну як вихідного матеріалу.

20

Препаративна методика	Структура	Хімічна назва	LC-ES/MS m/z
27		6-[5-(2,4-дифторфеніл)-2-(3-метилоксетан-3-іл)-1H-імідазол-4-іл]-3-нітро-піридин-2-ол	389,1 (M+1)
28		Метил-1-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-(6-гідрокси-5-нітро-2-піридил)-1H-імідазол-2-іл]циклопропанкарбоксилат	417 (M+1)

Препаративна методика 29

3-аміно-6-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]піридин-2-ол



25

6-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]-3-нітропіридин-2-ол (4,525 г, 12,63 ммоль) розчиняють в етанолі (63 мл). З розчину витискають газу шляхом барботування газоподібного азоту. До вказаної суміші порціями додають 10 % Pd/C (920 мг), і насичують суміш воднем. Суміш перемішують в атмосфері водню (еластична камера з газом під тиском)

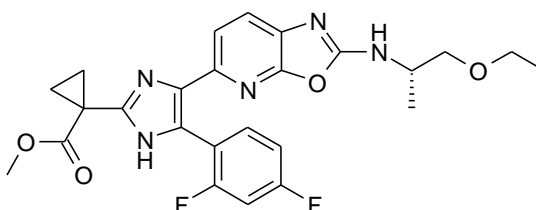
при кімнатній температурі впродовж укенду. Після завершення перемішування дані LC/MS показують повне перетворення. Суспензію фільтрують через шар CELITE® для видалення каталізатора, і розчин концентрують при зниженому тиску з одержанням вказаної в заголовку сполуки (3,97 г, 89 %). LC-ES/MS m/z 328,9 (M+1).

- 5 Проміжні сполуки, вказані у наведеній нижче таблиці, одержують по суті за методикою, описаною в Препаративній методиці 29, з використанням відповідного 3-нітропіридинолу як вихідного матеріалу.

Препаративна методика	Структура	Хімічна назва	LC-ES/MS m/z
30		3-аміно-6-[5-(2,4-дифторфеніл)-2-(3-метилоксетан-3-іл)-1H-імідазол-4-іл]піридин-2-ол	359 (M+1)
31		метил-1-[4-(5-аміно-6-гідрокси-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-2-іл]циклопропанкарбоксилат	387 (M+1)

- 10 Препаративна методика 32

Метил-1-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[(1S)-2-етокси-1-метилетил]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]циклопропанкарбоксилат

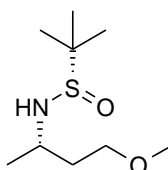


- 15 Суміш метил-1-[4-(5-аміно-6-гідрокси-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-2-іл]циклопропанкарбоксилату (4 г, 10,35 ммоль) і (2S)-1-етокси-2-ізотіоціанатопропану (2,379 г, 15,53 ммоль) розчиняють в етанолі (34 мл). Суміш нагрівають до температури 85°C в герметичній колбі протягом 16 год. Краплями додають діізопропілкарбодіімід (3,21 г, 20,71 ммоль), і перемішують суміш при температурі 85°C протягом 16 год., після чого додатково додають 3 г діізопропілкарбодіміду, і нагрівають суміш при температурі 85°C протягом 20 додаткових 4 год. Розчинник випарюють, і залишок очищають шляхом хроматографування з нормальною фазою (120 г силікагелевий картридж, із застосуванням градієнту гексан-етанол) з одержанням вказаної в заголовку сполуки (1,180 г, 24 %). LC-ES/MS m/z 498,1 (M+1).

Альтернативні препаративні методики синтезу Прикладу 1

- 25 Препаративна методика 33

(S)-N-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]-2-метилпропан-2-сульфінамід



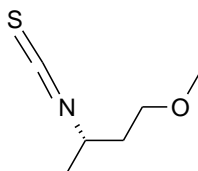
Для порівняння L-селектриду у зіставленні з борогідридом натрію стосовно відновлення N-трет-бутансульфінілімінів дивись Faul, MM. J Org. Chem. 2007, 71, 6859-6862.

- 30 1,3,3-триметоксибутан (145,4 г, 0,98 моль) змішують з 1н водним розчином соляної кислоти (50,0 мл, 0,05 моль), і перемішують протягом 1-2 год. при кімнатній температурі в атмосфері азоту. Додають THF (1,5 л), і двічі випарюють розчинник при стандартному атмосферному тиску

і температурі нижче 70°C. THF (1,5 л) додають для одержання розчину 4-метоксибутан-2-ону у THF. Додають (S)-(-)-2-метил-2-пропансульфінамід (124,4 г, 1,03 моль) і етоксид титану (IV) (447,0 г, 1,96 моль), і нагрівають реакційну суміш до температури 65-70°C протягом 16-17 год. Реакційну суміш охолоджують до температури у межах від -10°C до 0°C. Порціями додають борогідрид натрію (37,0 г, 0,98 моль), після чого суміш перемішують протягом 1-2 год. при тій самій температурі. Реакційну суміш нагрівають до кімнатної температури, і перемішують протягом 1-2 год. Потім вказану суміш охолоджують до температури 10-20°C, і протягом 1-2 год. краплями додають метанол (100 мл). Додають 25 % водний розчин хлориду натрію (300 мл), і нагрівають суміш до кімнатної температури. Додають етилацетат (500 мл). Суміш перемішують протягом 1-2 год. при кімнатній температурі, і потім фільтрують. Осад на фільтрі промивають додатковою кількістю етилацетату (807 мл). Шари розділяють, і органічну фазу промивають 25 % водним розчином хлориду натрію (1,0 л). Водну фазу екстрагують етилацетатом (500 мл). Органічні частини об'єднують, і відганяють розчинник при атмосферному тиску (без вакууму) при температурі нижче 75°C з одержанням розчину загальним об'ємом 300-500 мл. Додають етилацетат (600 мл) і тіосульфат натрію (150,0 г), і перемішують суміш протягом 1-2 год. при температурі 20-30°C. Суміш фільтрують, і фільтрат концентрують. Діастереомери розділяють засобами надкритичної рідинної хроматографії з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді масла жовтого кольору (205,0 г, 65 %). Колонка: ChiralPak® AD 10 мкм, 50×300 мм; Режим елювання: Ізократичний; Рухома фаза: CO₂/етанол; Швидкість потоку: 280 мл/хв, УФ-детекція: 215,16 нм; Навантаження: 300 мг/мл. Перший елюційний пік являє собою міnorний діастереомер, T_R=15,17 хв. Другий елюційний пік являє собою основний діастереомер (вказану в заголовку сполуку), T_R=17,11 хв.

Препаративна методика 34

(3S)-3-ізотіоціанат-1-метоксибутан



В атмосфері азоту змішують метанол (185 мл), THF (1,76 л) і N-S-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]-2-метилпропан-2-сульфінамід (220,0 г; 1,06 моль), і охолоджують до температури у межах від -10°C до 0°C. Краплями додають соляну кислоту (1,26 л, 5,3 моль, 4,2н розчин в THF), і підтримують температуру нижче 10°C. Вказану реакційну суміш перемішують протягом 3-4 год. при температурі 0-10°C, і концентрують під зниженим тиском при температурі нижче 45°C до об'єму 400,0-600,0 мл. Додають THF (880 мл), і концентрують реакційну суміш під зниженим тиском при температурі нижче 45°C до об'єму 400-600 мл. Реакційну суміш охолоджують до температури 20-30°C, і перемішують протягом 0,5-1 год. Додають затравні кристали гідрохлориду (S)-4-метоксибутан-2-аміну (5,0 г, 35,8 ммоль). (Затравні кристали можуть бути одержані з твердих речовин, одержаних за Препаративними методиками 4 або 6, або можуть бути одержані з використанням інших методів, відомих фахівцю в цій галузі, таких як перекристалізація аліквоти невеликого об'єму). Додають також метил-трет-бутиловий простий ефір (660 мл), і перемішують суміш при температурі 20-25°C протягом 2-4 год. Суміш охолоджують до температури 0-5°C, і перемішують протягом 2-4 год. Тверді речовини збирають шляхом фільтрації, і залишок на фільтрі промивають метил-трет-бутиловим простим ефіром (110 мл). Тверді речовини переносять до реакційної посудини, і при кімнатній температурі додають метил-трет-бутиловий простий ефір (660 мл). Додають тіосульфат натрію (270,0 г, 1,9 моль) і гідроксид натрію (42,5 г, 1,06 моль), і перемішують суміш протягом 1-2 год. при температурі 10-20°C. Вказану суміш фільтрують, і осад на фільтрі промивають метил-трет-бутиловим простим ефіром (440 мл) з одержанням (S)-4-метоксибутан-2-аміну у вигляді неочищеного розчину в метил-трет-бутиловому простому ефірі (87,5 г). Цей матеріал використовують в подальшій реакції так, як наведено нижче.

В атмосфері азоту додають N, N-тіокарбонілдімідазол (97,0 г, 0,55 моль) і THF (470 мл), і перемішують суміш протягом 15-30 хв. Вказану суміш охолоджують до температури у межах від -10°C до 0°C, додають розчин (S)-4-метоксибутан-2-аміну (46,9 г, 0,455 моль) у метил-трет-бутиловому простому ефірі (389 мл), і нагрівають реакційну суміш до температури 10-20°C. Вказану реакційну суміш перемішують при цій температурі протягом 15-20 год., після чого охолоджують до температури 0-10°C. Додають соляну кислоту (275 мл, 4н розчин у воді) з одержанням pH у межах від 1 до 2. Реакційну суміш нагрівають до кімнатної температури, і

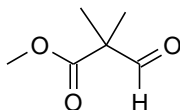
шари розділяють. Водний шар екстрагують етилацетатом (235 мл), органічні шари об'єднують, і промивають водою (140 мл). Органічний розчин концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 45°C, додають етилацетат (211,5 мл), розчин двічі концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 45°C, і додають етилацетат (235 мл). Додають

5

тіосульфат натрію (32,3 г, 227,0 ммоль), розчин фільтрують, і залишок на фільтрі промивають етилацетатом (104 мл). Фільтрат концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 45°C з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді масла жовтого кольору (55,0 г, 77 %).

Препаративна методика 35

Метил-2,2-диметил-3-оксопропаноат



10

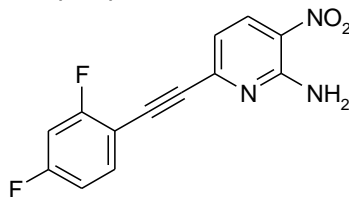
Метил-3-гідрокси-2,2-диметилпропаноат (25,4 кг, 192,2 моль) і діхлорметан (241 л) об'єднують в атмосфері азоту при кімнатній температурі з перемішуванням. Додають (2,2,6,6-тетраметилпіперидин-1-іл)окси (0,61 кг, 3,9 моль), і охолоджують реакційну суміш до температури 0-5°C. Порціями при температурі 0-5°C додають трихлорізоціанурову кислоту (31,2 кг, 134,5 моль), і перемішують реакційну суміш протягом 16-18 год. при цій температурі. Реакційну суміш фільтрують, осад на фільтрі промивають діхлорметаном (25,4 л), і концентрують фільтрат при зниженому тиску при температурі нижче 50°C. Додають 1,4-діоксан (25,4 л), і концентрують органічну фазу при зниженому тиску при температурі нижче 65°C до одержання вказаної в заголовку сполуки у вигляді рідини жовтого кольору (127,8 кг, 77 %), яку використовують без подальшого очищення.

15

20

Препаративна методика 36

6-[2-(2,4-дифторфеніл)етиніл]-3-нітропіридин-2-амін



6-хлор-3-нітропіридин-2-іамін (16,2 кг, 93,3 моль), ацетонітрил (130,8 л), йодид міді (0,18 кг, 1,0 моль) і хлорид біс(трифенілфосфін)паладію (II) (0,66 кг, 0,9 моль) об'єднують в атмосфері азоту при температурі 20-25°C з перемішуванням. Додають триетиламін (19,7 л, 141,3 моль), і нагрівають суміш до температури 30-35°C. У атмосфері азоту при температурі 30-35°C додають розчин 1-етиніл-2,4-дифтор-бензолу (18,0 кг, 130,3 моль) в ацетонітрилі (32,6 л). Суміш перемішують при температурі 15-25°C протягом 2-4 год. Додають толуол (80,0 л), і перемішують суміш протягом 0,5-1 год., потім охолоджують до температури 0-5°C, і перемішують протягом 2-4 год. Реакційну суміш центрифугують, і відфільтрований осад промивають толуолом (2×64 л) і водою (2×32,4 л). Тверді речовини сушать при зниженому тиску при температурі нижче 50°C з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини жовтого кольору (21,7 кг, 83 %).

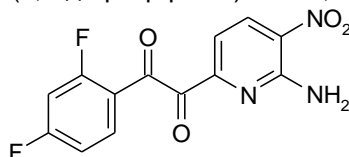
25

30

35

Препаративна методика 37

1-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-2-(2,4-дифторфеніл)етан-1,2-діон



6-[2-(2,4-дифторфеніл)етиніл]-3-нітропіридин-2-амін (2,0 кг, 7,3 моль) і ацетон (40,5 л) додають у реактор в атмосфері азоту, і охолоджують суміш до температури 0-10°C з перемішуванням. Буферний розчин з води (38,3 л), дигідрофосфату натрію (3,3 кг) і динатрій гідрофосфату (0,7 кг) додають при температурі 0-15°C. Суміш охолоджують до температури 3-6°C, і завантажують твердий перманганат калію (4,1 кг, 25,9 моль) при температурі 3-6°C. Суміш перемішують протягом 3-5 год., а потім частину реакційної суміші переносять в посудину, що містить воду (9,3 л) і пентагідрат тіосульфату натрію (3,6 кг) при температурі 15-20°C. Вказану суміш перемішують при температурі 15-25°C. Додають воду (50 л), суміш перемішують протягом 0,5-1 год., і фільтрують. Фільтрат концентрують при зниженому тиску при температурі

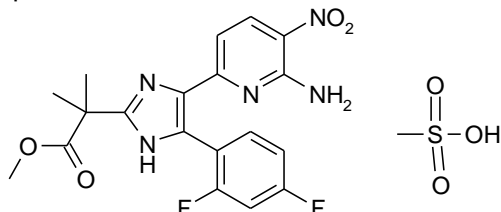
40

45

нижче 45°C. Після завершення перегонки розчинника додають воду (40 л) при температурі 20-25°C, і суміш перемішують протягом 0,5-1 год. Тверді речовини збирають шляхом фільтрації, і залишок на фільтрі сушать при температурі нижче 40°C з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини жовтого кольору (1,7 кг, 75 %).

5 Препаративна методика 38

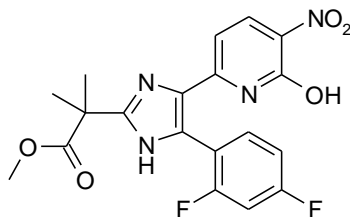
Метил-2-[4-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1Н-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноату метансульфонат



Ацетат амонію (30,0 кг, 389,2 моль), 1,4-діоксан (193,6 л) і метил-2,2-диметил-3-оксипропаноат (10,2 кг, 78,4 моль) об'єднують в атмосфері азоту з перемішуванням при температурі 20-25°C протягом 0,5-1 год. Додають 1-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-2-(2,4-дифторфеніл)етан-1,2-діон (18,5 кг, 60,2 моль), і перемішують суміш протягом 10-14 год. при температурі 20-25°C. Додають толуол (36,9 л), і концентрують розчин при зниженому тиску при температурі нижче 65°C. Додають толуол (76,8 л), після чого розчин концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 65°C. Додають толуол (36,9 л) і етилацетат (37,1 л), і фільтрують суміш. Фільтрат видаляють, а відфільтрований осад переносять до окремого реактора, і додають етилацетат (37,1 л). Вказану суміш нагрівають до температури 50-60°C при перемішуванні протягом 20-30 хв. Одержану суміш охолоджують до температури 20-25°C, фільтрують, і фільтрат змішують з попереднім фільтратом. Об'єднані фільтрати концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 60°C, і додають толуол (76,8 л). Суміш концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 65°C. Додають етилацетат (18,6 л) і толуол (18,3 л), і нагрівають розчин до температури 50-70°C. Додають розчин метансульфонової кислоти (4,3 л, 66,2 моль) у етилацетаті (18,6 л), і перемішують реакційну суміш протягом 1-2 год. Вказану реакційну суміш охолоджують до температури 10-25°C, і перемішують протягом 2-5 год. Тверді речовини збирають шляхом фільтрації, осад на фільтрі промивають етилацетатом (18,6 л) з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини брунатного кольору (17,0 кг, 96,2 % чистота, 46,2 % вихід). ¹H ЯМР (d₆-DMSO, 400 МГц) δ 1,69 (s, 6H), 2,36 (s, 3H), 3,68 (s, 3H), 6,89 (d, 1H, J=8,8 Гц), 7,00 (s, 1H), 7,25 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 7,27 (dd, 1H, J=8,4 Гц, 1,6 Гц), 7,45 (ddd, 1H, J=10,0 Гц, 10,0 Гц, 2,4 Гц), 7,83-7,68 (m, 2H), 8,40 (d, 1H, J=8,8 Гц).

Препаративна методика 39

Метил-2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-(6-гідрокси-5-нітро-2-піридил)-1Н-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат



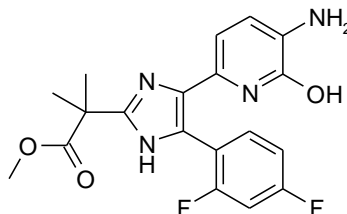
У атмосфері азоту додають метил-2-[4-(6-аміно-5-нітро-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1Н-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноату метансульфонат (68,9 г, 134,2 ммоль), диметилсульфоксид (275,5 мл), THF (116,2 мл) і воду (303,2 мл), і перемішують суміш при температурі 20-25°C. До вказаної реакційної суміші краплями додають сірчану кислоту (95-97 %, 93,6 мл) з підтриманням температури нижче 30°C. Реакційну суміш охолоджують до температури 0-5°C, і додають розчин нітриту натрію (18,6 г, 0,27 ммоль) у воді (82,7 мл) при температурі 0-10°C. Реакційну суміш перемішують протягом 1-2 год. при цій температурі. Краплями додають 10 %-ний водний розчин дигідрофосфату натрію (930,0 мл) для підтримання температури нижче 25°C. Одержану суміш перемішують протягом 2-3 год. при температурі 15-25°C, і тверді речовини збирають шляхом фільтрування. Осад на фільтрі промивають водою (138 мл), і переносять тверді речовини до реакційної посудини. Додають метанол (566 мл), і нагрівають суміш до температури 60-65°C протягом 1-2 год. Додають воду (87 мл), і перемішують суміш при

температурі 60-65°C протягом 1-2 год. Реакційну суміш охолоджують до температури 15-25°C, і перемішують при температурі 15-25°C протягом 2-4 год. Вказану суміш фільтрують, осад на фільтрі промивають метанолом (87 мл), і сушать під вакуумом при температурі нижче 70 °C з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини жовтого кольору (53,28 г, 93 %).

5

Препаративна методика 40

Метил-2-[4-(5-аміно-6-гідрокси-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат



10

Метил-2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-(6-гідрокси-5-нітро-2-піридил)-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат (90,0 г, 0,22 моль), вологий 10 % Pd/C (4,5 г) і метанол (1,77 л) змішують при температурі 15-25°C. Вказану реакційну суміш перемішують під тиском 20-25 фунтів/дюйм² (1,3790-1,7237 МПа) у атмосфері водню протягом 3-6 год. Реакційну суміш фільтрують через діатомову землю, і промивають допоміжну фільтрувальну речовину метанолом (227 мл). Фільтрат концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 40°C, і додають метил-трет-бутиловий простий ефір (MTBE) (729,3 мл). MTBE видаляють при зниженому тиску при температурі нижче 40°C, і додають додаткову кількість метил-трет-бутилового простого ефіру (729,3 мл). MTBE видаляють при зниженому тиску при температурі нижче 40°C. Додають метил-трет-бутиловий простий ефір (182 мл) і метанол (46 мл), і нагрівають суміш до температури 50-60°C протягом 1-2 год. Одержану суміш охолоджують до температури 10-15°C, і перемішують протягом 2-4 год. Тверду речовину збирають шляхом фільтрації, і залишок на фільтрі промивають метил-трет-бутиловим простим ефіром (61 мл). Тверді речовини сушать під вакуумом при температурі нижче 50°C з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини жовтого кольору (75,0 г, 88 %).

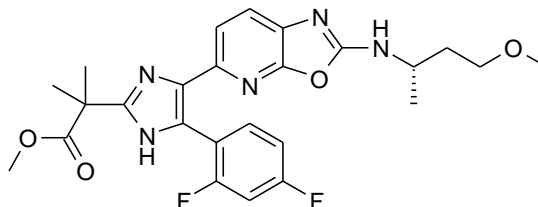
15

20

25

Препаративна методика 41

Метил-2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат



30

Диметилсульфоксид (713 мл) знегажують азотом при температурі 25-30°C протягом 0,5-1 год. в атмосфері азоту. Додають метил-2-[4-(5-аміно-6-гідрокси-2-піридил)-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат (35,0 г, 90,0 ммоль) і (3S)-3-ізотіоціанат-1-метоксибутан (19,58 г, 0,14 моль), і нагрівають реакційну суміш до температури 63-68°C. Вказану реакційну суміш перемішують протягом 18-24 год. при цій температурі, і потім порціями додають гідрохлорид 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (19,3 г, 100,7 ммоль). Реакційну суміш перемішують протягом 2-4 год. при температурі 60-65°C. У разі, якщо реакційна суміш не зазнала повного перетворення, додають додаткову кількість гідрохлориду 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (1,9 г, 9,9 ммоль). Реакційну суміш охолоджують до температури 20-30°C, і фільтрують через діатомову землю. До фільтрату додають етилацетат (351 мл) і воду (350 мл). Шари розділяють, і водну фазу екстрагують етилацетатом (312 мл). Органічні шари об'єднують, і промивають водою (2×210 мл), після чого додають гептан (626 мл). Розчин перемішують протягом 0,5-1 год., і фільтрують через силікагель, промивають сумішшю етилацетату (351 мл) і гептану (348 мл). Розчин концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 45°C, і додають етилацетат (156 мл). Додають активоване вугілля (3,5 г), і нагрівають суміш до температури 60-70°C з перемішуванням протягом 0,5-1 год. Вказану суміш охолоджують до температури 20-30°C, фільтрують, і фільтрат концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 45°C. До одержаного залишку додають толуол (242 мл), і матеріал

35

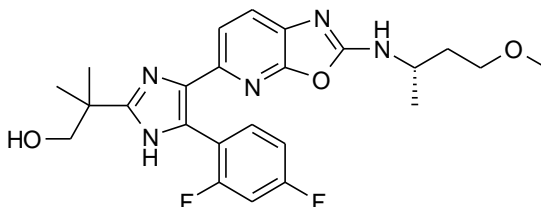
40

45

концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 45°C. Додають толуол (40 мл), і суміш нагрівають до температури 60-70°C з перемішуванням протягом 0,5-1 год. Суміш охолоджують до температури 25-30°C, перемішують протягом 2-4 год., а потім охолоджують до температури 0-5°C. Суміш перемішують при температурі 0-5°C протягом 2-4 год., і тверді речовини збирають шляхом фільтрування. Осад на фільтрі промивають толуолом (40 мл), і сушать при зниженому тиску при температурі нижче 60°C з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини не зовсім білого кольору (33,0 г, 71 %).

Приклад 1

2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[1S]-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол



Метил-2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[1S]-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат (497 мг, 0,99 ммоль) розчиняють в суміші діетилового ефіру (5 мл) і THF (2,5 мл). Суміш охолоджують до температури 0°C, і порціями додають борогідрид літію (45,6 мг, 1,99 ммоль). Потім реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі в атмосфері азоту протягом 2 год. Повільно додають 1 М HCl, доки величина pH досягне рівня 1, і суміш перемішують протягом 15 хв при кімнатній температурі. Суміш підлучують за допомогою твердого NaHCO₃, і шари розділяють. Водний шар екстрагують дихлорметаном, і об'єднані органічні шари сушать над MgSO₄, фільтрують, і концентрують при зниженому тиску. Неочищений матеріал очищають шляхом хроматографування з нормальною фазою (40 г силікагелевий картридж, 20 % розчин етанолу у гексанах). Одержують тверду речовину брунатного кольору (298 мг), яку піддають додатковому очищенню шляхом хроматографування з оберненою фазою (колонка XBRIDGE™ (5 мкм, 19×100 мм): градієнт від 35 % до 38 % ацетонітрилу в розчині карбонату амонію у воді (pH 9). Швидкість потоку 25 мл/хв) з одержанням 193 мг (41 %) вказаної в заголовку сполуки. LC-ES/MS m/z 472 (M+1). [α]_D²² +33,79° (c=0,72, метанол).

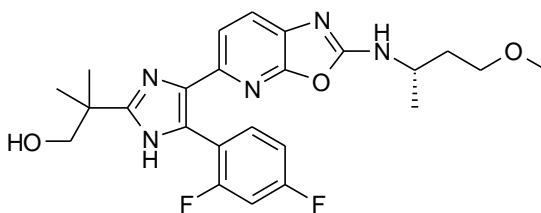
Приклад 1 Альтернативний варіант очищення

2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[1S]-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол

Метил-2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[1S]-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноат (50 г, 100,1 ммоль) розчиняють в суміші діетилового ефіру (1 л) і THF (500 мл). Суміш охолоджують до температури 0°C, і додають борогідрид літію (4,36 г, 200,19 ммоль). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі в атмосфері азоту протягом 2 год. Повільно додають 1 М HCl (600 мл) (виділення газу), і перемішують одержану суміш протягом 1,5 год. при кімнатній температурі. Шари розділяють, і екстрагують водну фазу метил-трет-бутиловим простим ефіром. Водний шар підлучують (pH=8) шляхом додання 2 М NaOH (200 мл), і екстрагують дихлорметаном (3×400 мл). Об'єднані органічні шари сушать Na₂SO₄, фільтрують, і концентрують при зниженому тиску до одержання піни брунатного кольору. Неочищений продукт елюють через колонку з силікагелем (елюент: дихлорметан/3н розчин NH₃ в метанолі 95:5) з одержанням цільового продукту у вигляді піни фіолетового кольору (35 г). Тверду речовину суспендують в суміші (2:1) гептану/метил-трет-бутилового простого ефіру, і обробляють ультразвуком. Суспензію перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Тверду речовину відфільтровують і сушать під вакуумом з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді кристалічної твердої речовини не зовсім білого кольору (30 г, 64 %). MS (m/z): 472 (M+1).

Приклад 1: Альтернативний шлях Препаративних методик 33-41

2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[1S]-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол



2-метилтетрагідрофуран (135 мл) охолоджують до температури від -5°C до 0°C в атмосфері азоту, і порціями додають борогідрид літію (4,95 г, 0,23 моль), підтримуючи температуру нижчою ніж 10°C . Краплями при температурі від -5°C до 0°C додають розчин метил-2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропаноату (45,0 г, 0,09 моль) у 2-метилтетрагідрофурані (225 мл), і перемішують протягом 12-14 год. Краплями при температурі від -5°C до 0°C додають 2 М водний розчин соляної кислоти (203 мл), і нагрівають реакційну суміш до температури $30-40^{\circ}\text{C}$ з перемішуванням протягом 1-2 год. Реакційну суміш охолоджують до температури $15-25^{\circ}\text{C}$, і розділяють шари. Органічну фазу екстрагують сумішшю води (135 мл) і 2 М водного розчину соляної кислоти (45 мл), і вказану органічну фазу відкидають. Водні шари об'єднують, і краплями додають 25 % водний розчин гідроксиду натрію (75 мл) для доведення рН до 8-9. Водну фазу екстрагують дихлорметаном (225 мл) при кімнатній температурі, і шари розділяють. Органічну частину промивають водою (2×180 мл), і потім концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 40°C . Додають метил-трет-бутиловий простий ефір (231 мл), і двічі концентрують розчин при зниженому тиску при температурі нижче 40°C . Додають етилацетат (101 мл), і нагрівають суміш до температури $50-60^{\circ}\text{C}$ з перемішуванням протягом 1-2 год. Вказаний розчин охолоджують до температури $0-5^{\circ}\text{C}$ з перемішуванням протягом 2-4 год. Тверді речовини відфільтровують, і залишок на фільтрі промивають гептаном (66 мл). Тверді речовини переносять до реакційної посудини, додають етилацетат (181 мл), після чого суміш нагрівають до температури $70-75^{\circ}\text{C}$ з перемішуванням протягом 0,5-1 год. Суміш охолоджують до температури $50-60^{\circ}\text{C}$, краплями додають гептан (157 мл), і перемішують протягом 2-4 год. Потім суміш охолоджують до температури $10-15^{\circ}\text{C}$ з перемішуванням протягом 2-4 год. Тверді речовини відфільтровують, і залишок на фільтрі промивають гептаном (66 мл). Тверді речовини переносять до реакційної посудини, і додають етилацетат (406 мл). Суміш нагрівають до температури $60-75^{\circ}\text{C}$ з перемішуванням протягом 0,5-1 год. Потім вказану суміш охолоджують до температури $40-45^{\circ}\text{C}$, і концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 45°C до одержання розчину загальним об'ємом приблизно 200 мл. Суміш нагрівають до температури $70-75^{\circ}\text{C}$ з перемішуванням протягом 0,5-1 год., після чого знову охолоджують до температури $50-60^{\circ}\text{C}$. Додають спочатку гептан (268 мл), після чого додають затравні кристали (2,25 г). (Затравні кристали можуть бути одержані з твердих речовин, одержаних з попередніх партій продукту Прикладу 1, або можуть бути одержані з використанням відомих фахівцю в даній цій галузі інших методів, таких як перекристалізація аліквоти невеликого об'єму). Суміш перемішують при температурі $50-60^{\circ}\text{C}$ протягом 2-4 год. Одержану суміш охолоджують до температури $10-15^{\circ}\text{C}$, і перемішують протягом 2-4 год. Тверді речовини збирають шляхом фільтрування, і залишок на фільтрі промивають сумішшю етилацетату (18 мл) і гептанів (16 мл). Осад сушать при зниженому тиску при температурі нижче 65°C з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини не зовсім білого кольору (27,5 г, 63 %). Метод РХВЕ: Колонка: ChiralPak® AD-H, 5 мкм, $4,6 \times 250$ мм; Режим елюювання: Ізократичний; Рухома фаза: гексан/ізопропанол/діетиламін (92:8:0.1); Швидкість потоку: 1,0 мл/хв; УФ-детекція: 337 нм. $T_R=22,6$ хв, 100 % ее.

Сполука Прикладу 1, порошкова рентгенографія (XRPD)

Порошкові рентгенограми кристалічних твердих речовин одержують за допомогою порошкового рентгенівського дифрактометру Bruker D4 Endeavor, спорядженого джерелом $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54060$ Å) і детектором Vantec, що працює при 35 кВ і 50 мА. Зразок сканують у межах $4-40^{\circ}2\theta$ з кроком, що становить $0,009^{\circ}2\theta$, при швидкості сканування 0,5 с/крок, з 0,6 мм розходженням, фіксованим рівнем антирозсіювання 5,28 мм та 9,5 мм діафрагмами детектору. Сухим порошком наповнюють кварцовий тримач зразку; і одержують гладку поверхню із застосуванням предметного скла. Дифрактограми кристалічних форм одержують при температурі та відносній вологості навколишнього середовища. У даному разі змінність положення піків $\pm 0,2^{\circ}2\theta$ буде враховувати ці потенційні зміни без перешкоджання однозначній ідентифікації вказаної кристалічної форми. Підтвердження кристалічної форми може бути

здійсненим на основі будь-якої унікальної комбінації різко виражених піків (2θ), як правило, більш виражених піків. Порошкові рентгенограми кристалічної форми, зібрані при температурі і відносній вологості навколишнього середовища, коригують на основі стандартних піків NIST 675 при $8,853^\circ 2\theta$ і $26,774^\circ 2\theta$.

5

Таблиця 1

Піки порошкових рентгенограм Прикладу 1, Форма I

Пік	Положення піків		
	Кут (2θ) $\pm 0,2^\circ$	Відносна інтенсивність (% найбільш інтенсивного піку)	Значення d (ангстрем)
1	15,06	100	5,88
2	19,94	85,5	4,45
3	10,31	60,8	8,57
4	20,78	60,4	4,27
5	17,91	59,9	4,95
6	19,25	40,1	4,61
7	16,16	39,3	5,48
8	9,33	35,7	9,47
9	21,86	31,5	4,06
10	26,61	27,7	3,35

Таким чином, кристалічний 2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[1S]-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол, Форма I, за цим винаходом може бути охарактеризований за допомогою порошкової рентгенограми з використанням джерела випромінювання CuK_α як такий, що має піки дифракції (значення 2θ), як описано в Таблиці 1, і, зокрема, що має піки при 15,06 в комбінації з одним або декількома піками при 19,94, 10,31 і 20,78; і, зокрема, що має пік при 15,06; з допуском на кути дифракції $0,2^\circ$.

10

Приклад 1 (вільна основа, Форма II):

15

Вільну основу у Формі II Прикладу 1 одержують шляхом змішування 8,01 г вільної основи у 125 мл колбі із 100 мл метил-трет-бутилового простого ефіру з одержанням суспензії твердої речовини брунатного кольору. Зразок суспендують протягом ночі при 300 об/хв і температурі 50°C . Через 18 год. вказаний зразок являє собою суспензію твердої речовини не зовсім білого кольору під супернатантом винно-червоного кольору. Зразок випарюють до зменшення об'єму приблизно наполовину, а тверду речовину не зовсім білого кольору одержують шляхом вакуумної фільтрації. Одержаний відфільтрований осад твердої речовини не зовсім білого кольору сушать протягом 2 год. у вакуумній печі при температурі 65°C . Одержують 7,15 г твердої речовини (89 %).

20

Таблиця 2

Піки порошкових рентгенограм Прикладу 1, Форма II

Пік	Положення піків		
	Кут (2θ) $\pm 0,2^\circ$	Відносна інтенсивність (% найбільш інтенсивного піку)	Значення d (ангстрем)
1	13,73	100	6,45
2	16,54	67,6	5,35
3	22,87	66,5	3,89
4	18,57	62,2	4,77
5	20,80	37,4	4,27
6	17,47	37,2	5,07
7	15,30	34,3	5,79
8	12,36	31,2	7,16
9	12,87	29,4	6,87
10	9,61	22,3	9,20

25

Таким чином, кристалічний 2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол, Форма II, за цим винаходом може бути охарактеризований за допомогою порошкової рентгенограми з використанням джерела випромінювання CuK_α як такий, що має піки дифракції (значення 2-тета), як описано в Таблиці 2, і, зокрема, що має піки при 13,73 в комбінації з одним або декількома піками при 16,54, 22,87 і 18,57; і більш конкретно, що має пік при 13,73; з допуском на кути дифракції 0,2°.

Приклад 2

2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-олу метансульфонат

2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол (37,5 мг, 0,080 ммоль) розчиняють в суміші (1:1) дихлорметан/метанол (1 мл загальний об'єм). Краплями додають 0,5 М розчин метансульфонової кислоти в метанолі (0,16 мл). Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Розчинник випарюють при зниженому тиску, і одержаний залишок двічі розтирають з трет-бутилметиловим простим ефіром. Залишок сушать під вакуумом з одержанням вказаної в заголовку сполуку (42 мг, 93 %). LC-ES/MS m/z 472 ($M+1$).

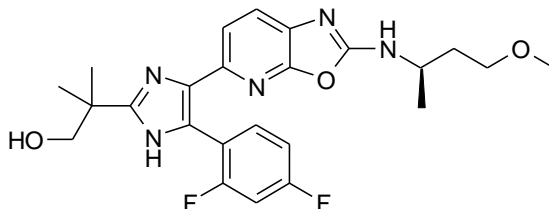
Приклад 3

2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-олу гідрохлорид

До суспензії 2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-олу (25,7 г, 54,51 ммоль) злегка рожевого кольору у метил-трет-бутиловому простому ефірі (771 мл) при температурі 60°C додають 4,0 М розчин HCl в діоксані (16,35 мл, 65,41 ммоль). Одержану суспензію нагрівають до температури 60°C протягом 30 хв, і потім витримують з поступовим досягненням кімнатної температури. Утворену тверду речовину відфільтровують в інертній азотній атмосфері, швидко збирають, і сушать під вакуумом при температурі 60°C протягом ночі з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини кремового кольору (27 г, 98 %). LC-ES/MS m/z 472 ($M+1$).

Приклад 4

2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[(1R)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол



Вказану в заголовку сполуку одержують по суті із застосуванням того самого шляху синтезу, що і для її енантіомеру S, з тією різницею, що у Препаративній методиці 1 замість S-енантіомеру використовують (1R)-N-бензил-1-фенілетанамін. $[\alpha]_D^{22}$ -32,11°, ($c=0,54$, метанол).

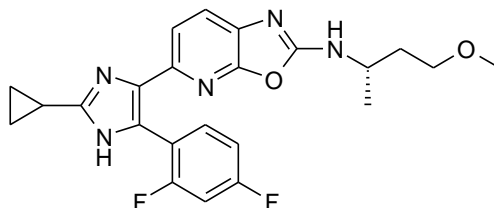
Приклад 5

2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[(1R)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-олу метансульфонат

Вказану в заголовку сполуку одержують із застосуванням по суті тієї самої методики, яка описана в Прикладі 2 для її S-енантіомеру.

Приклад 6

5-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]-N-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]оксазол[5,4-b]піридин-2-амін



До пробірки KIMAX® завантажують 3-аміно-6-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]піридин-2-ол (0,7 г, 2,13 ммоль) та етанол (7 мл). Додають (3S)-3-ізотіоціанат-1-метоксибутан (0,46 г, 3,2 ммоль), пробірку ущільнюють, і нагрівають суміш до температури

85°C. Через 16 год. додають N, N'-дициклогексилкарбодіїмід (0,88 г, 4,26 ммоль), і перемішують суміш протягом 4 год. при температурі 85°C в щільно закритій пробірці. Після закінчення цього часу до вказаної суміші додають додаткову кількість N, N'-дициклогексилкарбодіїмиду (0,44 г, 2,13 ммоль). Нагрівання продовжують при температурі 85°C протягом ночі. Після закінчення цього часу до вказаної суміші додають додаткову кількість N, N'-дициклогексилкарбодіїмиду (0,88 г, 4,26 ммоль), і продовжують нагрівання при температурі 85°C протягом 4 год. Неочищену реакційну суміш концентрують при зниженому тиску, і залишок очищають шляхом хроматографування з нормальною фазою (120 г силікагелевий картридж, градієнт дихлорметан-етанол). Фракції, що містять цільову сполуку, додатково очищають засобами напівпрепаративної PXBE з оберненою фазою (LC/MS) із застосуванням колонки XBRIDGE™ (5 мкм, 19×100 мм) та ізократичного елюювання: 36 % ацетонітрилу в 20 мМ розчині NH₄HCO₃ (pH 9), протягом 5 хв при швидкості потоку 25 мл/хв з одержанням вказаної в заголовку сполуки (0,15 г, 16 %). LC-ES/MS m/z 440 (M+1); [α]_D²²+58,60°, (c=0,50, метанол).

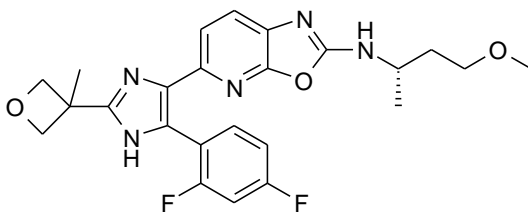
Приклад 7

5-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]-N-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]оксазол[5,4-b]піридин-2-аміну метансульфонат

5-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]-N-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]оксазол[5,4-b]піридин-2-амін (0,090 г, 0,23 ммоль) розчиняють в суміші (1:1) дихлорметану і метанолу (3 мл загальний об'єм). До вказаного розчину краплями додають 0,5 М розчин метансульфонової кислоти в метанолі (0,47 мл). Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 30 хв, після чого розчинник випарюють при зниженому тиску. Залишок змішують з метанолом, і двічі концентрують з одержанням вказаної в заголовку сполуки (0,111 г, 89 %). LC-ES/MS m/z 440 (M+1).

Приклад 8

5-[5-(2,4-дифторфеніл)-2-(3-метилоксетан-3-іл)-1H-імідазол-4-іл]-N-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]оксазол[5,4-b]піридин-2-амін



До пробірки KIMAX® завантажують 3-аміно-6-[5-(2,4-дифторфеніл)-2-(3-метилоксетан-3-іл)-1H-імідазол-4-іл]піридин (2,28 г, 6,36 ммоль) і етанол (18 мл). Додають (3S)-3-ізотіоціанат-1-метоксибутан (1,39 г, 9,54 ммоль), пробірку герметизують, і суміш нагрівають до температури 85°C. Через 16 год. додають (3S)-3-ізотіоціанат-1-метоксибутан (700 мг), і перемішують суміш протягом 48 год. при температурі 85°C в щільно закритій пробірці. До вказаної суміші додають N, N'-диізопропілкарбодіїмід (1,04 г), і перемішують суміш протягом 3 год. при температурі 85°C в щільно закритій пробірці. Неочищену реакційну суміш концентрують при зниженому тиску, і очищають залишок шляхом хроматографування з нормальною фазою (120 г силікагелевий картридж, гексан-етанол). Цільове з'єднання елюють при 3 % етанолу з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини брунатного кольору (2,61 г, 87 %). LC-ES/MS m/z 470 (M+1); [α]_D²²+42,2°, (c=0,50, метанол).

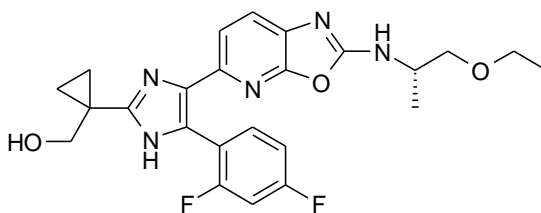
Приклад 9

5-[5-(2,4-дифторфеніл)-2-(3-метилоксетан-3-іл)-1H-імідазол-4-іл]-N-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]оксазол[5,4-b]піридин-2-аміну метансульфонат

5-[5-(2,4-дифторфеніл)-2-(3-метилоксетан-3-іл)-1H-імідазол-4-іл]-N-[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]оксазол[5,4-b]піридин-2-амін (0,72 г, 1,54 ммоль) розчиняють в суміші (1:1) дихлорметан/метанол (15 мл загальний об'єм). До вказаного розчину краплями додають 0,5 М розчин метансульфонової кислоти в метанолі (3,07 мл). Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 30 хв, після чого розчинник випарюють при зниженому тиску. Залишок розтирають з трет-бутилметилмовим ефіром з одержанням вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини брунатного кольору (0,841 г, 97 %). LC-ES/MS m/z 470 (M+1).

Приклад 10

[1-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[(1S)-2-етокси-1-метилетил]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]циклопропіл]метанол



Метил-1-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-2-етокси-1-метилетил]аміно]оксазол[5,4-*b*]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]циклопропанкарбоксилат (0,9 г, 1,99 ммоль) розчиняють у безводному діетиловому ефірі (20 мл) і безводному THF (7 мл) в атмосфері азоту, і охолоджують до температури 0°C. Порціями додають борогідрид літію (87 мг, 3,99 ммоль), і перемішують суміш при температурі 0°C протягом 1 год. Решту реагентів гасять доданням до вказаної суміші краплями 1н розчину HCl до досягнення pH=1 при кімнатній температурі протягом 30 хв. Вказану суміш промивають етилацетатом, водний шар підлужують (до pH=8) за допомогою NaOH, і екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні шари сушать MgSO₄, фільтрують, і концентрують при зниженому тиску. Залишок очищають шляхом хроматографування з нормальною фазою (120 г силікагелевий картридж) із застосуванням градієнту гексан-етанол з одержанням вказаної в заголовку сполуки (0,56 г, 60 %). LC-ES/MS *m/z* 470,2 (*M*+1); [α]_D²²-18,00°C, (*c*=0,50, MeOH), [α]_D²²-18,00°C, (*c*=0,50, CHCl₃).

Приклад 11

1-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-2-етокси-1-метилетил]аміно]оксазол[5,4-*b*]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]циклопропіл]метанолу метансульфонат

1-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-2-етокси-1-метилетил]аміно]оксазол[5,4-*b*]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]циклопропіл]метанол (0,56 г, 1,19 ммоль) розчиняють в суміші (1:1) дихлорметан/метанол (12 мл загального обсягу). До вказаного розчину краплями додають 0,5 М розчин метансульфонової кислоти в метанолі (2,37 мл). Вказану суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 30 хв, після чого розчинник випарюють при зниженому тиску. Залишок змішують з метанолом, і двічі концентрують з одержанням вказаної в заголовку сполуки (0,64 г, 96 %). LC-ES/MS *m/z* 470,1 (*M*+1).

Біологічні дослідження

Наведені нижче дослідження показують, що досліджувані сполуки за цим винаходом є ефективними інгібіторами p38 α MAP-кінази, ефективними інгібіторами p38 β MAP-кінази і ефективними інгібіторами передачі сигналів p38 MAP-кінази в ракових клітинах. Наведені нижче аналізи показують також, що сполуки Прикладу 1 або солі сполук Прикладу 1 (Приклади 2 і 3) мають високу активність *in vivo* і є ефективними протираковими агентами поодиночі та/або в комбінації з іншими онколітичними агентами.

Пригнічення активності ферменту p38 α MAP-кінази

Одержання реагентів:

Реакційний буфер для кінази одержують у вигляді концентрованого розчину, що містить 1440 мкл 1 М розчину 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонової кислоти (HEPES), pH 7,5, 240 мкл 1 М розчину MgCl₂, 72 мкл 1 М розчину дитіотреїтолу (DTT), 25 мкл 10 % розчину TRITON[®] X-100, 43223 мкл H₂O. Суміш для субстрату одержують шляхом об'єднання таких складових: 2775 мкл реакційного буферу для кінази, 75,0 мкл розчину аденозинтрифосфату (АТФ) з концентрацією 10 мМ, 270 мкл розчину пептиду EGFR (рецептор епідермального фактору росту) (компанія Upstate Biotechnology/Millipore) з 4 мМ концентрацією (9,17 мг/мл) і 12,5 мкл розчину ³³P-АТФ. Концентрований розчин ферменту p38 α MAP-кінази одержують шляхом розведення 0,1 мг/мл розчину очищеної людської p38 α MAP-кінази в 3000 мкл реакційного буферу. Концентровані розчини досліджуваних сполук одержують шляхом розчинення вказаних сполук в 100 % розчині диметилсульфоксиду (DMSO) з концентрацією 10 мМ. Планшети з 100 мкМ розведення концентрованого розчину одержують шляхом розведення 2 мкл 10 мМ концентрованого розчину в 198 мкл 20 % розчину DMSO. Розведення 1:3 у 20 % розчині DMSO одержують із 100 мкМ концентрованого розчину, із застосуванням піпетувального пристрою компанії Тесал.

Дослідження кінази:

Для проведення дослідження кінази на реакційний планшет спочатку переносять 5 мкл розбавленої сполуки, потім 10 мкл концентрованого розчину ферменту (додають за допомогою рідинного дозатора MULTIDROP[®]). Для започаткування реакції за допомогою рідинного дозатора MULTIDROP[®] додають 10 мкл субстратної суміші, і струшують планшет протягом 30 с. Заключні умови проведення реакції такі: 25 мМ розчин HEPES, pH 7,5, 4,25 мМ розчин MgCl₂, 1,30 мМ розчин DTT, 0,004 % розчин TRITON[®] X-100, 100 мкМ розчин АТФ, 100 мкМ розчин

пептиду EGFR, 11,8 нМ розчин р38α MAP-кінази і 4 % розчин DMSO. Реакційну суміш інкубують при кімнатній температурі протягом 60 хв, після чого реакцію зупиняють шляхом додання 75 мкл 5 % розчину оцтової кислоти (свіжоприготований). Після припинення реакції 100 мкл реакційної суміші переносять на планшет з фосфоцеллюлозним фільтром (компанія Millipore, NAPH), який попередньо промивають 100 мкл 0,5 % розчину оцтової кислоти. Реакційну суміш інкубують на планшеті з фосфоцеллюлозним фільтром протягом 30 хв, фільтрують із застосуванням вакуумного колектора, і один раз промивають 300 мкл, а потім двічі 200 мкл 0,5 % розчину ортофосфорної кислоти. Після стадій промивки додають 80 мкл розчину MICROSCINT™ 20, і підраховують радіоактивність за допомогою лічильника Trilux MicroBeta®. Значення IC₅₀ обчислюють із застосуванням програми Activity Base (компанія IDBS). Величина IC₅₀ усіх досліджуваних сполук є меншою ніж 0,050 мкМ. Наприклад, сполука Прикладу 1 має IC₅₀=0,003 мкМ. Це дослідження показує, що сполука Прикладу 1 є потужним інгібітором р38α MAP-кінази.

Пригнічення активності ферменту р38β MAP-кінази

Одержання реагентів:

Реакційний буфер для кінази одержують по суті як описано вище. Суміш для субстрату одержують шляхом об'єднання таких складових: 2840 мкл реакційного буферу для кінази, 15,0 мкл розчину аденозинтрифосфату (АТФ) з концентрацією 10 мМ, 125 мкл розчину пептиду EGFR з концентрацією 4 мМ (9,174 мг/мл) і 18,75 мкл розчину ³³P-АТФ. Концентрований розчин ферменту р38β MAP-кінази одержують шляхом розведення 2,25 мкл розчину (0,57 мг/мл) наявної у продажу р38β MAP-кінази (компанія Upstate Biotechnology/Millipore) в 2000 мкл реакційного буфера. Концентровані розчини експериментальних сполук одержують по суті як описано вище.

Дослідження кінази:

Дослідження кінази проводять по суті як описано для р38α MAP-кінази. Заключні умови проведення реакції такі: 25 мМ розчин HEPES, рН 7,5, 4,25 мМ розчин MgCl₂, 1,30 мМ розчин DTT, 0,004 % розчин TRITON® X-100, 20 мкМ розчин АТФ, 65 мкМ розчин пептиду EGFR, 0,25 нг/мкл розчин р38α MAP-кінази і 4 % розчин DMSO. Величина IC₅₀ усіх зразкових сполук є меншою за 0,050 мкМ. Наприклад, сполука Прикладу 1 має IC₅₀=0,007 мкМ. Це дослідження показує, що сполука Прикладу 1 є потужним інгібітором р38β MAP-кінази.

Пригнічення активності р38 MAP-кінази у аналізі на клітинній основі

Пригнічення р38 MAP-кінази в клітинах HeLa досліджують шляхом визначення рівнів р-MAPKAPK2 після стимулювання TNFα у присутності досліджуваної сполуки. Людські клітини HeLa (Американська колекція типових культур (ATCC)) культивують у модифікованому за способом Дульбекко середовищі Ігла (середовище DMEM), що містить 10 % зародкової бичачої сироватки (FBS, компанія GIBCO). Досліджувані сполуки приготують при послідовному розведенні 1:3 у культуральному середовищі з кінцевою концентрацією DMSO 0,1 %. Для проведення дослідження 60000 клітин/лунку висівають на 96-лункові планшети з полі-D-лізиновим покриттям в 100 мкл середовища DMEM, що містить 10 % зародкової бичачої сироватки. Клітини інкубують протягом ночі при температурі 37°C у 5 % CO₂-інкубаторі. Наступного дня планшети перевертають для того, щоб видалити середовище, і додають 90 мкл свіжого середовища, що містить DMSO (контрольні лунки) або послідовно розведені досліджувані сполуки. Планшети інкубують протягом 1 год. при температурі 37°C у присутності 5 % CO₂. Через 1 год. у лунки додають 20 мкл розчину (100 нг/мл) людського TNFα (у суміші DMEM/FBS) з одержанням кінцевої концентрації 18,2 нг/мл. Всі лунки обробляють TNFα, за виключенням лунок з мінімальним контрольним сигналом, у які TNFα не додають. Клітини інкубують з TNFα протягом 15 хв (37°C/5 % CO₂) для того, щоб стимулювати фосфорилювання MAPKAPK-2, субстрату р38 MAP-кінази.

Для проведення дослідження cELISA середовище видаляють шляхом перевертання планшету. Клітини фіксують шляхом додавання фіксатора PREFER® (компанія Anatech Ltd) протягом 30 хв при кімнатній температурі. Клітини тричі промивають (протягом 5 хв кожного разу) 100 мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину (PBS), що містить 0,1 % розчин TRITON® X-100 (ця суміш визначається як PBST). До клітин на 15 хв додають 100 мкл 0,6 % розчину H₂O₂ в PBST для гасіння пероксидази, а потім знову тричі промивають (протягом 5 хв кожного разу) PBST. Клітини блокують шляхом додаванням 5 % розчину бичачого сироваткового альбуміну (BSA) при кімнатній температурі протягом 1 год. Клітини тричі промивають (протягом 5 хв кожного разу) PBST. Клітини інкубують протягом ночі при температурі 4°C з розведеним 1/1000 першим антитілом, спрямованим проти р-MAPKAPK-2 Thr334 (компанія Cell Signaling), у PBST, що містить 5 % BSA. Клітини тричі промивають PBST (протягом 5 хв кожного разу). Клітини впродовж 1 год. при кімнатній температурі обробляють другим антитілом, кон'югованим з пероксидазою анти-кролячим Ig-антитілом (компанія

Amersham), розведеним 1/1000 в PBST з 5 % BSA. Клітини тричі промивають PBST (протягом 5 хв кожного разу).

Для виявлення сигналу застосовують комплект SuperSignal® ELISA femto kit (компанія Pierce). Рівні частини люміналу Femto/інтенсифікатору і пероксидази змішують перед застосуванням. 100 мкл цієї суміші додають в кожну лунку, і струшують протягом 1 хв перемішувальним пристроєм для мікропланшетів. Відносні світлові одиниці визначають із застосуванням люмінометра Victor 1420. Відносні значення IC_{50} визначають із застосуванням програми Activity Base (компанія IDBS). Величина IC_{50} усіх досліджуваних сполук є меншою за 0,050 мкМ. Наприклад, сполука Прикладу 1 має $IC_{50}=0,0016$ мкМ. Це дослідження показує, що сполука Прикладу 1 є потужним інгібітором передачі сигналів р38β MAP-кінази в ракових клітинах.

In vivo цільове пригнічення (IVTI) р38 MAP-кінази у "наївних" мишей лінії C57BL/6

IVTI р38 MAP-кінази визначають на мононуклеарних клітинах периферичної крові (PBMC) мишей з пероральним введенням досліджуваної сполуки із застосуванням протоково-цитометричного дослідження р-MAPKAPK2, субстрату р38 MAP-кінази.

Стадія експерименту на живих тваринах:

Мишей-самців лінії C57BL/6 (віком 6-8 тижнів) довільно розподіляють на групи по 4 тварини. Досліджувану сполуку вводять пероральним шляхом за допомогою шлунокового зонду в 0,1 мл носія (1 % розчин гідроксиетилцелюлози (HEC), 0,25 % розчин TWEEN® 80, 0,05 % розчин протиспінювача). Контрольним тваринам вводять 0,1 мл носія без досліджуваної сполуки. Для дослідження ефекту разової дози і залежності "доза-ефект" тварин вмертвлюють через 2 год. після введення дози. Для дослідження часового перебігу тварин вмертвлюють в різних часових точках після введення дози, як правило через 1 год., 2 год., 4 год., 6 год., 18 год. і 24 год. Цільну кров збирають у пробірки з EDTA (компанія AQUISEL).

Виявлення фосфо-MAPKAPK2 в PBMC за допомогою протокової цитометрії:

До кожної пробірки з EDTA додають 100 мкл цільної мишачої крові, і інкубують при температурі 37°C протягом 10 хв. У суміші барвнику/буферу для промивання одержують суміш трьох антитіл у таких розведеннях: FITC-кон'юговане пацюче анти-мишаче моноклональне антитіло (mAb) Ly-6G (компанія BD Biosciences) 1:25; APC-кон'юговане пацюче анти-мишаче моноклональне антитіло CD11b (компанія BD Biosciences) 1:10; і блок BD мишачих Fc (компанія BD Biosciences) 1:100. Одержують концентрований розчин анізоміцину (компанія Sigma) з концентрацією 5 мг/мл у DMSO. 15 мкл концентрованого розчину анізоміцину поділяють на аліквоти в одноразові пробірки, і зберігають при температурі -20°C для одноразового застосування. У день проведення дослідження концентрований розчин (5 мг/мл) розбавляють за допомогою суміші барвнику/буферу для промивання (компанія BD) до 100 мкг/мл. Рівний об'єм розведеного анізоміцину змішують із сумішшю антитіл.

20 мкл вищевказаної суміші додають до кожної пробірки з цільною кров'ю, по одній пробірці кожні 20 с. Зразок інкубують при температурі 37°C протягом 15 хв у термоміксері з обережним струшуванням. Лізисний/фіксувальний буфер (компанія BD Biosciences) розбавляють 5× у воді, і нагрівають до температури 37°C. До кожної пробірки (по одній пробірці кожні 20 с) в тій самій послідовності, як і раніше, додають 1,6 мл розбавленого лізисного/фіксувального буферу (=1×робоча концентрація). Зразки інкубують при температурі 37°C протягом 10 хв зі струшуванням. Потім клітини центрифугують при 600×g протягом 8 хв при кімнатній температурі. Клітини один раз промивають 3 мл буферу для промивання/забарвлювання, PBS і 5 % декомплементованої (інактивованої нагріванням) FBS. Супернатант обережно відкидають, щоб запобігти втраті клітинного дебрису. Анти-фосфо-MAPKAPK-2 (Thr334) антитіло (компанія Cell Signaling Technology, клон 27B) і блок мишачих Fc розводять разом у середовищі Permeabilization Medium B (компанія Caltag) (250×розведення для обох). 200 мкл розбавленої суміші антитіл використовують для ресуспендування клітин.

Після цього клітини інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Потім додають 3 мл буферу для забарвлювання/промивання, і клітини центрифугують, як описано вище. Повторюють промивання 3 мл буферу для забарвлювання/промивання. Кон'югат козячого F(ab')₂ анти-кролячого імуноглобуліну-PE (компанія Biosource) розводять в буфері для забарвлювання/промивання (250×розведення). Потім 200 мкл розведеного антитіла додають в кожну пробірку.

Зразки інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Потім додають 3 мл буферу для забарвлювання/промивання, і центрифугують клітини. Повторюють промивання 3 мл буферу для забарвлювання/промивання. Нарешті, клітини ресуспендують в 250 мкл PBS плюс 1 % декомплементованої (інактивованої нагріванням) FBS. Зразки аналізують методом протокової цитометрії (FACScaliber, компанія BD). Після визначення життєздатної моноклітинної популяції

шляхом бічного і прямого розсіювання, у популяції моноцитів, визначеній (за допомогою дискримінаційного вікна) із застосуванням CD11b^{hi}Ly6G⁻, визначають рівень p-MAPKAPK2.

Аналіз даних:

Середню інтенсивність флуоресценції в моноцитарних клітинах аналізують, щоб визначити рівень p-MAPKAPK2. Рівень p-MAPKAPK2 (pMK2) в анізоміцин-стимульованих моноцитах мінус нестимульовані моноцити контрольних тварин, які одержували носій, використовується для визначення сигнального вікна. Відсоткове пригнічення досліджуваною сполукою визначають за допомогою такого рівняння:

% пригнічення = $100 - [100 \times (\text{стимульована pMK2} - \text{нестимульована pMK2 у тварин, які одержували досліджувану сполуку}) / (\text{стимульована pMK2} - \text{нестимульована pMK2 у тварин, які одержували носій})]$

Із застосуванням цього протоколу порогова ефективна доза для 70 % пригнічення (TED₇₀) для сполуки Прикладу 1 становить 5,1 мг/кг через 2 год. після введення дози. Порогова ефективна концентрація для 70 % пригнічення (TEC₇₀), визначена шляхом вимірювання рівня циркулюючої сполуки в плазмі при проведенні того ж самого аналізу, становить 39,4 нг/мл (0,084 мкМ) через 2 год. після введення дози. Це дослідження показує, що сполука Прикладу 1 має високу активність in vivo.

In vivo пригнічення p38 MAP-кінази у мишей з пухлинами

Ксенотрансплантатну мишачу модель з використанням лінії людських пухлинних клітин, U87MG, використовують для оцінки пригнічення p38 MAP-кінази в пухлинах.

Стадія експерименту на живих тваринах:

"Голим" мишам-самцям (24-26 г, компанія Harlan) підшкірно до задньої бічної частини ін'єктують 5×10^6 клітин/тварину лінії U87MG. Клітини в об'ємі 0,2 мл вводять із сумішшю (1:1) культурального середовища і матричного матеріалу BD MATRIGEL™. Через 7 днів після імплантації пухлини вимірюють за допомогою штангенциркуля, і дані реєструють. У подальшому пухлини вимірюють два рази на тиждень, і розмір пухлин реєструють. Коли середній об'єм пухлин досягає приблизно 250 мм³ (зазвичай через 10-15 днів після імплантації), тварин довільно розподіляють на групи по 8-10 голів для проведення оброблення. Потім тваринам перорально у об'ємі 0,2 мл вводять лише носій (1 % HEC, 0,25 % TWEEN® 80, 0,05 % протиспінювача) або носій, що містить досліджувану сполуку. Через 2 год. після введення дози тварин вмертвлюють. Пухлини вирізають і негайно обробляють шляхом гомогенізації в розчині 1 % TRITON® X-100 з сумішшю повних інгібіторів протеаз і фосфатаз (дивись Standard tablets complete, EDTA-free Protease Inhibitor cocktail, компанія Roche, № за каталогом: 11873580001). Крім того, кров збирають у пробірки, вкриті етилендіамінтетраоцтовою кислотою (EDTA), і у 96-лунковому планшеті одержують плазму для проведення аналізу експозиції.

Аналіз p-MAPKAPK2 в пухлинних лізатах:

Рівні p-MAPKAPK2 в пухлинних лізатах визначаються за допомогою набору Mesoscale Discovery (MSD) capture ELISA Kit (2 фосфо-MAPKAPK-2 (Thr334)). Концентрацію білка у вказаних лізатах визначають за допомогою набору для аналізу білка BioRad DC protein assay kit (компанія Bio-Rad). Зразки білка від кожного пухлинного лізату доводять до 2 мг/мл із застосуванням 1 % TRITON® X-100. Для мезомасштабного виявлення p-MAPKAPK2, 50 мкг пухлинного лізату додають на 96- лунковий планшет, який попередньо вкритий іммобілізованим антитілом (=антитіло проти загального білка MAPKAPK2), та який включає в себе вугільний електрод. Рівні p-MAPKAPK2 зондують із застосуванням міченого рутенієм анти-p-MAPKAPK2 ідентифікуючого антитіла. Після інкубації з ідентифікуючим антитілом MSD-планшет промивають з подальшим доданням MSD-буферу для зчитування. Після проходження струму по електроду, електро-хемілюмінесценція призводить до утворення світла, кількісне визначення якого здійснюють за допомогою приладу MSD Sector 6000. Для кожного дослідження відсоткове пригнічення обчислюють по відношенню до контрольної групи, яка одержувала носій, і із застосуванням пакету програм JMP здійснюють дисперсійний аналіз (середнє обчислене значення статистичного дисперсійного аналізу) для визначення статистичної значущості. Результати вказаного аналізу підтверджуються імуноблотингами при проведенні репрезентативних досліджень. За результатами цього дослідження було встановлено, що TED₇₀ сполуки Прикладу 1 для цільового пригнічення p38 MAP-кінази в пухлинах дорівнює 2,9 мг/кг, а TEC₇₀ дорівнює 31,3 нг/мл. Ці дані показують, що, у разі сполуки Прикладу 1, цільова пригнічувальна активність в пухлинах є подібною до пригнічувальної активності у PBMC.

Визначення ефективності in vivo на ксенотрансплантатних моделях

Ксенотрансплантатна модель A2780:

"Голих" мишей-самців лінії CD1 одержують від компанії Charles River Laboratories масою приблизно 22-25 г. Після акліматизації протягом 1 тижня до задньої бічної частини кожної миші

підшкірно ін'єктують клітини людського раку яєчника (2×10^6 , лінія A2780) в об'ємі 0,2 мл із сумішшю (1:1) культурального середовища і матричного матеріалу BD MATRIGEL™. Розмір пухлин постійно контролюють шляхом вимірювання штангенциркулем двічі на тиждень. Коли середній об'єм пухлин досягає приблизно 150 мм³, тварин довільно розподіляють на групи по 10 голів. Обробку інгібітором p38 MAP-кінази розпочинають після довільного розподілу на групи. Сполуку Прикладу 2 вводять пероральним шляхом в об'ємі 0,2 мл, що містить 1 % НЕС, 0,25 % TWEEN® 80, 0,05 % протиспінювача (НЕС/TWEEN®). Сполуку вводять дозами 1 мг/кг, 3 мг/кг і 10 мг/кг. Дозування здійснюється тричі на день (TID) за схемою: введення протягом 4 днів, 3 дні без введення. Здійснюють три цикли дозування. Об'єм пухлини контролюють два рази на тиждень протягом періоду дозування, а ефективність (пригнічення росту пухлини) контролюють відносно контрольної групи, яка одержує носій (n=10 тварин). Через 1 год., 2 год. і 8 год. після останньої дози інгібітора p38 MAP-кінази у тварин відбирають плазму для визначення циркуляційних рівнів сполуки в організмі тварин.

	Пригнічення росту пухлини (%)				Середня концентрація в плазмі (мкМ) на момент часу (год.) після останньої дози		
Досліджувані групи (перорально, тричі на день, введення впродовж 4 днів, 3 дні вихідні, 4 цикли) (мг/кг)	День 20	День 23	День 26	День 29 (останній)	1	2	3
1	70,6	76,6	76	78,3	0,0263	0,0146	BQL<(1,00)
3	32,5	47,7	42,7	37,7	0,0526	0,0604	0,0042
10	60	71,2	72,8	74,8	0,4952	0,3978	0,0243

Ксенотрансплантатна модель множинної мієломи OPM-2:

Мишей-самиць лінії CB-17 SCID масою приблизно 20-22 г одержують від компанії Taconic. Після акліматизації протягом одного тижня мишей опромінюють дозою у 2,5 Гр. Через 24 год. після опромінення мишам до задньої бічної частини підшкірно ін'єктують клітини OPM-2 ($1,0 \times 10^7$) в об'ємі 0,2 мл із сумішшю (1:1) культурального середовища і матричного матеріалу BD MATRIGEL™. Розмір пухлин постійно контролюють шляхом вимірювання штангенциркулем двічі на тиждень. Коли об'єм пухлин досягає 100-150 мм³, тварин довільно розподіляють на групи для дозування. Обробку сполукою розпочинають після довільного розподілу на групи. Сполуку Прикладу 2 вводять пероральним шляхом в об'ємі 0,2 мл, що містить 1 % НЕС, 0,25 % TWEEN® 80, 0,05 % протиспінювача (НЕС/TWEEN®). Сполуку вводять дозами 15 мг/кг і 30 мг/кг. Дозування здійснюють двічі на день (BID) впродовж 28 днів. Об'єм пухлини контролюють два рази на тиждень протягом періоду дозування, а ефективність (пригнічення росту пухлини) контролюють відносно контрольної групи, яка одержує носій (n=10 тварин).

-	НЕС/TWEEN, 0,2 мл, перорально, двічі на день				Сполука Прикладу 2, 15 мг/кг, перорально, двічі на день				Сполука Прикладу 2, 30 мг/кг, перорально, двічі на день			
-	Кількість мишей	Середній об'єм пухлини (мм ³)	Середня квадратична помилка	Значущість	Кількість мишей	Середній об'єм пухлини (мм ³)	Середня квадратична помилка	Значущість	Кількість мишей	Середній об'єм пухлини (мм ³)	Середня квадратична помилка	Значущість
4	10	102,8	20,84	Контр.	9	101,69	18,94	H3	9	97,8	16,77	H3
8	10	88,54	17,95	Контр.	9	87,96	16,38	H3	9	90,78	15,57	H3
11	10	141,58	28,7	Контр.	9	104,9	19,54	H3	9	118,46	20,32	H3
15	10	132,95	26,95	Контр.	8	104,21	19,65	H3	9	95,34	16,35	H3
18	10	161,01	32,64	Контр.	8	120,17	22,83	H3	9	103,71	17,79	*
21	10	211,27	42,83	Контр.	8	182,47	34,89	H3	9	115,16	19,75	**
25	10	233,07	47,25	Контр.	8	169,53	32,63	H3	9	155,27	26,63	H3
29	10	289,92	58,77	Контр.	8	214,28	41,47	H3	9	154,83	26,56	**
33	10	464,75	94,21	Контр.	8	326,29	63,41	H3	9	224,14	38,45	**
36	10	635,98	128,92	Контр.	8	384,59	74,93	*	9	243,32	41,74	***

-	HEC/TWEEN, 0,2 мл, перорально, двічі на день				Сполука Прикладу 2, 15 мг/кг, перорально, двічі на день				Сполука Прикладу 2, 30 мг/кг, перорально, двічі на день			
-	Кіль- кість ми- шей	Серед- ній об'єм пухлини (мм ³)	Середня квадра- тична помилка	Зна- чу- щість	Кіль- кість мишей	Серед- ній об'єм пухли- ни (мм ³)	Середня квадра- тична помилка	Зна- чу- щість	Кіль- кість ми- шей	Середній об'єм пухлини (мм ³)	Середня квадра- тична помилка	Зна- чу- щість
43	10	875,15	177,41	Контр.	8	628,46	123,01	H3	9	407,07	69,82	***
46	9	1162,28	237,09	Контр.	8	700,62	137,33	*	9	527,14	90,42	***
49	8	1238,92	256,05	Контр.	8	937,29	183,95	H3	9	642,22	110,16	**
53	8	1437,56	301,51	Контр.	8	1138,19	223,68	H3	9	812,48	139,37	*

Контр. - контроль

H3 - не значуща

Ксенотрансплантатна модель 786-О в поєднанні з сунітинібом:

- 5 "Голих" мишей-самиць масою 24-26 г одержують від компанії Harlan Labs. Після акліматизації протягом 1 тижня до задньої бічної частини кожної миші підшкірно ін'єктують клітини людського гіпернефроїдного раку (5×10^6 , лінія 786-О) в об'ємі 0,2 мл із сумішшю (1:1) культурального середовища і матричного матеріалу BD MATRIGEL™. Розмір пухлин постійно контролюють шляхом вимірювання штангенциркулем двічі на тиждень. Коли середній об'єм пухлин досягає приблизно 150-200 мм³, тварин довільно розподіляють на групи по 8-10 голів.
- 10 Обробку інгібітором р38 MAP-кінази розпочинають після довільного розподілу на групи. Сполуку вводять пероральним шляхом в об'ємі 0,2 мл, що містить 1 % HEC, 0,25 % TWEEN® 80, 0,05 % протиспінювача (HEC/TWEEN®). Дозування здійснюється двічі на день (BID) лише сполукою або у поєднанні з сунітинібом у дозі 10 мг/кг або 20 мг/кг, який також вводять пероральним шляхом
- 15 двічі на день у такому ж самому носії. Об'єм пухлини контролюють два рази на тиждень, а ефективність (пригнічення росту пухлини) контролюють відносно тварин контрольної групи, які одержують носій.

			% пригнічення росту пухлин				
Група №	Експериментальні групи (перорально, двічі на день×28)	Кількість суб'єктів	День 17	День 21	День 24	День 28	День 31
1	HEC/TWEEN®, 0,2 мл HEC/TWEEN® 0,2 мл	10	0	0	0	0	0
2	Приклад 3 15 мг/кг HEC/TWEEN® 0,2 мл	8	-35,5	-23	-52,4	-74,1*	-58,8*
3	Сунітиніб 10 мг/кг HEC/TWEEN® 0,2 мл	8	-1,6	2,9	-16,3	-21,2	-27,7
4	Сунітиніб 20 мг/кг HEC/TWEEN® 0,2 мл	8	-55,9	31,5	18	34,5	35,4*
5	Приклад 3 15 мг/кг Сунітиніб 10 мг/кг	8	-31,3	9,8	-14,9	-23,2	-0,4
6	Приклад 3 15 мг/кг Сунітиніб 20 мг/кг	8	69,4*	96,8*	89*	99,1*	97,5*

* Статистично значущий у порівнянні з носієм.

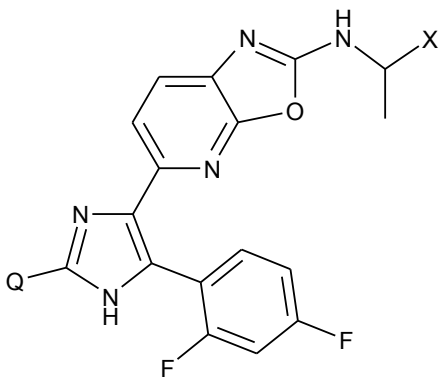
- 20 Дані цього дослідження показують, що пригнічення р38 MAP-кінази (15 мг/кг BID) підвищує протипухлинну ефективність сунітинібу у дозі 20 мг/кг. Статистичну оцінку синергії проводили із застосуванням дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями log об'єму пухлини у залежності від часу. Цей аналіз показав загальну значущу синергію ($p > 0,0001$) між 15 мг/кг BID інгібітора р38 MAP-кінази і 20 мг/кг BID сунітинібу.
- 25 Сполуки за цим винаходом за варіантом, якому віддають перевагу, включають до складу фармацевтичних композицій, які вводять різними шляхами. За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, такі композиції є призначеними для перорального або внутрішньовенного введення. Такі фармацевтичні композиції і способи їх одержання є добре відомими в цій галузі. Дивись, наприклад, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (D. Troy, et al.,

eds., 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

Сполуки за цим винаходом як правило ефективні в широкому діапазоні доз. Наприклад, добові дози зазвичай знаходяться в діапазоні від приблизно 14 мг до приблизно 155 мг. У деяких випадках рівні доз нижче нижньої межі вищевказаного діапазону можуть бути більш ніж достатніми, тоді як в інших випадках ще більш високі дози можуть бути застосовані без вчинення будь-якої шкідливої побічної дії, і тому вказаний вище діапазон дозування не є призначеним для обмеження обсягу винаходу будь-яким чином. Слід розуміти, що кількість сполуки, яку фактично вводять, буде визначатися лікарем у залежності від конкретних обставин, у тому числі від стану, що підлягає лікуванню, вибраного шляху введення, фактичної сполуки або сполук, що вводяться, віку, маси і реакції конкретного пацієнта, а також від тяжкості симптомів пацієнта.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука формули:



де:

- Х - метоксіетил або етоксиметил;
- Q - циклопропіл, 2-метилпропанол-2-іл, 3-метилоксетан-3-іл або 1-гідроксиметил-1-циклопропіл; або її фармацевтично прийнятна сіль.
2. Сполука за п. 1, яка являє собою 2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол, або її фармацевтично прийнятна сіль.
3. Сполука за п. 1 або п. 2, яка являє собою кристалічний 2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол, який характеризується порошковою рентгенограмою (випромінювання Си-анода, $\lambda=1,54060 \text{ \AA}$), що містить пік при 15,06 і один або декілька піків при 19,94, 10,31 і 20,78 ($2\theta \pm 0,2^\circ$).
4. Сполука за п. 1 або п. 2, яка являє собою кристалічний 2-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]-2-метилпропан-1-ол, який характеризується порошковою рентгенограмою (випромінювання Си-анода, $\lambda=1,54060 \text{ \AA}$), що містить пік при 13,73 і один або декілька піків при 16,54, 22,87 і 18,57 ($2\theta \pm 0,2^\circ$).
5. Сполука за п. 1, яка являє собою 5-[2-циклопропіл-5-(2,4-дифторфеніл)-1H-імідазол-4-іл]-N-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]оксазол[5,4-b]піридин-2-амін, або її фармацевтично прийнятна сіль.
6. Сполука за п. 1, яка являє собою 5-[5-(2,4-дифторфеніл)-2-(3-метилоксетан-3-іл)-1H-імідазол-4-іл]-N-[[[(1S)-3-метокси-1-метилпропіл]оксазол[5,4-b]піридин-2-амін, або її фармацевтично прийнятна сіль.
7. Сполука за п. 1, яка являє собою [1-[5-(2,4-дифторфеніл)-4-[2-[[[(1S)-2-етокси-1-метилетил]аміно]оксазол[5,4-b]піридин-5-іл]-1H-імідазол-2-іл]циклопропіл]метанол, або її фармацевтично прийнятна сіль.
8. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку або сіль за будь-яким із пп. 1-7 в комбінації з одним(ією) або декількома фармацевтично прийнятними носіями, розріджувачами або допоміжними речовинами.
9. Фармацевтична композиція за п. 8, яка додатково містить один або декілька терапевтичних агентів.
10. Сполука або сіль за будь-яким із пп. 1-7 для застосування у терапії.
11. Сполука або сіль за будь-яким із пп. 1-7 для застосування у лікуванні раку.

12. Сполука або сіль для застосування за п. 11, де раком є рак яєчників.
13. Сполука або сіль для застосування за п. 11, де раком є множинна мієлома.
14. Сполука або сіль за будь-яким із пп. 1-7 для застосування в одночасній, роздільній або послідовній комбінації з сунітинібом у лікуванні раку.
5 15. Сполука або сіль для застосування за п. 14, де раком є рак нирок.
16. Застосування сполуки або солі за будь-яким із пп. 1-7 для виготовлення лікарського засобу для лікування раку яєчників.
17. Застосування сполуки або солі за будь-яким із пп. 1-7 для виготовлення лікарського засобу для лікування множинної мієломи.
10

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601