

SIB EX5697R

P068348SM:JAW/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n°14812015.7, pubblicazione n° 3066085

a nome di Incyte Holdings Corporation

di 1801 Augustine Cut-Off, Wilmington, Delaware 19803, U.S.A.

“PROCEDIMENTO PER LA SINTESI DI UN INIBITORE DI INDOLAMMINA 2,3-DIOSSIGENASI”

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente domanda si riferisce a procedimenti e a intermedi per preparare 4-({2-[(amminosolfonil)ammino]etil}ammino)-*N*-(3-bromo-4-fluorofenil)-*N'*-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimidammide, che è un inibitore di indolamina 2,3-diossigenasi utile nel trattamento di cancro e altri disturbi.

FONDAMENTO DELL'INVENZIONE

Il triptofano (Trp) è un amminoacido essenziale richiesto per la biosintesi di proteine, niacina e il neurotrasmettitore 5-idrossitriptamina (serotonina). L'enzima indolamina 2,3-diossigenasi (anche noto come INDO o IDO) catalizza la prima e la fase limitante nella degradazione di L-triptofano a L-formil-chinurenina. In cellule umane, una deplezione di Trp derivante dall'attività di IDO è un meccanismo effettore antimicrobico inducibile da interferone gamma (IFN- γ) prominente. La stimolazione con IFN- γ induce attivazione di IDO, che porta alla deplezione di Trp, arrestando così la crescita di patogeni intracellulari dipendenti da Trp come *Toxoplasma gondii* e *Chlamydia trachomatis*. L'attività di IDO ha anche un effetto antiproliferativo su molte cellule tumorali, e induzione di IDO è stata osservata *in vivo* durante il rigetto di tumori allogenei, indicando un possibile ruolo per questo enzima nel processo di rigetto del tumore (Daubener, *et al.*, 1999, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 467: 517-24; Taylor, *et al.*, 1991, *FASEB J.*, 5: 2516-22).

È stato osservato che cellule HeLa co-coltivate con linfociti di sangue periferico (PBL) acquisiscono un fenotipo di inibizione dell'immunità tramite regolazione verso l'alto dell'attività di IDO. Si ritiene che una riduzione nella proliferazione di PBL dopo trattamento con interleuchina-2 (IL2) derivi da IDO rilasciata mediante le cellule tumorali in risposta alla secrezione di IFNG mediante i PBL. Questo effetto è stato invertito mediante trattamento con 1-metil-triptofano (1MT), un inibitore di IDO specifico. È stato proposto che l'attività di IDO in cellule tumorali può servire ad ostacolare risposte antitumorali (Logan, *et al.*, 2002, *Immunology*, 105: 478-87).

Recentemente, un ruolo di immunoregolazione della deplezione di Trp ha ricevuto molta attenzione. Diverse linee di prova suggeriscono che IDO è coinvolta nell'induzione di immunotolleranza. Studi di gravidanza,

resistenza a tumori, infezioni croniche e malattie autoimmuni in mammiferi hanno dimostrato che cellule che esprimono IDO possono sopprimere risposte di cellule T e promuovere tolleranza. Catabolismo di Trp accelerato è stato osservato in malattie e disturbi associati con immunoattivazione cellulare, come infezione, malignità, malattie autoimmuni e AIDS, nonché durante la gravidanza. Per esempio, livelli aumentati di IFN e livelli aumentati di metaboliti di Trp urinari sono stati osservati in malattie autoimmuni; è stato supposto che la deplezione sistemica o locale di Trp che si verifica in malattie autoimmuni può essere correlata ai sintomi di degenerazione e debilitanti di queste malattie. In sostegno di questa ipotesi, alti livelli di IDO sono stati osservati in cellule isolate dal fluido sinoviale di articolazioni artritiche. Gli IFN sono anche elevati in pazienti con virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e livelli di IFN crescenti sono associati con prognosi peggiorativa. Quindi, è stato proposto che IDO viene indotta cronicamente mediante infezione da HIV, e viene ulteriormente aumentata mediante infezioni opportunistiche, e che la perdita cronica di Trp inizia meccanismi responsabili di cachessia, demenza e diarrea ed eventualmente immunosoppressione di pazienti con AIDS (Brown, *et al.*, 1991, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 294: 425-35). A questo fine, è stato recentemente dimostrato che l'inibizione di IDO può aumentare i livelli di cellule T virus-specifiche e, concomitantemente, ridurre il numero di macrofagi infettati viralmente in un modello nel topo di HIV (Portula *et al.*, 2005, *Blood*, 106: 2382-90).

Si ritiene che IDO svolga un ruolo nei processi immunosoppressivi che prevengono il rigetto fetale nell'utero. Più di 40 anni fa, è stato osservato che, durante la gravidanza, il concepito di mammifero geneticamente disparato sopravvive nonostante quello che può venire previsto mediante immunologia con trapianto di tessuto. (Medawar, 1953, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7: 320-38). La separazione anatomica di madre e feto e l'imaturità antigenica del feto non possono spiegare completamente la sopravvivenza di un allotrapianto fetale. L'attenzione recente si è focalizzata sulla tolleranza immunologica della madre. Poiché IDO viene espressa mediante sinciziotrofoblasti umani e la concentrazione sistemica di triptofano diminuisce durante la gravidanza normale, è stato ipotizzato che l'espressione di IDO all'interfaccia materna-fetale sia necessaria per prevenire il rigetto immunologico degli allotrapianti fetali. Per testare questa ipotesi, topi gravidi (che hanno feti singenici o allogenic) sono stati esposti a IMT, ed è stato osservato rigetto rapido indotto da cellule T di tutti i concepiti

allogenici. Quindi, catabolizzando triptofano, il concepito di mammifero sembra sopprimere l'attività di cellule T e difendersi nei confronti del rigetto, e il bloccaggio del catabolismo del triptofano durante la gravidanza murina permette a cellule T materne di provocare un rigetto di allotrapianto fetale (Munn, *et al.*, 1998, *Science*, 281: 1191-3).

Ulteriore evidenza di un meccanismo di immunoresistenza tumorale basato sulla degradazione di triptofano mediante IDO, sembra provenire dall'osservazione che la maggior parte dei tumori umani esprimono costitutivamente IDO, e che l'espressione di IDO mediante cellule tumorali di topo immunogeniche ne previene il rigetto da parte di topi preimmunizzati. Questo effetto è accompagnato da una mancanza di accumulo di cellule T specifiche nel sito del tumore e può venire parzialmente invertito mediante trattamento sistemico di topi con un inibitore di IDO, in assenza di tossicità evidente. Quindi, è stato suggerito che l'efficacia di vaccinazione terapeutica di pazienti affetti da cancro può venire migliorata mediante somministrazione concomitante di un inibitore di IDO (Uyttenhove *et al.*, 2003, *Nature Med.*, 9: 1269-74). È stato anche dimostrato che l'inibitore di IDO, 1-MT, può agire in sinergia con agenti chemioterapeutici per ridurre la crescita tumorale in topi, suggerendo che l'inibizione di IDO può anche potenziare l'attività anti-tumorale di terapie citotossiche convenzionali (Muller *et al.*, 2005 *Nature Med.*, 11: 312-9).

Un meccanismo che contribuisce alla non responsività immunologica verso tumori può essere presentazione di antigeni tumorali mediante APC di un ospite tollerogenico. È stata anche descritta una sottoserie di cellule di presentazione dell'antigene (APC) che esprimono IDO umane che coesprimono CD123 (IL3RA) e CCR6 e inibiscono la proliferazione di cellule T. Cellule dendritiche CD123-positive mature e immature sopprimono entrambe l'attività di cellule T, e questa attività soppressiva di IDO è stata bloccata mediante 1MT (Munn, *et al.*, 2002, *Science*, 297: 1867-70). È stato anche dimostrato che nodi linfatici drenanti tumori (TDLN) di topo contengono una sottoserie di cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC) che esprimono costitutivamente livelli immunosoppressivi di IDO. Nonostante formino solo lo 0,5% delle cellule dei nodi linfatici, *in vitro*, queste pDC hanno soppresso potentemente le risposte di cellule T ad antigeni presentati mediante le pDC stesse e anche, in modo dominante, soppresso le risposte di cellule T verso antigeni di terze parti presentati mediante APC non

soppressive. Nella popolazione di pDC, la maggior parte dell'attività di soppressore mediata daIDO funzionale è segregata con una nuova sottoserie di pDC che coesprimono il marcatore della stirpe B CD19. Quindi, è stato ipotizzato che la soppressione mediata daIDO mediante pDC in TDLN crei un microambiente locale che è potentemente soppressivo di risposte di cellule T antitumorali nell'ospite (Munn *et al.*, 2004, *J. Clin. Invest.*, 114(2), 280-90).

IDO degrada la parte di indolo di triptofano, serotonina e melatonina, ed inizia la produzione di metaboliti neuroattivi e immunoregolatori, noti collettivamente come chinurenine. Mediante deplezione locale di triptofano e aumento di chinurenine proapoptotiche, IDO espressa mediante cellule dendritiche (DC) può influenzare grandemente la proliferazione e la sopravvivenza di cellule T. L'induzione di IDO in DC può essere un meccanismo comune di tolleranza delezionale guidato mediante cellule T regolatrici. Poiché si può prevedere che tali risposte tollerogeniche operino una varietà di condizioni fisiopatologiche, il metabolismo del triptofano e la produzione di chinurenina possono rappresentare una interfaccia cruciale fra i sistemi immunitario e nervoso (Grohmann, *et al.*, 2003, *Trends Immunol.*, 24: 242-8). In stati di immunoattivazione persistente, la disponibilità di Trp nel siero libero è diminuita e, come conseguenza della produzione di serotonina ridotta, possono anche venire influenzate funzioni serotonergiche (Wirleitner, *et al.*, 2003, *Curr. Med. Chem.*, 10: 1581-91).

In modo interessante, è stato osservato che la somministrazione di interferone- α induce effetti secondari neuropsichiatrici, come sintomi depressivi e cambiamenti nella funzione cognitiva. L'influenza diretta sulla neurotrasmissione serotonergica può contribuire a questi effetti secondari. Inoltre, poiché l'attivazione di IDO porta a livelli ridotti di triptofano, il precursore di serotonina (5-HT), IDO può svolgere un ruolo in questi effetti secondari neuropsichiatrici riducendo la sintesi di 5-HT centrale. Inoltre, metaboliti di chinurenina come 3-idrossi-chinurenina (3-OH-KYN) e acido chinolinico (QUIN) hanno effetti tossici sulla funzione cerebrale. 3-OH-KYN è in grado di produrre stress ossidativo aumentando la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), e QUIN può produrre una sovrastimolazione di recettori ippocampali di N-metil-D-aspartato (NMDA), che porta ad apoptosi e atrofia ippocampale. Sia la sovrapproduzione di ROS che l'atrofia ippocampale causata

da sovrastimolazione di NMDA, sono state associate con depressione (Wichers e Maes, 2004, *J. Psychiatry Neurosci.*, 29: 11-17). Quindi, l'attività di IDO può svolgere un ruolo nella depressione.

Inibitori a molecola piccola di IDO vengono sviluppati per trattare o prevenire malattie correlate a IDO come quelle suddescritte. Per esempio, ossadiazolo e altri inibitori di IDO eterociclici sono riportati in US 2006/0258719 e US 2007/0185165. La pubblicazione PCT WO 99/29310 riporta metodi per alterare l'immunità mediata da cellule T, comprendenti l'alterazione delle concentrazioni extracellulari locali di triptofano e metaboliti del triptofano, usando un inibitore di IDO come 1-metil-DL-triptofano, p-(3-benzofuranil)-DL-alanina, p-[3-benzo(b)tienil]-DL-alanina e 6-nitro-L-triptofano) (Munn, 1999). In WO 03/087347, anche pubblicata come brevetto europeo 1501918, vengono riportati metodi di produzione di cellule di presentazione dell'antigene per potenziare o ridurre la tolleranza a cellule T (Munn, 2003). Composti aventi attività inibitoria di indolamina-2,3-diossigenasi (IDO) vengono inoltre riportati in WO 2004/094409; e la pubblicazione della domanda di brevetto U.S. n. 2004/0234623 si riferisce a metodi di trattamento di un soggetto con un cancro o una infezione mediante la somministrazione di un inibitore di indolamina-2,3-diossigenasi in combinazione con altre modalità terapeutiche.

Alla luce dei dati sperimentali indicanti un ruolo per IDO in immunosoppressione, resistenza e/o rigetto di tumori, infezioni croniche, infezione da HIV, AIDS (comprese le sue manifestazioni come cachessia, demenza e diarrea), malattie o disturbi autoimmuni (come artrite reumatoide), e tolleranza e prevenzione immunologica del rigetto fetale *in utero*, sono desiderabili agenti terapeutici destinati alla soppressione della degradazione del triptofano inibendo l'attività di IDO. Inibitori di IDO possono venire usati per attivare cellule T e quindi potenziare l'attivazione di cellule T quando le cellule T vengono sopresse mediante gravidanza, malignità o un virus come HIV. L'inibizione di IDO può anche essere una strategia di trattamento importante per pazienti con malattie o disturbi neurologici o neuropsichiatrici come depressione.

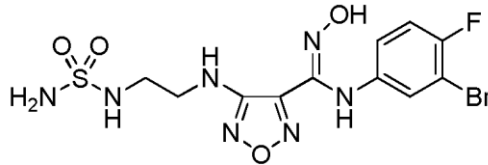
WO 2010/005958 descrive derivati di 1,2,5-ossadiazolo che sono inibitori di IDO e procedimenti ed intermedi per produrre tali derivati di 1,2,5-ossadiazolo.

Per effetto dell'utilità di inibitori di IDO, vi è necessità di sviluppare nuovi procedimenti per produrre inibitori di

IDO. La presente domanda è rivolta a questa necessità e ad altre.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

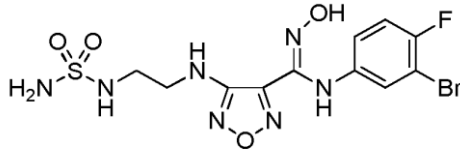
Il composto 4-({2-[(amminosolfonil)ammino]etil}ammino)-N-(3-bromo-4-fluorofenil)-N'-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimmidammide avente Formula I:



I

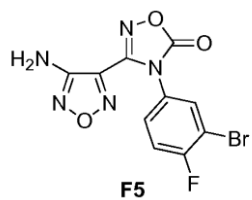
è un inibitore dell'enzima indolammina 2,3-diossigenasi (anche nota come IDO). Il composto di Formula I, nonché la sua preparazione e uso, sono stati descritti nel brevetto U.S. n. 8.088.803. Gli intermedi ed i procedimenti forniti in questa sede contribuiscono a soddisfare la necessità crescente per lo sviluppo di inibitori di IDO per il trattamento di malattie gravi.

La presente domanda fornisce, fra l'altro, intermedi e procedimenti per preparare un composto di Formula I:



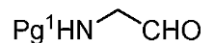
I

Per conseguenza, la presente domanda fornisce un procedimento comprendente la reazione di un composto di Formula F5:



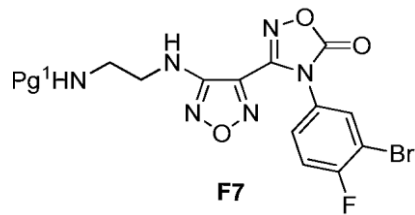
F5

con una aldeide di Formula F6:



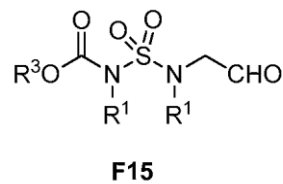
F6

per ottenere un composto di Formula F7:

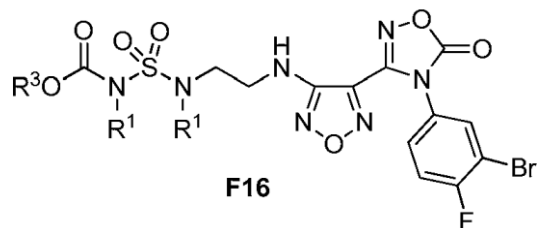


in cui Pg¹ viene definito in seguito.

La presente domanda fornisce inoltre un procedimento comprendente la reazione di un composto di Formula F15:

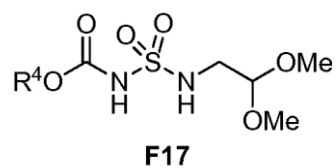


con un composto di Formula F5 per ottenere un composto di Formula F16:

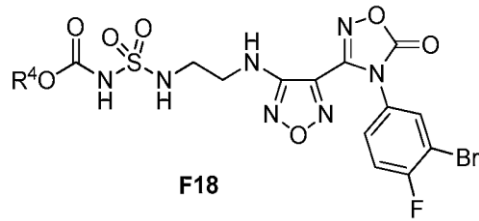


in cui R¹ e R³ vengono definiti in seguito.

La presente domanda fornisce inoltre un procedimento comprendente la reazione di un composto di Formula F17:



con un composto di Formula F5 per ottenere un composto di Formula F18:



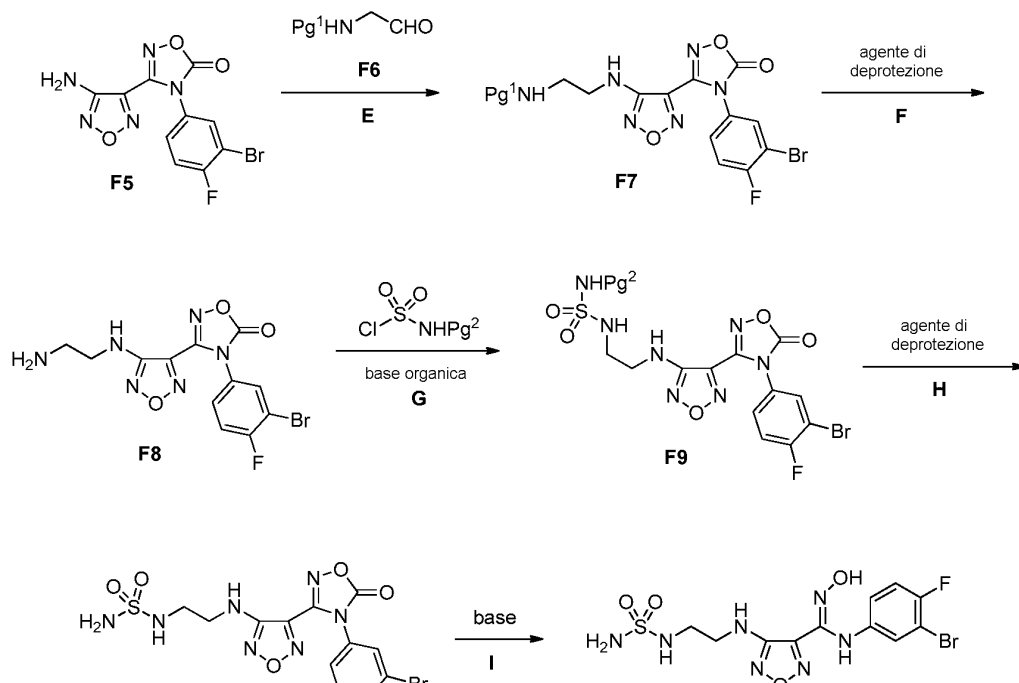
in cui R⁴ viene definito in seguito.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

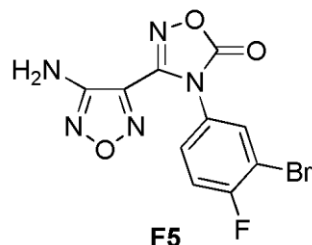
Mentre certe delle fasi dei procedimenti vengono illustrate negli schemi mostrati in seguito, si intende che le singole fasi del procedimento possono venire rivendicate singolarmente o in qualsiasi combinazione (per esempio nello Schema I, le Fasi E, F, G, H e I possono venire rivendicate singolarmente o in combinazione). Non si intende che i procedimenti siano limitati ad un procedimento globale avente ciascuna e ogni fase negli schemi seguenti.

Per conseguenza, uno schema generale per la preparazione del composto di Formula I viene descritto nello Schema 1.

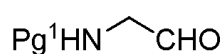
Schema 1



Per conseguenza, la presente domanda fornisce un procedimento comprendente la reazione di un composto di Formula F5:

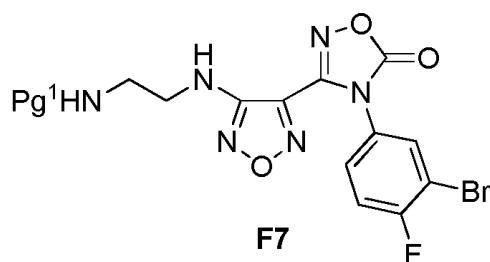


con una aldeide di Formula F6:



F6

in cui Pg^1 è un gruppo di protezione dell'ammino, per ottenere un composto di Formula F7:



Gruppi di protezione dell'ammino Pg^1 possono venire usati per prevenire reazioni non volute di un gruppo ammino mentre si esegue una trasformazione desiderata. Gruppi di protezione dell'ammino permettono un facile attacco covalente ad un atomo di azoto nonché scissione selettiva dall'atomo di azoto. "Gruppi di protezione dell'ammino" adatti come alcossicarbonile (come etossicarbonile, *terz*-butossicarbonile (Boc), benzilossicarbonile (Cbz), 9-fluorenilmetilossicarbonile (Fmoc), e simili), acile (come acetile (Ac), benzoile (Bz), e simili), solfonile (come metansolfonile, trifluorometansolfonile, e simili), arilalchile (come benzile, 4-metossibenzile, difenilmetile, trifenilmetile (tritile), e simili), alchenilalchile (come allile, prenile, e simili), diarilmetilenile (come $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{C}=\text{N}$, e simili), e silile (come *terz*-butildimetilsilile, triisopropilsilile, e simili) sono noti ad un esperto nella tecnica. La chimica di gruppi di protezione dell'ammino si può trovare in Wuts e Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^a Ed., pp 696-926, John Wiley & Sons: New York, 2006.

In alcune realizzazioni, Pg¹ è etossicarbonile, *terz*-butossicarbonile, benzilossicarbonile o 9-fluorenilmetilossicarbonile.

In alcune realizzazioni, Pg¹ è C₁₋₆ alcossicarbonile.

In alcune realizzazioni, Pg¹ è *terz*-butossicarbonile.

Solventi appropriati per la Fase E comprendono, ma non sono limitati a questi, metanolo o tetraidrofurano (THF), acetonitrile e simili. Possono anche venire usati solventi di idrocarburo alogenato (cioè alcani alogenati come diclorometano, cloroformio, dicloroetano o tetracloroetano).

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in un componente solvente comprendente tetraidrofurano. Quando usato in questa sede, un componente solvente può riferirsi ad un solvente o a una miscela di solventi. In alcune realizzazioni, il componente solvente è un solvente organico. In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in un componente solvente comprendente un solvente di idrocarburo alogenato. In alcune realizzazioni, detto solvente di idrocarburo alogenato è diclorometano.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in un componente solvente comprendente acetonitrile.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in un componente solvente comprendente diclorometano e acetonitrile.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in presenza di un agente riducente.

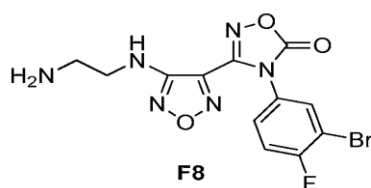
L'agente riducente può essere qualsiasi composto in grado di ridurre un composto organico ad uno stato di ossidazione inferiore. La riduzione comporta usualmente l'addizione di atomi di idrogeno o la rimozione di atomi di ossigeno da un gruppo. Per esempio, aldeidi come F6 possono venire ridotte in presenza di una ammina di Formula F5 (Fase E, Schema 1) mediante l'addizione di idrogeno, in forma di gas di idrogeno (H₂) o usando un reagente di idruro (come NaB(OAc)₃H, NaBH₄, LiAlH₄, e simili); usando trifenilfosfina; o usando una combinazione di ioduro di sodio, clorotrimetilsilano, e metanolo. In alcune realizzazioni, questa fase può venire eseguita in condizioni acide in presenza di un acido (come acido trifluoroacetico). In alcune realizzazioni, questa fase può venire eseguita ad una temperatura da circa -15°C fino a circa 30°C, per esempio da circa -15°C fino a circa 0°C, da circa -5°C fino a circa 5°C, da circa -5°C fino a circa 0°C, o da circa 0°C fino a circa 45°C.

In alcune realizzazioni, detto agente riducente è un agente riducente di boroidruro (per esempio $\text{NaB}(\text{OAc})_3\text{H}$, NaBH_4), o altro agente riducente di idruro contenente boro.

In alcune realizzazioni, detto agente riducente di boroidruro è triacetossiboroidruro di sodio.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in presenza di acido trifluoroacetico.

In alcune realizzazioni, il procedimento comprende inoltre la deprotezione di detto composto di Formula F7 per ottenere un composto di Formula F8:



Agenti di deprotezione dell'ammino utili per questa Fase F sono noti agli esperti nella tecnica, come quelli in Wuts e Greene (*supra*). In particolare, i gruppi di protezione dell'ammino suddescritti possono venire convenientemente rimossi usando molti agenti di deprotezione dell'ammino disponibili che sono specifici per i vari gruppi summenzionati senza influenzare altre porzioni desiderate del composto. Il gruppo *terz*-butossicarbonile può venire rimosso (per esempio idrolizzato) dall'atomo di azoto, per esempio, mediante trattamento con un acido (come acido cloridrico, acido trifluoroacetico, acido toluensolfonico, e simili); una combinazione di reagenti (per esempio una miscela di cloruro di acetile e metanolo) nota per generare un acido; o un acido di Lewis (per esempio $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$). Il gruppo benzilossicarbonile può venire rimosso (per esempio idrogenolizzato) dall'atomo di azoto, per esempio, mediante trattamento con idrogeno ed un catalizzatore (come carbone palladiato).

In alcune realizzazioni, l'agente di deprotezione dell'ammino è acido trifluoroacetico. In alcune realizzazioni, l'agente di deprotezione dell'ammino contiene acido trifluoroacetico e >0,5% in volume di acqua, per esempio >1,0% in volume di acqua, >1,5% in volume di acqua, >2,0% in volume di acqua, da circa il 2% fino a circa il 10% in volume di acqua, da circa il 10% fino a circa il 20% in volume di acqua, o da circa il 20% fino a circa il 50% in volume di acqua. In alcune realizzazioni, l'agente di deprotezione dell'ammino può essere una miscela di acido trifluoroacetico e acqua in un rapporto volumetrico di circa 98:2. In alcune realizzazioni, l'agente di

deprotezione dell'ammino può essere acido cloridrico, opzionalmente in un solvente (per esempio acqua, THF, diossano, etilacetato, ecc.). In alcune realizzazioni, il componente solvente è etilacetato. In alcune realizzazioni, l'agente di deprotezione dell'ammino può essere acido cloridrico opzionalmente in un solvente come un alcool (come isopropanolo, metanolo o etanolo). Possono anche venire usati solventi di idrocarburo alogenato (per esempio diclorometano, cloroformio, dicloroetano o tetracloroetano). In alcune realizzazioni, il rapporto molare dell'acido cloridrico e del composto di Formula F7 è circa 6,0, circa 5,0, circa 4,0, circa 3,0, circa 2,0, circa 1,0, o circa 1,1. In alcune realizzazioni, la Fase F può venire eseguita in una temperatura da circa -10°C fino a circa 60°C, per esempio da circa -10°C fino a circa 0°C, da circa 0°C fino a circa 25°C, da circa 25°C fino a circa 45°C, o da circa 45°C fino a circa 60°C.

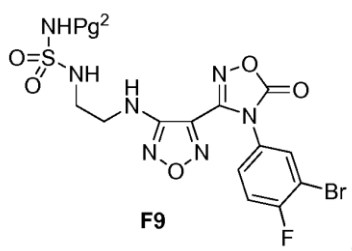
In alcune realizzazioni, detta deprotezione comprende la reazione del composto di Formula F7 con acido cloridrico.

In alcune realizzazioni, detta deprotezione comprende la reazione del composto di Formula F7 con acido cloridrico in un componente solvente comprendente isopropanolo.

In alcune realizzazioni, detta deprotezione comprende la reazione del composto di Formula F7 con acido cloridrico in un componente solvente comprendente un solvente di idrocarburo alogenato.

In alcune realizzazioni, detto solvente di idrocarburo alogenato è diclorometano.

In alcune realizzazioni, l'invenzione comprende inoltre la reazione di detto composto di Formula F8 con $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{-X}$ in presenza di una base organica per ottenere un composto di Formula F9:



in cui:

Pg^2 è un gruppo di protezione dell'ammino; e

X è alo.

In alcune realizzazioni, $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{Cl}$ può venire preparato e usato immediatamente nella reazione con il composto di Formula F8. Il gruppo di protezione Pg^2 può venire scelto da qualsiasi dei gruppi di protezione noti nella tecnica per proteggere ammine o solfonammidi (come quelli descritti in precedenza per Pg^1). In alcune realizzazioni, Pg^2 può essere un gruppo carbossicarbonile (come *terz*-butossicarbonile).

Solventi appropriati comprendono, ma non sono limitati a questi, solventi di idrocarburo alogenato come diclorometano e simili. La base organica può essere qualsiasi base che serve a neutralizzare il HCl generato durante la reazione del composto di Formula F8 e del cloruro di ammino-solfonile protetto. La base organica può comprendere ammine terziarie acicliche come $\text{tri}(\text{C}_{1-6})$ alchilammina (per esempio trietilammina, diisopropilettilammina (DIPEA) e simili), ammine terziarie cicliche (per esempio N-metilpiperidina, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]ottano (DABCO) e simili). In alcune realizzazioni, la base organica può essere trietilammina. In alcune realizzazioni, questa fase può venire eseguita ad una temperatura da circa -15°C fino a circa 60°C , per esempio da circa -15° fino a circa 0°C , da circa 0°C fino a circa 25°C , da circa 25°C fino a circa 45°C , o da circa 45°C fino a circa 60°C .

In tali realizzazioni, $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{-Cl}$ può venire ottenuto mediante la reazione di un alcool (come etanolo, alcool *terz*-butilico e simili) con clorosolfonilisocianato ($\text{ClS}(\text{O})_2\text{NCO}$).

In alcune realizzazioni, Pg^2 è etossicarbonile, *terz*-butossicarbonile, benzilossicarbonile o 9-fluorenilmetilossicarbonile.

In alcune realizzazioni, Pg^2 è C_{1-6} alcossicarbonile.

In alcune realizzazioni, Pg^2 è *terz*-butossicarbonile.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in un componente solvente comprendente un solvente di idrocarburo alogenato.

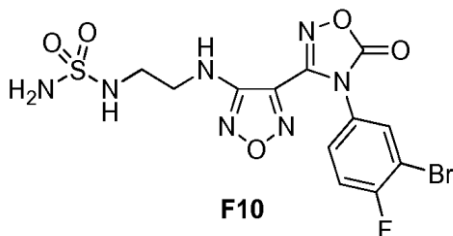
In alcune realizzazioni, detto solvente di idrocarburo alogenato è diclorometano.

In alcune realizzazioni, detta base organica comprende $\text{tri}(\text{C}_{1-6})$ alchilammina.

In alcune realizzazioni, detta base organica è trietilammina.

In alcune realizzazioni, X è cloro.

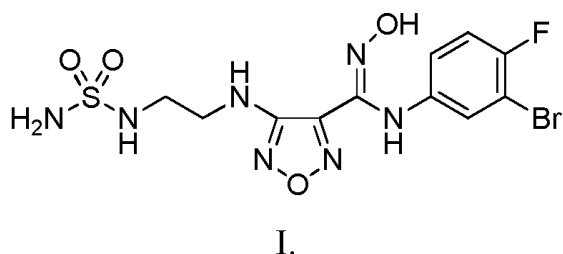
In alcune realizzazioni, l'invenzione comprende inoltre la deprotezione di detto composto di Formula F9 per ottenere un composto di Formula F10:



In alcune realizzazioni, agenti di deprotezione adatti possono comprendere quelli descritti in precedenza per deproteggere il composto di Formula F7.

In alcune realizzazioni, detta deprotezione comprende la reazione di un composto di Formula F9 con acido cloridrico. In alcune realizzazioni, detta deprotezione comprende la reazione di un composto di Formula F9 con acido cloridrico in un componente solvente comprendente un alcool. In alcune realizzazioni, detto alcool è etanolo. In alcune realizzazioni, detta deprotezione comprende la reazione di un composto di Formula F9 con acido cloridrico in un componente solvente comprendente etilacetato.

In alcune realizzazioni, l'invenzione comprende inoltre la reazione di detto composto di Formula F10 con una base per ottenere un composto di Formula I:



Una base può venire usata per la conversione (per esempio idrolisi) dell'anello di ossadiazolone in F10 per rivelare l'ammidossima nel composto di Formula I, opzionalmente in un solvente (Fase I, Schema 1). La protezione dell'ammidossima come ossadiazolone può essere utile per prevenire reazioni negative del gruppo ossidrilico o quelle dell'ammidossima globale. La base può essere una base inorganica come idrossido di metallo alcalino (per esempio NaOH, LiOH, KOH, Mg(OH)₂, ecc.); o una base organica come una ammina aciclica (per esempio trietilammina, diisopropiletilammina (DIPEA), ecc.) o una ammina ciclica (per esempio pirrolidina,

piperidina, ecc.). La base può venire resa disponibile nella forma di una resina (come Amberlite® e simili). In alcune ulteriori realizzazioni, la base può venire fornita nella forma di una soluzione in acqua (per esempio soluzione circa 0,5 N, soluzione circa 1 N, soluzione circa 1,5 N, soluzione circa 2,5 N, soluzione da circa 3 N fino a circa 5 N, soluzione da circa 5 N fino a circa 10 N). In alcune realizzazioni, la base è un idrossido di metallo alcalino (come idrossido di sodio). In alcune realizzazioni, la base può essere una soluzione di NaOH 2 N in acqua. In alcune realizzazioni, il solvente può essere etanolo o tetraidrofurano (THF). In alcune realizzazioni, il solvente può essere una miscela di etanolo e acqua. In alcune realizzazioni, la reazione del composto di Formula F10 con una base per ottenere il composto di Formula I può venire eseguita ad una temperatura da circa -10°C fino a circa 60°C, per esempio da circa -10°C fino a circa 20°C, da circa 0°C fino a circa 30°C, da circa 0°C fino a circa 10°C, o da circa 0°C fino a circa 5°C.

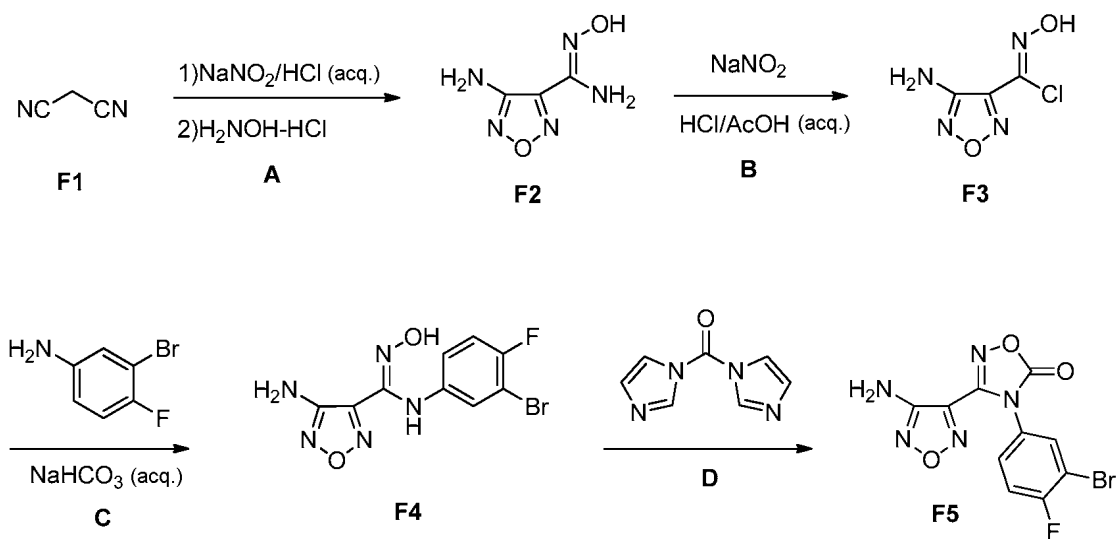
In alcune realizzazioni, detta base comprende un idrossido di metallo alcalino.

In alcune realizzazioni, detto idrossido di metallo alcalino è idrossido di sodio.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in componente solvente comprendente tetraidrofurano, acqua ed etanolo.

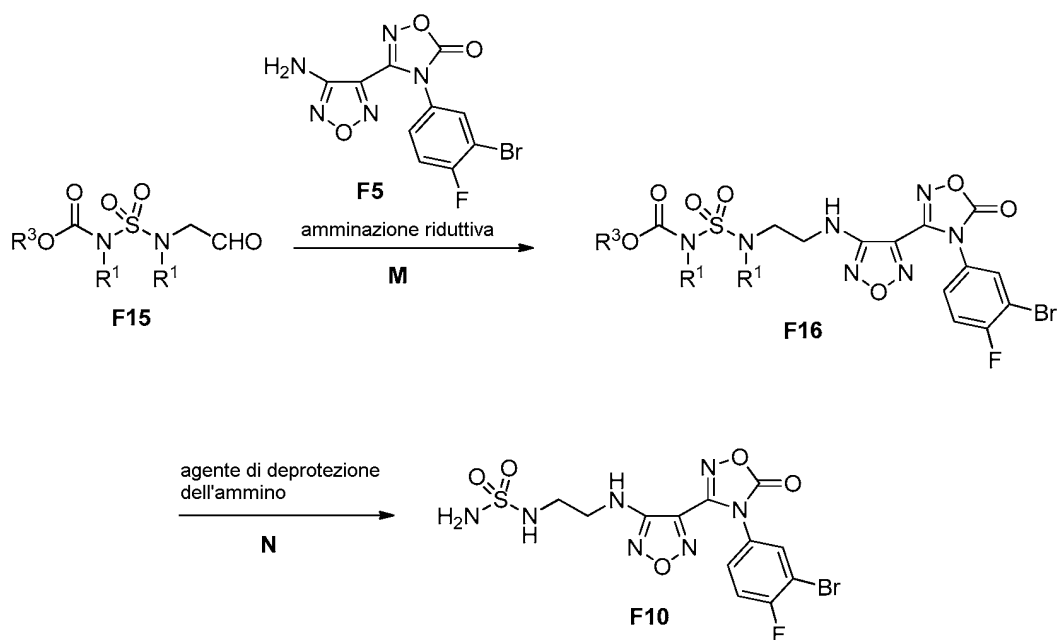
In alcune realizzazioni, il composto di Formula F5 può venire ottenuto in una sequenza di fasi mostrate nello Schema 2. La preparazione dell'intermedio, 4-ammino-*N*'-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimidammide F2, è stata descritta in *J. Heterocycl. Chem* (1965), 2, 253, e la sua conversione alla cloroossima F3 è stata descritta in *Synth. Commun.* (1988), 18, 1247. In alcune realizzazioni, la cloroossima di Formula F3 può venire accoppiata a 3-bromo-4-fluoroanilina, opzionalmente in un solvente (come acqua), facendo seguire aggiunta di bicarbonato di sodio, per fornire una ammidossima di Formula F4. La funzionalità di ammidossima del composto di F4 può quindi venire convertita ad un ossadiazolone o Formula F5 usando *N,N*-carbonildiimidazolo (DCI) in un solvente (come etilacetato, diossano, THF e simili), a temperature elevate come circa 50°C, circa 60°C, circa 70°C, circa 80°C, circa 90°C, o circa 100°C.

Schema 2



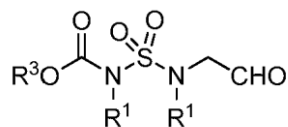
In alternativa, il composto di Formula F10 può venire ottenuto tramite una sequenza di fasi rappresentate nello Schema 3

Schema 3



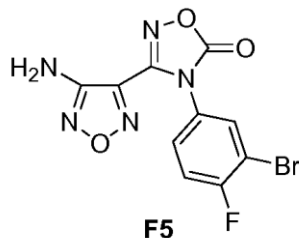
In alcune realizzazioni, la presente domanda fornisce un procedimento comprendente la reazione di un composto

di Formula F15:



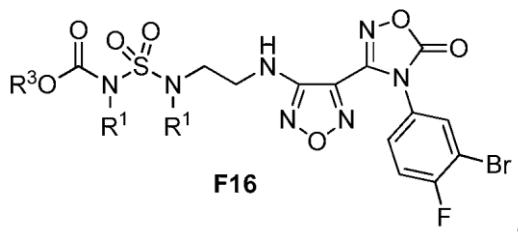
F15

con un composto di Formula F5:



F5

per ottenere un composto di formula F16:



F16

in cui:

ciascun R¹ è indipendentemente un gruppo di protezione dell'ammino; e

R³ è alchile C₁₋₆ o benzile.

In alcune realizzazioni, R¹ è C₂₋₄ alchenile-C₁₋₃ alchile o fenile-C₁₋₃ alchile, in cui detto fenile-C₁₋₃ alchile è opzionalmente sostituito con 1, 2 o 3 gruppi C₁₋₄ alcossi scelti indipendentemente.

In alcune realizzazioni, R¹ è C₂₋₄ alchenile-C₁₋₃ alchile o fenile-C₁₋₃ alchile, in cui detto fenile-C₁₋₃ alchile è opzionalmente sostituito con 1, 2 o 3 gruppi metossi.

In alcune realizzazioni, R¹ è allile.

In alcune realizzazioni, R¹ è 4-metossibenzile.

In alcune realizzazioni, R³ è C₁₋₆ alchile.

In alcune realizzazioni, R³ è *terz*-butile.

In alcune realizzazioni, R³ è C₁₋₄ alchile.

In alcune realizzazioni, R³ è butile.

Preferibilmente, la reazione viene eseguita in presenza di un agente riducente. L'agente riducente può essere qualsiasi composto in grado di ridurre un composto organico ad uno stato di ossidazione minore. In alcune realizzazioni, l'agente riducente può essere gas di idrogeno in presenza di un catalizzatore o un reagente di idruro (come NaB(OAc)₃H, NaHB₄, LiAlH₄ e simili); usando trifenilfosfina; o usando una combinazione di ioduro di sodio, clorotrimetilsilano e metanolo. In alcune realizzazioni, questa fase può venire eseguita in presenza di un acido come acido trifluoroacetico. Solventi adatti per questa fase comprendono alcool isopropilico, THF, diossano o simili. In alcune realizzazioni, questa fase può venire eseguita ad una temperatura da circa -15°C fino a circa 30°C, per esempio da circa -15°C fino a circa 0°C, da circa -5°C fino a circa 5°C, da circa -5°C fino a circa 0°C, da circa 0 fino a 5°C, o da circa 0°C fino a circa 45°C.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in un componente solvente comprendente tetraidrofurano.

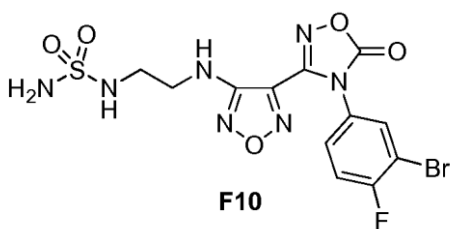
In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in presenza di un agente riducente.

In alcune realizzazioni, detto agente riducente è un agente riducente di boroidruro.

In alcune realizzazioni, detto agente riducente di boroidruro è triacetossiboroidruro di sodio.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in presenza di acido trifluoroacetico.

In alcune realizzazioni, l'invenzione comprende inoltre la deprotezione di detto composto di Formula F16 per ottenere un composto di Formula F10:



Il trattamento di un composto F16 per sostituire R¹N con NH₂ può venire eseguito mediante metodi per la deprotezione di particolari gruppi di protezione dell'ammina noti agli esperti nella tecnica, come quelli in Wuts e Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^a Ed. pp 696-926, John Wiley & Sons: New York,

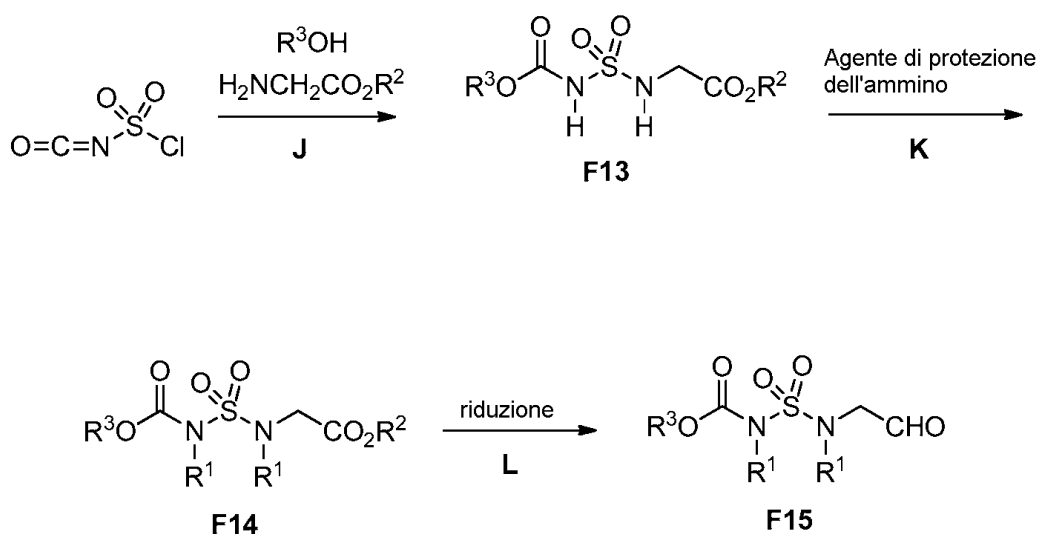
2006. In alcune realizzazioni, quando R¹ è allile, l'agente di deprotezione può essere un catalizzatore di palladio (per esempio Pd(Ph₃P)₄, Pd/C, o Pd(dba)DPPB). In alcune realizzazioni, quando R¹ è 4-metossibenzile, l'agente di deprotezione può comprendere un acido organico (come acido trifluoroacetico o acido metansolfonico, e simili); un acido inorganico (come acido cloridrico); idrogeno e palladio; o sodio in ammoniaca liquida. La deprotezione può venire eseguita ad una temperatura da circa 30°C fino a circa 90°C, per esempio da circa 50°C fino a circa 100°C, o da circa 60°C fino a circa 80°C.

In alcune realizzazioni, detta deprotezione comprende la reazione di un composto di Formula F16 con acido trifluoroacetico.

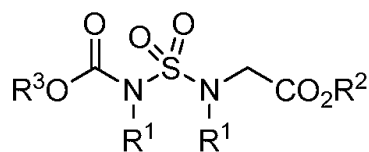
In alcune realizzazioni, detta deprotezione comprende la reazione di un composto di Formula F16 con acido cloridrico.

Il composto F15 può venire prodotto mediante un procedimento in tre fasi (Fasi J, K e L) da clorosolfonilisocianato, come mostrato nello Schema 4.

Schema 4



Per conseguenza, la presente domanda fornisce inoltre un procedimento in cui detto composto di Formula F15 viene ottenuto mediante un procedimento comprendente il trattamento di un composto di formula F14:



con un agente riducente per ottenere detto composto di Formula 15; in cui R² è alchile C₁₋₄; e R³ è definito *supra*.

In alcune realizzazioni, R² è metile.

In alcune realizzazioni, R² è etile.

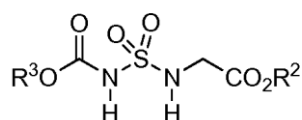
In alcune realizzazioni, la riduzione può venire eseguita con idruro di diisobutilalluminio (DIBAL-H). Solventi adatti comprendono solventi di idrocarburo alogenato come diclorometano, cloroformio, dicloroetano, tetracloroetano, e simili. In alcune realizzazioni, la riduzione può venire eseguita circa a temperatura ambiente, per esempio da circa -80°C fino a circa 30°C, da circa -78°C fino a circa 0°C, da circa 0°C fino a circa 30°C, o da circa 25°C fino a circa 30°C.

In alcune realizzazioni, detto trattamento viene eseguito in un solvente di idrocarburo alogenato.

In alcune realizzazioni, detto solvente di idrocarburo alogenato è diclorometano.

In alcune realizzazioni, detto agente riducente è idruro di diisobutilalluminio.

In alcune realizzazioni, detto composto di Formula F14 viene ottenuto mediante un procedimento comprendente la protezione di un composto di Formula F13:



con uno o più agenti di protezione dell'ammino scelti indipendentemente per ottenere un composto di Formula F14.

Il gruppo di protezione R¹ su F14 può venire scelto dai vari gruppi di protezione dell'ammino noti nella tecnica (*supra*). In alcune realizzazioni, l'agente di protezione dell'ammino è bromuro di allile o cloruro di 4-metossibenzile.

In alcune realizzazioni, detti uno o più agenti di protezione dell'ammino vengono scelti da bromuro di allile e cloruro di 4-metossibenzile.

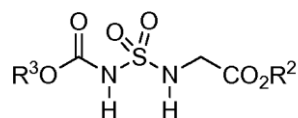
In alcune realizzazioni, detta protezione viene eseguita in presenza di una base.

In alcune realizzazioni, detta base è carbonato di potassio.

In alcune realizzazioni, detta protezione viene eseguita in un componente solvente comprendente acetonitrile.

In alcune realizzazioni, la preparazione del composto F13 può venire ottenuta trattando clorosolfoniliscianato con un alcool R^3OH (in cui R^3 è definito in precedenza) e un estere di glicina $H_2NCH_2CO_2R^2$, in cui R^2 è alchile C_{1-4} . In alcune realizzazioni, questa Fase J viene eseguita in presenza di un acido organico (come acido acetico, acido benzoico, acido trifluoroacetico). Solventi adatti per questa fase comprendono diclorometano, cloroformio, dicloroetano, tetracloroetano, e simili.

In alcune realizzazioni, la presente domanda fornisce un composto di Formula F13:



F13

in cui:

R^2 è alchile C_{1-4} ; e

R^4 è alchile C_{1-6} o benzile.

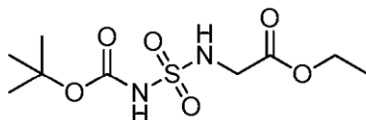
In alcune realizzazioni, R^2 è metile.

In alcune realizzazioni, R^2 è etile.

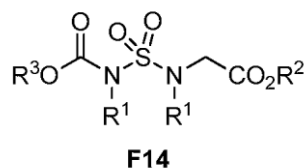
In alcune realizzazioni, R^3 è alchile C_{1-6} .

In alcune realizzazioni, R^3 è *terz*-butile.

In alcune realizzazioni, il composto di Formula F13 è etil-2-((N-(*terz*-butossicarbonil)sulfamoil)ammino)acetato:



In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce inoltre un composto di Formula F14:



in cui:

ciascun R¹ è indipendentemente un gruppo di protezione dell'ammino;

R² è alchile C₁₋₄; e

R³ è alchile C₁₋₆ o benzile.

In alcune realizzazioni, R¹ è C₂₋₄ alchenile-C₁₋₃ alchile o fenile-C₁₋₃ alchile, in cui detto fenile-C₁₋₃ alchile è opzionalmente sostituito con 1, 2 o 3 gruppi alcossi C₁₋₄ scelti indipendentemente.

In alcune realizzazioni, R¹ è allile.

In alcune realizzazioni, R¹ è 4-metossibenzile.

In alcune realizzazioni, R² è metile.

In alcune realizzazioni, R² è etile.

In alcune realizzazioni, R³ è alchile C₁₋₆.

In alcune realizzazioni, R³ è *terz*-butile.

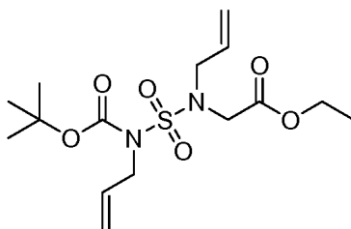
In alcune realizzazioni, R³ è alchile C₁₋₄.

In alcune realizzazioni, R³ è butile.

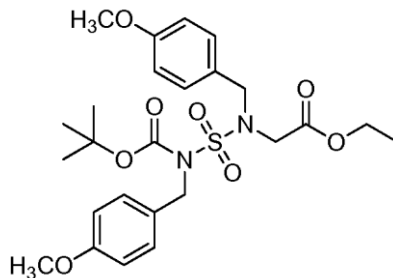
In alcune realizzazioni, R³ è alchile C₁₋₄.

In alcune realizzazioni, R³ è butile.

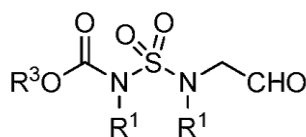
In alcune realizzazioni, il composto di Formula F14 è etil-2-(allil(N-allil-N-(*terz*-butossicarbonil)sulfamoil)ammino)acetato:



In alcune realizzazioni, il composto di Formula F14 è etil-2-(4-metossibenzil(N-4-metossibenzil-N-(*terz*-butossicarbonil)sulfamoil)ammino)acetato:



In alcune realizzazioni, la presente domanda fornisce un composto di Formula F15:



F15

in cui:

R³ è alchile C₁₋₆ o benzile; e

ciascun R¹ è indipendentemente un gruppo di protezione dell'ammino.

In alcune realizzazioni, R¹ è C₂₋₄ alchenile-C₁₋₃ alchile o fenile-C₁₋₃ alchile, in cui detto fenile-C₁₋₃ alchile è opzionalmente sostituito con 1, 2 o 3 gruppi alcossi C₁₋₄ scelti indipendentemente.

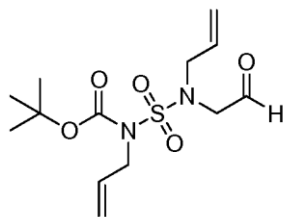
In alcune realizzazioni, R¹ è allile.

In alcune realizzazioni, R¹ è 4-metossibenzile.

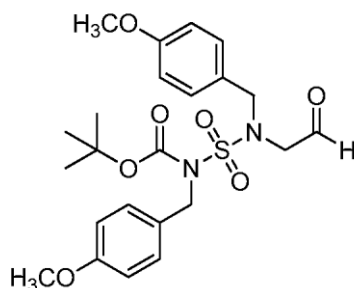
In alcune realizzazioni, R³ è C₁₋₆ alchile.

In alcune realizzazioni, R³ è *terz*-butile.

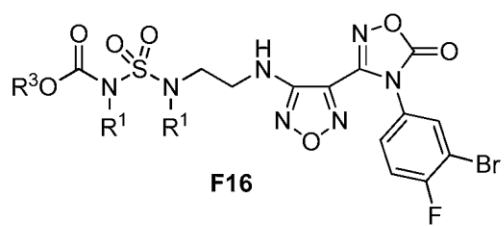
In alcune realizzazioni, il composto di Formula F15 è *terz*-butilallil{[allil(2-ossoetil)ammino]solfonil}carbammato:



In alcune realizzazioni, il composto di formula F15 è *terz*-butil(4-metossibenzil){[(4-metossibenzil)(2-ossietil)ammino]solfonil}carbammato:



In alcune realizzazioni, l'invenzione fornisce un composto di Formula F16:



in cui R^3 è alchile C_{1-6} o benzile e ciascun R^1 è indipendentemente un gruppo di protezione dell'ammino.

In alcune realizzazioni, R^1 è C_{2-4} alchenile- C_{1-3} alchile o fenile- C_{1-3} alchile, in cui detto fenile- C_{1-3} alchile è opzionalmente sostituito con 1, 2 o 3 gruppi alcossi C_{1-4} scelti indipendentemente.

In alcune realizzazioni, R^1 è allile.

In alcune realizzazioni, R^1 è 4-metossibenzile.

In alcune realizzazioni, R^3 è alchile C_{1-6} .

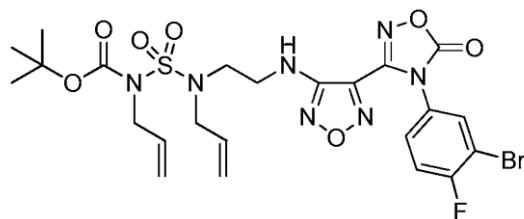
In alcune realizzazioni, R^3 è *terz*-butile.

In alcune realizzazioni, R^3 è alchile C_{1-4} .

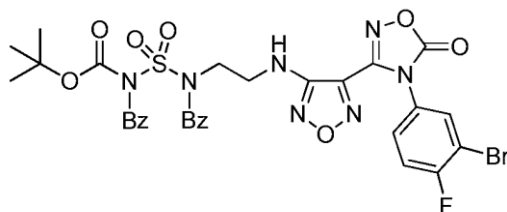
In alcune realizzazioni, R^3 è butile.

In alcune realizzazioni, il composto di Formula F16 è *terz*-butilallil(*N*-allil-*N*-(2-(4-(4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-

osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il)-1,2,5-ossadiazol-3-ilammino)etil)sulfamoil)carbammato:

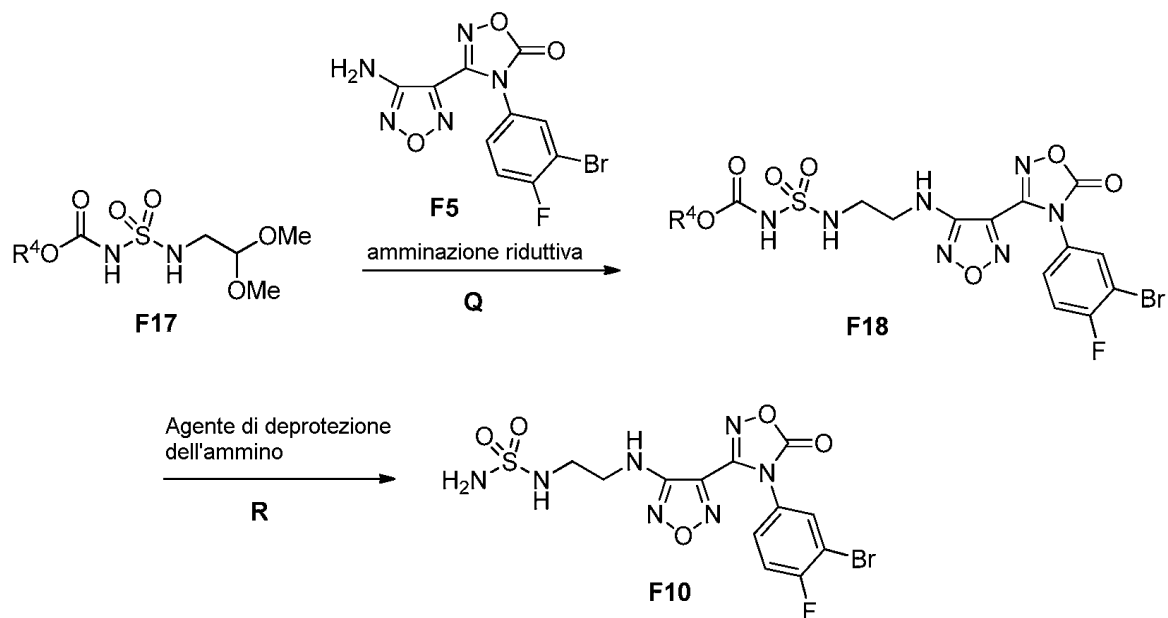


In alcune realizzazioni, il composto di formula F16 è *terz*-butil (4-metossibenzil)-(*N*-(4-metossibenzil)-*N*-(2-(4-(4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il)-1,2,5-ossadiazol-3-ilammino)etil)sulfamoil)carbammato:

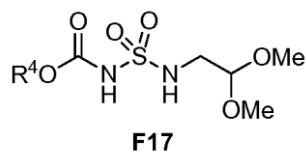


Lo schema 5 delinea una via alternativa per la preparazione del composto di Formula F10.

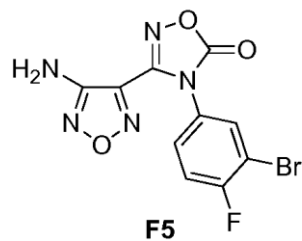
Schema 5



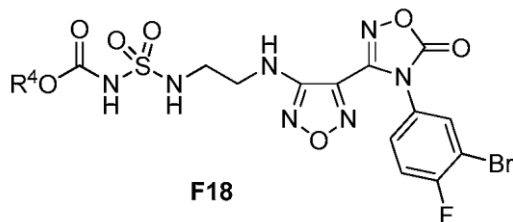
La presente domanda fornisce anche un procedimento comprendente la reazione di un composto di Formula F17:



in cui R⁴ è alchile C₁₋₆, aloalchile C₁₋₆, benzile o 9H-fluoren-9-ilmetile con un composto di Formula 5:



per ottenere un composto di Formula F18:



In alcune realizzazioni, R⁴ è *terz*-butile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è benzile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è etile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è aloalchile C₁₋₃.

In alcune realizzazioni, R⁴ è 2,2,2-tricloroetile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è 9H-fluoren-9-ilmetile.

In questa Fase Q, il composto F18 può venire preparato, in alcune realizzazioni, facendo reagire F17 con il composto di ammina di Formula F5 in presenza di un agente riducente.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in presenza di un agente riducente.

L'agente riducente può essere qualsiasi composto in grado di ridurre un composto organico ad uno stato di ossidazione minore, per esempio usando un organosilano come tri(C₁₋₃ alchile)silano (per esempio trietilsilano); idrogeno elementare o usando un reagente di idruro (come NaB(OAc)₃H, NaBH₄, LiAlH₄ e simili); usando

trifenilfosfina; o usando una combinazione di ioduro di sodio, clorotrimetilsilano e metanolo. In alcune realizzazioni, questa fase può venire eseguita in presenza di un acido come acido trifluoroacetico. Solventi adatti comprendono, ma non sono limitati a questi, solventi di idrocarburo alogenato (per esempio diclorometano, cloroformio, dicloroetano o tetracloroetano). In alcune realizzazioni, il solvente di idrocarburo alogenato è 1,2-dicloroetano.

In alcune realizzazioni, detto agente riducente è un organosilano.

In alcune realizzazioni, detto agente riducente è tri(C₁₋₃ alchile)silano.

In alcune realizzazioni, detto agente riducente è trietilsilano.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in presenza di un acido organico.

In alcune realizzazioni, detto acido organico è acido trifluoroacetico.

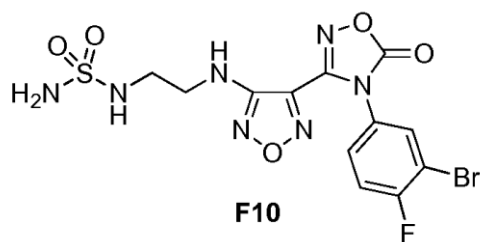
In alcune realizzazioni, detto acido organico è acido metansolfonico.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in un componente solvente comprendente un solvente di idrocarburo alogenato.

In alcune realizzazioni, detto solvente di idrocarburo alogenato è diclorometano.

In alcune realizzazioni, detto solvente di idrocarburo alogenato è 1,2-dicloroetano.

In alcune realizzazioni, il procedimento comprende inoltre la deprotezione di detto composto di Formula F18 per ottenere un composto di formula F10:



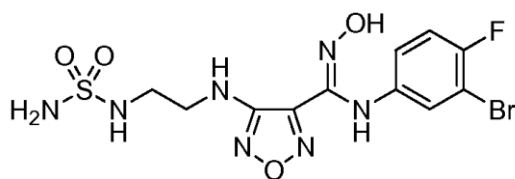
In alcune realizzazioni, metodi per la deprotezione di particolari gruppi di protezione dell'ammina (come carbammati) sono noti ad un esperto nella tecnica, come quelli in Wuts e Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^a Ed., pp 696-926, John Wiley & Sons: New York, 2006. Per esempio, il gruppo *terz*-butossicarbonile (per esempio quando R⁴ è *terz*-butile) può venire rimosso (per esempio idrolizzato) dall'atomo

di azoto, per esempio mediante trattamento con un acido (come acido cloridrico, acido trifluoroacetico, acido toluensolfonico e simili); una combinazione di reagenti (per esempio miscela di cloruro di acetile e metanolo) nota per generare un acido; o un acido di Lewis (per esempio $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$). Il gruppo benzilossicarbonile (per esempio quando R^4 è benzile) può venire rimosso (per esempio idrogenolizzato) dall'atomo di azoto, per esempio mediante trattamento con idrogeno e un catalizzatore (come carbone palladiato). I gruppi metossicarbonile ed etossicarbonile (cioè quando R^4 è metile o etile) possono venire rimossi mediante trattamento con una base inorganica (come KOH o K_2CO_3); una combinazione di reagenti (per esempio miscela di cloruro di acetile, ioduro di sodio e acetonitrile); o mediante trattamento con un acido (per esempio HBr , AcOH). Il gruppo 2,2,2-tricloroetossicarbonile può venire rimosso, per esempio, mediante trattamento con un catalizzatore (per esempio Zn/AcOH o Cd/AcOH). Solventi adatti per questa fase comprendono, ma non sono limitati a questi, metanolo o tetraidrofurano (THF), acetonitrile e simili. In alcune realizzazioni, il trattamento viene eseguito ad una temperatura da circa 30°C fino a circa 90°C , per esempio da circa 50°C fino a circa 100°C , o da circa 60°C fino a circa 80°C .

In alcune realizzazioni, detta deprotezione comprende la reazione del composto di Formula F18 con zinco in presenza di acido acetico.

In alcune realizzazioni, detta deprotezione viene eseguita in un componente solvente comprendente tetraidrofurano.

In alcune realizzazioni, il procedimento comprende inoltre la reazione di detto composto di Formula F10 con una base per ottenere un composto di Formula I:



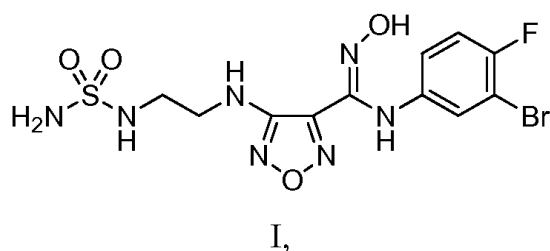
I.

In alcune realizzazioni, detta base comprende un idrossido di metallo alcalino.

In alcune realizzazioni, detto idrossido di metallo alcalino è idrossido di sodio.

In alcune realizzazioni, detta reazione viene eseguita in un componente solvente comprendente tetraidrofurano, acqua ed etanolo.

In alcune realizzazioni, il procedimento comprende inoltre la conversione di detto composto di Formula F18 ad un composto di Formula I:



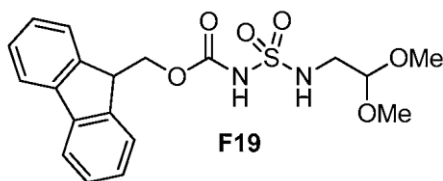
in cui detta conversione comprende il combinare il composto di Formula F18 con una base per formare una prima miscela. In alcune realizzazioni, la base è N,N-bis(2-amminoetil)etan-1,2-diammina.

In alcune realizzazioni, la conversione comprende inoltre l'aggiunta di un acido alla prima miscela. In alcune realizzazioni, detto acido è un acido forte acquoso. In alcune realizzazioni, detto acido forte acquoso è acido cloridrico acquoso.

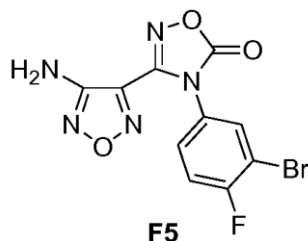
In alcune realizzazioni, detta conversione viene eseguita in un componente solvente comprendente tetraidrofurano ed etilacetato.

La presente domanda fornisce anche un procedimento comprendente:

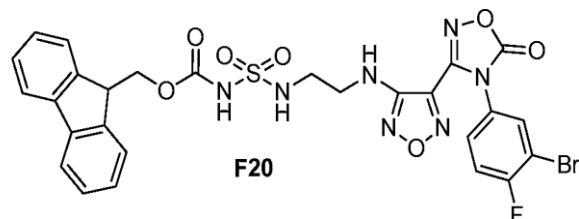
i) fare reagire un composto di Formula F19:



con un composto di Formula F5:

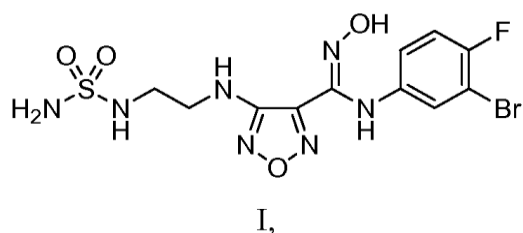


in presenza di trietilsilano e acido metansolfonico per ottenere un composto di Formula F20:



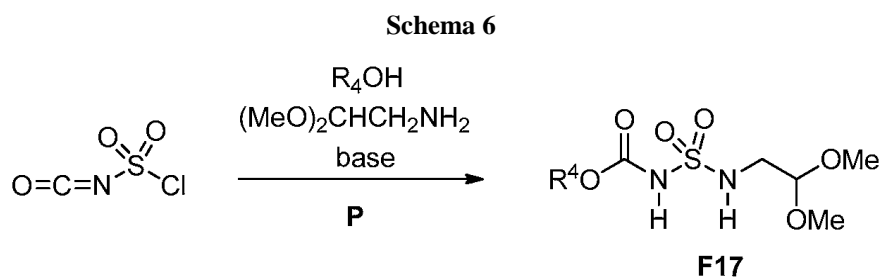
e

ii) convertire detto composto di Formula F20 a un composto di Formula I:



in cui detta conversione comprende il combinare detto composto di Formula F20 con *N,N*-bis(2-amminoetil)etan-1,2-diammina. In alcune realizzazioni, detta conversione comprende inoltre l'aggiunta di acido cloridrico acquoso dopo detta combinazione.

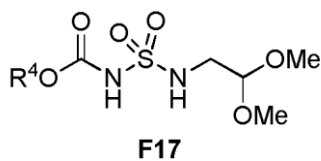
Il composto F17 può venire prodotto mediante un procedimento in una fase (Fase P) da clorosolfonilisocianato, come mostrato nella Schema 6.



In alcune realizzazioni, la preparazione del composto di Formula F17 può venire ottenuta trattando clorosolfonilisocianato con 2,2-dimetossietanamina e alcool R^4OH (R^4 è definito come in precedenza), opzionalmente in un solvente (per esempio un solvente di idrocarburo alogenato come diclorometano, cloroformio, dicloroetano e tetracloroetano). In alcune realizzazioni, questa fase viene eseguita in presenza di

una base. La base può essere una base organica come una ammina aciclica (per esempio trietilammina, diisopropilettilammina (DIPEA), ecc.) o una ammina ciclica (per esempio pirrolidina, piperidina, ecc.) o una base inorganica come alcali (per esempio NaOH, LiOH, KOH, Mg(OH)₂, ecc.). In alcune realizzazioni, la reazione viene eseguita in un solvente, per esempio un solvente di idrocarburo alogenato come diclorometano, cloroformio, dicloroetano o tetracloroetano.

In alcune realizzazioni, la presente domanda fornisce inoltre un composto di Formula F17:



in cui R⁴ è aloalchile C₁₋₆ o benzile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è *terz*-butile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è benzile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è etile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è aloalchile C₁₋₃.

In alcune realizzazioni, R⁴ è 2,2,2-tricloroetile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è 9*H*-fluoren-9-ilmetile.

In alcune realizzazioni, il composto di Formula F17 è *terz*-butil N-(2,2,dimetossietil)sulfamoilcarbammato.

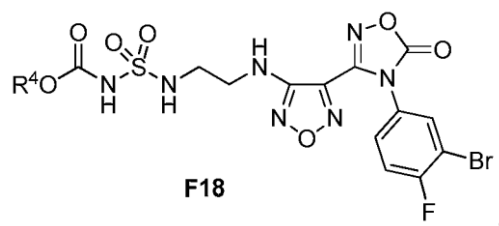
In alcune realizzazioni, il composto di Formula F17 è benzil N-(2,2,dimetossietil)sulfamoilcarbammato.

In alcune realizzazioni, il composto di Formula F17 è etil N-(2,2,dimetossietil)sulfamoilcarbammato.

In alcune realizzazioni, il composto di Formula F17 è 2,2,2-tricloroetil N-(2,2,dimetossietil)sulfamoilcarbammato.

In alcune realizzazioni, il composto di Formula F17 è (9*H*-fluoren-9-il)metil N-(2,2,dimetossietil)sulfamoilcarbammato.

In alcune realizzazioni, la presente domanda fornisce inoltre un composto di Formula F18:



in cui R⁴ è alchile C₁₋₆, aloalchile C₁₋₆ o benzile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è *terz*-butile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è benzile.

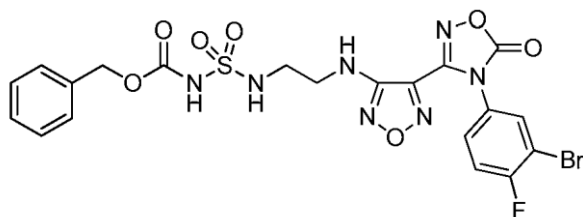
In alcune realizzazioni, R⁴ è etile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è aloalchile C₁₋₃.

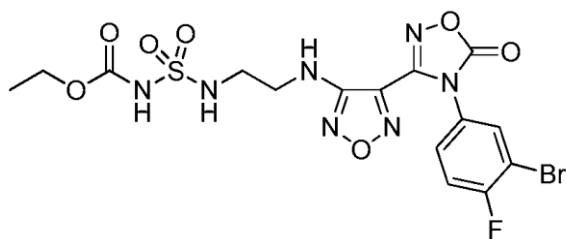
In alcune realizzazioni, R⁴ è 2,2,2-tricloroetile.

In alcune realizzazioni, R⁴ è 9*H*-fluoren-9-ilmetile.

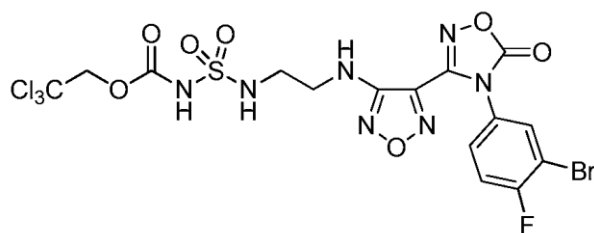
In alcune realizzazioni, il composto di Formula F18 è benzil ([2-([4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il)ammino)etil]ammino)solfonil)carbammato:



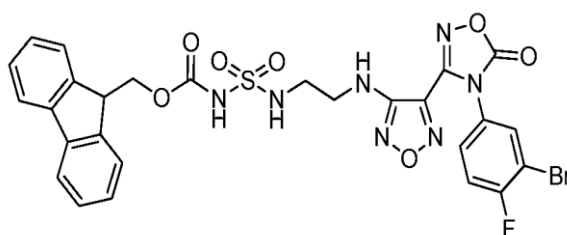
In alcune realizzazioni, il composto di Formula F18 è etil ([2-([4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il)ammino)etil]ammino)solfonil)carbammato:



In alcune realizzazioni, il composto di Formula F18 è 2,2,2-tricloroetil ([2-([4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il)ammino)etil]ammino)solfonil)carbammato:



In alcune realizzazioni, il composto di Formula F18 è (9*H*-fluoren-9-il)metil N-(2-((4-(4-(3-bromo-4-fluorenil)-5-osso-1,2,4-ossadiazol-3-il)-1,2,5-ossadiazol-3-il)ammino)etil]ammino} sulfamoilcarbammato:



Quando usato in questa sede, il termine “alchile”, quando usato da solo o insieme con termini di una parte addizionale, si riferisce ad un gruppo di idrocarburo saturo a catena lineare o ramificato avente da 1 fino a 6 atomi di carbonio, da 1 fino a 4 atomi di carbonio, o da 1 fino a 3 atomi di carbonio. Gruppi alchile di esempio comprendono metile, etile, n-propile, isopropile, n-butile, isobutile, sec-butile, terz-butile, e simili.

Quando usato in questa sede, “alchenile” si riferisce ad un gruppo alchile avente uno o più doppi legami carbonio-carbonio. In alcune realizzazioni, detto gruppo alchile ha da 2 fino a 6 atomi di carbonio, da 2 fino a 4 atomi di carbonio, o da 2 fino a 3 atomi di carbonio. Gruppi alchenile di esempio comprendono etenile (vinile), propenile, e simili.

Quando usato in questa sede, “alchenilalchile” si riferisce ad un gruppo di formula -alchile-alchenile. In alcune realizzazioni, il gruppo alchenilalchile è allile.

Quando usato in questa sede, il termine “aloalchile”, quando usato da solo o insieme con una parte addizionale, si riferisce ad un gruppo alchile sostituito con uno o più atomi di alogeno scelti indipendentemente da F, Cl, Br e I. Gruppi aloalchile di esempio comprendono CF₃, CHF₂, CH₂CF₃, e simili.

Quando usato in questa sede, il termine “alcossi” si riferisce ad un gruppo -O-alchile. In alcune realizzazioni, il gruppo alchile ha da 1 fino a 6 atomi di carbonio, da 1 fino a 4 atomi di carbonio o da 1 fino a 3 atomi di

carbonio. Gruppi alcossi di esempio comprendono metossi, etossi, propossi (per esempio n-propossi e isopropossi), t-butossi, e simili.

Quando usata in questa sede, "trialchilammina" si riferisce ad un atomo di azoto sostituito con tre gruppi alchile scelti indipendentemente. In alcune realizzazioni, ciascun gruppo alchile ha da 2 fino a 6 atomi di carbonio, da 2 fino a 4 atomi di carbonio, o da 2 fino a 3 atomi di carbonio. Gruppi trialchilammina di esempio comprendono trimetilammina, trietilammina, e simili.

Quando usato in questa sede, il termine "alcossicarbonile" si riferisce ad un gruppo di formula -C(O)-O-alchile. In alcune realizzazioni, il gruppo alchile ha da 2 fino a 6 atomi di carbonio, da 2 fino a 4 atomi di carbonio, o da 2 fino a 3 atomi di carbonio. Gruppi alcossicarbonile di esempio comprendono etossicarbonile, *terz-butossicarbonile* (Boc), e simili.

Solventi di idrocarburo alogenato si riferiscono ad alcani alogenati come diclorometano, cloroformio, dicloroetano o tetracloroetano, in cui l'alcano può essere a catena ramificata o lineare avente da 1 fino a 12 atomi di carbonio, da 1 fino a 6 atomi di carbonio, o da 1 fino a 4 atomi di carbonio, con uno o più atomi di alogeno. In alcune realizzazioni, il solvente di idrocarburo alogenato è un alcano clorurato avente da 1 fino a 12 atomi di carbonio, da 1 fino a 6 atomi di carbonio, o da 1 fino a 4 atomi di carbonio.

In vari punti della presente descrizione, sostituenti di composti dell'invenzione possono venire descritti in gruppi o in intervalli. Si intende specificamente che l'invenzione comprende ciascuna e ogni singola subcombinazione dei membri di tali gruppi e intervalli.

Si intende che i composti dell'invenzione sono stabili. Quando usato in questa sede, "stabile" si riferisce ad un composto che è sufficientemente robusto da sopravvivere all'isolamento ad un grado di impurezza utile da una miscela di reazione, e preferibilmente in grado di venire formulato in un agente terapeutico efficace.

Si noterà inoltre che certe caratteristiche dell'invenzione che vengono, per chiarezza, descritte nel contesto di realizzazioni separate, possono anche venire fornite in combinazione in una realizzazione singola. Al contrario, varie caratteristiche dell'invenzione che vengono, per brevità, descritte nel contesto di una singola realizzazione, possono anche venire fornite separatamente o in qualsiasi subcombinazione adatta.

I composti dell'invenzione sono inoltre destinati a includere tutti i possibili isomeri geometrici. Isomeri geometrici cis e trans dei composti vengono descritti e possono venire isolati come una miscela di isomeri o come forme isomeriche separate.

Composti dell'invenzione comprendono anche forme tautomere. Le forme tautomere derivano dallo scambio di un legame singolo con un doppio legame adiacente insieme con la concomitante migrazione di un protone.

Composti dell'invenzione possono anche comprendere tutti gli isotopi di atomi presenti negli intermedi o nei composti finali. Isotopi comprendono quegli atomi aventi lo stesso numero atomico, ma numeri di massa diversi. Per esempio, isotopi dell'idrogeno comprendono trizio e deuterio.

In alcune realizzazioni, i composti dell'invenzione, e loro sali, sono sostanzialmente isolati. Con "sostanzialmente isolati" si intende che il composto è almeno parzialmente o sostanzialmente separato dall'ambiente in cui è stato formato o rilevato. La separazione parziale può comprendere, per esempio, una composizione arricchita nel composto dell'invenzione. La separazione sostanziale può comprendere composizioni contenenti almeno circa il 50%, almeno circa il 60%, almeno circa il 70%, almeno circa l'80%, almeno circa il 90%, almeno circa il 95%, almeno circa il 97%, o almeno circa il 99% in peso del composto dell'invenzione, o un suo sale. Metodi per isolare composti e loro sali sono ordinari nella tecnica.

La presente domanda comprende anche sali dei composti descritti in questa sede. Quando usati in questa sede, "sali" si riferiscono a derivati dei composti descritti, in cui il composto genitore viene modificato convertendo una parte di acido o base esistente alla sua forma di sale. Esempi di sali comprendono, ma non sono limitati a questi, sali con acido minerale (come HCl, HBr, H₂SO₄) o acido organico (come acido acetico, acido benzoico, acido trifluoroacetico) di residui basici come ammine; sali di alcali (come Li, Na, K, Mg, Ca) od organici (come trietilammonio) di residui acidi come acidi carbossilici; e simili. I sali della presente domanda possono venire sintetizzati dal composto genitore che contiene una parte basica o acida mediante metodi chimici convenzionali. Generalmente, tali sali possono venire preparati facendo reagire le forme libere di acido o base di questi composti con una quantità stechiometrica della base o dell'acido appropriato in acqua o in un solvente organico, o in una miscela dei due: generalmente, si preferiscono mezzi non acquosi come etere, etilacetato, etanolo,

isopropanolo o acetonitrile (ACN).

La presente domanda comprende anche sali farmaceuticamente accettabili dei composti descritti in questa sede. I “sali farmaceuticamente accettabili” comprendono una sottoserie dei “sali” suddescritti, che sono sali non tossici convenzionali del composto genitore formato, per esempio, da acidi inorganici o organici non tossici. Elenchi di sali adatti si trovano in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 e *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2 (1977). La frase “farmaceuticamente accettabile” viene impiegata in questa sede per riferirsi a quei composti, materiali, composizioni e/o forme di dosaggio che sono, entro il campo di una valutazione medica oculata, adatti per l'uso in contatto con i tessuti di esseri umani e animali, senza tossicità, irritazione, risposta allergica o altro problema o complicazione eccessivi, commensurato con un rapporto beneficio/rischio ragionevole.

I procedimenti descritti in questa sede possono venire controllati secondo qualsiasi metodo adatto noto nella tecnica. Per esempio, la formazione del prodotto può venire controllata mediante mezzi spettroscopici come spettroscopia a risonanza magnetica nucleare (per esempio ^1H o ^{13}C), spettroscopia all'infrarosso, spettrofotometria (per esempio UV-visibile) o spettrometria di massa; o mediante cromatografia come cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) o cromatografia su strato sottile. I composti ottenuti mediante le reazioni possono venire purificati mediante qualsiasi metodo noto adatto nella tecnica. Per esempio, cromatografia (pressione media) su un adsorbente adatto (per esempio silicagel, allumina e simili), HPLC, o cromatografia su strato sottile preparativa; distillazione; sublimazione, sminuzzamento o ricristallizzazione. La purezza dei composti, in generale, viene determinata mediante metodi fisici, come misurazione del punto di fusione (nel caso di un solido), ottenimento di uno spettro NMR, o esecuzione di separazione mediante HPLC. Se il punto di fusione diminuisce, se segnali indesiderati nello spettro NMR vengono diminuiti, o se picchi estranei in un tracciato HPLC vengono rimossi, si può affermare che il composto è stato purificato. In alcune realizzazioni, i composti sono sostanzialmente purificati.

La preparazione di composti può comportare la protezione e deprotezione di vari gruppi chimici. La necessità di protezione e deprotezione, e la selezione di gruppi di protezione appropriati, possono venire determinate

facilmente da un esperto nella tecnica. La chimica di gruppi di protezione può venire trovata, per esempio, in Wuts e Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^a Ed., John Wiley & Sons: New York, 2006.

Le reazioni dei procedimenti descritti in questa sede possono venire eseguite in solventi adatti che possono venire scelti facilmente da un esperto nella tecnica di sintesi organica. Solventi adatti possono essere sostanzialmente non reattivi con i materiali di partenza (reagenti), gli intermedi, o i prodotti alle temperature alle quali le reazioni vengono eseguite, cioè temperature che possono essere nel campo dalla temperatura di congelamento del solvente fino alla temperatura di ebollizione del solvente. Una data reazione può venire eseguita in un solvente o in una miscela di più di un solvente. A seconda della fase di reazione, il solvente(i) adatto per quella particolare fase di reazione può venire scelto. Solventi appropriati comprendono acqua, alcani (come pentani, esani, eptani, cicloesano, ecc., o una loro miscela), solventi aromatici (come benzene, toluene, xilene, ecc.), alcoli (come metanolo, etanolo, isopropanolo, ecc.), eteri (come dialchileteri, metil *terz*-butiletere (MTBE), tetraidrofurano (THF), diossano, ecc.), esteri (come etilacetato, butilacetato, ecc.), solventi di idrocarburo alogenato (come diclorometano (DCM), cloroformio, dicloroetano, tetracloroetano), dimetilformammide (DMF), dimetilsolfossido (DMSO), acetone, acetonitrile (ACN), esametilfosforammide (HMPA), e N-metilpirrolidone (NMP). Tali solventi possono venire usati nelle loro forme umida o anidra.

La risoluzione di miscele racemiche di composti può venire eseguita mediante qualsiasi di numerosi metodi noti nella tecnica. Un metodo di esempio comprende ricristallizzazione frazionata usando un "acido risolvente chirale" che è un acido organico che forma un sale, otticamente attivo. Agenti risolventi adatti per metodi di ricristallizzazione frazionata sono, per esempio, acidi otticamente attivi come le forme D e L di acido tartarico, acido diacetiltartarico, acido dibenzoiltartarico, acido mandelico, acido malico, acido lattico o i vari acidi camforsolfonici otticamente attivi. La risoluzione di miscele racemiche può anche venire eseguita mediante eluizione su una colonna impaccata con un agente risolvente otticamente attivo (per esempio dinitrobenzoilfenilglicina). Una composizione di un solvente di eluizione adatta può venire determinata da un esperto nella tecnica.

Metodi di uso

Il composto di Formula I può inibire l'attività dell'enzima indolamina-2,3-diossigenasi (IDO). Per esempio, il composto di Formula I può venire usato per inibire l'attività di IDO in una cellula o in un individuo che necessita di modulazione dell'enzima somministrando una quantità di inibizione del composto di Formula I.

I composti di Formula I possono venire usati in metodi di inibizione della degradazione di triptofano in un sistema contenente cellule che esprimono IDO come un tessuto, organismo vivente, o coltura cellulare. Vengono anche descritti metodi per modificare (per esempio aumentare) i livelli di triptofano extracellulare in un mammifero somministrando una quantità efficace del composto di Formula I. Metodi di misurazione dei livelli di triptofano e di degradazione del triptofano sono ordinari nella tecnica.

I composti di Formula I possono venire usati in metodi di inibizione dell'immunosoppressione come immunosoppressione mediata da IDO in un paziente somministrando al paziente una quantità efficace del composto di Formula I. L'immunosoppressione mediata da IDO è stata associata con, per esempio, cancro, crescita di un tumore, metastasi, infezione virale, replicazione virale, ecc.

I composti di formula I possono anche venire usati in metodi di trattamento di malattie associate con attività o espressione, compresa attività anormale e/o sovraespressione, di IDO in un individuo (per esempio paziente) somministrando all'individuo che necessita di tale trattamento una quantità o dose terapeuticamente efficace del composto di Formula I o una sua composizione farmaceutica. Malattie di esempio possono comprendere qualsiasi malattia, disturbo o condizione che sia legata direttamente o indirettamente all'espressione o all'attività dell'enzima IDO, come sovraespressione o attività anormale. Una malattia associata a IDO può anche comprendere qualsiasi malattia, disturbo o condizione che possano venire prevenuti, migliorati o curati modulando l'attività enzimatica. Esempi di malattie associate a IDO comprendono cancro, infezione virale come infezione da HIV, infezione da HCV, depressione, disturbi neurodegenerativi come morbo di Alzheimer e corea di Huntington, trauma, cataratte correlate all'età, trapianto di organo (per esempio rigetto di trapianto di organo), e malattie autoimmuni comprendenti asma, artrite reumatoide, sclerosi multipla, infiammazione allergica, malattia infiammatoria dell'intestino, psoriasi e lupus eritematoso sistemico. Cancro di esempio trattabili mediante i metodi in questa sede comprendono cancro di colon, pancreas, seno, prostata, polmone, cervello,

ovaia, cervice, testicoli, renale, testa e collo, linfoma, leucemia, melanoma, e simili. Il composto di Formula I può anche essere utile nel trattamento di obesità ed ischemia.

Quando usato in questa sede, il termine “cellula” è destinato a riferirsi ad una cellula che è *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. In alcune realizzazioni, una cellula *ex vivo* può essere parte di un campione di tessuto asportato da un organismo come un mammifero. In alcune realizzazioni, una cellula *in vitro* può essere una cellula in una coltura cellulare. In alcune realizzazioni, una cellula *in vivo* è una cellula vivente in un organismo come un mammifero.

Quando usata in questa sede, l’espressione “portare in contatto” si riferisce al portare insieme parti indicate in un sistema *in vitro* o in un sistema *in vivo*. Per esempio “portare in contatto” l’enzima IDO con il composto di Formula I comprende la somministrazione del composto di Formula I ad un individuo o paziente, come un uomo, avente IDO, nonché, per esempio, l’introduzione del composto di Formula I in un campione contenente una preparazione cellulare o purificata contenente l’enzima IDO.

Quando usato in questa sede, il termine “individuo” o “paziente”, usati in modo intercambiabile, si riferisce a qualsiasi animale comprendente mammiferi, preferibilmente topi, ratti, altri roditori, conigli, cani, gatti, suini, bestiame, pecore, cavalli o primati, e molto preferibilmente uomini.

Quando usata in questa sede, la frase “quantità terapeuticamente efficace” si riferisce alla quantità di composto o agente farmaceutico attivo che stimola la risposta biologica o medicinale in un tessuto, sistema, animale, individuo o uomo che viene ricercata da un ricercatore, veterinario, dottore o altro personale clinico.

Quando usato in questa sede, il termine “trattare” o “trattamento” si riferisce a 1) prevenzione della malattia; per esempio, prevenzione di una malattia, una condizione o un disturbo in un individuo che può essere predisposto alla malattia, alla condizione o al disturbo, ma non sperimenta o presenta ancora la patologia o sintomatologia della malattia; 2) inibizione della malattia; per esempio, inibizione di una malattia, condizione o un disturbo in un individuo che sperimenta o presenta la patologia o sintomatologia della malattia, condizione o disturbo (cioè arrestare l’ulteriore sviluppo della patologia e/o della sintomatologia), o 3) miglioramento della malattia; per esempio, miglioramento di una malattia, condizione o un disturbo in un individuo che sperimenta o presenta la patologia o sintomatologia della malattia, della condizione o del disturbo (cioè invertire la patologia e/o

sintomatologia).

Terapia in combinazione

Uno o più agenti farmaceutici o metodi di trattamento addizionali come, per esempio, agenti anti-virali, prodotti chemioterapeutici o altri agenti anti-cancro, immunopotenziatori, immunosoppressori, radiazione, vaccini anti-tumorali e anti-virali, terapia con citochine (per esempio IL2, GM-CSF, ecc.), e/o inibitori di tirosina chinasi possono venire usati in combinazione con il composto di Formula I per il trattamento di malattie, disturbi o condizioni associati a IDO. Gli agenti possono venire combinati con il composto di Formula I in una forma di dosaggio singola, o gli agenti possono venire somministrati simultaneamente o sequenzialmente come forme di dosaggio separate.

Agenti antivirali adatti contemplati per l'uso in combinazione con il composto di Formula I possono comprendere inibitori di trascrittasi inversa nucleosidici e nucleotidici (NRTI), inibitori di trascrittasi inversa non nucleosidici (NNRTI), inibitori di proteasi e altri farmaci antivirali.

Esempi di NRTI comprendono zidovudina (AZT); didanosina (ddl); zalcitabina (ddC); stavudina (d4T); lamivudina (3TC); abacavir (1592U89); adefovir dipivoxil [bis(POM)-PMEA]; lobucavir (BMS-180194); BCH-10652; emtricitabina [(-)-FTC]; beta-L-FD4 (anche chiamato beta-L-D4C e denominato beta-2',3'-dideoossi-5-fluoro-citidene); DAPD, ((-)-beta-D-2,6-diammino-purina diossolano); e lodenosina (FddA). NNRTI adatti tipici comprendono nevirapina (BI-RG-587); delaviradina (BHA, U-90152); efavirenz (DMP-266); PNU-142721; AG-1549; MKC-442 (1-(etossi-metil)-5-(1-metiletil)-6-(fenilmetil)-(2,4(1H,3H)-pirimidindione); e (+)-calanolide A (NSC-675451) e B. Inibitori di proteasi adatti tipici comprendono saquinavir (Ro 31-8959; ritonavir (ABT-538); indinavir (MK-639); nelfnavir (AG-1343); amprenavir (141W94); lasinavir (BMS-234475); DMP-450; BMS-2322623; ABT-378, e AG-1 549. Altri agenti antivirali comprendono idrossiurea, ribavirina, IL-2, IL-12, pentafuside e progetto Yissum n. 11607.

Prodotti chemioterapeutici o altri agenti anti-cancro adatti comprendono, per esempio, agenti alchilanti (comprendenti, senza limitazione, mostarde azotate, derivati di etilenimmina, alchilsolfonati, nitrosouree e triazeni), come mostarda di uracile, clormetino, ciclofosfammide (CytosanTM), ifosfammide, melphalan,

clorambucile, pipobromano, trietilen-melammina, trietilfosforammina, busulfam, carmustina, lomustina, streptozocina, dacarbazina e temozolomide.

Nel trattamento del melanoma, agenti adatti per l'uso in combinazione con il composto di Formula 1 comprendono: dacarbazina (DTIC), opzionalmente insieme con altri farmaci chemioterapeutici come carmustina (BCNU) e cisplatino; il "regime Dartmouth", che consiste in DTIC, BCNU, cisplatino e tamoxifene; una combinazione di cisplatino, vinblastina e DTIC; o temozolomide. Composti secondo l'invenzione possono anche venire combinati con farmaci per immunoterapia comprendenti citochine come interferone alfa, interleuchina 2, e fattore di necrosi tumorale (TNF) nel trattamento del melanoma.

Il composto di Formula I può anche venire usato in combinazione con terapia con vaccino nel trattamento del melanoma. I vaccini antimelanoma sono, in alcuni modi, simili ai vaccini anti-virus che vengono usati per prevenire malattie causate da virus come poliomielite, morbillo, e parotite. Cellule di melanoma indebolite o parti di cellule di melanoma denominate antigeni, possono venire iniettate in un paziente per stimolare la risposta immunitaria del corpo per distruggere cellule di melanoma.

I melanomi che sono limitati alle braccia o alle gambe possono anche venire trattati con una combinazione di agenti comprendente il composto di Formula I, usando una tecnica di perfusione degli arti isolati ipertermici. Questo protocollo di trattamento separa temporaneamente la circolazione dell'arto coinvolto dal resto del corpo e inietta alte dosi di chemioterapia nell'arteria che alimenta l'arto, fornendo così alte dosi all'area del tumore senza esporre organi interni a queste dosi che potrebbero altrimenti causare effetti secondari gravi. Usualmente, il fluido viene riscaldato a 102° fino a 104°F. Melphalan è il farmaco maggiormente usato in questa procedura di chemioterapia. Questo può venire fornito con un altro agente denominato fattore di necrosi tumorale (TNF) (vedere la sezione sulle citochine).

Agenti chemioterapeutici o altri anti-cancro adatti comprendono, per esempio, antimetaboliti (comprendenti, senza limitazione, antagonisti dell'acido folico, analoghi di pirimidina, analoghi di purina e inibitori di adenosindeamminasi) come metotrexato, 5-fluorouracile, floxuridina, citarabina, 6-mercaptipurina, 6-tioguanina, fludarabina fosfato, pentostatina e gemcitabina.

Agenti chemioterapeutici o altri anti-cancro adatti comprendono inoltre, per esempio, certi prodotti naturali e loro derivati (per esempio alcaloidi vinca, antibiotici antitumorali, enzimi, linfocine ed epipodofillotossine) come vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, ara-C, paclitaxel (TAXOLTM), mitramicina, deossicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasi, interferoni (specialmente IFN- α), etoposide e teniposide.

Altri agenti citotossici comprendono navelbene, CPT-11, anastrozolo, letrozolo, capecitabina, reloxafina, ciclofosfammide, ifosammide e droloxafina.

Sono anche adatti agenti citotossici come epidofillotossina; un enzima antineoplastico; un inibitore di topoisomerasi; procarbazina; mitoxantrone; complessi di coordinazione del platino come cis-platino e carboplatino; modificatori della risposta biologica; inibitori di crescita; agenti terapeutici antiormonali; leucovorina; tegafur; e fattori di crescita ematopoietica.

Un altro agente(i) anti-cancro comprende prodotti terapeutici anticorpali come trastuzumab (Herceptin), anticorpi per molecole costimolatrici come CTLA-4, 4-1BB e PD-1, o anticorpi per citochine (IL-10, TGF- β , ecc.)

Altri agenti anti-cancro comprendono anche quelli che bloccano la migrazione di cellule immunitarie come antagonisti per i recettori di chemioquina comprendenti CCR2 e CCR4.

Altri agenti anti-cancro comprendono anche quelli che migliorano il sistema immunitario come adiuvanti o trasferimento di cellule T adottive.

Vaccini anti-cancro comprendono cellule dendritiche, peptidi sintetici, vaccini a DNA, e virus ricombinanti.

Metodi per la somministrazione sicura ed efficace della maggior parte di questi agenti chemioterapeutici sono noti agli esperti nella tecnica. Inoltre, la loro somministrazione viene descritta nella letteratura standard. Per esempio, la somministrazione di molti degli agenti chemioterapeutici è descritta nel "Physicians' Desk Reference" (PDR, per esempio edizione 1996, Medical Economics Company, Montvale, NJ).

Formulazioni farmaceutiche e forme di dosaggio

Quando impiegato come prodotto farmaceutico, il composto di Formula I può venire somministrato nella forma

di composizioni farmaceutiche che sono una combinazione del composto di Formula I e un veicolante farmaceuticamente accettabile. Queste composizioni possono venire preparate in un modo ben noto nella tecnica farmaceutica, e possono venire somministrate mediante una varietà di vie, a seconda che si desideri trattamento locale o sistemico e dell'area da trattare. La somministrazione può essere topica (comprendente oftalmica e a membrane mucose comprendente somministrazione intranasale, vaginale e rettale), polmonare (per esempio mediante inalazione o insufflazione di polveri o aerosol, comprendente mediante nebulizzatore; intratracheale, intranasale epidermica e transdermica), oculare, orale o parenterale. Metodi per la somministrazione oculare possono comprendere somministrazione topica (gocce oculari), iniezione subcongiuntivale, perioculare o intravitreale, o introduzione mediante catetere a palloncino o inserti oftalmici posizionati chirurgicamente nel sacco congiuntivale. La somministrazione parenterale comprende iniezione o infusione intravenosa, intrarteriosa, sottocutanea, intraperitoneale o intramuscolare; o somministrazione intracraniale, per esempio intratecale o intraventricolare. La somministrazione parenterale può essere nella forma di una singola dose in bolo, o può essere, per esempio, mediante una pompa di perfusione continua. Composizioni e formulazioni farmaceutiche per somministrazione topica possono comprendere cerotti transdermici, unguenti, lozioni, creme, gel, gocce, supposte, spray, liquidi e polveri. Veicolanti, basi acquose, in polvere od oleose, addensanti e simili farmaceuticamente convenzionali possono essere necessari o desiderabili.

Composizioni farmaceutiche contenenti il composto di Formula I possono venire preparate in combinazione con uno o più veicolanti farmaceuticamente accettabili. Nella preparazione delle composizioni dell'invenzione, l'ingrediente attivo viene tipicamente miscelato con un eccipiente, diluito mediante un eccipiente o racchiuso entro tale veicolante nella forma, per esempio, di una capsula, sacchetto, cartina, o altro contenitore. Quando l'eccipiente serve come un diluente, esso può essere un materiale solido, semi-solido o liquido, che agisce come un veicolo, veicolante o mezzo per l'ingrediente attivo. Quindi, le composizioni possono essere nella forma di compresse, pillole, polveri, confetti, sacchetti, pasticche, elisir, sospensioni, emulsioni, soluzioni, sciroppi, aerosol (come un solido o un in un mezzo liquido), unguenti contenenti, per esempio, fino al 10% in peso del composto attivo, capsule di gelatina dure e morbide, supposte, soluzioni iniettabili sterili, e polveri confezionate

sterili.

Nella preparazione di una formulazione, il composto attivo può venire macinato per fornire la dimensione delle particelle appropriate prima di combinarlo con gli altri ingredienti. Se il composto attivo è sostanzialmente insolubile, esso può venire macinato ad una dimensione delle particelle minore di 200 mesh. Se il composto attivo è sostanzialmente solubile in acqua, la dimensione delle particelle può venire regolata mediante macinazione per fornire una distribuzione sostanzialmente uniforme nella formulazione, per esempio circa 40 mesh.

Alcuni esempi di eccipienti adatti comprendono lattosio, destrosio, saccarosio, sorbitolo, mannitolo, amidi, gomma di acacia, fosfato di calcio, alginati, gomma adragante, gelatina, silicato di calcio, cellulosa microcristallina, polivinilpirrolidone, cellulosa, acqua, sciroppo, e metilcellulosa. Le formulazioni possono inoltre comprendere: agenti lubrificanti come talco, stearato di magnesio, e olio minerale; agenti bagnanti; agenti emulsionanti e di sospensione; agenti conservanti come metil- e propilidrossi-benzoati; agenti dolcificanti; ed agenti aromatizzanti. Le composizioni dell'invenzione possono venire formulate per fornire rilascio rapido, prolungato o ritardato dell'ingrediente attivo dopo somministrazione al paziente impiegando procedure note nella tecnica.

Le composizioni possono venire formulate in una forma di dosaggio unitaria, ciascun dosaggio contenendo da circa 5 fino a circa 100 mg, più usualmente da circa 10 fino a circa 30 mg, dell'ingrediente attivo. L'espressione "forme di dosaggio unitarie" si riferisce ad unità fisicamente separate adatte come dosaggi unitari per soggetti umani e altri mammiferi, ciascuna unità contenendo una quantità predeterminata di materiale attivo calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato, in associazione con un eccipiente farmaceutico adatto.

Il composto attivo può essere efficace su un ampio intervallo di dosaggio, e viene generalmente somministrato in una quantità farmaceuticamente efficace. Si comprenderà, tuttavia, che la quantità del composto realmente somministrata verrà usualmente determinata da un medico, sulla base di circostanze pertinenti, comprendenti la condizione da trattare, la via di somministrazione scelta, il composto reale somministrato, età, peso e risposta del singolo paziente, la gravità dei sintomi del paziente, e simili.

Per preparare composizioni solide come compresse, l'ingrediente attivo principale viene miscelato con un eccipiente farmaceutico per formare una composizione pre-formulazione solida contenente una miscela omogenea del composto di Formula I. Quando si fa riferimento a queste composizioni pre-formulazione come omogenee, l'ingrediente attivo è tipicamente disperso uniformemente nella composizione, per cui la composizione può venire facilmente suddivisa in forme di dosaggio unitario ugualmente efficaci come compresse, pillole e capsule. Questa pre-formulazione solida viene quindi suddivisa in forme di dosaggio unitarie del tipo suddescritto contenenti, per esempio, da 0,1 fino a circa 500 mg dell'ingrediente attivo della presente domanda.

Le compresse o pillole contenenti il composto di Formula I possono essere rivestite o altrimenti mescolate per fornire una forma di dosaggio che fornisce il vantaggio di azione prolungata. Per esempio, la compressa o pillola può comprendere un componente di dosaggio interno e uno di dosaggio esterno, l'ultimo essendo nella forma di un involucro sul primo. I due componenti possono essere separati mediante uno strato enterico che serve a resistere alla disintegrazione nello stomaco e permettere al componente interno di passare intatto nel duodeno o di venire ritardato come rilascio. Una varietà di materiali può venire usata per tali strati o rivestimenti enterici, come materiali comprendenti numerosi acidi polimerici e miscele di acidi polimerici con materiali come gommalacca, alcool cetilico, e acetato di cellulosa.

Le forme liquide in cui i composti e le composizioni della presente domanda possono venire incorporati per somministrazione orale o mediante iniezione comprendono soluzioni acquose, sciroppi opportunamente aromatizzati, sospensioni acquose o di olio, ed emulsioni aromatizzate con oli edibili come olio di cotone, olio di sesamo, olio di cocco o olio di arachidi, nonché elisir e veicoli farmaceutici simili.

Composizioni per inalazione o insufflazione comprendono soluzioni o sospensioni in solventi acquosi o organici farmaceuticamente accettabili, o loro miscele, e polveri. Le composizioni liquide o solide possono contenere eccipienti farmaceuticamente accettabili adatti come descritto in precedenza. In alcune realizzazioni, le composizioni vengono somministrate mediante la via respiratoria orale o nasale per un effetto locale o sistemico. Le composizioni possono venire nebulizzate mediante uso di gas inerti. Le soluzioni nebulizzate possono venire

respirate direttamente dal dispositivo di nebulizzazione, o il dispositivo di nebulizzazione può venire attaccato ad una tenda di maschere facciali, o una macchina per la respirazione a pressione positiva intermittente. Composizioni in soluzione, sospensione o polvere possono venire somministrate oralmente o nasalmente da dispositivi che erogano la formulazione in un modo appropriato.

La quantità di composto o composizione somministrata ad un paziente varierà a seconda di ciò che viene somministrato, dello scopo della somministrazione, come profilassi o terapia, dello stato del paziente, del modo di somministrazione, e simili. In applicazioni terapeutiche, composizioni possono venire somministrate ad un paziente che soffre già di una malattia in una quantità efficace per curare o almeno arrestare parzialmente i sintomi della malattia e sue complicazioni. Dosi efficaci dipenderanno dalla condizione di malattia che viene trattata nonché dalla valutazione del medico curante che dipende da fattori come gravità della malattia, età, peso e condizione generale del paziente, e simili.

Le composizioni somministrate ad un paziente possono essere nella forma di composizioni farmaceutiche suddescritte. Queste composizioni possono venire sterilizzate mediante tecniche di sterilizzazione convenzionali, o possono venire filtrate in modo sterile. Soluzioni acquose possono venire confezionate per l'uso come tali, o liofilizzate, la preparazione liofilizzata venendo combinata con un veicolante acquoso sterile prima della somministrazione. Il pH delle preparazioni del composto sarà tipicamente fra 3 e 11, più preferibilmente da 5 fino a 9, e molto preferibilmente da 7 fino a 8. Si comprenderà che l'uso di certi degli eccipienti, veicolanti o stabilizzanti precedenti porterà alla formazione di sali farmaceutici.

Il dosaggio terapeutico del composto di Formula I può variare a seconda, per esempio, del particolare uso per il quale viene effettuato il trattamento, il modo di somministrazione del composto, la salute e condizione del paziente, e la valutazione del medico che lo prescrive. La proporzione o concentrazione del composto di Formula I in una composizione farmaceutica può variare a seconda di numerosi fattori comprendenti dosaggio, caratteristiche chimiche (per esempio idrofobicità), e via di somministrazione. Per esempio, il composto di Formula I può venire fornito in una soluzione tampone fisiologica acquosa contenente da circa lo 0,1 fino a circa il 10% peso/volume del composto per somministrazione parenterale. Alcuni intervalli della dose tipici sono da

circa 1 µg/kg fino a circa 1 g/kg di peso corporeo per giorno. In alcune realizzazioni, l'intervallo della dose è da circa 0,01 mg/kg fino a circa 100 mg/kg di peso corporeo per giorno. Il dosaggio dipende probabilmente da variabili come il tipo e l'entità di avanzamento della malattia o disturbo, dello stato di salute globale del particolare paziente, dell'efficacia biologica relativa del composto scelto, della formulazione dell'eccipiente, e della sua via di somministrazione. Dosi efficaci possono venire estrapolate da curve dose-risposta derivate da sistemi di test *in vitro* o in un modello animale.

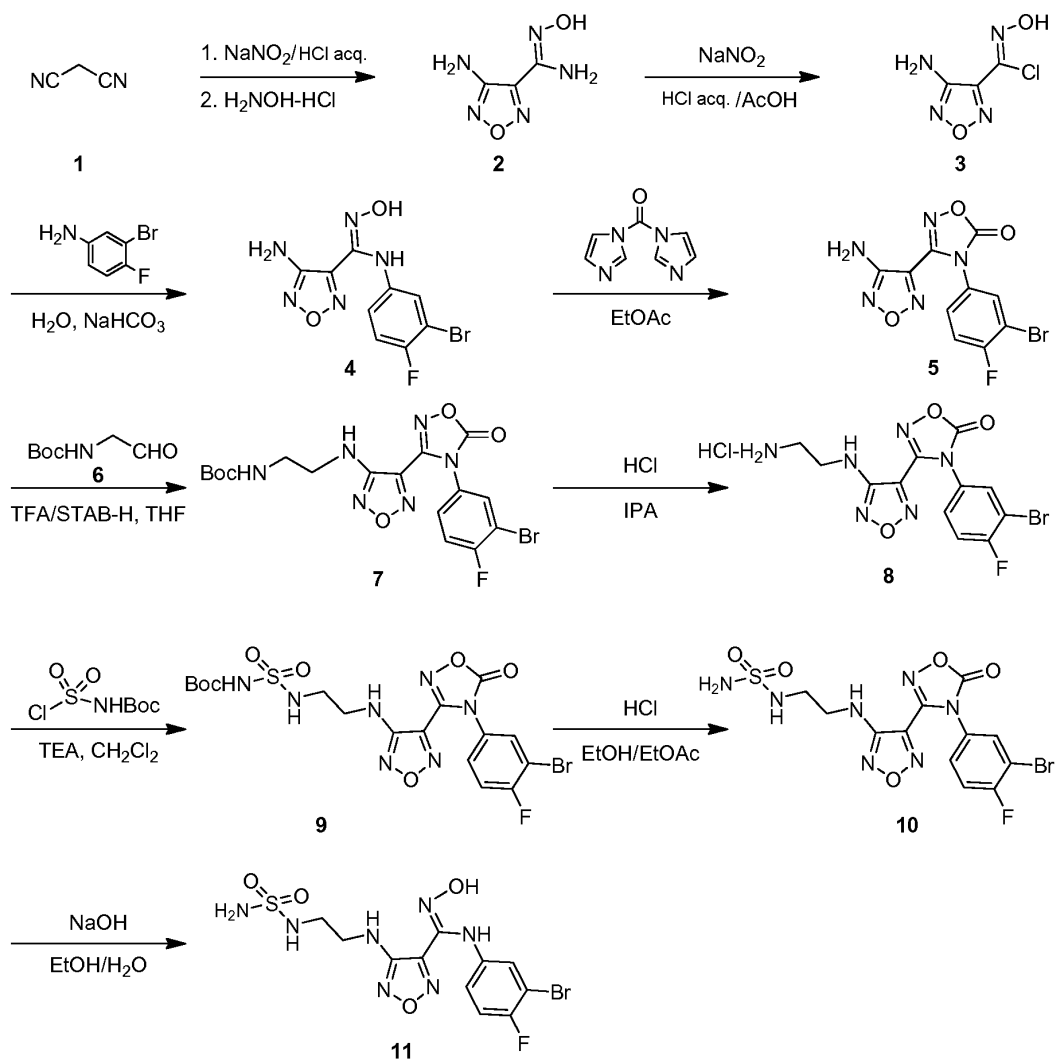
Il composto di Formula I può anche venire formulato in combinazione con uno o più ingredienti attivi addizionali che possono comprendere qualsiasi agente farmaceutico come agenti anti-virali, vaccini, anticorpi, immunopotenziatori, immunosoppressori, agenti anti-infiammatori e simili.

La presente domanda comprende anche kit farmaceutici utili, per esempio, nel trattamento o nella prevenzione di malattie o disturbi associati a IDO, obesità, diabete e altre malattie indicate in questa sede, che comprendono uno o più contenitori contenenti una composizione farmaceutica comprendente una quantità terapeuticamente efficace del composto di Formula I. Tali kit possono inoltre comprendere, se desiderato, uno o più di vari componenti di kit farmaceutici convenzionali come, per esempio, contenitori con uno o più veicolanti farmaceuticamente accettabili, contenitori addizionali, ecc., come sarà facilmente evidente agli esperti nella tecnica. Istruzioni come inserti o come etichette, indicanti quantità dei componenti da somministrare, linee guida per la somministrazione, e/o linee guida per miscelare i componenti, possono anche venire incluse nel kit.

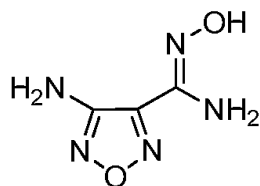
ESEMPI

L'invenzione verrà descritta più in dettaglio per mezzo di esempi specifici. Gli esempi seguenti vengono offerti per scopi illustrativi, e non sono destinati a limitare l'invenzione in alcun modo. Gli esperti nella tecnica riconosceranno facilmente una varietà di parametri non critici che possono venire cambiati o modificati per ottenere essenzialmente gli stessi risultati.

Esempio 1. Sintesi di 4-({2-[(amminosolfonil)ammino]etil}ammino)-N-(3-bromo-4-fluorofenil)-N'-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimidammide.



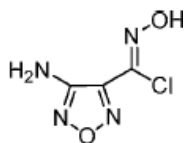
Fase A: 4-ammino-N'-idrossi-1,2,5-ossadiazol-2-carbossimmidamide (2)



Malononitrile [Aldrich, prodotto # M1407] (320,5 g, 5 moli) è stato aggiunto ad acqua (7 l), preriscaldato a 45°C ed agitato a 45°C per 5 minuti. La soluzione risultante è stata raffreddata in un bagno di ghiaccio ed è stato aggiunto nitrito di sodio (380 g, 5,5 moli, 1,1 eq.). Quando la temperatura ha raggiunto 10°C, è stato aggiunto

acido cloridrico 6 N (55 ml). Ne consegue una moderata reazione esotermica con la temperatura che raggiunge 16°C. Dopo 15 minuti il bagno freddo è stato rimosso e la miscela di reazione è stata agitata per 1,5 ore a 16-18°C. La miscela di reazione è stata raffreddata a 13°C e idrossilammina cloridrato acquosa al 50% (990 g, 15 moli, 3,0 eq.) è stata aggiunta tutta in una volta. La temperatura aumenta a 26°C. Quando la reazione esotermica cessa, il bagno freddo è stato rimosso e l'agitazione è stata proseguita per 1 ora a 26-27°C, quindi è stata portata lentamente al ricadere. Il ricadere è stato mantenuto per 2 ore, e quindi la miscela di reazione è stata lasciata raffreddare gradualmente per una notte. La miscela di reazione è stata agitata in un bagno di ghiaccio, ed acido cloridrico 6 N (800 ml) è stato aggiunto in porzioni in 40 minuti per la regolazione a pH a 7,0. L'agitazione è stata continuata nel bagno di ghiaccio a 5°C. Il precipitato è stato raccolto mediante filtrazione, lavato bene con acqua ed essiccato in un forno sotto vuoto (50°C), per ottenere il prodotto desiderato (644 g, 90%) come un solido biancastro. ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 156.0, 145.9, 141.3; $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$ (P.M.143.10), LCMS (EI) m/e 144.0 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

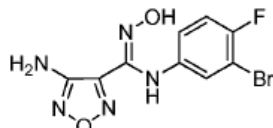
Fase B: cloruro di 4-ammino-N-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimmidoile (3)



4-ammino-N'-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimmidammide (422 g, 2,95 moli) è stata aggiunta ad una miscela di acqua (5,9 l), acido acetico (3 l) e acido cloridrico 6 N (1,475 l, 3,0 eq.), e la sospensione è stata agitata a 42-45°C fino a quando è stata ottenuta una soluzione limpida. È stato aggiunto cloruro di sodio (518 g, 3,0 eq.) e questa soluzione è stata agitata in un bagno di ghiaccio/acqua/metanolo. Una soluzione di nitrito di sodio (199,5 g, 0,98 eq.) in acqua (700 ml) è stata aggiunta in 3,5 ore mantenendo la temperatura inferiore a 0°C. Dopo aggiunta completa, l'agitazione è stata continuata nel bagno di ghiaccio per 1,5 ore, e quindi la miscela di reazione è stata lasciata riscaldare a 15°C. Il precipitato è stato raccolto mediante filtrazione, lavato bene con acqua, ripreso in etilacetato (3,4 l), trattato con solfato di sodio anidro (500 g) e agitato a temperatura ambiente per 1 ora. Questa sospensione è stata filtrata attraverso solfato di sodio (200 g), e il filtrato è stato concentrato su un evaporatore rotante. Il residuo è stato disciolto in metil *terz*-butiletere (5,5 l), trattato con il carbone vegetale

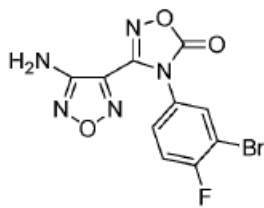
attivato (40 g), agitato a temperatura ambiente per 40 minuti e filtrato attraverso Celite. Il solvente è stato rimosso in un evaporatore rotante, e il prodotto risultante è stato essiccato in un forno sotto vuoto (45°C) per fornire il prodotto desiderato (256 g, 53,4%) come un solido biancastro. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 155.8, 143.4, 129.7; $\text{C}_3\text{H}_3\text{ClN}_4\text{O}_2$ (P.M.162.53), LCMS (ED) m/e 163/165 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Fase C: 4-ammino-N-(3-bromo-4-fluorofenil)-N'-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimmidammide (4)



Cloruro di 4-ammino-N-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimmidoile (33,8 g, 208 mmoli) è stato miscelato con acqua (300 ml). A 60°C, 3-bromo-4-fluoroanilina (Sigma-Aldrich) (43,6 g, 229 mmoli, 1,1 eq.) è stata aggiunta alla sospensione con agitazione per 10 minuti. Una soluzione di bicarbonato di sodio (26,3 g, 313 mmoli, 1,5 eq.) in acqua (300 ml) è stata aggiunta in 15 minuti con agitazione a 60°C. Dopo 20 minuti di agitazione, LCMS ha indicato completamento della reazione. La miscela di reazione è stata quindi raffreddata a temperatura ambiente ed estratta con etilacetato (2 x 300 ml). La soluzione in etilacetato combinata è stata essiccata su solfato di sodio anidro e concentrata per fornire il prodotto desiderato (65 g, 99%) come un solido biancastro, che è stato usato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione. $\text{C}_9\text{H}_7\text{BrFN}_5\text{O}_2$ (P.M. 316.09), LCMS (ED) m/e 316/318 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

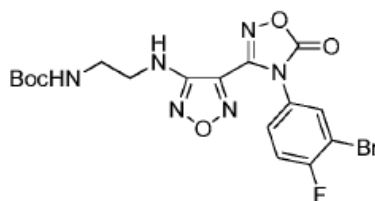
Fase D: 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4H)-one (5)



Una miscela di 4-ammino-N-(3-bromo-4-fluorofenil)-N'-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimmidammide (65,7 g, 208 mmoli), N,N-carbonildiimidazolo (Sigma-Aldrich) (50,6 g, 312 mmoli, 1,5 eq.) ed etilacetato (750 ml), è stata riscaldata a 60°C e agitata per 20 minuti. La LCMS ha indicato reazione completata. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, lavata con acido cloridrico 1 N (2 x 750 ml), essiccata su solfato di sodio e

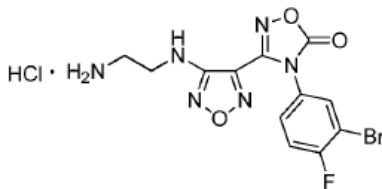
concentrata. Il prodotto grezzo è stato sminuzzato con una miscela di diclorometano, etilacetato e dietiletere, per ottenere il prodotto desiderato (60,2 g, 85%) come un solido biancastro. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.05 (m, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.57 (t, 1H, $J = 8.7$ Hz), 6.58 (s, 2H); $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{BrFN}_5\text{O}_3$ (P.M. 342.08), LCMS (EI) m/e 342/344 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Fase E: tert-butil [2-({4-[2-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-2,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il}ammino)etil]carbammato (7)



Ad una soluzione di acido trifluoroacetico (20,0 ml) e tetraidrofurano (10,0 ml) è stato aggiunto triacetossiboroidruo di sodio (10,59 g, 49,97 mmoli, 10,0 eq.) in porzioni con agitazione sotto azoto. Questa miscela è stata agitata per 10 minuti a temperatura ambiente e quindi raffreddata a -5°C . Una soluzione di 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4H)-one (1,71 g, 5,0 mmoli) e *tert*-butil (2-ossoetil)carbammato (Sigma-Aldrich) (1,99 g, 12,5 mmoli, 2,5 eq.) in THF (15,0 ml) è stata aggiunta goccia a goccia in 30 minuti con agitazione mantenendo la temperatura inferiore a 0°C . La reazione è stata agitata da -5 fino a 0°C , e porzioni addizionali di *tert*-butil (2-ossoetil)carbammato (0,20 g, 1,2 mmoli, 0,24 eq.) in THF (1,0 ml) sono state aggiunte goccia a goccia ad intervalli di 20 minuti, 40 minuti e 4 h. La HPLC ha indicato reazione completata dopo 5,25 h. La miscela di reazione è stata versata nel bicarbonato di sodio ghiacciato (500 ml), e questa soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. Il precipitato è stato raccolto mediante filtrazione e lavato con salamoia. Il residuo risultante è stato lavato con eptano (40 ml) e dietiletere (40 ml), e agitato a temperatura ambiente per 5 h. Il precipitato è stato raccolto mediante filtrazione, lavato con dietiletere, ed essiccato in un forno sotto vuoto per ottenere il prodotto desiderato (1.953 mg, 80,5%) come un solido biancastro. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.08 (m, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.59 (t, 1H, $J = 8.7$ Hz), 6.94 (m, 1H), 6.52 (m, 1H), 3.32 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 1.36 (s, 9H) $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrFN}_6\text{O}_5$ (P.M. 485.26); LCMS (EI) m/e 507/509 ($\text{M}^+ + \text{Na}$).

Fase F: 3-{4-[(2-amminoetil)ammino]-1,2,5-ossadiazol-3-il}-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4H)-one cloridrato (8)



Metodo A (preparato da *terz*-butil [2-({4-[2-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-2,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il}ammino)etil]carbammato; Fase E):

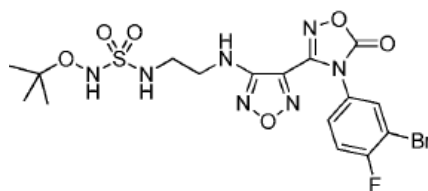
In un pallone a fondo tondo da 500 ml sono stati caricati *terz*-butil [2-({4-[2-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-2,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il}ammino)etil]carbammato (20 g, 41,2 mmoli) e isopropanolo (255 ml). L'impasto è stato agitato a temperatura ambiente. Gas di cloruro di idrogeno (7,55 g, 207 mmoli, 5,0 eq.) è stato aggiunto all'impasto con un tubo in vetro al disotto della superficie in 16 minuti. Etilacetato (111 ml) è stato quindi aggiunto alla carica e la reazione è stata riscaldata a 43°C e agitata per 7,5 ore. La carica è stata raffreddata a 19°C ed è stato aggiunto etilacetato (44 ml). L'impasto è stato filtrato e il residuo risultante è stato lavato con etilacetato (2 x 55 ml). Il solido isolato è stato essiccato sotto pressione ridotta a 45°C per 15 ore, per ottenere il prodotto desiderato (16,61 g, resa 95,5%) come un solido da biancastro a bianco. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.11 (bs, 3H), 7.78 (m, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.59 (t, 1H, *J* = 8.7 Hz), 6.74 (t, 1H, *J* = 6.1 Hz), 3.50 (m, 2H), 3.02 (m, 2H); C₁₂H₁₁BrClFN₆O₃, (P.M. 421.61); C₁₂H₁₀BrFN₆O₃ per base libera P.M. 385.15), LCMS (EI) *m/e* 385/387 (M⁺ + H).

Metodo B (preparato direttamente da 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4H)-one; Fase D):

Triacetossiboroidruo di sodio (2,33 g, 11,0 mmoli, 11,0 eq.) è stato miscelato con acido trifluoroacetico (12,0 ml, 155,8 mmoli, 115,8 eq.). La soluzione risultante è stata miscelata a temperatura ambiente per 30 minuti. Una soluzione di 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4H)-one (**5**, 0,342 g, 1,0 mmoli) e *terz*-butil (2-ossoetil)carbammato (Sigma-Aldrich) (1,04 g, 6,51 mmoli, 6,5 eq.) in diclorometano (10,0 ml) e acetonitrile (6,0 ml) è stata agitata sotto N₂. Questa soluzione è stata raffreddata a

-5°C, e la soluzione di triacetossiboroidruro di sodio e acido trifluoroacetico è stata aggiunta goccia a goccia in 5 minuti. La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 4 ore. HPLC e LC-MS (M^+ - Boc + H: 385/387, modello di bromuro) ha indicato che un rapporto del prodotto desiderato e del materiale di partenza era 4 a 1. La miscela è stata concentrata e diluita con diclorometano (10 ml). La soluzione è stata raffreddata a 0°C, e idrossido di sodio 4 N è stato aggiunto lentamente mantenendo la temperatura a 0-5°C per regolare il pH a 8-9. Lo strato acquoso è stato estratto con diclorometano (3 x 10 ml). La soluzione in diclorometano combinata è stata lavata con bicarbonato di sodio e salamoia, essiccata su solfato di sodio e concentrata. Il residuo grezzo è stato quindi disciolto in diclorometano (6,0 ml), e la soluzione risultante è stata raffreddata a 0°C. Acido cloridrico 4 N in diossano (3,0 ml) è stato aggiunto goccia a goccia a 0-5°C. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 20 minuti. Il precipitato è stato raccolto mediante filtrazione, lavato con dietilere, ed essiccato sotto vuoto per ottenere il prodotto desiderato (289 mg, 54%) come un solido biancastro. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.11 (bs, 3H), 7.78 (m, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.59 (t, 1H, $J = 8.7$ Hz), 6.74 (t, 1H, $J = 6.1$ Hz), 3.50 (m, 2H), 3.02 (m, 2H); $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{BrClFN}_6\text{O}_3$, (P.M. 421.61; $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrFN}_6\text{O}_3$ per base libera P.M. 385.15), LCMS (EI) m/e 385/387 ($M^+ + \text{H}$).

Fase G: terz-butil ([2-([4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il]ammino)etil]ammino)solfonil]carbammato (9)



Un reattore in vetro da 20 l è stato caricato con 3-{4-[(2-amminoetil)ammino]-1,2,5-ossadiazol-3-il}-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4H)-one cloridrato (1.200 g, 2,846 moli) e diclorometano (6,5 l) a temperatura ambiente. Trietilammina (950 g, 9,39 moli, 3,3 eq.) è stata aggiunta alla carica in 7 minuti. La carica è stata quindi raffreddata a -14,6°C.

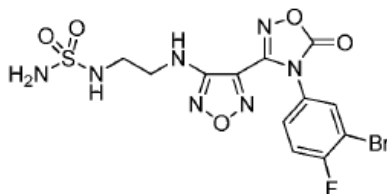
Un pallone a fondo tondo da 5 l è stato caricato con *terz*-butanolo (253 g, 3,41 moli, 1,2 eq.) e diclorometano

(2,6 l). La soluzione è stata raffreddata a 0,9°C. A questa soluzione, è stato aggiunto clorosolfonilisocianato (463 g, 3,27 moli, 1,15 eq.) in 43 minuti, mantenendo la temperatura della carica minore di 10°C. La soluzione in *terz*-butil(clorosolfonil)carbammato risultante è stata mantenuta a 3-5°C per 1 ora.

La soluzione di *terz*-butil(clorosolfonil)carbammato è stata aggiunta al reattore in 73 minuti, mantenendo la temperatura della carica inferiore a 0°C. La carica è stata quindi riscaldata a 10°C in 1 ora, ed è stata quindi agitata a 10-14°C per 1 ora. Acqua (4,8 l) è stata aggiunta alla carica e la miscela di reazione bloccata è stata agitata a temperatura ambiente per 14,5 ore. La carica è stata lasciata sedimentare, e fasi si sono separate. La soluzione in diclorometano è stata mantenuta isolata nel reattore, ed è stata caricata con acido acetico (513 g) in 25 minuti per precipitare il prodotto. L'impasto risultante è stato agitato a 20°C per 2,5 ore. Il prodotto è stato isolato mediante filtrazione e lavato con diclorometano (1,8 l). Il prodotto è stato essiccato sotto pressione ridotta (-30 inHg) a 45°C per 16 ore, per ottenere il prodotto desiderato (1.342 g, resa 83,5%) come un solido bianco.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.90 (s, 1 H), 8.08 (dd, *J* = 6.2, 2.5 Hz, 1 H), 7.72 (m, 1 H), 7.59 (t, *J* = 8.6 Hz, 1 H), 6.58 (t, *J* = 5.7 Hz, 1 H), 3.38 (dd, *J* = 12.7, 6.2 Hz, 2 H), 3.10 (dd, *J* = 12.1, 5.9 Hz, 2 H), 1.41 (s, 9 H). C₁₇H₁₉BrFN₇O₇S (P.M. 564.34), LCMS (EI) *m/e* 585.9/587.9 (M⁺ + Na).

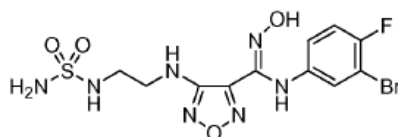
Fase H: *N*-[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il]ammino)etil]sulfammide (10)



Ad un pallone da 20 l contenente *terz*-butil ({[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il]ammino)etil]ammino}solfonil)carbammato (1.200 g, 2,126 moli) è stato aggiunto etanolo (12 l) a 20°C. La miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente e caricata con gas di cloruro di idrogeno (472 g, 12,9 moli, 6,07 eq.). La carica è stata riscaldata a 50°C e la temperatura è stata mantenuta per 3 ore fino a completamento della reazione. Il solvente è stato rimosso mediante distillazione sotto vuoto a 33-39°C, e sono stati raccolti 6 kg di distillato. Etilacetato (6,8 l, 6,1 kg) è stato aggiunto alla carica e

distillato per raccogliere 5,1 kg di distillato. Etilacetato (7,2 l, 6,48 kg) è stato aggiunto alla carica e distillato per raccogliere 5,1 kg di distillato. Etilacetato (2,4 l, 2,14 kg) è stato aggiunto alla carica per regolare il rapporto dei solventi. ^1H NMR ha indicato che il rapporto molare fra etilacetato ed etanolo era 1,0:0,1. La soluzione è stata riscaldata a 65°C. *n*-eptano (4,1 kg) è stato aggiunto alla soluzione a 60-65°C in 43 minuti. L'impasto risultante è stato agitato a 65°C per 1 ora. L'impasto è stato raffreddato a 20°C in 12,5 ore, e mantenuto a quella temperatura per 15 ore. Il prodotto è stato raccolto mediante filtrazione e lavato con *n*-eptano (2,42 l). Il prodotto è stato essiccato sotto pressione ridotta a 45°C per 65 ore, per ottenere il prodotto desiderato (906 g, resa 91,8%) come solido biancastro. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.08 (dd, $J = 6.2$) 7.72 (m, 1 H), 7.59 (t, $J = 8.7$ Hz, 1 H), 6.67 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 6.55 (s, 2H) 6.52 (t, $J = 6.0$ Hz, 1 H), 3.38 (dd, $J = 12.7$, 6.3 Hz, 2 H), 3.11 (dd, $J = 12.3$, 6.3 Hz, 2H); C₁₂H₁₁BrFN₇O₅S (P.M. 464.23), LCMS (EI) *m/e* 485.8/487.8 (M⁺ - C₅H₈O₂ + Na).

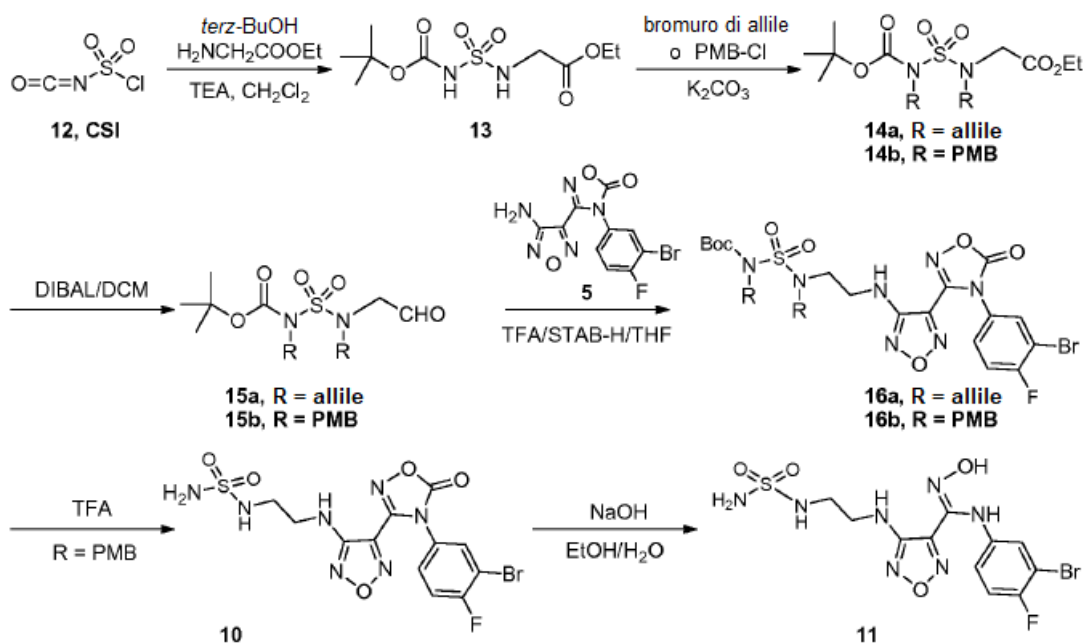
Fase I: 4-((2-[(amminosolfonil)ammino]etil)ammino)-N-(3-bromo-4-fluorofenil)-N'-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimmidammide (11)



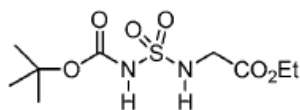
Ad un reattore in vetro da 20 l sono stati aggiunti *N*-[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il]ammino)etil]sulfammide (799,4 g, 1,72 moli) e THF (3,2 l). La soluzione risultante è stata agitata a 20°C per 7 minuti, e quindi caricata con acqua (1,6 l). La carica è stata raffreddata a 2°C ed è stata caricata con soluzione di idrossido di sodio al 30% in peso (475 ml, 666,4 g, 4,99 moli, 2,9 eq.) in 8 minuti. La carica è stata riscaldata a 20°C e la temperatura è stata mantenuta per 16 ore. La carica è stata quindi caricata con metil *terz*-butiletere (8,0 l) in 23 minuti. È stata aggiunta acqua (2,7 l) e la carica è stata raffreddata a circa 0°C. La carica è stata quindi caricata con acido fosforico all'85% in peso (370,7 g, 3,22 moli, 1,9 eq.) in 9 minuti. La carica è stata riscaldata a 20°C e agitata per 1 ora. La carica è stata lasciata sedimentare e fasi sono state separate. Lo strato organico è stato trattenuto nel reattore e caricato con acqua (2,9 l) e acido fosforico all'85% in peso (370,7 g, 3,22 moli), e agitato a 20°C per 1 ora. La carica è stata lasciata sedimentare, e fasi sono state separate. Lo strato organico è stato trattenuto nel reattore e caricato con acqua (3,2 l) e agitato a 2°C per 1 ora. La carica è stata lasciata sedimentare e fasi sono state separate. La soluzione organica è stata

trattenuta nel reattore e distillata sotto pressione ridotta a 20°C per rimuovere 3,4 kg di distillato. Etanolo (4,8 l) è stato caricato nella carica, e la carica è stata distillata fino ad un volume di 3,2 l. Questo procedimento di distillazione è stato ripetuto ancora una volta. Etanolo (0,6 l) è stato aggiunto alla carica per regolare il volume della carica a 4 l. La carica è stata agitata a 20°C per 16 ore e quindi caricata con acqua (6,39 l). L'impasto risultante è stato agitato a 20°C per 5 ore. Il prodotto è stato raccolto mediante filtrazione e lavato due volte con una miscela di etanolo (529 ml) e acqua (1.059 ml). Il prodotto è stato essiccato sotto pressione ridotta a 45°C per 65 ore per ottenere il prodotto desiderato (719,6 g, 95,4%) come un solido bianco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.51 (s, 1 H), 8.90 (s, 1 H), 7.17 (t, *J* = 8.8 Hz, 1 H), 7.11 (dd, *J* = 6.1, 2.7 Hz, 1 H), 6.76 (m, 1 H), 6.71 (t, *J* = 6.0 Hz, 1 H), 6.59 (s, 2 H), 6.23 (t, *J* = 6.1 Hz, 1 H), 3.35 (dd, *J* = 10.9, 7.0 Hz, 2 H), 3.10 (dd, *J* = 12.1, 6.2 Hz, 2 H); C₁₁H₁₃BrFN₇O₄S (P.M. 438.23), LCMS (EI) *m/e* 437.9/439.9 (M⁺ + H).

Esempio 2. Preparazione alternativa di N-[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il}ammino)etil]sulfammide

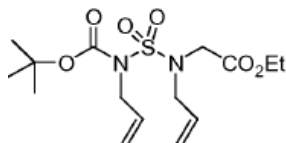


Fase 1: Etil [(*tert*-butossicarbonil)-ammino]solfonil}amminoacetato (13)



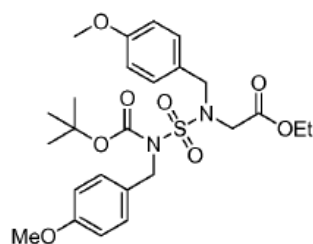
Una soluzione di clorosolfonilisocianato (Sigma-Aldrich) (5,0 ml, 57,4 mmoli) in diclorometano (100 ml) è stata raffreddata a 0°C. Alcool *terz*-butilico (4,26 g, 57,4 mmoli, 1,0 eq.) è stato aggiunto a diclorometano (100 ml) tramite un imbuto a rubinetto. Questa soluzione è stata agitata a 0°C per 30 minuti. È stato aggiunto estere etilico di glicina cloridrato (8,82 g, 63,2 mmoli, 1,1 eq.), seguito da aggiunta goccia a goccia di trietilammina (20,0 ml, 144 mmoli, 2,5 eq.) a 0°C. Questa miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 4 ore. La reazione è stata diluita con diclorometano (100 ml) e lavata con acido cloridrico 0,1 N e salamoia. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di solido e concentrato per ottenere il prodotto desiderato (13,2 g, 81,4%) come un solido biancastro grezzo, che è stato usato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.88 (s, 1H), 8.07 (t, 1H, *J* = 6.1 Hz), 4.08 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 3.78 (d, 2H, *J* = 6.1 Hz), 1.40 (s, 9H), 1.18 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz).

Fase 2a. Etil (allil){[allil(terz-butossicarbonil)ammino]solfonil}ammino)acetato (14a)



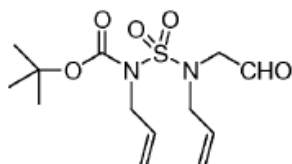
Etil ([(*terz*-butossicarbonil)ammino]solfonil)amminoacetato (1,0 g, 3,54 mmoli) è stato miscelato con carbonato di potassio (2,45 g, 17,7 mmoli, 5,0 eq.) e acetonitrile (23,0 ml) sotto N₂ a temperatura ambiente. Bromuro di allile (1,84 ml, 21,2 mmoli, 6,0 eq.) è stato aggiunto goccia a goccia. Questa miscela di reazione è stata riscaldata a 70°C e agitata a quella temperatura per 14 ore. HPLC e LCMS hanno indicato completamento della reazione. La reazione è stata filtrata, ed il filtrato è stato concentrato. Il residuo è stato disciolto in diclorometano e lavato con bicarbonato di sodio e salamoia. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato per ottenere il prodotto desiderato (1,11 g, 87%) come solido biancastro grezzo, che è stato usato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.75 (m, 2H), 5.20 (m, 4H), 4.12 (m, 6H), 3.89 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.18 (t, 3H, *J* = 8.7 Hz).

Fase 2b. Etil [(terz-butossicarbonil)(4-metossibenzil)ammino]solfonil}(4-metossibenzil)ammino)acetato (14b)



Etil ([(*tert*-butossicarbonil)ammino]solfonil)ammino)acetato (1,00 g, 4,0 mmoli) è stato miscelato con *N,N*-dimetilformammide (DMF, 6,0 ml) e agitato a temperatura ambiente. Ioduro di sodio (0,01 g, 0,1 mmoli, 0,025 eq.), carbonato di potassio (2,40 g, 20 mmoli, 5,0 eq.) e cloruro di *para*-metossibenzile (2,64 ml, 19,5 mmoli, 4,875 eq.) sono stati aggiunti alla miscela. Questa reazione è stata riscaldata a 80°C e agitata a 80°C per 2 ore. LCMS ha indicato completamento della reazione. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e filtrata attraverso Celite. Il letto di Celite è stato lavato con diclorometano, e i filtrati organici combinati sono stati concentrati. Il residuo concentrato è stato disciolto in diclorometano (20 ml) e lavato con bicarbonato di sodio (5 x 12 ml) e salamoia. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato. Il residuo è stato purificato su silicagel (eluizione a gradiente in 0-40% di etilacetato/esano) per ottenere il prodotto desiderato (1,39 g, 80%) come solido biancastro. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.22 (m, 2H), 7.14 (m, 2H), 6.88 (m, 4H), 4.64 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 4.03 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 3.92 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.14 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz).

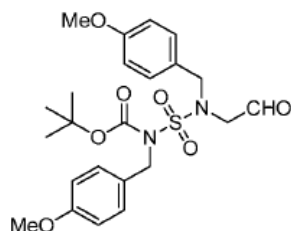
Fase 3a. tert-butil allil{[allil(2-ossoetil)ammino]solfonil}carbammato (15a)



Una soluzione di etil (allil{[allil(*tert*-butossicarbonil)ammino]solfonil)ammino)acetato (1,11 g, 3,05 mmoli) in diclorometano (15 ml) a -78°C sotto N_2 è stata trattata con idruro di diisobutilalluminio 1,0 M in diclorometano (3,66 ml, 3,66 mmoli, 1,2 eq.). La miscela di reazione è stata agitata a -78°C per 1 ora, e quindi bloccata con metanolo (1,5 ml) e trattata con una soluzione satura di tartrato di sodio e potassio (65 ml). Questa soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. Lo strato acquoso è stato quindi estratto con diclorometano (3

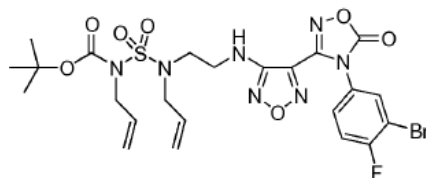
x 20 ml). La soluzione in diclorometano combinata è stata lavata con salamoia, essiccata su solfato di sodio, filtrata, e concentrata per ottenere il prodotto desiderato (0,62 g, 64%) come olio incolore denso grezzo, che è stato usato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.45 (s, 1H), 5.76 (m, 2H), 5.18 (m, 4H), 4.15 (m, 4H), 3.72 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

*Fase 3b. *terz*-butil (4-metossibenzil){[(4-metossibenzil)(2-ossoetil)ammino]solfonil}carbammato (15b)*



Una soluzione di etil [[[(*terz*-butossicarbonil)(4-metossibenzil)ammino]solfonil](4-metossibenzil)ammino]acetato (5,30 g, 10 mmoli) in diclorometano (20,0 ml) a -78°C sotto N_2 è stata trattata con idruro di diisobutilalluminio 1,0 M in diclorometano (12,2 ml, 12,2 mmoli, 1,22 eq.). La miscela di reazione è stata agitata a -78°C per 3 ore. La reazione è stata quindi bloccata con metanolo (3 ml) e trattata con diclorometano (100 ml) ed una soluzione satura di tartrato di sodio e potassio (150 ml). Questa soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. Lo strato acquoso è stato quindi estratto con diclorometano (3 x 20 ml). La soluzione in diclorometano combinata è stata lavata con salamoia, essiccata su solfato di sodio e concentrata. Il residuo è stato quindi purificato su silicagel (eluizione a gradiente con 0-30% di etilacetato/esano) per ottenere il prodotto desiderato (3,45 g, 71%) come un solido biancastro. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.24 (s, 1H), 7.23 (m, 4H), 6.88 (m, 4H), 4.68 (s, 2H), 4.31 (s, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 1.40 (s, 9H).

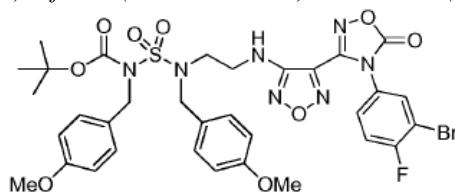
*Fase 4a. *terz*-butil allil(N-allil-N-(2-(4-(4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il)-1,2,5-ossadiazol-3-ilammino)etil)sulfamoil)carbammato (16a)*



Ad un pallone da 50 ml sono stati aggiunti triacetossiboroidruo di sodio (1,06 g, 5,0 mmoli, 1,0 eq.), acido

trifluoroacetico (TFA, 2,0 ml, 26 mmoli) e tetraidrofurano (THF, 1,0 ml) a temperatura ambiente. Questa miscela è stata raffreddata a -5°C sotto N₂ e agitata a 0-5°C per 10 minuti. A questa soluzione sono stati aggiunti 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4*H*)-one (0,171 g, 5,0 mmoli; Fase D) e *terz*-butil allil{[allil(2-ossoetil)ammino]solfonil}carbammato (0,398 g, 2,5 mmoli, 0,5 eq.) in THF (1,5 ml) goccia a goccia a 0-5°C in 5 minuti. La miscela di reazione risultante è stata agitata sotto N₂ a 0-5°C. Ai punti di tempo di 20 minuti, 40 minuti e 2,5 ore, una soluzione di *terz*-butil allil{[allil(2-ossoetil)ammino]solfonil}carbammato (0,398 g, 2,5 mmoli, 0,5 eq.) in THF (1,5 ml) è stata aggiunta goccia a goccia a 0-5°C. A 2,5 ore, una soluzione di triacetossiboroidruo di sodio (0,211 g, 1,0 mmoli, 0,2 eq.) in acido trifluoroacetico (TFA, 1,5 ml, 9,5 mmoli) è stata aggiunta a 0-5°C. La reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per una notte. La miscela di reazione è stata quindi versata in una soluzione satura ghiacciata di carbonato di sodio (50 ml) ed estratta con diclorometano (3 x 20 ml). Gli estratti in diclorometano combinati sono stati lavati con salamoia, essiccati su solfato di sodio e concentrati. Il residuo è stato quindi purificato su silicagel (eluizione a gradiente con 0-75% di etilacetato/esano) per ottenere il prodotto desiderato (0,239 g, 74,2%) come un solido biancastro. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.07 (m, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.58 (t, 1H, J = 8.7 Hz), 6.62 (m, 1H), 5.77 (m, 2H), 5.19 (m, 4H), 4.17 (m, 2H), 3.89 (m, 2H), 3.44 (m, 2H), 3.38 (m, 2H), 1.42 (s, 9H); C₂₃H₂₇BrFN₇O₇S (P.M.644.47), LCMS (EI) *m/e* 544/546 (M⁺ - Boc + H).

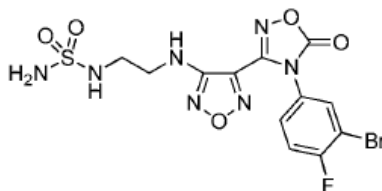
Fase 4b. *terz*-butil *N*-(2-(4-(4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il)-1,2,5-ossadiazol-3-ilammino)etil)-*N*-(4-metossibenzil)sulfamoil(4-metossibenzil)carbammato (16b)



Ad un pallone da 50 ml sono stati aggiunti triacetossiboroidruo di sodio (0,50 g, 2,37 mmoli, 4,74 eq.), acido trifluoroacetico (TFA, 1,0 ml, 13 mmoli) e tetraidrofurano a temperatura ambiente. Questa miscela è stata raffreddata a 0-5°C sotto N₂ e agitata a 0-5°C per 10 minuti. A questa soluzione, sono stati aggiunti *terz*-butil (4-

metossibenzil){[(4-metossibenzil)(2-ossoetil)ammino]solfonil}carbammato (0,40 g, 0,84 mmoli, 1,68 eq.) e 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4H)-one (0,17 g, 0,50 mmoli; Fase D) in tetraidrofurano (THF, 1,50 ml) a 0-5°C. La reazione è stata agitata a 0-5°C per 45 minuti, ed una soluzione di *terz*-butil (4-metossibenzil){[(4-metossibenzil)(2-ossoetil)ammino]solfonil}carbammato (0,12 g, 0,20 mmoli, 0,4 eq.) in THF (0,50 ml) è stata aggiunta a 0-5°C. Dopo agitazione a 0-5°C per 1 ora, la reazione è stata gradualmente riscaldata a temperatura ambiente con agitazione. Ai punti di tempo di 2,5 ore e 4,5 ore è stato aggiunto acido trifluoroacetico (0,25 ml). A 5 ore, è stata aggiunta una soluzione di *terz*-butil (4-metossibenzil){[(4-metossibenzil)(2-ossoetil)ammino]solfonil}carbammato (0,12 g, 0,20 mmoli, 0,4 eq.) in THF (0,20 ml). A 6,5 ore, è stata aggiunta una soluzione di triacetossiboroidruo di sodio (0,060 g, 0,24 mmoli, 0,48 eq.) in acido trifluoroacetico (0,25 ml). La HPLC ha indicato approssimativamente il 4% del materiale di partenza 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4H)-one (dalla Fase D) ancora rimanente. La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. HPLC ha indicato completamento della reazione. La miscela di reazione è stata versata in una soluzione satura ghiacciata di carbonato di sodio (50 ml), e la miscela è stata estratta con diclorometano (3 x 20 ml). Gli estratti in diclorometano combinati sono stati lavati con salamoia, essiccati su solfato di sodio, e concentrati. Il residuo è stato quindi purificato su silicagel (eluizione a gradiente con 0-30% di etilacetato/esano) per ottenere il prodotto desiderato (0,33 g, 82,5%) come un solido biancastro. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.06 (m, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.57 (t, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.22 (m, 4H), 6.87 (m, 4H), 6.48 (m, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.70 (s, 6H), 3.39 (m, 2H), 3.31 (m, 2H), 1.37 (s, 9H); C₃₃H₃₅BrFN₇O₉S (P.M. 804.64), LCMS (EI) *m/e* 826/828 (M⁺ - Boc + Na).

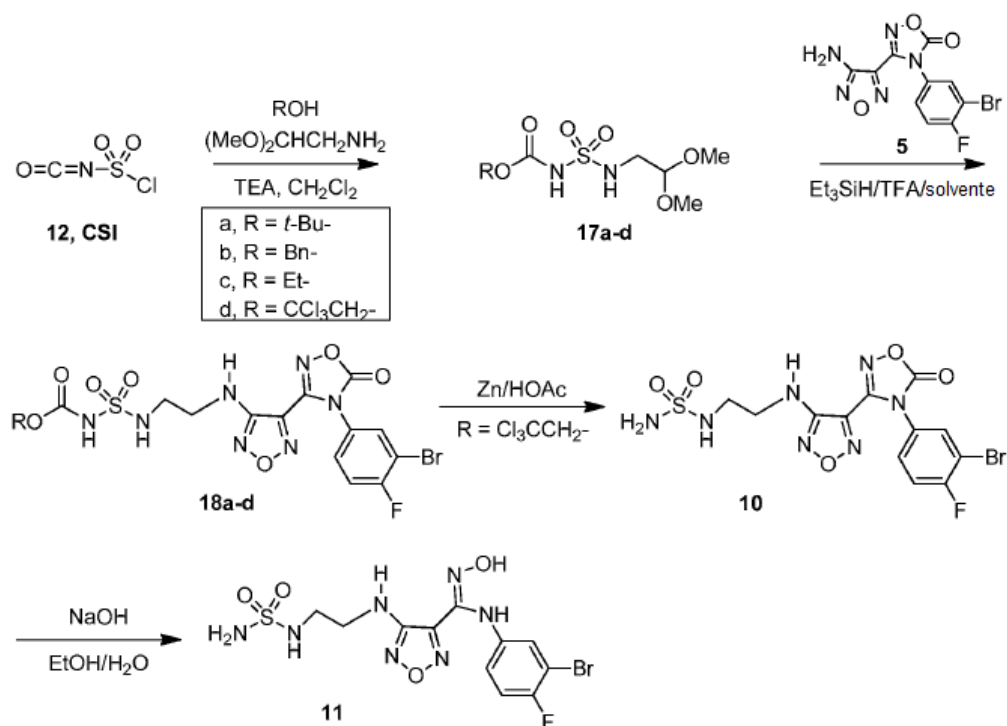
Fase 5: *N*-[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il}ammino)etil]sulfammide (10)



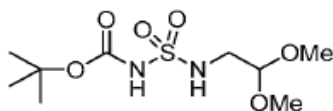
Ad un pallone da 25 ml è stato aggiunto *terz*-butil {[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-

ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il)ammino)etil](4-metossibenzil)ammino]solfonil}(4-metossibenzil)carbammato (40,2 mg, 0,050 mmoli) in acido trifluoroacetico (TFA, 0,50 ml, 6,5 mmoli) a temperatura ambiente. Questa miscela di reazione è stata riscaldata a 70°C sotto N₂ e agitata per 1 ora. La HPLC ha indicato reazione completata. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente ed il TFA è stato evaporato. Il TFA residuo è stato rimosso mediante trattamento con diclorometano (3 x 10 ml), facendo seguire evaporazione sotto vuoto. Il residuo è stato quindi sminuzzato con diclorometano e metanolo per ottenere il prodotto desiderato (20 mg, 88%) come un solido biancastro grezzo. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.08 (dd, *J* = 6.2, 2.5 Hz, 1 H), 7.72 (m, 1 H), 7.59 (t, *J* = 8.7 Hz, 1 H), 6.67 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 6.55 (s, 2H) 6.52 (t, *J* = 6.0 Hz, 1 H), 3.38 (dd, *J* = 12.7, 6.3 Hz, 2 H), 3.11 (dd, *J* = 12.3, 6.3 Hz, 2H); C₁₂H₁₁BrFN₇O₅S (P.M. 464.23), LCMS (EI) *m/e* 487.8/489.8 (M⁺ + Na).

Esempio 3. Preparazione alternativa di *N*-[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il)ammino)etil]sulfammide

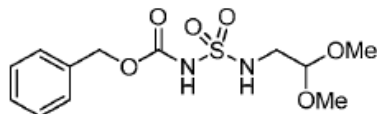


Fase 1a. *terz*-butil *N*-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbammato (17a)



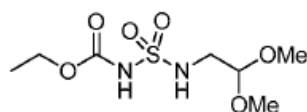
Una soluzione di clorosolfonilisocianato (11,32 g, 80 mmoli) in diclorometano (120 ml) è stata raffreddata a 0°C. Alcool *terz*-butilico (7,65 ml, 80,0 mmoli, 1,0 eq.) è stato aggiunto tramite un imbuto a rubinetto. La miscela è stata agitata a 0°C per 1,5 ore. A questa miscela, una soluzione di amminoacetaldeide dimetilacetale (8,76 ml, 80,0 mmoli, 1,0 eq.) e trietilammina (TEA, 33,4 ml, 240 mmoli, 3,0 eq.) in cloruro di metilene (DCM, 120,0 ml) è stata aggiunta goccia a goccia tramite un imbuto a rubinetto. La reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per una notte. La reazione è stata trattata con acido cloridrico 0,1 N e lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su solfato di sodio e concentrato per fornire il prodotto desiderato (15,6 g, 68,5%) come un solido biancastro grezzo, che è stato usato per la reazione successiva senza ulteriore purificazione. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.84 (s, 1H), 7.62 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz), 4.38 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 3.24 (s, 6H), 2.96 (dd, 2H, *J* = 5.8 Hz), 1.41 (s, 9H).

Fase 1b. Benzil N-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbamato (17b)



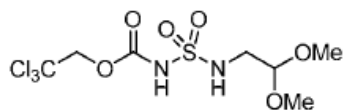
Una soluzione di clorosolfonilisocianato (16,26 g, 114,9 mmoli) in diclorometano (100 ml) è stata raffreddata a 0°C. Alcool benzilico (12,44 g, 115,0 mmoli, 1,0 eq.) è stato aggiunto tramite un imbuto a rubinetto. La miscela è stata agitata a 0°C per 0,5 ore. A questa miscela è stata aggiunta una miscela di amminoacetaldeide dimetilacetale (13,25 g, 126,0 mmoli, 1,1 eq.) e trietilammina (TEA, 17,4 g, 172 mmoli, 1,5 eq.) goccia a goccia tramite un imbuto a rubinetto a meno di 15°C. La reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per una notte. La reazione è stata trattata con acido cloridrico 0,5 N (100 ml) e la fase organica raccolta è stata lavata con salamoia, essiccata su solfato di sodio e concentrata sotto vuoto per fornire il prodotto desiderato (23,5 g, 64,3%) come un solido biancastro grezzo. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.29 (s, 1H), 7.90 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz), 7.37 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.35 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 3.21 (s, 6H), 2.97 (dd, 2H, *J* = 5.8 Hz).

Fase 1c. Etil N-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbammato (17c)



Una soluzione di clorosolfonilisocianato (11,32 g, 80 mmoli) in diclorometano (120 ml) è stata raffreddata a 0°C. Etanolo (4,67 ml, 80,0 mmoli, 1,0 eq.) è stato aggiunto tramite un imbuto a rubinetto. La miscela è stata agitata a 0°C per 1,5 ore. A questa miscela è stata aggiunta una soluzione di amminoacetaldeide dimetilacetale (8,76 ml, 80,0 mmoli, 1,0 eq.), trietilammina (TEA, 33,4 ml, 240 mmoli, 3,0 eq.) in diclorometano (DCM, 120,0 ml) goccia a goccia tramite un imbuto a rubinetto a 0°C. La reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per una notte. La reazione è stata trattata con acido cloridrico 0,1 N e la fase organica raccolta è stata lavata con salamoia, essiccata su solfato di sodio e concentrata sotto vuoto per fornire il prodotto desiderato (11,2 g, 55%) come un solido biancastro grezzo. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.13 (s, 1H), 7.81 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz), 4.37 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 4.09 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 3.23 (s, 6H), 2.97 (dd, 2H, *J* = 5.8 Hz), 1.19 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz).

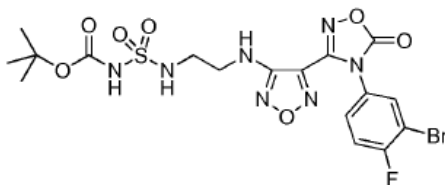
Fase 1d. 2,2,2-tricloroetil N-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbammato (17d)



Una soluzione di clorosolfonilisocianato (6,96 ml, 80 mmoli) in diclorometano (120 ml) è stata raffreddata a 0°C. 2,2,2-tricloroetano (7,67 ml, 80,0 mmoli, 1,0 eq.) è stato aggiunto tramite un imbuto a rubinetto a 0°C. Questa miscela è stata agitata a 0°C per 1,5 ore. A questa miscela è stata quindi aggiunta una soluzione di amminoacetaldeide dimetilacetale (8,76 ml, 80,0 mmoli, 1,0 eq.) e trietilammina (TEA, 33,4 ml, 240 mmoli, 3,0 eq.) in diclorometano (DCM, 120,0 ml) goccia a goccia tramite un imbuto a rubinetto a 0°C. La reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata a temperatura ambiente per una notte. La reazione è stata trattata con acido cloridrico 0,1 N e la fase organica raccolta è stata lavata con salamoia, essiccata su Na₂SO₄ e concentrata per fornire il prodotto desiderato (28,01 g, 97%) come un solido biancastro grezzo, che è stato usato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione. ¹H NMR (300 MHz,

DMSO- d_6) δ 11.79 (s, 1H), 8.08 (t, 1H, $J = 5.9$ Hz), 4.90 (s, 2H), 4.37 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 3.23 (s, 6H), 3.00 (dd, 2H, $J = 5.7$ Hz).

Fase 2a. *Terz-butil* ([2-([4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il)ammino)etil]ammino)solfonil)carbammato (18a)



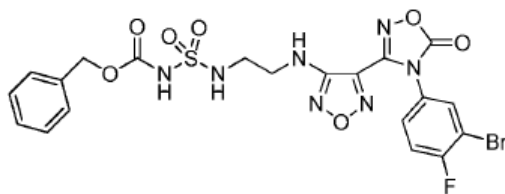
Una miscela di 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4H)-one (103 mg, 0,302 mmoli, 1,5 eq.; Fase D) e *terz*-butil *N*-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbammato (57,2 mg, 0,201 mmoli) in diclorometano (1,0 ml) è stata agitata sotto N_2 a temperatura ambiente. A questa miscela sono stati aggiunti goccia a goccia acido trifluoroacetico (0,50 ml, 6,5 mmoli) e trietilsilano (80,2 μ l, 0,502 mmoli, 2,5 eq.). Questa miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore. La HPLC ha indicato conversione di approssimativamente il 30%. La miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C e bloccata con bicarbonato di sodio saturo a pH ~8. La miscela è stata estratta in etilacetato (3 x 10 ml). Gli estratti organici combinati sono stati lavati con salamoia, essiccati su solfato di sodio e concentrati. Il residuo è stato purificato mediante TLC preparativa (50% etilacetato/esano) per fornire il prodotto desiderato (27,5 mg, 29,5%) come un solido biancastro.

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 10.90 (s, 1H), 8.08 (dd, $J = 6.2, 2.5$ Hz, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.59 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.58 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J = 12.7, 6.2$ Hz, 2H), 3.10 (dd, $J = 12.1, 5.9$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H). $C_{17}H_{19}BrFN_7O_7S$ (P.M. 564.34), LCMS (EI) m/e 485.8/487.8 ($M^+ - C_5H_8O_2 + Na$).

1H NMR (DMSO- d_6 , 400

MHz): δ 10.90 (s, 1H), 8.08 (dd, $J = 6.2, 2.5$ Hz, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.59 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.58 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J = 12.7, 6.2$ Hz, 2H), 3.10 (dd, $J = 12.1, 5.9$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H). $C_{17}H_{19}BrFN_7O_7S$ (P.M. 564.34), LCMS (EI) m/e 485.8/487.8 ($M^+ - C_5H_8O_2 + Na$).

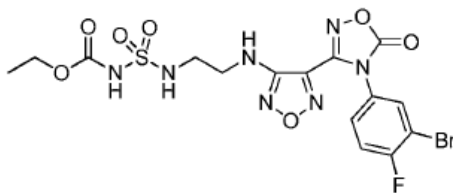
Fase 2b. *Benzil* ([2-([4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il)ammino)etil]ammino)solfonil)carbammato (18b)



Una miscela di 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4*H*)-one (68 mg, 0,20 mmoli; dalla Fase D) e benzil {[2,2-dimetossietil]ammino]solfonil}carbammato (191 mg, 0,60 mmoli, 3,0 eq.) in 1,2-dicloroetano (3,0 ml) è stata raffreddata a 0°C. A questa miscela sono stati aggiunti goccia a goccia acido trifluoroacetico (1,0 ml, 13,0 mmoli) e trietilsilano (105 µl, 0,66 mmoli, 3,3, eq.). Questa miscela di reazione è stata agitata a 0°C per 2 ore. La HPLC ha indicato completamento della reazione. La miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C e bloccata con bicarbonato di sodio saturo a pH ~8, e la miscela di reazione bloccata è stata estratta con EtOAc (3 x 10 ml). Gli estratti organici combinati sono stati lavati con salamoia, essiccati su solfato di sodio e concentrati. Il residuo è stato quindi agitato in una miscela di eptano e dietilere per una notte. I solidi sono stati raccolti mediante filtrazione, lavati con eptano ed essiccati sotto vuoto, per fornire il prodotto desiderato (125 mg, 99%) come un solido biancastro grezzo. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.31 (s, 1H), 8.05 (m, 1H), 7.87 (m, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.56 (m, 1H), 7.32 (m, 5H), 6.54 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 3.29 (m, 2H), 3.09 (m, 2H);

C₂₀H₁₇BrFN₇O₇S (P.M. 598.36), LCMS *m/e* 598/600 (M⁺ + H).

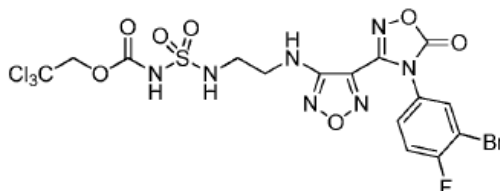
Fase 2c. Etil ([2-(4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il]ammino)etilammino]solfonil)carbammato (18c)



Una miscela di 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4*H*)-one (68 mg, 0,20 mmoli; dalla Fase D) ed etil {[2,2-dimetossietil]ammino]solfonil}carbammato (154 mg, 0,600 mmoli, 3,0 eq.) in 1,2-dicloroetano (2,50 ml, 31,7 mmoli) è stata agitata a 0°C. A questa miscela sono stati aggiunti goccia a goccia acido trifluoroacetico (1,00 ml, 13,0 mmoli) e trietilsilano (105 µl, 0,66 mmoli, 3,3 eq.). La miscela di reazione è stata agitata a 0°C per 3 ore. La HPLC ha indicato conversione del 97,5% al prodotto

desiderato. La miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C e bloccata con bicarbonato di sodio saturo a pH ~8. La miscela è stata estratta in etilacetato (3 x 10 ml). Gli estratti organici combinati sono stati lavati con salamoia, essiccati su solfato di sodio e concentrati. Il residuo è stato agitato in una miscela di eptano e dietilere per una notte. I solidi sono stati raccolti mediante filtrazione, lavati con eptano per fornire il prodotto desiderato (95 mg, 88%) come un solido biancastro grezzo. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.18 (s, 1H), 8.08 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.59 (t, 1H, *J* = 8.7 Hz), 6.56 (s, 1H), 4.04 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz), 3.35 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 1.15 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz); C₁₅H₁₅BrFN₇O₇S (P.M. 536.29), LCMS (EI) *m/e* 536/538 (M⁺ + H).

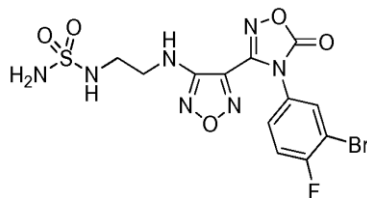
Fase 2d. 2,2,2-tricloroetil ([2-([4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il)ammino)etil]ammino)solfonil)carbammato (18d)



Una sospensione di 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4*H*)-one (**5**, 0,680 g, 1,99 mmoli) e 2,2,2-tricloroetil [(2,2-dimetossietil)ammino]solfonil)carbammato (**17d**, 2,22 g, 6,17 mmoli, 3,1 eq.) in diclorometano (DCM, 6,0 ml) è stata agitata a temperatura ambiente. A questa miscela sono stati aggiunti trietilsilano (1,27 ml, 7,95 mmoli, 4,0 eq.) ed una soluzione di acido trifluoroacetico (TFA, 3,0 ml, 39,0 mmoli) in diclorometano (DCM, 2,0 ml), mantenendo la temperatura di reazione inferiore a 30°C. La miscela di reazione diventa omogenea dopo 5 minuti con agitazione a temperatura ambiente, ed è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora. La HPLC ha indicato completamento della reazione. La reazione è stata filtrata ed il precipitato è stato sospeso in una miscela di diclorometano ed eptano (il rapporto fra diclorometano ed eptano era 1 a 9 in volume). La sospensione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. Il precipitato è stato raccolto mediante filtrazione e lavato con diclorometano al 10% in eptano, ed essiccato sotto vuoto per fornire il prodotto desiderato (1,15 g, 90,4%) come un solido biancastro, che è stato usato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

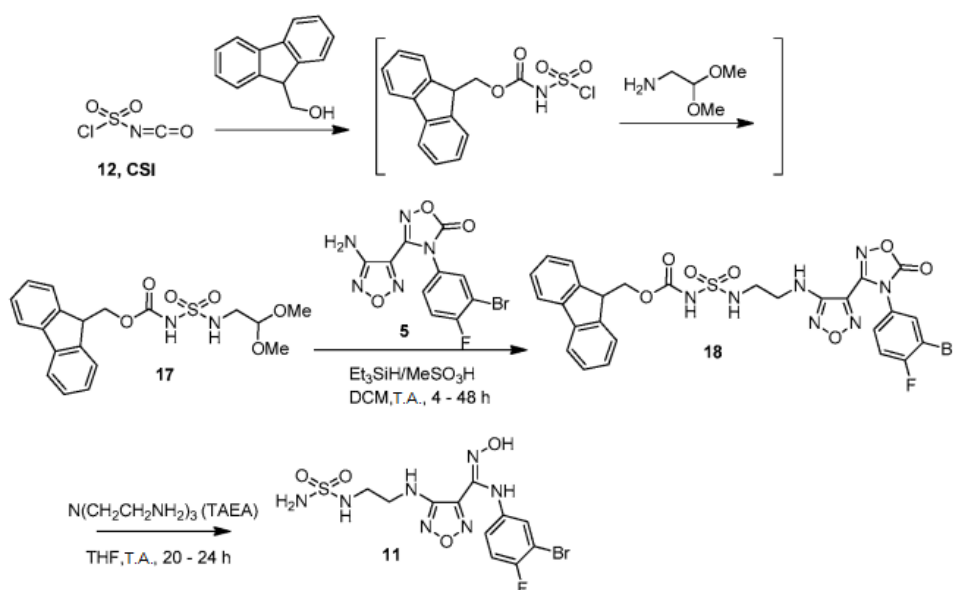
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.85 (s, 1H), 8.07 (m, 2H), 7.70 (m, 1H), 7.57 (t, 1H, *J* = 8.7 Hz), 6.56 (m, 1H), 4.88 (m, 2H), 3.37 (m, 2H), 3.16 (m, 2H); C₁₅H₁₂BrCl₃FN₇O₇S (P.M. 639.62), LCMS (EI) *m/e* 638/640/642 (M⁺ + H).

Fase 3. *N*-[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il}ammino)etil]sulfammide (10)

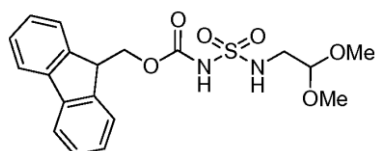


Una soluzione di 2,2,2-tricloroetil ({[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il}ammino)etil]ammino}solfonil)carbammato (320 mg, 0,50 mmoli; della Fase Q, Metodo D) in tetraidrofurano (THF, 4,0 ml) è stata agitata a temperatura ambiente. Acido acetico (0,30 ml, 5,3 mmoli) e scaglie di zinco (160 mg, 2,5 mmoli, 5,0 eq.) sono stati aggiunti sequenzialmente. Questa miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore. La HPLC ha indicato completamento della reazione. La miscela di reazione è stata filtrata attraverso Celite, e la Celite è stata lavata con THF. Il filtrato combinato è stato concentrato sotto vuoto ed il residuo risultante è stato disciolto in etilacetato (20 ml). La soluzione in etilacetato è stata lavata con carbonato di sodio saturo e salamoia, essiccata su solfato di sodio e concentrata. Il materiale grezzo è stato cristallizzato da etilacetato e dietilere per fornire il prodotto desiderato (147 mg, 63%) come un solido biancastro.

Esempio 4. Preparazione alternativa di 4-({2-[(amminosolfonil)ammino]etil}ammino)-N-(3-bromo-4-fluorofenil)-N'-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimidammide



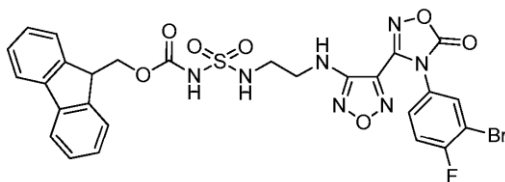
Fase 1. (9H-fluoren-9-il)metil N-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbammato



In un pallone a fondo tondo a 4 colli da 2 l essiccato in forno sono stati caricati 9-fluorenilmetanolo (50,0 g, 255 mmoli) e DCM anidro (382 ml) a temperatura ambiente. L'impasto risultante è stato raffreddato in un bagno di ghiaccio a circa 0-5°C. Una soluzione di clorosolfonilisocianato (CSI, 23,0 ml, 264 mmoli) in DCM anidro (127 ml) è stata aggiunta goccia a goccia all'impasto tramite un imbuto a rubinetto in 22 minuti, mantenendo la temperatura della miscela di reazione a < 5°C. La miscela risultante è stata agitata a 0-5°C per 1,75 ore, producendo un impasto bianco denso. Una soluzione di amminoacetaldeide dimetilacetale (27,9 ml, 255 mmoli) in DCM anidro (382 ml) e 4-metilmorfolina (84,0 ml, 764 mmoli) sono state aggiunte alla miscela di reazione a circa 0-5°C in 71 minuti. La miscela di reazione risultante è stata quindi agitata in un bagno di ghiaccio per 1,5 ore. Quando la HPLC ha mostrato che la reazione era completa, la miscela di reazione è stata acidificata mediante l'aggiunta goccia a goccia di acido fosforico 1,0 M (H₃PO₄, acq., 640 ml) in 22 minuti a pH 1-2. Acqua (300 ml), EtOAc (2.150 ml) ed eptano (250 ml) sono stati quindi aggiunti e la miscela risultante è stata agitata

per 10 minuti. Le due fasi sono state separate, e la fase organica è stata lavata sequenzialmente con acqua (500 ml), eptano (300 ml) e acqua (2 x 500 ml), ed essiccata su MgSO₄. Il filtrato è stato concentrato sotto vuoto a secchezza. I solidi risultanti sono stati ridisciolti in EtOAc (600 ml) a 65°C, e la soluzione calda è stata filtrata in un pallone a fondo tondo da 3 l pulito. Il filtrato è stato raffreddato a temperatura ambiente e agitato per 2,5 ore prima che venga aggiunto eptano (1.200 ml) tramite un imbuto a rubinetto in 80 minuti. Dopo agitazione per una notte a temperatura ambiente, la miscela è stata quindi raffreddata in un bagno di ghiaccio per 1 ora. I solidi risultanti sono stati raccolti mediante filtrazione, lavati con EtOAc/eptano al 25% (250 ml) ed essiccati per una notte a circa 40-45°C sotto vuoto, per ottenere 9H-fluoren-9-ilmetil {[2,2-dimetossietil)ammino]solfonil}carbammato (91,3 g, resa 88%) come una polvere bianca. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.43 (s, 1H), 7.98 – 7.85 (m, 3H), 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.33 (td, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 2H), 4.44 – 4.33 (m, 3H), 4.33 – 4.22 (m, 1H), 3.23 (s, 6H), 2.99 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H) ppm.

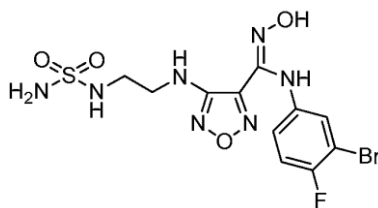
Fase 2. 9H-fluoren-9-ilmetil ([2-([4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il)ammino)etil]ammino)solfonil}carbammato



Ad una sospensione agitata di 3-(4-ammino-1,2,5-ossadiazol-3-il)-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5(4H)-one (10,00 g, 29,23 mmoli) in DCM (160 ml) sono stati aggiunti acido metansolfonico (MeSO₃H, 8,46 g, 88,04 mmoli) e trietilsilano (Et₃SiH, 8,37 g, 71,96 mmoli) a temperatura ambiente in 10 minuti per fornire un impasto. 9H-fluoren-9-ilmetil {[2,2-dimetossietil)ammino]solfonil}carbammato solido (12,25 g, 30,14 mmoli) è stato aggiunto in porzioni (1 g/3-4 minuti; in 1 ora) mantenendo la temperatura interna a meno di circa 20°C usando un bagno di acqua. Dopo l'aggiunta, la miscela risultante è stata agitata a circa 13 fino a 22°C per 3 giorni. Trietilsilano (Et₃SiH, 0,1755 g, 1,51 mmoli) e 9H-fluoren-9-ilmetil {[2,2-dimetossietil)ammino]solfonil}carbammato (0,3082 g, 0,76 mmoli) addizionali sono stati aggiunti, e la miscela

risultante è stata agitata a temperatura ambiente per altre 23 ore. È stato aggiunto alcool isopropilico (IPA, 15 ml), e la miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora. È stato aggiunto eptano (100 ml) e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per altre 2 ore. I solidi sono stati raccolti mediante filtrazione, lavati con IPA/eptano (1/5; 2 x 30 ml) ed eptano (2 x 30 ml), ed essiccati sotto vuoto per ottenere 9H-fluoren-9-ilmetil ({{[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il}ammino)etil]ammino}solfonil)carbammato come un solido bianco (18,30 g, resa 91,1%).
 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.44 (s, 1H), 8.07 (dd, $J = 6.2, 2.5$ Hz, 1H), 7.90 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.71 (ddd, $J = 8.9, 4.3, 2.6$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J = 8.7, 8.7$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.31 (td, $J = 7.4, 1.0$ Hz, 2H), 6.55 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.35 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.39 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.15 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 159.03 (d, $J = 248.7$ Hz), 156.61 (s), 155.22 (s), 151.55 (s), 148.67 (s), 143.29 (s), 140.68 (s), 133.82 (s), 133.39 (s), 130.05 (d, $J = 8.5$ Hz), 128.54 (d, $J = 3.2$ Hz), 127.73 (s), 127.07 (s), 125.24 (s), 120.11 (s), 117.42 (d, $J = 24.0$ Hz), 108.19 (d, $J = 22.5$ Hz), 66.70 (s), 46.17 (s), 43.34 (s), 40.79 (s) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ -103.99 – -107.39 (m) ppm.

Fase 3. 4-({2-[(amminosolfonil)ammino]etil}ammino)-N-(3-bromo-4-fluorofenil)-N'-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimmidammide



In un pallone a fondo tondo a 4 colli da 1 l sono stati caricati 9H-fluoren-9-ilmetil({[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorofenil)-5-osso-4,5-diidro-1,2,4-ossadiazol-3-il]-1,2,5-ossadiazol-3-il}ammino)etil]ammino}solfonil)carbammato (25,0 g, 36,4 mmoli) e THF anidro (250 ml) a temperatura ambiente per produrre una soluzione omogenea. La soluzione è stata quindi raffreddata a 0-5°C in un bagno di

ghiaccio prima di aggiungere *N,N*-bis(2-amminoetil)etan-1,2-diammina (114 ml, 728 mmoli) goccia a goccia in 35 minuti tramite un imbuto a rubinetto. L'imbuto a rubinetto è stato risciacquato con THF anidro (50 ml) ed il risciacquo è stato aggiunto alla miscela di reazione. Il bagno freddo è stato rimosso e la miscela di reazione è stata gradualmente riscaldata fino a temperatura ambiente e agitata a temperatura ambiente per 2,5 ore. È stato aggiunto EtOAc (400 ml) e la miscela risultante è stata trasferita in un pallone a fondo tondo a 4 colli da 2 l e raffreddata a circa 0-5°C in un bagno di ghiaccio. Una soluzione di HCl acquoso 2,0 M (400 ml, 800,0 mmoli) è stata aggiunta goccia a goccia tramite un imbuto a rubinetto, mantenendo la temperatura interna inferiore a 10°C. Le due fasi sono state separate e la fase acquosa è stata estratta con EtOAc (200 ml). Le frazioni organiche sono state combinate e raffreddate a circa 6-7°C. Una soluzione di HCl acquoso 2,0 M (200,0 ml, 400,0 mmoli) è stata aggiunta goccia a goccia alla frazione organica fredda, mantenendo la temperatura interna inferiore a 10°C. Le due fasi sono state separate, e la fase organica è stata lavata con acqua (2 x 400 ml), essiccata su MgSO₄, e concentrata sotto pressione ridotta ad uno sciroppo giallo chiaro. Lo sciroppo è stato disciolto in EtOAc (60,0 ml) per ottenere una soluzione omogenea. Alla soluzione è stata aggiunta una soluzione di DCM (250,0 ml) e *tert*-butilmetil etero (TBME, 100,0 ml) goccia a goccia. L'impasto risultante è stato agitato per una notte a temperatura ambiente, quindi raffreddato in un bagno di ghiaccio per 1 ora. I solidi sono stati raccolti mediante filtrazione, lavati con 250 ml di una soluzione ghiacciata di DCM (150 ml) e TBME (100 ml), ed essiccati sotto vuoto per fornire 14,4 g del prodotto desiderato grezzo come solidi bianchi.

Il prodotto grezzo è stato disciolto in EtOAc (140,0 ml) a 60°C, e la soluzione calda è stata filtrata. Il filtrato è stato raffreddato fino a temperatura ambiente prima di aggiungere eptano (100,0 ml) goccia a goccia in 55 minuti. La miscela risultante è stata quindi agitata per una notte a temperatura ambiente. I solidi sono stati raccolti mediante filtrazione, lavati con una miscela 2:1 di eptano ed EtOAc (75 ml), ed essiccati sotto vuoto a 40-50°C a peso costante per ottenere 4-({2-[(amminosolfonil)ammino]etil}ammino)-*N*-(3-bromo-4-fluorofenil)-*N'*-idrossi-1,2,5-ossadiazol-3-carbossimidammide (12,9 g, resa 81%) come un solido bianco.

Esempio A: Saggio dell'enzima indolammina 2,3-diossigenasi (IDO) umana

Indolammina 2,3-diossigenasi (IDO) umana con un marcatore His al N terminale è stata espressa in *E. coli* e

purificata ad omogeneità. IDO catalizza la scissione ossidativa dell'anello di pirrolo del nucleo di indolo di triptofano per fornire *N'*-formilchinurenina. I saggi sono stati eseguiti a temperatura ambiente come descritto nella letteratura usando IDO 95 nM e D-Trp 2 mM in presenza di ascorbato 20 mM, blu di metilene 5 µM e 0,2 mg/ml di catalasi in tampone di fosfato di potassio 50 mM (pH 6,5). Le velocità di reazione iniziali sono state registrate seguendo in continuo l'aumento di assorbanza a 321 nm dovuto alla formazione di *N'*-formilchinurenina (vedere: Sono, M., *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255, 1339-1345). Il composto di formula I è stato testato nel saggio dell'esempio A, ed è stato trovato che ha una IC₅₀ <200 nM.

Esempio B: Determinazione dell'attività inibitoria in saggio con indolamina 2,3-diossigenasi (IDO)/chinurenina basato su cellule HeLa

Cellule HeLa (#CCL-2) sono state ottenute dalla American Type Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) e mantenute in modo ordinario in terreno essenziale minimo (Eagle) con L-glutamina 2 mM e BSS di Earle regolato per contenere 1,5 g/l di bicarbonato di sodio, amminoacidi non essenziali 0,1 mM, piruvato di sodio 1 mM e 10% di siero fetale bovino (tutti della Invitrogen). Le cellule sono state mantenute a 37°C in un incubatore umidificato alimentato con il 5% di CO₂. Il saggio è stato eseguito come segue: cellule HeLa sono state insemiante in una piastra di coltura a 96 pozzetti ad una densità di 5 x 10³ per pozzetto e fatte crescere per una notte. Il giorno seguente, IFN-γ (concentrazione finale 50 ng/ml) e diluizioni seriali di composti (in un volume totale di 200 µl di terreno di coltura) sono stati aggiunti nelle cellule. Dopo 48 ore di incubazione, 140 µl del supernatante per pozzetto sono stati trasferiti ad una nuova piastra a 96 pozzetti. 10 µl di acido tricloroacetico 6,1 N (#T0699, Sigma) sono stati miscelati in ciascun pozzetto e incubati a 50°C per 30 minuti per idrolizzare *N'*-formilchinurenina prodotta mediante indolamina 2,3-diossigenasi a chinurenina. La miscela di reazione è stata quindi centrifugata per 10 minuti a 2.500 giri/minuto per rimuovere i sedimenti. 100 µl del supernatante per pozzetto sono stati trasferiti ad un'altra piastra a 96 pozzetti e miscelati con 100 µl di *p*-dimetilamminobenzaldeide al 2% (peso/volume) (#15647-7, Sigma-Aldrich) in acido acetico. Il colore giallo derivante da chinurenina è stato misurato a 480 nm usando un lettore di micropiastre SPECTRAmax 250 (Molecular Devices). L-chinurenina (#K8625, Sigma) è stata usata come standard. Gli standard (240, 120, 60,

30, 15, 7,5, 3,75, 1,87 μM) sono stati preparati in 100 μl di terreni di coltura e miscelati con un volume uguale di *p*-dimetilamminobenzaldeide al 2% (peso/volume). È stata determinata l'inibizione percentuale alle singole concentrazioni, e sono stati ottenuti i valori medi di duplicati. I dati sono stati analizzati usando regressione non lineare per generare valori IC_{50} (Prism Graphpad). Vedere: Takikawa O, *et al.*, 1988, *J. Biol. Chem.*, 263(4): 2041-8.

Esempio C: Determinazione dell'effetto di inibitori di IDO sulla proliferazione di cellule T, che viene soppressa mediante cellule dendritiche che esprimono IDO

Monociti sono stati raccolti da cellule mononucleari periferiche umane mediante leucoforesi. I monociti sono quindi stati inseminati ad una densità di 1×10^6 cellule/pozzetto in una piastra a 96 pozzetti, usando terreno RPMI 1640 additivato con il 10% di siero fetale bovino e L-glutamina 2 mM (tutti della Invitrogen). Cellule aderenti sono state mantenute sulla piastra dopo coltivazione per una notte a 37°C. Monociti aderenti sono quindi stati stimolati per 5-7 giorni con 100 ng/ml di GM-CSF (#300-03, PeproTech) e 250 ng/ml di IL-4 (#200-04, PeproTech), facendo seguire attivazione con 5 $\mu\text{g/ml}$ di LPS ottenuto da *Salmonella typhimurium* (#437650, Sigma) e 50 ng/ml di IFN- γ (#285-IF, R&D Systems) per altri 2 giorni per indurre maturazione delle cellule dendritiche.

Dopo attivazione delle cellule dendritiche, il terreno è stato sostituito con RPMI 1640 completo additivato con 100-200 U/ml di IL-2 (#CYT-209, ProSpec-Tany TechnoGene) e 100 ng/ml di anticorpo anti-CD3 (#555336, PharMingen), cellule T ($2-3 \times 10^5$ cellule/pozzetto), e diluizioni seriali di composti di IDO. Dopo incubazione per altri 2 giorni, la proliferazione di cellule T è stata misurata mediante saggio di incorporazione di BrdU, usando un kit per ELISA di proliferazione cellulare colorimetrico secondo l'istruzione del produttore (#1647229, Roche Molecular Biochemicals). Le cellule sono state coltivate in continuo per 16-18 ore in presenza di soluzione di marcatura di BrdU 10 μM . Quindi, il terreno di marcatura è stato rimosso, e 200 μl di FixDenat per pozzetto sono stati aggiunti alle cellule ed incubati per 30 minuti a temperatura ambiente. La soluzione di FixDenat è stata rimossa, e sono stati aggiunti 100 $\mu\text{l/pozzetto}$ di soluzione operativa di coniugato di anticorpo anti-BrdU-POD. La reazione è stata eseguita per 90 minuti a temperatura ambiente. Il coniugato di anticorpo è

stato quindi rimosso, e le cellule sono state risciacquate tre volte con 200 µl/pozzetto di soluzione di lavaggio. Infine, 100 µl/pozzetto di soluzione di substrato sono stati aggiunti, ed i risultati sono stati ottenuti usando un lettore di micropiastre (Spectra Max PLUS, Molecular Devices) durante lo sviluppo del colore. Sono state ottenute letture multiple a vari punti di tempo per assicurare che i dati fossero entro l'intervallo lineare. I dati sono stati ottenuti in modo ordinario da esperimenti replicati, e sono stati inclusi controlli appropriati. Vedere: Terness P, *et al.*, 2002, *J. Exp. Med.*, 196(4): 447-57; e Hwu, P, *et al.*, 2000, *J. Immunol.*, 164(7): 3596-9.

Esempio D: Valutazione *in vivo* di inibitori di IDO per l'attività antitumorale

L'efficacia anti-tumorale *in vivo* può venire testata usando protocolli di alloinnesto/xenoinnesto di tumore modificati. Per esempio, è stato descritto nella letteratura che l'inibizione di IDO può agire in sinergia con chemioterapia citotossica in topi immuno-competenti (Muller, A.J., *et al.*, 2005, *Nat. Med.* 11:312-319). È stato dimostrato che questa sinergia è dipendente da cellule T mediante confronto degli effetti sinergici di un inibitore di IDO di studio in modelli di xenotrapianto di tumore murino (per esempio B16 e varianti correlate, CT-26, LLC) cresciuti in topi singenici immunocompetenti con quelli osservati in topi singenici trattati con anticorpi anti-CD4 neutralizzanti, o gli stessi tumori cresciuti in topi immunocompromessi (per esempio nu/nu).

Il concetto di effetti anti-tumorale differenziali in topi immuno-competenti rispetto ad immuno-compromessi, permette anche di testare inibitori di IDO di studio come agenti singoli. Per esempio, tumori LLC crescono bene nel loro ceppo ospite singenico, C57Bl/6. Tuttavia, se questi topi vengono trattati con l'inibitore di IDO 1-MT (rispetto a placebo), la formazione di tumori viene marcatamente ritardata, implicando che l'inibizione di IDO era inibitrice della crescita (Friberg, M., *et al.*, 2002, *Int. J. Cancer* 101:151-155). Seguendo questa logica, si può esaminare l'efficacia dell'inibizione di IDO nel modello di tumore come xenotrapianto di LLC cresciuto in topi immunocompetenti C57Bl/6 e confrontarla agli effetti di inibitori di IDO sulla crescita del tumore LLC in topi nudi o SCID (o topi C57Bl/6 trattati con anticorpi che neutralizzano l'attività di cellule T). Poiché gli effetti di diminuzione dell'attività immunosoppressiva mediata da tumore di IDO differiranno probabilmente a seconda del potenziale immunogenico di differenti modelli di tumore, modifiche genetiche possono venire apportate alle cellule tumorali per aumentarne il potenziale immunogenico. Per esempio, l'espressione di GM-CSF in cellule

B16.F10 ne aumenta il potenziale immunogenico (Dranoff, G., *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:3539-3543). Pertanto, in alcuni modelli di tumore (per esempio B16.F10) si possono generare [poli]cloni che esprimono proteine immunostimolatrici come GM-CSF e testare gli effetti di inibizione della crescita di inibitori di IDO contro tumori ottenuti da queste cellule tumorali in topi immuno-competenti e immuno-compromessi.

Una terza strada per valutare l'efficacia di inibitori di IDO *in vivo* impiega modelli di alloinnesto/xenoinnesto di tumore murino 'pre-immunizzazione'. In questi modelli, topi immuno-competenti vengono sensibilizzati ad un antigene (o antigeni) tumorale specifico per imitare una vaccinazione anti-tumorale terapeutica. Questo innesca i topi per una risposta anti-tumorale mediata dal sistema immunitario quando i topi vengono successivamente stimolati con linee di cellule tumorali murine (che possiedono antigeni tumorali simili a quelli usati per l'immunizzazione) in esperimenti di xenoinnesto. È stato dimostrato che l'espressione di IDO smorza la risposta anti-tumorale e permette a xenoinnesti di crescere più rapidamente. In modo importante, la crescita di tumori in questo modello viene inibita mediante l'inibitore di IDO 1-MT (Uytenhove, C., *et al.*, 2003, *Nat. Med.* 9:1269-1274). Questo modello è particolarmente attraente poiché l'attività di IDO è permissiva per la crescita del tumore P815 e l'inibizione specifica di IDO può quindi essere inibitoria della crescita.

Infine, immunizzazione terapeutica può venire usata per valutare l'impatto di inibitori di IDO *in vivo*. Per esempio, è stato dimostrato usando cellule B16-BL6 che si possono stimolare topi Blk/6 con una iniezione intravenosa di cellule tumorali, facendo seguire trattamento con un peptide immunogenico ben caratterizzato (per esempio TRP-2) espresso mediante le cellule tumorali (Ji, *et al.*, 2005, *J. Immunol.*, 175: 1456-63). In modo importante, modificatori del sistema immunitario, come un anticorpo anti-CTL-4, possono migliorare risposte a tali immunizzazioni terapeutiche. L'impatto di inibitori di IDO può venire valutato in modo simile - immunizzazione con peptide tumorale con o senza inibitore di IDO. L'efficacia viene valutata mediante la sopravvivenza dell'animale (tempo fino a morbilità) o mediante la misurazione di metastasi tumorali ai polmoni e/o altri organi a punti di tempo definiti.

In qualsiasi/tutti i modelli summenzionati, può anche essere possibile misurare direttamente e/o indirettamente il numero e/o l'attività di cellule immunitarie reattive al tumore. Metodi per misurare il numero e/o l'attività di

cellule immunitarie reattive al tumore sono ben affermati, e possono venire eseguiti usando tecniche famigliari agli esperti nella tecnica (Current Protocols in Immunology, vol. 4, Coligan, J.E., *et al.*; *Immunotherapy of Cancer*, Human Press, 2006, Disis, M.L. e riferimenti al loro interno). Concettualmente, una riduzione negli effetti immunosoppressivi di IDO può portare a numeri o reattività aumentati di cellule immunitarie tumore-specifiche. Inoltre, l'inibizione di IDO può inoltre aumentare il numero o le reattività di cellule immunitarie reattive al tumore quando combinata con altri prodotti terapeutici, per esempio prodotti chemioterapeutici e/o immunomodulatori (per esempio anticorpo anti-CTLA4).

Tutti gli esperimenti di alloinnesto/xenoinnesto possono venire eseguiti usando tecniche con tumore standard (esposte da Corbett, *et al.*, In *Cancer Drug Discovery and Development: Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*, 2^a ed. Teicher, B.A. and Andrews, P.A., Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2004). La clonazione e l'introduzione di geni (per esempio IDO, GM-CSF) in linee di cellule tumorali, possono venire eseguite usando tecniche famigliari agli esperti nella tecnica (esposte in Sambrook, J. e Russel, D., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3^a edizione)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 2001).

Esempio E: Valutazione *in vivo* di inibitori di IDO nel modello di encefalite da virus dell'immunodeficienza umana-1 (HIV-1)

1. Isolamento di cellule ed infezione virale

Monociti e PBL possono venire ottenuti mediante elutriazione centrifuga in controcorrente di pacchi di leucoferesi ottenuti da donatori sieronegativi per HIV-1, 2 ed epatite B. Monociti vengono messi in coltura in colture in sospensione usando palloni in teflon in terreno di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich) additivato con il 10% di siero umano riunito inattivato a caldo, 1% di glutammina, 50 µg/ml di gentamicina, 10 µg/ml di ciprofloxacina (Sigma), e 1.000 U/ml di fattore di stimolazione della colonia di macrofagi umani ricombinante altamente purificato. Dopo sette giorni in coltura, MDM vengono infettate con HIV-1_{ADA} ad una molteplicità di infezione di 0,01.

2. Topi Hu-PBL-NOD/SCID HIVE

Topi SCID NOD/C.B-17 maschi di quattro settimane possono venire acquistati (Jackson Laboratory). Gli animali vengono mantenuti in gabbie di microisolamento sterili in condizioni prive di patogeni. Tutti gli animali vengono iniettati intraperitonealmente con anti-CD122 di ratto (0,25 mg/topo) tre giorni prima del trapianto di PBL e due volte con anticorpi asialo-GM1 di coniglio (0,2 mg/topo) (Wako) un giorno prima e tre giorni dopo l'iniezione di PBL (20×10^6 cellule/topo). MDM infettate con HIV-1_{ADA} (3×10^5 cellule in 10 μ l) vengono iniettate intracranialmente (i.c.) otto giorni dopo la ricostruzione di PBL, generando topi hu-PBL-NOD/SCID HIVE. Immediatamente dopo l'iniezione i.c. di MDM infettate con HIV-1, i topi hu-PBL-NOD/SCID HIVE vengono impiantati subcutaneamente (s.c.) con pellet di controllo (veicolo) o composto (rilascio lento di 14 o 28 giorni, Innovative Research). Gli esperimenti iniziali sono progettati per confermare l'induzione di CTL virus-specifici negli animali hu-PBL-NOD/SCID HIVE trattati con composti di IDO. Questo viene confermato mediante colorazione del tetramero ed analisi neuropatologiche dell'eliminazione di MDM dal tessuto cerebrale. Quindi, l'esperimento è progettato per analizzare la ricostituzione di linfociti umani, risposte immunitarie umorali, ed alterazioni neuropatologiche. In questi esperimenti, gli animali vengono sottoposti a prelievo il giorno 7, ed uccisi 14 e 21 giorni dopo l'iniezione i.c. di MDM umane. Il sangue raccolto in provette contenenti EDTA viene usato per citometria a flusso ed il plasma viene usato per la rilevazione di HIV-1 p24 usando ELISA (Beckman Coulter™). Anticorpi specifici per HIV-1 vengono rilevati mediante test Western blot secondo le istruzioni del produttore (kit per Western blot di HIV-1 Cambridge Biotech, Calypte Biomedical). Quantità simili di anticorpi virus-specifici vengono rilevate in animali di controllo e trattati con il composto. Può venire eseguito un totale di tre esperimenti indipendenti usando tre donatori di leucociti umani diversi.

3. FACS di sangue periferico e milza in topi hu PBL-NOD/SCID HIVE

Analisi FACS a due colori può venire eseguita su sangue periferico alle settimane 1-3 e su splenociti alla settimana 2 e 3 dopo iniezione i.c. di MDM umane. Le cellule vengono incubate con Ab monoclonali (mAb) coniugati a fluorocromo per CD4, CD8, CD56, CD3, IFN- γ umani (eBioscience) per 30 minuti a 4°C. Per valutare la risposta immunitaria cellulare, la colorazione intracellulare di IFN- γ viene eseguita in combinazione con CD8 anti-umani e CD45 anti-topo coniugati a FITC per escludere cellule murine. Per determinare CTL Ag-

specifica, colorazione del tetramero coniugato ad allofococianina per HIV-1^{gag} (p17 (aa77-85) SLYNTVATL, SL-9) e HIV-1^{pol} [(aa476-485) ILKEPVHGV, IL-9], viene seguita su splenociti stimolati con fitoemagglutinina/interleuchina-2 (BHA/IL-2). Le cellule vengono colorate seguendo le raccomandazioni del NIH/National Institute of Allergy and Infections Disease, National Tetramer Core Facilities. I dati sono stati analizzati con un FACS Calibur™ usando software CellQuest (Becton Dickinson Immunocytometry System).

4. Istopatologia e analisi delle immagini

Tessuto cerebrale viene prelevato ai giorni 14 e 21 dopo iniezione i.c. di MDM, fissato in paraformaldeide tamponata con fosfato al 4%, e incorporato in paraffina o congelato a -80°C per l'uso successivo. Sezioni coronali ottenute dai blocchi inglobati vengono tagliate per identificare il sito di iniezione. Per ciascun topo, 30-100 sezioni seriali (spesse 5 µm) vengono tagliate dal sito di iniezione di MDM umane e vengono analizzate 3-7 fette (distanziate di 10 sezioni). Sezioni di cervello vengono deparaffinate con xilene e idratate in alcoli a gradiente. La colorazione immunostochimica segue un protocollo indiretto basico, usando recupero dell'antigene mediante riscaldamento a 95°C in tampone citrato 0,01 moli/l per 30 minuti per il recupero dell'antigene. Per identificare cellule umane in cervelli di topo, viene usato mAb per vimentina (1:50, clone 3B4, Dako Corporation), che identifica tutti i leucociti umani. MDM umane e linfociti CD8⁺ vengono rilevati con, rispettivamente, anticorpi CD68 diluizione 1:50, clone KP 1) e CD8 (diluizione 10, clone 144B). Cellule infettate con il virus vengono marcate con mAb per HIV-1 p24 (1:10, clone Kal-1, tutti della Dako). Cellule microgliali murine reattive vengono rilevate con anticorpo Iba-1 (1:500, Wako). L'espressione diIDO umana (huIDO) viene visualizzata con Ab ottenuti dal Department of Cell Pharmacology, Central Research Institute, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Giappone. Anticorpi primari vengono rilevati con anticorpi secondari biotinilati appropriati, e visualizzati con complessi avidina-biotina (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories) e polimero di destrano accoppiato a perossidasi di barbaforte (HRP) (EnVision, Dako Corporation). Sezioni immunocolorate vengono controcolorate con ematossilina di Mayer. Sezioni dalle quali l'anticorpo primario è delecto o è incorporato l'isotipo IgG irrilevante, servono come controlli. Due osservatori indipendenti in modo cieco hanno contato i numeri di linfociti CD8⁺, MDM CD68⁺ e cellule HIV-1 p24⁺ in

ciascuna sezione ottenuta da ciascun topo. L'esame al microscopio ottico viene eseguito con un microscopio Nikon Eclipse 800 (Nikon Instruments Inc.). Analisi semi-quantitativa per Iba1 (percentuale dell'area occupata mediante immunocolorazione) viene eseguita mediante analisi delle immagini assistita da computer (Image-Pro®Plus, Media Cybernetics) come descritto precedentemente.

5. *Analisi statistica*

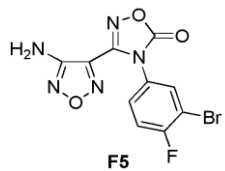
I dati possono venire analizzati usando Prism (Graph Pad) usando test *t* di Student per confronti e ANOVA. Valori $P < 0,05$ sono stati considerati significativi.

6. *Riferimento*

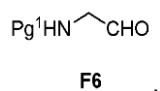
Poluektova LY, Munn DH, Persidsky Y, e Gendelman HE (2002). Generation of cytotoxic T cells against virus-infected human brain macrophages in a murine model of HIV-1 encephalitis. *J. Immunol.* 168(8):3941-9.

RIVENDICAZIONI

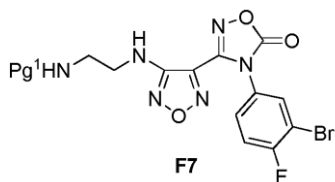
1. Procedimento comprendente la reazione di un composto di Formula F5:



con una aldeide di Formula F6:



in cui Pg¹ è un gruppo di protezione dell'ammino, per ottenere un composto di Formula F7:



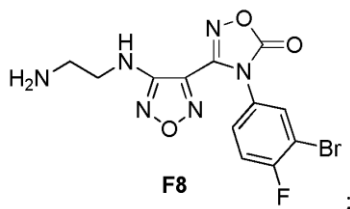
2. Procedimento della rivendicazione 1, in cui Pg¹ è:

- (a) etossicarbonile, *terz*-butossicarbonile, benzilossicarbonile o 9-fluorenilmetilossicarbonile; o
- (b) *terz*-butossicarbonile.

3. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui detta reazione viene eseguita in presenza di un agente riducente, in cui detto agente riducente è:

- (a) un agente riducente di boroidruro; o
- (b) un agente riducente di boroidruro, che è triacetossiboroidruro di sodio.

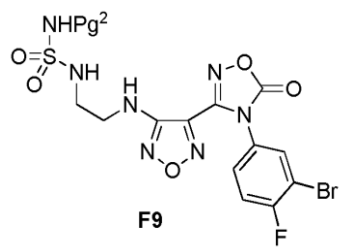
4. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, comprendente inoltre la deprotezione di detto composto di Formula F7 per ottenere un composto di formula F8:



opzionalmente in cui detta deprotezione comprende la reazione del composto di Formula F7 con acido

cloridrico.

5. Procedimento della rivendicazione 4, comprendente inoltre la reazione di detto composto di Formula F8, con $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{-X}$, in presenza di una base organica per ottenere un composto di Formula F9:



in cui:

Pg^2 è un gruppo di protezione dell'ammino; e

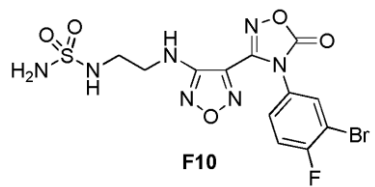
X è alogeno.

6. Procedimento della rivendicazione 5, in cui Pg^2 è:

(a) etossicarbonile, *terz*-butossicarbonile, benzilossicarbonile o 9-fluorenilmetilossicarbonile; o

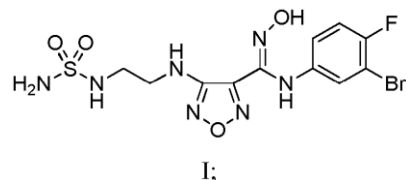
(b) *terz*-butossicarbonile; e in cui X è cloro.

7. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 5-6, comprendente inoltre la deprotezione di detto composto di Formula F9 per ottenere un composto di formula F10:



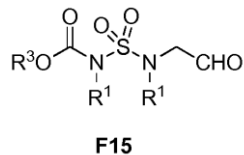
opzionalmente in cui detta deprotezione comprende la reazione di un composto di Formula F9 con acido cloridrico.

8. Procedimento della rivendicazione 7, comprendente inoltre la reazione di detto composto di Formula F10 con una base per ottenere un composto di Formula I:

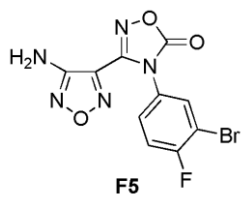


opzionalmente in cui detta base è idrossido di sodio.

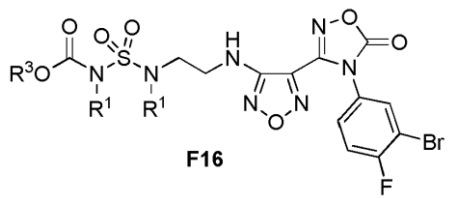
9. Procedimento, comprendente la reazione di un composto di Formula F15:



con un composto di Formula F5:



per ottenere un composto di Formula F16:



in cui:

ciascun R¹ è indipendentemente un gruppo di protezione dell'ammino scelto da C₂₋₄ alchenile-C₁₋₃ alchile o fenile-C₁₋₃ alchile, in cui detto fenile-C₁₋₃ alchile è opzionalmente sostituito con uno, due o tre gruppi alcossi C₁₋₄ scelti indipendentemente; e

R³ è alchile C₁₋₆ o benzile.

10. Procedimento della rivendicazione 9, in cui:

(a) ciascun R¹ è allile;

(b) ciascun R¹ è 4-metossibenzile;

(c) R³ è alchile C₁₋₆; o

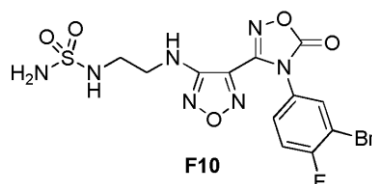
(d) R³ è *terz*-butile.

11. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 9-10, in cui detta reazione viene eseguita in presenza di un agente riducente, in cui detto agente riducente è:

(a) un agente riducente di boroidruro; o

(b) un agente riducente di boroidruro, che è triacetossiboroidruro di sodio; e in cui detta reazione viene eseguita in presenza di acido trifluoroacetico.

12. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 9-11, comprendente inoltre la deprotezione di detto composto di Formula F16 per ottenere un composto di Formula F10:

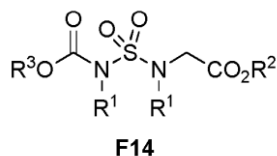


in cui detta deprotezione comprende:

(a) reazione di un composto di Formula F16 con acido trifluoroacetico; o

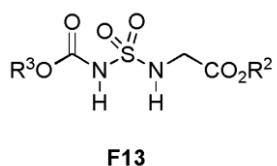
(b) reazione di un composto di Formula F16 con acido cloridrico.

13. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 9-12, in cui detto composto di Formula F15 viene ottenuto mediante un procedimento comprendente il trattamento di un composto di Formula F14:



con un agente riducente per ottenere detto composto di Formula F15; in cui R² è alchile C₁₋₄; opzionalmente in cui detto agente riducente è idruro di diisobutilalluminio.

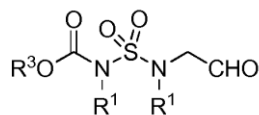
14. Procedimento della rivendicazione 13, in cui detto composto di Formula F14 viene ottenuto mediante un procedimento comprendente la protezione di un composto di Formula F13:



con uno o più agenti di protezione dell'ammino scelti indipendentemente, per ottenere un composto di Formula F14; opzionalmente in cui detti uno o più agenti di protezione dell'ammino vengono scelti da bromuro di allile e

cloruro di 4-metossibenzile, e in cui detta protezione viene eseguita in presenza di una base.

15. Composto di Formula F15:



in cui:

R³ è alchile C₁₋₆ o benzile; e

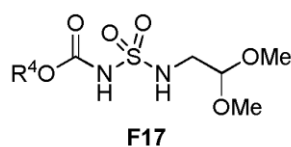
ciascun R¹ è indipendentemente un gruppo di protezione dell'ammino.

16. Composto della rivendicazione 15, che è:

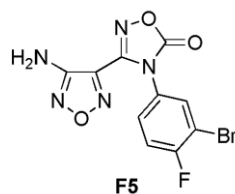
(a) *terz*-butil allil{[allil(2-ossoetil)ammino]solfonil}carbammato; o

(b) *terz*-butil (4-metossibenzil){[(4-metossibenzil)(2-ossoetil)ammino]solfonil}carbammato.

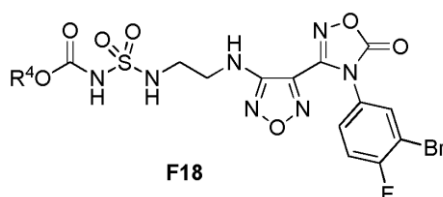
17. Procedimento, comprendente la reazione di un composto di Formula F17:



in cui R⁴ è alchile C₁₋₆, aloalchile C₁₋₆, benzile o 9*H*-fluoren-9-ilmatile con un composto di Formula F5:



per ottenere un composto di Formula F18:



18. Procedimento della rivendicazione 17, in cui R⁴ è:

(a) *terz*-butile;

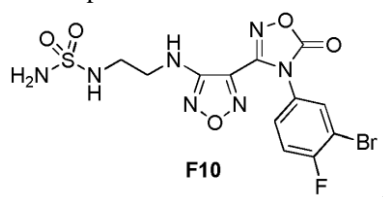
(b) benzile;

(c) etile; o

(d) 2,2,2-tricloroetile.

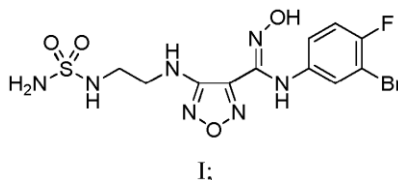
19. Procedimento della rivendicazione 18, in cui detta reazione viene eseguita in presenza di un agente riducente; opzionalmente in cui detto agente riducente è trietilsilano, ed in cui detta reazione viene eseguita in presenza di un acido organico; opzionalmente in cui detto acido organico è acido trifluoroacetico.

20. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 18-19, comprendente inoltre la deprotezione di detto composto di Formula F18 per ottenere un composto di Formula F10:



opzionalmente in cui detta deprotezione comprende la reazione del composto di Formula F18 con zinco in presenza di acido acetico.

21. Procedimento della rivendicazione 20, comprendente inoltre la reazione di detto composto di Formula F10 con una base per ottenere un composto di Formula I:

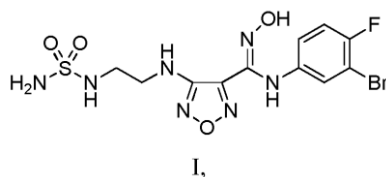


opzionalmente in cui detta base è idrossido di sodio.

22. Procedimento della rivendicazione 17, in cui R⁴ è 9H-fluoren-9-ilmetile.

23. Procedimento della rivendicazione 22, in cui detta reazione viene eseguita in presenza di un agente riducente; opzionalmente in cui detto agente riducente è trietilsilano; ed in cui detta reazione viene eseguita in presenza di un acido organico; opzionalmente in cui detto acido organico è acido metansolfonico.

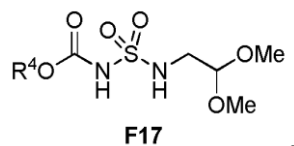
24. Procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 22-23, comprendente inoltre la conversione di detto composto di Formula F18 ad un composto di Formula I:



in cui detta conversione comprende il combinare il composto di Formula F18 con una base per formare una prima miscela; opzionalmente in cui detta base è *N,N*-bis(2-amminoetil)etan-1,2-diammina.

25. Procedimento della rivendicazione 24, in cui detta conversione comprende inoltre l'aggiunta di acido cloridrico acquoso a detta prima miscela.

26. Composto di formula F17:



in cui R⁴ è aloalchile C₁₋₆, benzile, o *9H*-fluoren-9-ilmetile.

27. Composto della rivendicazione 26, che è:

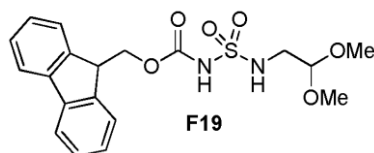
- (a) benzil *N*-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbammato;
- (b) 2,2,2-tricloroetil *N*-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbammato; o
- (c) (*9H*-fluoren-9-il)metil *N*-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbammato.

28. Composto che è:

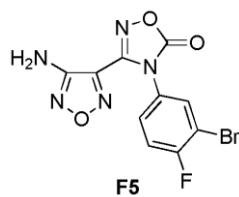
- (a) *tert*-butil *N*-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbammato; o
- (b) etil *N*-(2,2-dimetossietil)sulfamoilcarbammato.

29. Procedimento, comprendente:

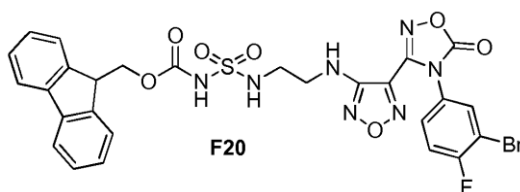
i) reazione di un composto di Formula F19:



con un composto di Formula F5:

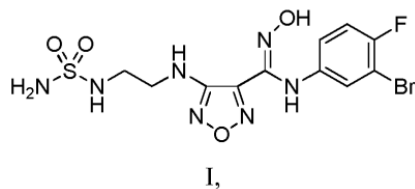


in presenza di trietilsilano e acido metansolfonico per ottenere un composto di Formula F20:



e

ii) conversione di detto composto di Formula F20 ad un composto di Formula I:



in cui detta conversione comprende il combinare detto composto di Formula F20 con N,N-bis(2-amminoetil)etan-1,2-diammina.