



MD/EP 3615027 T2 2021.11.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3615027 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 31/4192 (2006.01.01)
A61K 31/454 (2006.01.01)
A61K 31/496 (2006.01.01)
A61K 31/5377 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
A61P 35/02 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0226	(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 11/2021, 2021.11.30
(22) Data de depozit: 2018.04.19	(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 28/2021, 2021.07.14
(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18723602.1, 2018.04.19	(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2020, 2020.04.30
(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3615027, 2020.03.04	
(31) Numărul cererii prioritare: 201715494820; 201815899707	
(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.04.24; 2018.02.20	
(33) Țara cererii prioritare: US; US	
(71) Solicitant: AURIGENE DISCOVERY TECHNOLOGIES LIMITED, IN	
(72) Inventatori: NELLORE Kavitha, IN; HOSAHALLI Subramanya, IN	
(73) Titular: AURIGENE DISCOVERY TECHNOLOGIES LIMITED, IN	
(74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Metode de utilizare pentru derivații de benzotriazol trisubstituiți ca inhibitori de oxigenază dihidroorotată

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție furnizează metode pentru tratarea cancerului la un subiect și pentru inhibarea creșterii tumorale, metastazelor sau a activității enzimatică de oxigenază dihidroorotată a unei tumori sau celule canceroase. Cel puțin un derivat de benzotriazol trisubstituit cu formula (I) este administrat subiectului sau este pus în contact cu celula canceroasă. Compușii cu formula (I) au substituenții R_1 , R_2 și R_3 care au înțelesurile date în specificația, și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora.

Revendicări: 15

Figuri: 10

2

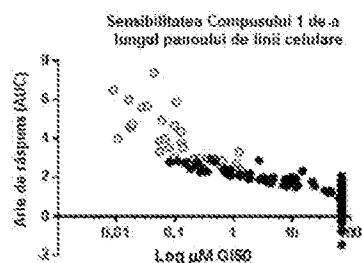
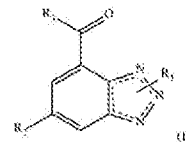


FIG. 1



MD/EP 3615027 T2 2021.11.30

(54) Methods of use for trisubstituted benzotriazole derivatives as dihydroorotate oxygenase inhibitors

(57) Abstract:

1
The present invention provides methods for treating a cancer in a subject and for inhibiting tumor growth, metastasis or a dihydroorotate oxygenase enzyme activity of a tumor or cancer cell. At least one trisubstituted benzotriazole derivative with the formula (I) is administered to the subject or is contacted with the cancer cell. Compounds of formula (I)

2
have substituents R1, R2 and R3 which have the meanings given in the specification, and pharmaceutically acceptable salts thereof.

Claims: 15

Fig.: 10

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****BAZELE INVENȚIEI**5 **Domeniul invenției**

Prezenta invenție se referă la noi derivați de benzotriazol trisubstituiți cu formula (I) care sunt inhibitori de dehidrogenază dihidroorotată. În particular, invenția se referă la noi compuși, care inhibă activitatea enzimei DHODH, la un procedeu pentru fabricarea lor și la compoziții farmaceutice care le conțin, și la utilizarea lor pentru tratamentul și prevenirea bolilor sau tulburărilor, în particular utilizarea lor în boli sau tulburări unde există un avantaj în inhibarea DHODH.

10 **Descrierea domeniului inrudit**

DHODH este o proteină care catalizează una din etapele noii căi biosintetice a nucleotidei pirimidine. (Greene și colab. Biochem Farmacol 1995, 50:861-7; Davis J.P și colab. FASEB J 1996, 10(6): Abst C23). Ea catalizează singura reacție de oxidare/reducere în acea cale, care este etapa de transformare a DHO (dihidroorotat) în orotat cu ajutorul cofactorului flavin și a unui acceptor de electroni. Inhibitorii de dehidrogenază dihidroorotată au fost găsiți ca având aplicații pe scară mai largă ca agenții chimioterapeutici. (Kensler și colab. 1989 în: Design of Enzyme Inhibitors as Drugs; Sandler, M., și Smith, H. J. Eds., pp 379-401 Oxford Univ Press, Oxford England; Cody și colab. Am. J. Clin. Oncol. 16, 526-528 (1993)).

Ca un exemplu pentru inhibitorii DHODH, derivatul chinolină Brequinar (acid 6-fluoro-2-(2'-fluoro[1,1'-bifenil]-4-il)-3-metil-4-chinolinocarboxilic) prezintă o activitate anticancer către leucemia murină L1210 (Anderson LW. și colab. Cancer Commun. 1989; 1(6), 381-7; Chen SF. și colab. Cancer Res. 1986 Oct; 46(10): 5014-9). S-a arătat de asemenea că Brequinar potențiază activitatea antitumorală a 5-fluorouracilului într-o tumoare a colonului 38, model murin, prin modulare specifică țesutului de grupuri de nucleotide uridine. (G Pizzorno și colab. Cancer Res. 1992 Apr 1; 52:1660-5).

Inhibitorii DHODH pot fi de asemenea utili în tratamentul bolilor mediate viral (vezi US 6.841.561). Mai mult, se știe că inhibarea DHODH este o țintă promițătoare pentru tratarea respingerii transplantului, artritei reumatoide, psoriazisului precum și bolilor autoimune (Kovarik, J. M. și colab. Expert Opin. Emerg. Drugs 2003, 8, 47; Allison, A.C. Transplantation Proc. (1993) 25(3) Suppl. 2, 8-18); Makowka, L., Immunolog Rev. (1993) 136, 51-70; Davis J.P și colab. Biochemistry 1996, 35: 1270-3).

Leflunomida, un inhibitor DHODH bine cunoscut este un medicament sintetic comercializat în prezent, un medicament cu masă moleculară scăzută din clasa izoxazol(vezi EP0527736, JP1993506425, JP1999322700, JP1999343285, US5494911, US5532259, W O19991017748) și utilizat în tratamentul artritei reumatoide și este de asemenea sub evaluare pentru utilizare în tratamentul bolii inflamatorie intestinale și respingerea cronică a alogrefei.

In vivo, leflunomida este transformată repede în metabolitul său activ teriflunomidă care exercită efectele sale antiinflamatoare, antiproliferative și imunosupresive prin mecanisme care nu sunt complet înțelese. Teriflunomida nu este numai un inhibitor potențial de protein tirozin kinază *in vivo* ci și un inhibitor de 100-1.000 de ori mai puternic de DHODH (Davis J.P și colab. FASEB J 1996, 10(6): Abst C23; Davis J.P și colab. Biochemistry 1996, 35:1270-3).

WO2014/128669 divulgă „derivați de benzotriazol trisubstituiți ca compuși inhibitori de oxigenază dihidroorotată cu formula (I), care pot fi utili terapeutic ca inhibitori DHODH. (I) în care, R₁, R₂ și R₃ au înțelesurile date în specificație, și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora care sunt utile în tratamentul și prevenirea bolilor sau tulburărilor, în particular utilizarea lor în bolile sau tulburările unde există un avantaj în inhibarea DHODH“.

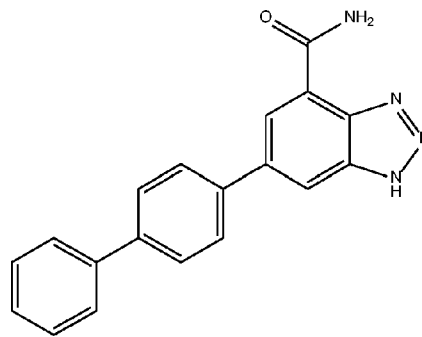
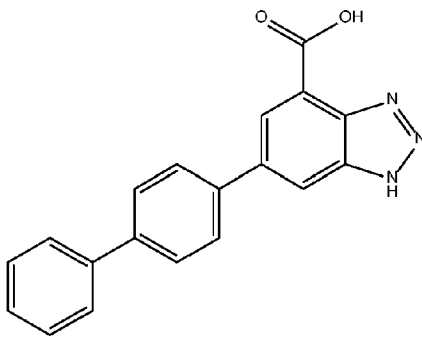
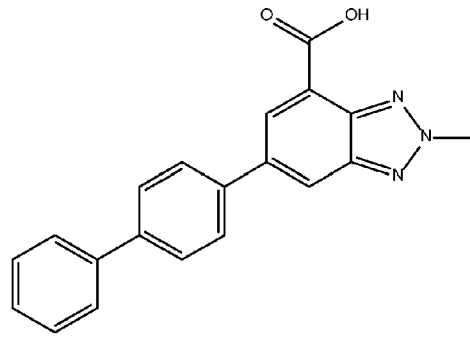
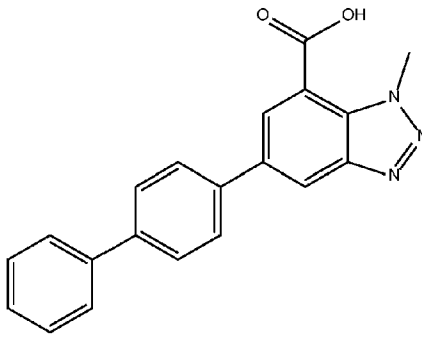
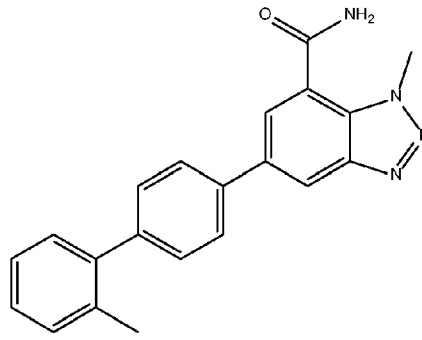
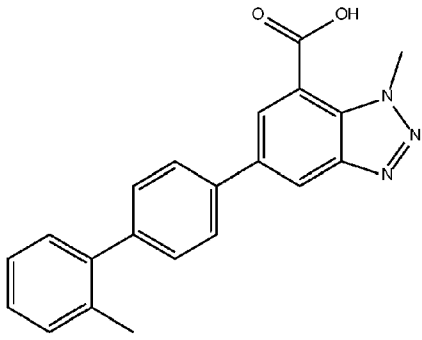
Cu creșterea numărului de pacienți afectați de bolile autoimune și înrudite, există o necesitate nesatisfăcută pentru noi medicamente care pot trata mai eficient astfel de boli. Există încă o necesitate crucială pentru agenți imunosupresivi, care sunt mai departe utili într-o largă varietate de boli inflamatorii autoimune și cronice, incluzând lupusul eritematos sistemic, artrita cronică reumatoidă, scleroza multiplă, diabetul zaharat de tip I, bolile inflamatorii intestinale, ciroza biliară, uveita și alte tulburări cum ar fi boala Crohn, colita ulcerativă, pemfigoidul bulos, sarcoidoza, psoriazisul, miozita autoimună, granulomatoza Wegener, ihtioza, oftalmopatia Graves, dermatita atopică și astmul. Ei pot fi de asemenea utili ca o parte din regimurile chimioterapeutice pentru tratamentul cancerelor, limfoamelor și leucemiilor, singuri sau în combinație cu compuși antitumorali bine cunoscuți de o persoană calificată în domeniu.

REZUMATUL INVENȚIEI

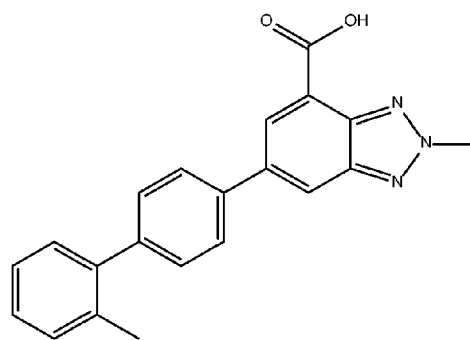
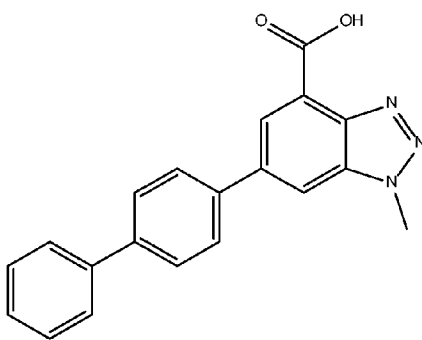
Prezenta invenție este direcționată spre un compus pentru utilizare în tratamentul leucemiei mieloid acute, mielomului multiplu, leucemiei B-prolimfocitare, limfomului non-Hodgkin, limfomului difuz cu celule B mari, limfomului anaplastic cu celule mari, limfomului cu celule manta, cancerului la

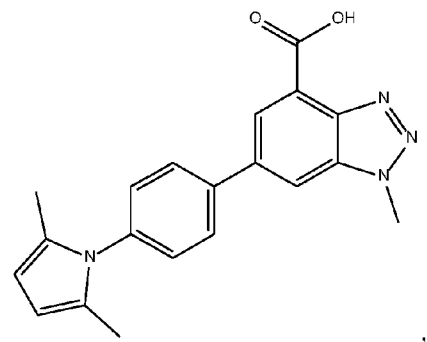
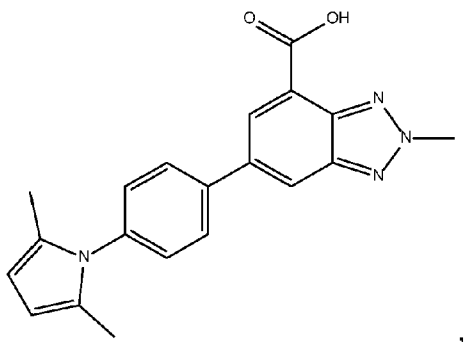
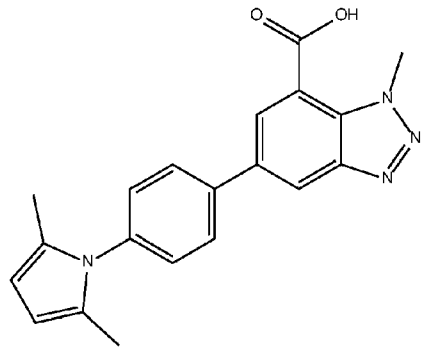
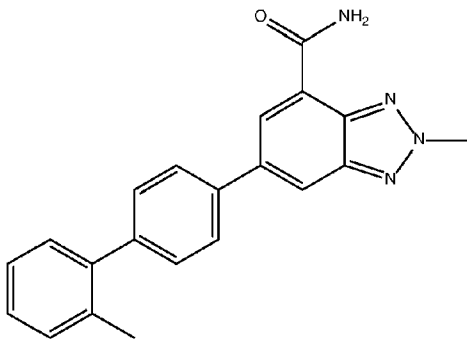
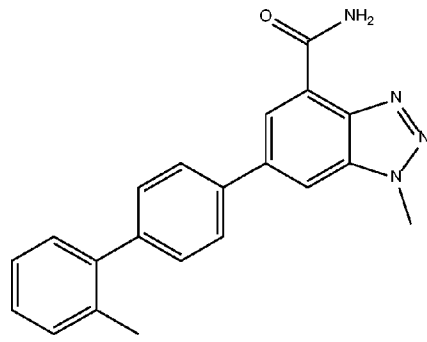
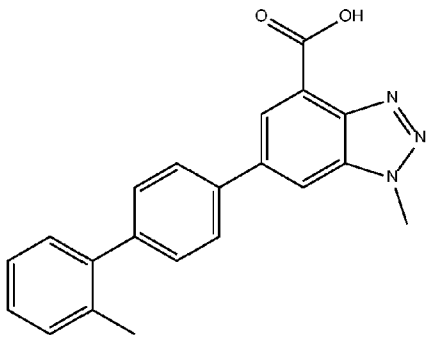
sân triplu negativ, melanomului, cancerului la prostată, sau cancerului la esofag, în care compusul este selectat dintre:

5

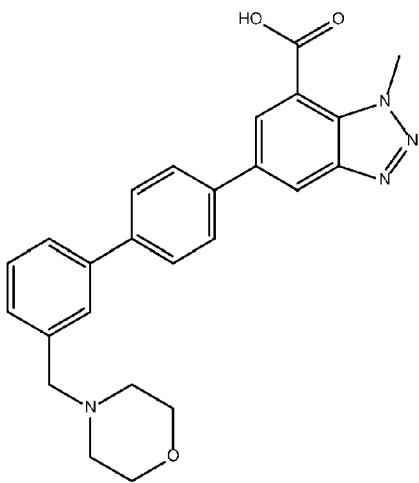


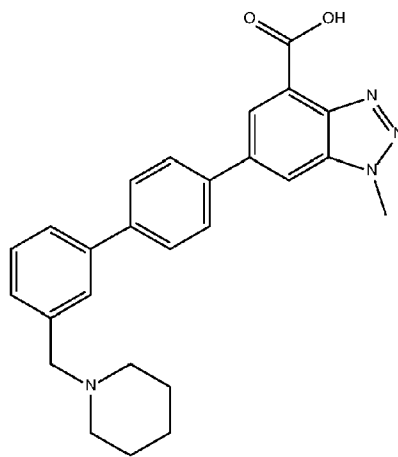
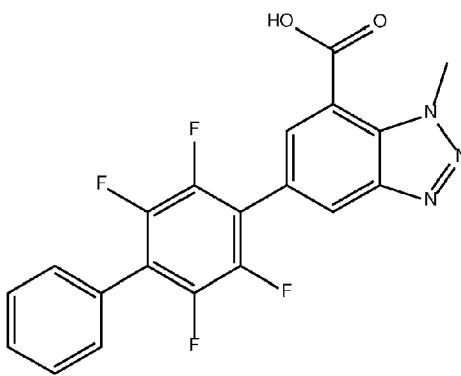
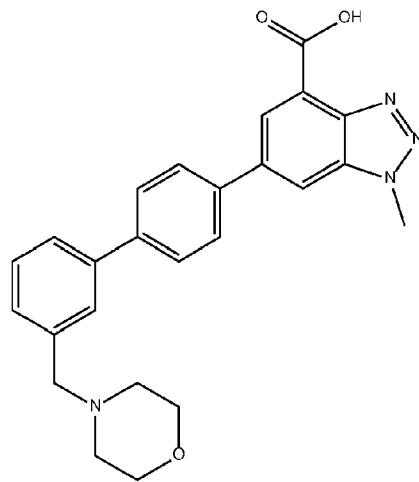
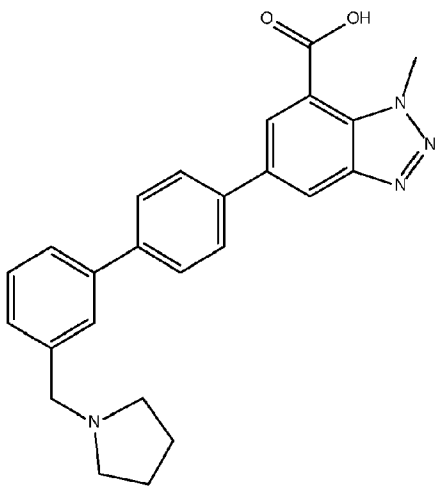
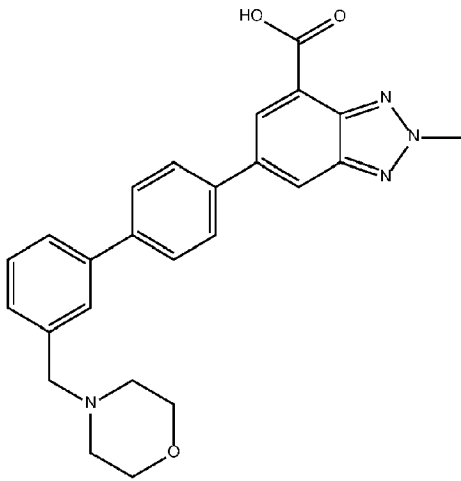
10

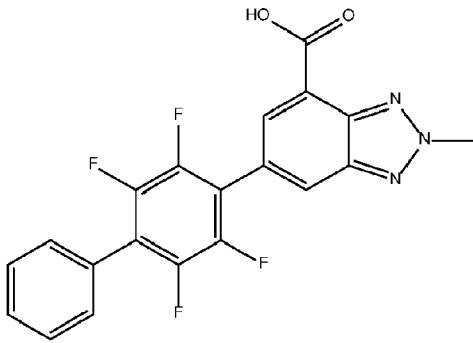
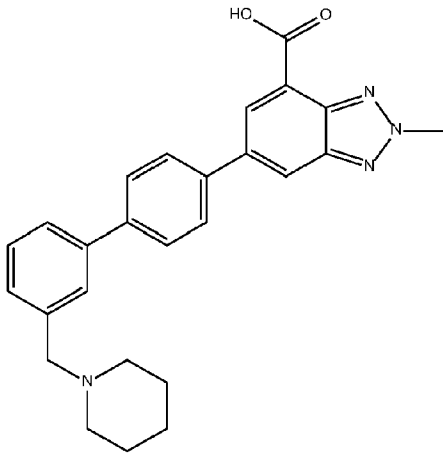
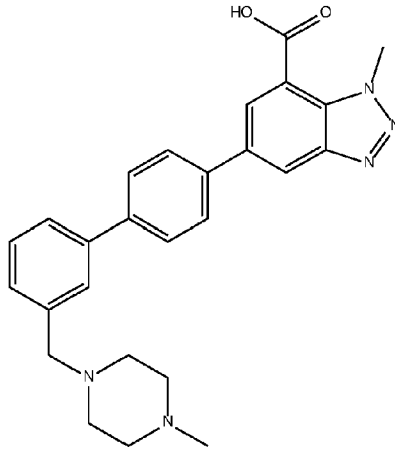
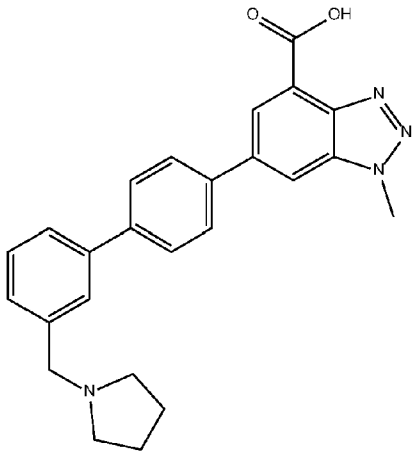




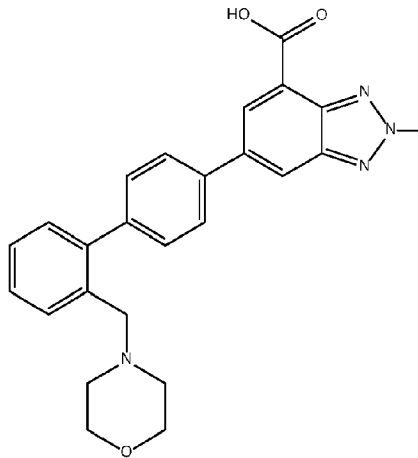
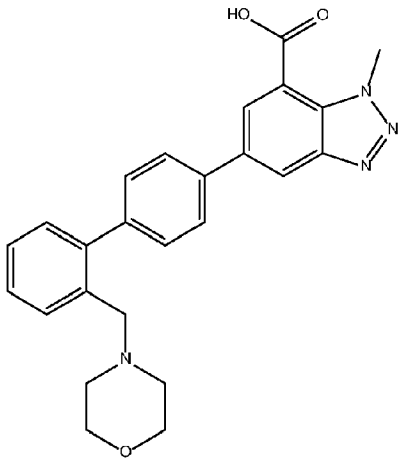
5

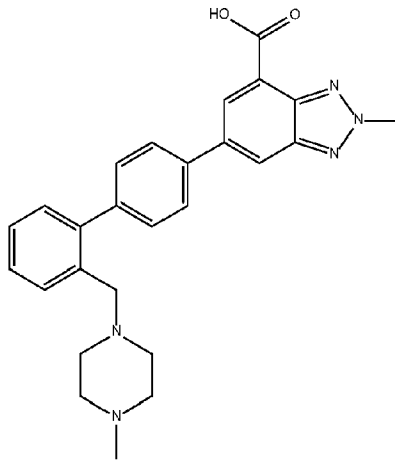
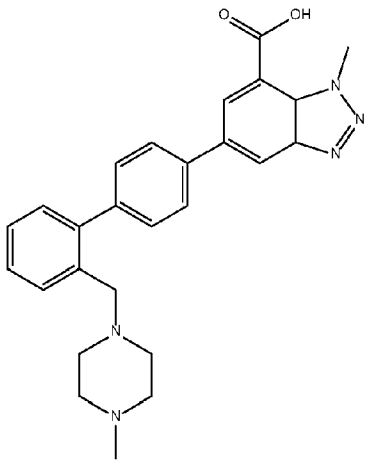
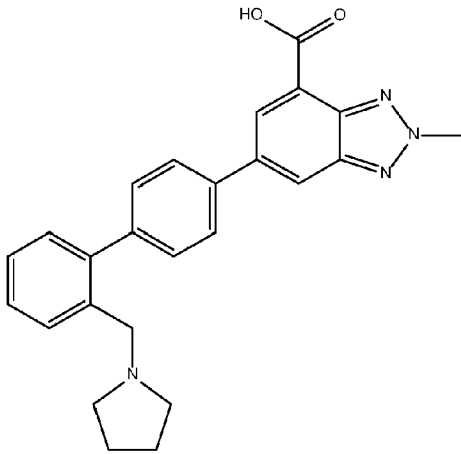
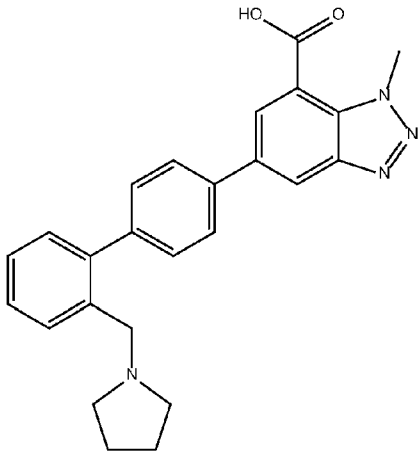


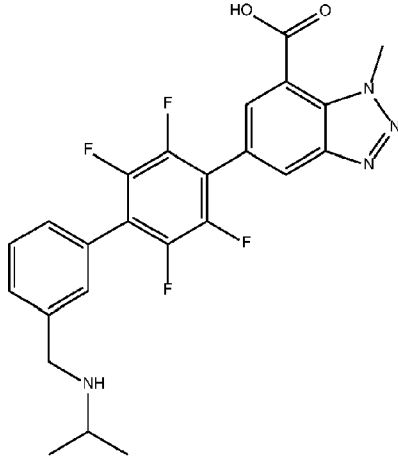
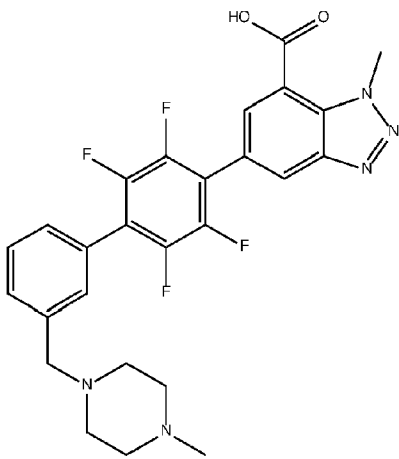
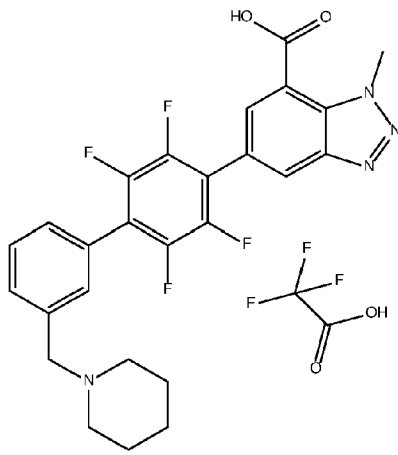
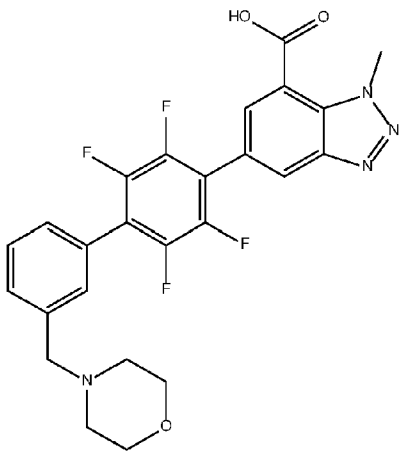
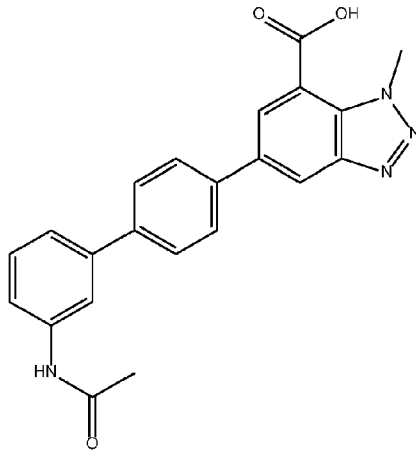
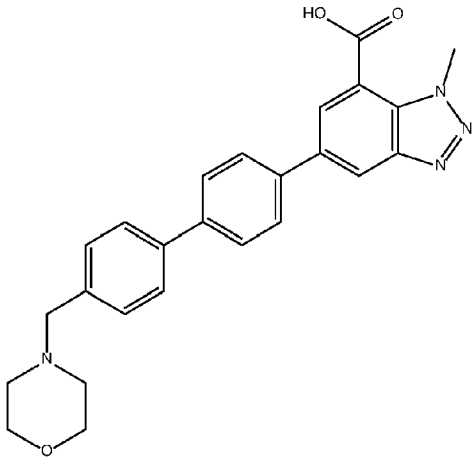




5



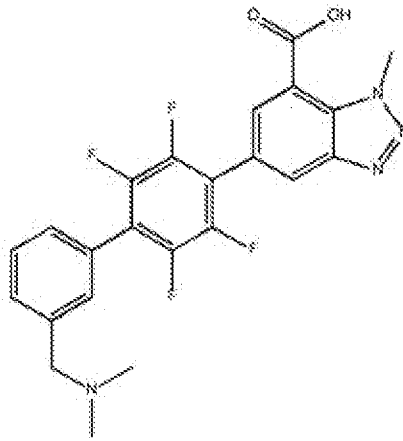
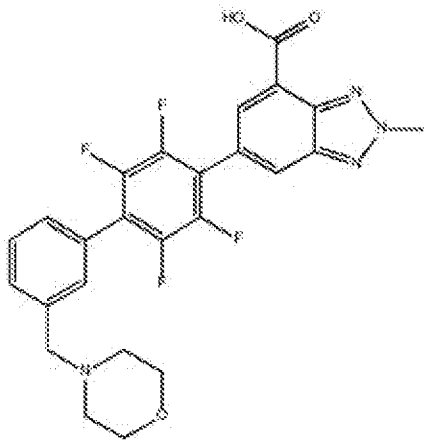
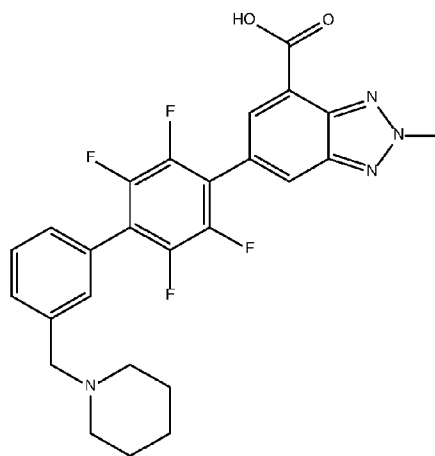
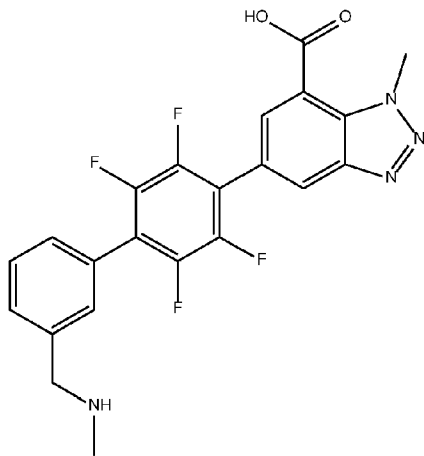




5

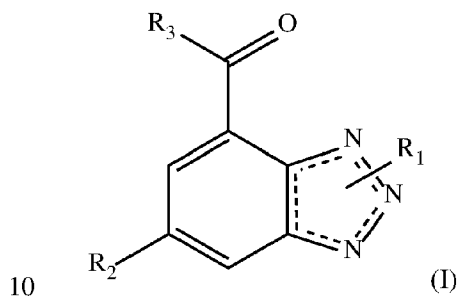
,

,



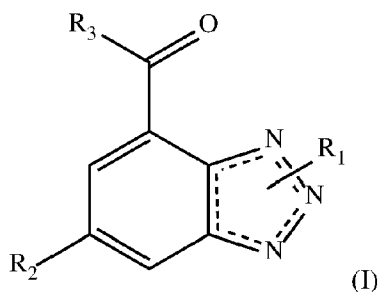
5 sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia.

Divulgată dar nu parte a invenției, este o metodă pentru inhibarea creșterii și/sau metastazei celulelor tumorale la un subiect. Metoda cuprinde etapa de administrare către subiect o dată sau de mai multe ori a unei cantități eficiente terapeutice din cel puțin un compus în conformitate cu formula (I) :



15 sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia. În structură, liniile punctate [...] din inel pot reprezenta o legătură opțională care poate fi prezentă în orice combinație stabilă. R₁ poate fi hidrogen și alchil. R₂ poate fi -A-R₄. A poate fi arilen sau arilen tetrasubstituit unde substituentul este halogen. R₃ poate fi hidroxi și amino. R₄ poate fi un aril substituit opțional și un heteroaril substituit opțional. Substituenții opționali pot fi unul sau mai mulți R₅. R₅ poate fi alchil și -(CH₂)_nN(R_a)R_b. R_a și R_b pot fi în mod independent hidrogen, alchil și -C(O)alchil sau, alternativ, R_a și R_b pot fi luate împreună cu atomul de azot la care ei sunt atașați pentru a forma un heterociclu cu 4-6 membri substituit opțional conținând 0-2 heteroatomi suplimentari selectați în mod independent dintre O și N unde substituentul opțional este alchil și 'n' poate fi un număr întreg 0 și 1.

20 Este de asemenea divulgată o metodă pentru inhibarea activității enzimei oxigenază dihidrorotată într-o celulă tumorală. Metoda cuprinde etapa de punere în contact a celulei tumorale o dată sau de mai multe ori cu o cantitate eficientă terapeutică din cel puțin un compus în conformitate cu formula (I) :



5 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia. În structură, liniile punctate [...] din inel pot reprezenta o
 10 legătură opțională care poate fi prezentă în orice combinație stabilă. R₁ poate fi hidrogen și alchil.
 R₂ poate fi -A-R₄. A poate fi arilen sau arilen tetrasubstituit unde substituentul este halogen. R₃ poate fi
 hidroxil și amino. R₄ poate fi un aril substituit opțional și un heteroaril substituit opțional. Substituenții
 15 opționali pot fi unul sau mai mulți R₅. R₅ poate fi alchil și -(CH₂)_nN(R_a)R_b. R_a și R_b pot fi în mod
 independent hidrogen, alchil și -C(O)alchil sau, alternativ, R_a și R_b pot fi luați împreună cu atomul de
 20 azot la care ei sunt atașați pentru a forma un heterociclic cu 4-6 membri substituit opțional conținând 0-2
 heteroatomi suplimentari selectați în mod independent dintre O și N unde substituentul opțional este
 alchil și 'n' poate fi un număr întreg 0 și 1.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

15 FIG. 1 prezintă sensibilitatea unui panou de □400 linii de cancer uman de origine hemapoietică și non-
 hemapoietică către creșterea inhibării cu Compusul 1 al invenției. Cercurile gri reprezintă linii celulare
 notate ca sensibile (care prezintă ≥75% creștere inhibare maximă și o valoare GI50 <1,5μM).
 FIG. 2 prezintă sensibilitatea unui panou suplimentar de linii de cancer uman de descendență hemă către
 creșterea inhibării cu Compusul 1 al invenției.
 20 FIG. 3 prezintă abilitatea concentrațiilor fiziologice (5 μM) și suprafiziologice (25 μM, 100 μM) de
 uridină exogenă de a salva efectele citotoxice de 10 μM ale compusului pe liniile de cancer indicate.
 FIG. 4A prezintă rata de creștere relativă vs. profilul de sensibilitate al concentrației de linii celulare
 MV411, Kasumi-1, THP-1, DB, Toledo și WSU-DLCL2 către concentrații variabile ale Compusului 1.
 FIG. 4B prezintă rata de creștere relativă vs. profilul de sensibilitate al concentrației de linii celulare
 25 MV411, Kasumi-1, THP-1, DB, Toledo și WSU-DLCL2 către concentrații variabile de citarabină.
 FIG. 4C prezintă rata de creștere relativă vs. profilul de sensibilitate al concentrației de linii celulare
 MV411, Kasumi-1, THP-1, DB, Toledo și WSU-DLCL2 către concentrații variabile de doxorubicină.
 FIG. 5A prezintă curbele de creștere tumorală MOLM-13 la șoarecii CB17 SCID când sunt lăsați
 netratați (vehicul) sau când sunt tratați cu 100 mg/kg de Compus 1, BID, măsurat în decursul a 14 zile.
 30 FIG. 5B prezintă profilurile farmacocinetice ale Compusului 1 (dozaj = 100 mg/kg, BID) în plasma
 șoarecilor CB17 SCID și în tumorile MOLM-13 implantate la momentele de timp indicate după ultima
 doză la sfârșitul studiului.
 FIG. 5C prezintă nivelurile DHO la tumorile MOLM-13 netratate (vehicul) și la tumorile tratate cu
 Compusul 1, măsurate în decursul a 12 ore după ultima doză la sfârșitul studiului.
 35 FIG. 5D prezintă nivelurile de uridină la tumorile MOLM-13 netratate (vehicul) și la tumorile tratate cu
 Compusul 1, măsurate în decursul a 12 ore după ultima doză la sfârșitul studiului.
 FIG. 6A prezintă curbele de creștere tumorală AML_1 derivate de la pacient la șoarecii CB17 SCID
 când sunt lăsați netratați (vehicul) sau când sunt tratați cu 100 mg/kg de Compus 1, BID.
 FIG. 6B prezintă curbele de creștere tumorală AML_2 derivate de la pacient la șoarecii CB 17 SCID
 40 când sunt lăsați netratați (vehicul) sau când sunt tratați cu 100 mg/kg de Compus 1, BID.
 FIG. 6C prezintă curbele de creștere tumorală AML_3 derivate de la pacient la șoarecii CB 17 SCID
 când sunt lăsați netratați (vehicul) sau când sunt tratați cu 100 mg/kg de Compus 1, BID.
 FIG. 6D prezintă curbele de creștere tumorală AML_4 derivate de la pacient la șoarecii CB 17 SCID
 când sunt lăsați netratați (vehicul) sau când sunt tratați cu 100 mg/kg de Compus 1, BID.
 45 FIG. 6E prezintă curbele de creștere tumorală AML_5 derivate de la pacient la șoarecii CB 17 SCID
 când sunt lăsați netratați (vehicul) sau când sunt tratați cu 100 mg/kg de Compus 1, BID.
 FIG. 7A prezintă curbele de creștere tumorală DLBCL_1 derivate de la pacient (modelul cu triplu
 impact) la șoarecii CB17 SCID când sunt lăsați netratați (vehicul) sau când sunt tratați cu 100 mg/kg de
 Compus 1, BID.
 50 FIG. 7B prezintă curbele de creștere tumorală DLBCL_1 derivate de la pacient la șoarecii CB17 SCID
 când sunt lăsați netratați (vehicul) sau când sunt tratați cu 100 mg/kg de Compus 1, BID.

FIG. 8 este a curbă prezentând rata de creștere relativă a liniilor celulare OCILY18, SC-1 și de limfom difuz cu celule B mari CARNAVAL cu dublu impact (DLBCL) tratate cu diferite concentrații de Compus 1 timp de 96 ore.

FIG. 9A prezintă curbele de creștere tumorală a limfomului difuz cu celule B mari, cu dublu impact, OCILY-19 (DLBCL) la șoarecii CB17 SCID când sunt lăsați netratați (vehicul) sau când sunt tratați cu 10 mg/kg de Compus 1, BID; 30 mg/kg de Compus 1, BID; 100 mg/kg de Compus 1, BID; și 200 mg/kg de Compus 1, QD, toate măsurate în decursul a 14 zile.

FIG. 9B prezintă profilul farmacocinetic al Compusului 1, administrat la dozele descrise pentru FIG. 9A, în plasma șoarecilor CB17 SCID, la momentele de timp indicate după ultima doză la sfârșitul studiului.

FIG. 9C prezintă nivelurile DHO la tumorile OCILY-19 netratate (vehicul) și la tumorile tratate cu Compusul 1 la dozele indicate, măsurate în decursul a 12 ore după ultima doză la sfârșitul studiului.

FIG. 9D prezintă nivelurile de uridină la tumorile OCILY-19 netratate (vehicul) și la tumorile tratate cu Compusul 1 la dozele indicate, măsurate în decursul a 12 ore după ultima doză la sfârșitul studiului.

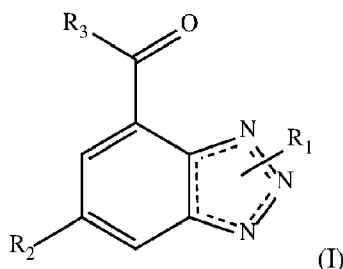
FIG. 10 este o curbă prezentând rata de creștere relativă a liniei de cancer la sân triplu negativ DU4475 tratată cu diferite concentrații de Compus 1 timp de 96 ore.

DESCRIERE DETALIATĂ A INVENȚIEI

Sunt divulgați derivați de benzotriazol trisubstituiți ca inhibitori de oxigenază dihidroorotată.

Acești derivați sunt utili ca medicament în tratamentul tulburărilor autoimune și inflamatorii cum ar fi scleroza multiplă, artrita reumatoidă și bolilor precum cancerul.

Sunt divulgați în acest document compuși cu formula (I),



sau o sare acceptabilă farmaceutic sau un regioizomer acceptabil farmaceutic ale acestuia, în care; liniile punctate [...] din inel reprezintă o legătură opțională care poate fi prezentă în orice combinație stabilă;

R_1 este selectat dintre hidrogen și alchil;

R_2 este -A- R_4 ;

A este arilen sau arilen tetrasubstituit; în care substituentul este halogen;

R_3 este selectat dintre hidroxi și amino;

R_4 este selectat dintre aril substituit opțional și heteroaril substituit opțional; în care substituenții opționali sunt selectați dintre unul sau mai mulți R_5 ;

R_5 este selectat dintre alchil și $-(CH_2)_nN(R_a)R_b$;

R_a și R_b sunt selectați în mod independent dintre hidrogen, alchil și -C(O)alchil;

alternativ R_a și R_b pot fi luați împreună cu atomul de azot la care ei sunt atașați pentru a forma un heterociclic cu 4-6 membri substituit opțional conținând 0-2 heteroatomi suplimentari selectați în mod independent dintre O și N; în care substituentul opțional este alchil; și

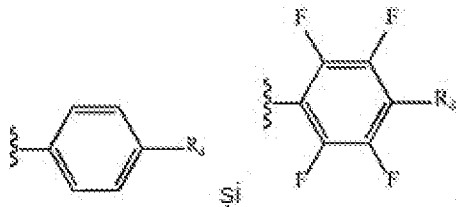
'n' este un număr întreg selectat dintre 0 și 1.

De asemenea sunt divulgați compuși cu formula (I), în care R_1 este alchil; în particular alchilul este metil.

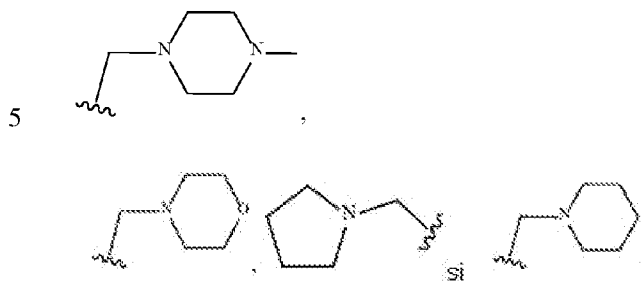
De asemenea sunt divulgați compuși cu formula (I), în care R_2 este -A- R_4 ; în care -A- este selectat dintre arilen și arilen tetrasubstituit.

De asemenea sunt divulgați compuși cu formula (I), în care R_2 este selectat dintre

45



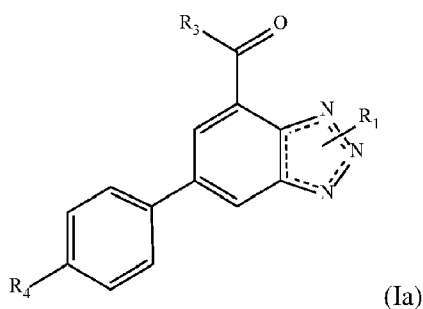
De asemenea sunt divulgați compuși cu formula (I), în care R_4 este selectat dintre fenil substituit opțional; în care substituenții opționali sunt selectați dintre metil, acetilamino, izopropilaminometil, metilaminometil, dimetilaminometil,



De asemenea sunt divulgați compuși cu formula (I), în care R_4 este selectat dintre 2,5-dimetil-1H-pirol;

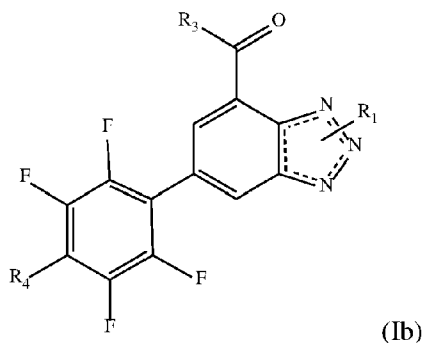
10 De asemenea sunt divulgați compuși cu formula (I), în care R_3 este -OH și -NH₂.

Este de asemenea divulgat compusul cu formula (I) care este un compus cu formula (Ia)



15 în care, linia punctată [---], R_1 , R_3 și R_4 sunt aceleași cum s-au descris în formula (I).

Este de asemenea divulgat compusul cu formula (I) care este un compus cu formula (Ib)



20 în care, linia punctată [---], R_1 , R_3 și R_4 sunt aceleași cum s-au descris în formula (I).

Este de asemenea divulgat procedeul pentru prepararea derivaților de benzotriazol trisubstituiți cu formula (I).

25 Procedura pentru compuși cu formula (I) este detaliată aici mai jos în specificația pe etape incluzând sinteza generală a diferiților intermediari implicați în procedeul de fabricare al compușilor în conformitate cu prezenta invenție.

Mai special, este divulgată utilizarea compușilor cu formula (I) sau a unei săruri acceptabile farmaceutic sau a unui regioizomer al acestuia, incluzând amestecuri ale acestora în toate rapoartele ca un medicament, prin inhibarea activității enzimei oxigenază dihidroorotată în tratarea tulburărilor precum scleroza multiplă și a altor boli cum ar fi tulburările inflamatorii, artrita reumatoidă și cancerul.

30 Derivații trisubstituiți de benzotriazol cu formula (I) din prezenta invenție posedă un rol terapeutic de inhibare a enzimei dehidrogenază dihidroorotată (DHODH sau DHOD). Compușii cu formula (I) pot fi utili pentru tratarea și/sau prevenirea, dar fără a fi restricționați la, bolilor inflamatorii autoimune și cronice, incluzând lupusul eritematos sistemic, artrita cronică reumatoidă, scleroza multiplă, diabetul zaharat de tip I, bolile inflamatorii intestinale, ciroza biliară, uveita și alte tulburări cum ar fi boala Crohn, colita ulcerativă, pemfigoidul bulos, sarcoidoza, psoriazisul, miozita autoimună,

35

granulomatoza Wegener, ihtioza, oftalmopatia Graves, dermatita atopică și astmul. Compușii cu formula (I) și cu formule înrudite pot fi de asemenea utili ca o parte din regimurile chimioterapeutice pentru tratamentul cancerelor, limfoamelor și leucemiilor singuri sau în combinație cu compuși antitumorali clasici bine cunoscuți de o persoană calificată în domeniu.

5 Următoarele definiții sunt furnizate pentru a-i ajuta pe cei calificați în domeniu în înțelegerea descrierii detaliate a prezentei invenții.

„Alchil” se referă la o catenă de hidrocarbură care poate fi o catenă liniară sau ramificată, conținând numărul indicat de atomi de carbon, de exemplu, o grupare alchil C₁-C₆ poate avea de la 1 până la 6 (inclusiv) atomi de carbon în ea. Exemple de grupări alchil C₁-C₄ și C₁-C₆ includ, dar nu se
10 limitează la, metil, etil, propil, butil, pentil, hexil, izopropil, izobutil, sec-butil, terț-butil, isopentil, neopentil, și isohexil. O grupare alchil poate fi nesubstituită sau substituită cu una sau mai multe grupări adecvate.

„Amino” se referă la o grupare -N-, atomul de azot al respectivei grupări fiind atașat la un hidrogen, alchil, cicloalchil, aril, heterociclic sau la orice grupare adecvată. Exemple reprezentative ale
15 unei grupări amino includ, dar nu se limitează la -NH₂, -NHCH₃ și -NH-ciclopropil. O grupare amino poate fi nesubstituită sau substituită cu una sau mai multe grupări adecvate.

„Aril” se referă la un sistem inelar carbociclic aromatic monociclic, biciclic sau policiclic substituit opțional, de aproximativ 6 până la 14 atomi de carbon. Exemple de o grupare aril C₆-C₁₄ includ, dar nu se limitează la fenil, naftil, bifenil, antril, tetrahidronaftil, fluorenil, indanil,
20 bifenilenil, și acenaftil. Gruparea aril poate fi nesubstituită sau substituită cu una sau mai multe grupări adecvate.

„Arilen” înseamnă un inel carbociclic divalent, monociclic sau biciclic, saturat, nesaturat sau aromatic având 6 până la 14 atomi de carbon care pot fi nesubstituiți sau substituiți cu una sau mai
25 multe grupări adecvate.

„Halogen” sau „halo” includ fluor, clor, brom sau iod.

„Hidroxi” se referă la gruparea -OH.

Termenul „heterociclic” include definițiile de „heterocicloalchil” și „heteroaril”. Termenul „heterocicloalchil” se referă la un sistem inelar non-aromatic, saturat sau parțial saturat, monociclic sau
30 policiclic de 3 până la 10 membri având cel puțin un heteroatom sau heterogrup selectat dintre O, N, S, S(O), S(O)₂, NH și C(O). Exemple de grupări heterocicloalchil includ piperdinil, piperazinil, morfolinil, tiomorfolinil, 1,3-dioxolanil, 1,4-dioxanil și altele asemenea. O grupare heterocicloalchil poate fi nesubstituită sau substituită cu una sau mai multe grupări adecvate.

„Heteroaril” se referă la un sistem inelar nesaturat, monociclic, biciclic, sau policiclic aromatic care conține cel puțin un heteroatom selectat dintre oxigen, sulf și azot. Exemple de grupări heteroaril
35 C₅-C₁₀ includ furan, tiofen, indol, azaindol, oxazol, tiazol, tiadiazol, izoxazol, izotiazol, imidazol, N-metilimidazol, piridină, pirimidină, pirazină, pirol, N-metilpirol, pirazol, N-metilpirazol, 1,3,4-oxadiazol, 1,2,4-triazol, 1-metil-1,2,4-triazol, 1H-tetrazol, 1-metiltetrazol, benzoxazol, benzotiazol, benzofuran, benzizoxazol, benzimidazol, N-metilbenzimidazol, azabenzimidazol, indazol, chinazolină, chinolină, și izochinolină. Grupările heteroaril biciclice le includ pe cele unde un inel de fenil, piridină,
40 pirimidină sau piridazină este fuzionat la un inel heterociclic monociclic cu 5 sau 6 membri având unul sau doi atomi de azot în inel, un atom de azot împreună cu un atom fie de oxigen sau fie de sulf în inel, sau un atom de O sau S în inel. O grupare heteroaril poate fi nesubstituită sau substituită cu una sau mai multe grupări adecvate.

„Hetero atom” se referă la un atom de sulf, azot sau oxigen.

„Substituit opțional sau substituit” așa cum s-au utilizat în acest document înseamnă că cel puțin un atom de hidrogen al grupării substituie opțional a fost substituit cu substituții adecvate cum s-a
45 exemplificat, dar fără a se limita la, halogen, nitro, ciano, hidroxi, oxo (=O), tio (=S), -N(alchil C₁-C₃)C(O)(alchil C₁-C₆), -NHC(O)(alchil C₁-C₆), -NHC(O)(cicloalchil), -NHC(O)(aril), -NHC(O)(heterociclic), -NHC(O)(heteroaril), -NHC(O)H, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alchil C₁-C₆), -C(O)NH(cicloalchil), -C(O)NH(heterociclic), -C(O)NH(heteroaril), -C(O)N(alchil C₁-C₆)(alchil C₁-C₆), -S(O)NH(alchil C₁-C₆), -S(O)₂NH(alchil C₁-C₆), -S(O)NH(cicloalchil), -S(O)₂NH(cicloalchil), carboxi, -C(O)O(alchil C₁-C₆), -C(O)(alchil C₁-C₆), =N-OH, alchil substituit sau nesubstituit, haloalchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, haloalcoxi substituit sau nesubstituit,
50 alchenil substituit sau nesubstituit, alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil substituit sau nesubstituit, cicloalchenilalchil substituit sau nesubstituit, cicloalchenil substituit sau nesubstituit, amino substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heterociclic substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, inel heterociclic substituit sau nesubstituit.

Compușii particulari ai prezentei invenții fără a se îndepărta de domeniul definițiilor date sub
60 compușii cu formula (I) și compușii particulari emanați din formula (I) sunt rezumați aici mai jos, tabelul cuprinzând integral domeniul compușilor cu compusul cu formula (I).

Nr. compus	Nume IUPAC
1.	acid 1-metil-5-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
2.	1-metil-5-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxamidă;
3.	acid 5-([1,1'-bifenil]-4-il)-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
4.	acid 6-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-metil-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
5.	acid 6-([1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
6.	6-([1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxamidă;
7.	acid 6-([1,1'-bifenil]-4-il)-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
8.	acid 2-metil-6-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
9.	acid 1-metil-6-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
10.	1-metil-6-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxamidă;
11.	2-metil-6-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxamidă;
12.	acid 5-(4-(2,5-dimetil-1H-pirol-1-il)fenil)-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
13.	acid 6-(4-(2,5-dimetil-1H-pirol-1-il)fenil)-2-metil-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
14.	acid 6-(4-(2,5-dimetil-1H-pirol-1-il)fenil)-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
15.	acid 1-metil-5-(3'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
16.	acid 2-metil-6-(3'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
17.	acid 1-metil-5-(3'-(pirolidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
18.	acid 1-metil-6-(3'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
19.	acid 1-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
20.	acid 1-metil-6-(3'-(piperidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
21.	acid 1-metil-6-(3'-(pirolidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
22.	acid 1-metil-5-(3'-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
23.	acid 2-metil-6-(3'-(piperidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
24.	acid 2-metil-6-(2,3,5,6-tetrafluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
25.	acid 1-metil-5-(2'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
26.	acid 2-metil-6-(2'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
27.	acid 1-metil-5-(2'-(pirolidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
28.	acid 2-metil-6-(2'-(pirolidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
29.	acid 1-metil-5-(2'-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-3a,7a-dihidro-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
30.	acid 2-metil-6-(2'-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
31.	acid 1-metil-5-(4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
32.	acid 5-(3'-acetamido-[1,1'-bifenil]-4-il)-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
33.	acid 1-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-3'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
34.	acid 1-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-3'-(piperidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic. acid 2,2,2-trifluoroacetic;
35.	acid 1-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-3'-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
36.	acid 1-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-3'-((izopropilamino)metil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
37.	acid 1-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-3'-((metilamino)metil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;
38.	acid 2-metil-6-(2,3,5,6-tetrafluoro-3'-(piperidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic;
39.	acid 2-metil-6-(2,3,5,6-tetrafluoro-3'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilic; și
40.	acid 5-(3'-((dimetilamino)metil)-2,3,5,6-tetrafluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic;

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora sau un regioizomer acceptabil farmaceutic al acestora.

De asemenea sunt divulgați compuși cu formula (I) pentru utilizare în tratamentul tulburărilor inflamatorii și bolilor autoimune sau cu răspuns imun hiperactiv. Este de asemenea divulgată utilizarea compușilor cu formula (I) pentru tratamentul sclerozei multiple, artritei reumatoide și respingerii transplantului.

Este de asemenea divulgată utilizarea compușilor cu formula (I) sau a derivaților acceptabili farmaceutic, sărurilor și regioizomerilor acestora, incluzând amestecuri ale acestora în toate rapoartele ca medicament.

Utilizarea compușilor ca mai sus și a derivaților utilizabili farmaceutici, sărurilor și regioizomerilor acestora, incluzând amestecuri ale acestora în toate rapoartele, pentru prepararea unui medicament pentru tratamentul și/sau profilaxia unei tulburări asociate cu dehidrogenaza dihidroorotată.

Utilizează compușilor ca mai sus în care tulburarea asociată cu dehidrogenaza dihidroorotată este o tulburare autoimună sau afecțiune asociată cu un răspuns imun hiperactiv.

Utilizarea compușilor ca mai sus și a derivaților utilizabili farmaceutic, sărurilor și regioizomerilor acestora, incluzând amestecuri ale acestora în toate rapoartele, pentru prepararea unui medicament pentru tratamentul și/sau profilaxia unei anomalități imunoregulatorie.

Utilizarea compușilor ca mai sus în care anomalitatea imunoregulatorie este scleroza multiplă sau artrita reumatoidă.

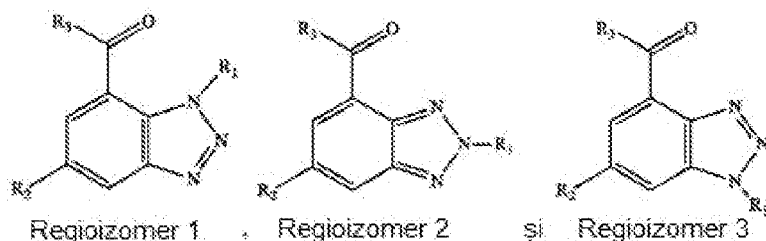
Utilizarea compușilor ca mai sus pentru prepararea unui medicament pentru tratamentul și profilaxia bolilor canceroase, bolii inflamatorii intestinale sau artritei reumatoide.

Este de asemenea divulgată o formulare farmaceutică care cuprinde cel puțin un compus în conformitate cu formula (I) și/sau derivați utilizabili farmaceutic, săruri și regioizomeri ai acestuia, incluzând amestecuri ale acestora în toate rapoartele, și cel puțin un ingredient activ suplimentar.

Este de asemenea divulgată o compoziție farmaceutică cuprinzând cel puțin un compus în conformitate cu formula (I) și/sau derivați utilizabili farmaceutic, săruri și regioizomeri ai acestuia, incluzând amestecuri ale acestora în toate rapoartele, eventual un ingredient activ suplimentar, și excipienți.

Termenii „sare acceptabilă farmaceutic” sau „derivați acceptabili farmaceutic” sunt luați pentru a însemna un ingredient activ, care cuprinde un compus cu formula (I) în forma uneia din sărurile sale, în particular dacă această formă de sare conferă proprietăți farmacocinetice îmbunătățite ingredientului activ comparativ cu forma liberă din ingredientul activ sau orice altă formă de sare din ingredientul activ utilizată mai devreme. Forma de sare acceptabilă farmaceutic din ingredientul activ poate furniza de asemenea acest ingredient activ pentru prima dată cu o proprietate farmacocinetică dorită pe care nu a avut-o mai devreme și poate avea chiar o influență pozitivă asupra farmacodinamicilor acestui ingredient activ față de eficacitatea sa terapeutică în corp.

Termenii „regioizomer” sau „regioizomeri” se referă la izomeri poziționali, care sunt o categorie de izomeri structurali, în care poziția sau substituentul, modifică poziția pe structura părinte. Aici termenul regioizomer fără a se îndepărta de domeniul compusului cu formula (I) include inerent toți regioizomerii fie ca regioizomeri puri sau fie ca amestec de doi sau mai mulți regioizomeri ai acestuia. Deoarece activitatea farmaceutică a compușilor regioizomeri din prezenta invenție poate diferi, se poate dori utilizarea regioizomerilor. În aceste cazuri regioizomerii pot fi separați în oricare din etapele posibile fie ca un intermediar sau fie ca un produs final printr-un procedeu bine cunoscut unei persoane calificate în domeniu sau chiar utilizați ca atare în sinteză. Regioizomerii compușilor cu formula (I) se referă la următoarele structuri



Formulările farmaceutice pot fi adaptate pentru administrare prin orice metodă adecvată dorită, de exemplu prin metodă orală (incluzând bucală sau sublinguală), rectală, nazală, topică (incluzând bucală, sublinguală sau transdermală), vaginală sau parenterală (incluzând subcutanată, intramusculară, intravenoasă sau intradermală). Astfel de formulări pot fi preparate utilizând toate procedeele cunoscute în domeniul farmaceutic prin, de exemplu, combinarea ingredientului activ cu excipienții sau adjuvanții.

Formulările farmaceutice adaptate pentru administrare orală pot fi administrate ca unități separate, cum ar fi, de exemplu, capsule sau tablete; pulberi sau granule; soluții sau suspensii în lichide

apoase sau non-apoase; spume comestibile sau spume alimentare; sau emulsii lichide de ulei-in-apă sau emulsii lichide de apă-in-ulei.

5 De exemplu, în cazul administrării orale ca tabletă sau capsulă, componenta de ingredient activ poate fi combinată cu un excipient inert oral, non-toxic și acceptabil farmaceutic, cum ar fi, de exemplu, etanol, glicerol, apă și altele asemenea. Pulberile sunt preparate prin pulverizarea compusului la o dimensiune adecvată de fină și amestecarea acestuia cu un excipient farmaceutic pulverizat într-o manieră similară, cum ar fi, de exemplu, un carbohidrat comestibil, cum ar fi, de exemplu, amidonul sau manitolul. Pot fi de asemenea prezente în mod asemănător o aromă, un conservant, un dispersant și un colorant.

10 Capsulele sunt produse prin prepararea unui amestec de pulbere cum s-a descris mai sus și umplerea cu acesta a carcaselor de gelatină în formă. La amestecul de pulbere pot fi adăugați agenți reologici și lubrifianți, cum ar fi, de exemplu, acid silicic cu dispersare ridicată, talc, stearat de magneziu, stearat de calciu sau polietilen glicol în formă solidă înainte de operația de umplere. Un dezintegrant sau solubilizator, cum ar fi, de exemplu, agar-agar, carbonat de calciu sau carbonat de sodiu, pot fi adăugați în mod asemănător pentru a îmbunătăți disponibilitatea medicamentului după ce au fost luate capsulele.

15 În plus, dacă se dorește sau este necesar, lianții, lubrifianții și dezintegrantii precum și coloranții adecvați pot fi încorporați în mod asemănător în amestec. Lianții adecvați includ amidon, gelatină, zaharuri naturale, cum ar fi, de exemplu, glucoza sau beta-lactoza, îndulcitori făcuți din porumb, cauciuc natural și sintetic, cum ar fi, de exemplu, acacia, tragacant sau alginat de sodiu, carboximetilceluloză, polietilen glicol, ceruri, și altele asemenea. Lubrifianții utilizați în aceste forme de dozare includ oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu, clorură de sodiu și altele asemenea. Dezintegrantii includ, fără a fi restricționați la aceștia, amidon, metilceluloză, agar, bentonită, gumă xantan și altele asemenea. Tabletele sunt formulate prin, de
20 exemplu, prepararea unui amestec de pulbere, granulara sau presarea uscată a amestecului, adăugarea unui lubrifiant și a unui dezintegrant și presarea întregului amestec pentru a da tabletele. Un amestec de pulbere este preparat prin amestecarea compusului pulverizat într-o manieră adecvată cu un diluant sau cu o bază, cum s-a descris mai sus, și opțional cu un liant, cum ar fi, de exemplu, carboximetilceluloză, un alginat, gelatină sau polivinil-pirolidonă, un agent de întârziere a dizolvării, cum ar fi, de exemplu, parafină, un accelerator de absorbție, cum ar fi, de exemplu, o sare cuaternară, și/sau un absorbant, cum ar fi, de exemplu, bentonită, caolin sau fosfat dicalcic. Amestecul de pulbere poate fi granulat prin
30 umezirea lui cu un liant, cum ar fi, de exemplu, sirop, pastă de amidon, mucilagiu de acadia sau soluții de celuloză sau materiale polimerice și presarea acestuia printr-o sită. Ca o alternativă la granulare, amestecul de pulbere poate fi rulat printr-o mașină de tabletare, dând bulgări de formă neuniformă care sunt ruși pentru a forma granule. Granulele pot fi lubrifiate prin adăugarea de acid stearic, o sare de stearat, talc sau ulei mineral pentru a preveni lipirea pe matrițele de turnare a tabletelor. Amestecul lubrifiat este apoi presat pentru a da tabletele. Ingredientele active pot fi de asemenea combinate cu un excipient inert care curge liber și apoi presate direct pentru a da tabletele fără efectuarea etapelor de granulare sau de presare uscată. Pot fi prezente un strat de protecție transparent sau opac constând dintr-un strat de etanșare cu șelac, un strat de zahăr sau polimer material și un strat lucios de ceară. La aceste
40 acoperiri se pot adăuga coloranți pentru a fi capabilă diferențierea între diferitele unități de dozare.

Lichidele orale, cum ar fi, de exemplu, soluțiile, siropurile și elixirele, pot fi preparate în formă de unități de dozare astfel încât o cantitate dată cuprinde o cantitate prespecificată de compuși. Siropurile pot fi preparate prin dizolvarea compușilor într-o soluție apoasă cu o aromă adecvată, în timp
45 ce elixirele sunt preparate utilizând un vehicul alcoolic netoxic. Suspensiile pot fi formulate prin dispersia compușilor într-un vehicul netoxic. Solubilizatorii și emulgatorii, cum ar fi, de exemplu, alcoolii isostearili etoxilați și eterii sorbitol polioxiutilen, conservanții, aditivii de aromă, cum ar fi, de exemplu, uleiul de mentă sau îndulcitorii naturali sau zaharina, sau alți îndulcitori artificiali și altele asemenea, pot fi adăugate în mod asemănător.

50 Formulările de doze unitare pentru administrare orală pot fi, dacă se dorește, încapsulate în microcapsule. Formularea poate fi de asemenea preparată într-un astfel de mod încât eliberarea să fie extinsă sau întârziată, cum ar fi, de exemplu, prin acoperirea sau încorporarea de materialului sub formă de particule în polimeri, ceară și altele asemenea.

55 Noii derivați trisubstituiți de benzotriazol cu formula (I) și sărurile acceptabile farmaceutic și derivații funcționali fiziologici ai acestora și celelalte ingrediente active pot fi de asemenea administrate sub forma sistemelor de livrare lipozomale, cum ar fi, de exemplu, veziculele mici unilamelare, veziculele mari unilamelare și veziculele multilamelare. Lipozomii pot fi formați din lipide adecvate sau fosfolipide sau din ambele, cum ar fi, de exemplu, colesterol, stearilamină sau fosfatidilcolină sau altele asemenea.

60 Formulările farmaceutice adaptate pentru administrare transdermală pot fi administrate ca acoperiri independente pentru contactul extins, închis cu epiderma destinatarului. Astfel, de exemplu,

ingredientul activ poate fi livrat din acoperire prin iontoforeză, cum s-a descris în termeni generali în *Pharmaceutical Research*, 3(6), 318 (1986).

Compușii farmaceutici adaptați pentru administrare topică pot fi formulați ca unguente, creme, suspensii, loțiuni, pulberi, soluții, paste, geluri, pulverizatoare, aerosoli sau uleiuri.

5 Pentru tratamentul ochiului sau altui țesut extern, de exemplu gură și piele, formulările sunt aplicate preferabil ca unguent sau cremă topice. În cazul formulării care trebuie să dea un unguent, ingredientul activ poate fi utilizat fie cu o bază de cremă parafinică sau fie amestecabilă în apă. Alternativ, ingredientul activ poate fi formulat pentru a da o cremă cu o bază de cremă de ulei-in-apă sau cu o bază de apă-in-ulei.

10 Formulările farmaceutice adaptate pentru aplicare topică la ochi includ picături pentru ochi, în care ingredientul activ este dizolvat sau suspendat într-un purtător adecvat, în particular un solvent apos.

Formulările farmaceutice adaptate pentru aplicare topică în gură cuprind tablete, pastile și ape de gură.

15 Formulările farmaceutice adaptate pentru administrare rectală pot fi administrate sub formă de supozitoare sau clisme.

Formulările farmaceutice adaptate pentru administrare nazală, în care substanța purtătoare este un solid, cuprind o pulbere grosieră având o dimensiune a particulei, de exemplu, în intervalul de 20-500 microni, care este administrată într-o manieră în care se face prizarea, adică prin inhalare rapidă prin pasajele nazale dintr-un recipient conținând pulberea menținută aproape de nas. Formulările adecvate pentru administrare ca pulverizator nazal sau picături nazale cu un lichid ca substanță purtătoare cuprind soluții de ingredient activ în apă sau ulei.

20 Formulările farmaceutice adaptate pentru administrare prin inhalare cuprind pulberi sau aglomerări fine de particule, care pot fi generate prin diferite tipuri de dozatoare presurizate cu aerosoli, nebulizatoare sau insuflătoare.

25 Formulările farmaceutice adaptate pentru administrare vaginală pot fi administrate ca formulări de pesare, tampoane, creme, geluri, paste, spume sau pulverizare. Formulările farmaceutice adaptate pentru administrare parenterală includ soluții injectabile sterile apoase și neapoase care cuprind antioxidanți, tampoane, bacteriostatice și substanțe dizolvate, prin intermediul cărora formularea este redată izotonic cu sângele destinatarului care urmează să fie tratat; și suspensii sterile apoase și neapoase, care pot cuprinde mediul de suspensie și agenți de îngroșare. Formulările pot fi administrate în recipiente pentru o singură doză sau pentru mai multe doze, de exemplu fiole etanșate și flacoane, și depozitate în stare criodesicată (liofilizată), astfel încât să fie necesară doar adăugarea lichidului purtător steril, de exemplu apă în scopuri de injectare, imediat înainte de utilizare.

30 Soluțiile și suspensiile pentru injectare preparate în conformitate cu rețeta pot fi preparate din pulberi sterile, granule și tablete.

35 Este de la sine înțeles că, în plus față de constituenții menționați în special mai sus, formulările pot cuprinde de asemenea alți agenți uzuali în domeniu față de tipul particular de formulare; astfel, de exemplu, formulările care sunt adecvate pentru administrare orală pot cuprinde arome.

40 O cantitate eficientă terapeutic dintr-un compus cu formula (I) și dintr-un alt ingredient activ depinde de un număr de factori, incluzând, de exemplu, vârsta și greutatea animalului, afecțiunea precisă a bolii care necesită tratament, și severitatea acesteia, natura formulării și metoda de administrare, și este în final determinată de medicul curant sau de veterinar. Totuși, o cantitate eficientă dintr-un compus este în general în intervalul de la 0,1 până la 100 mg/kg din greutatea corporală a destinatarului (mamiferului) pe zi și în special de obicei în intervalul de la 1 până la 10 mg/kg din greutatea corporală pe zi. Astfel, cantitatea actuală pe zi pentru un mamifer adult care cântărește 70 kg este uzual între 70 și 700 mg, unde această cantitate poate fi administrată ca o doză individuală pe zi sau uzual într-o serie de doze parțiale (cum ar fi, de exemplu, două, trei, patru, cinci sau șase) pe zi, astfel încât doza totală zilnică să fie aceeași. O cantitate eficientă dintr-o sare sau solvat sau dintr-un derivat funcțional fiziologic al acestora poate fi determinată ca fracțiunea din cantitatea eficientă de compus per se.

50 Este de asemenea divulgată o metodă pentru tratarea unui cancer la un subiect care are nevoie de un astfel de tratament cuprinzând etapa de administrare către subiect o dată sau de mai multe ori a unei cantități eficiente terapeutic din cel puțin un compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia cum s-a divulgat aici.

55 Este de asemenea divulgată o metodă pentru inhibarea creșterii și/sau metastazei celulelor tumorale la un subiect, cuprinzând etapa de administrare către subiect o dată sau de mai multe ori a unei cantități eficiente terapeutic din cel puțin un compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia cum s-a divulgat aici.

60 Este de asemenea divulgată o metodă pentru inhibarea activității enzimei oxigenază dihidroorotată într-o celulă tumorală, cuprinzând etapa de punere în contact a celulei tumorale o dată sau de mai multe ori cu o cantitate eficientă terapeutic din cel puțin un compus sau sare acceptabilă

farmaceutic a acestuia cum s-a divulgat aici. În această realizare celulele tumorale sunt puse în contact *in vivo*, *ex vivo* sau *in vitro*.

Compușii, sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora și formulările farmaceutice și compozițiile divulgate în acest document sunt utile pentru tratarea cancerului la un subiect care are nevoie de un astfel de tratament. Concomitent, creșterea celulei tumorale și/sau metastazei sau a unei activități a enzimei oxigenază dihidroorotată în acestea pot fi inhibate. Compușii și compozițiile farmaceutice pot fi administrate o dată sau de mai multe ori pentru a obține un efect terapeutic. Așa cum se cunoaște în domeniu, o persoană calificată este bine capabilă să determine doza, regimurile de dozare și căile de administrare depinzând de afecțiunea care trebuie tratată și subiectul care necesită tratament. Exemple reprezentative ale unui cancer includ malignități hematologice cum ar fi, dar fără a se limita la, leucemie mieloidă acută, mielom multiplu, leucemie B-prolimfocitară, leucemie limfoblastică acută, și leucemie limfocitară cronică. Exemple reprezentative ale unui cancer includ limfoame cum ar fi, dar fără a se limita la, boala Hodgkin, limfom non-Hodgkin, limfom folicular, limfom difuz cu celule B mari, limfom anaplastic cu celule mari, și limfom cu celule manta. Exemple reprezentative ale unui cancer includ un cancer solid cum ar fi, dar fără a se limita la, cancer pulmonar, cancer la sân, cancer la sân triplu negativ, melanom, glioblastom, cancer la prostată, cancer la colon, cancer pancreatic, cancer osos, cancer la cap sau gat, cancer la piele, endometriu malign cutanat sau intraocular, carcinom de col uterin, carcinom de vagin, carcinom de vulvă, cancer de esofag, cancer de intestin subțire, cancer de sistem endocrin, cancer de glandă tiroidă, cancer de glandă paratiroidă, cancer de glandă suprarenală, sarcom de țesut moale, cancer de uretră, cancer de penis, tumori solide din copilărie, cancer de limfom limfocitic al vezicii, cancer al rinichiului sau ureterei, carcinom de pelvis renal, neoplasm al sistemului nervos central (CNS), limfom CNS primar, angiogeneză tumorală, tumoare a axei spinale, gliom de stem cerebral, adenom pituitar, sarcom Kaposi, cancer epidermoid, cancer al celulei scuamoase, limfom al celulei T, cancere induse de mediu incluzându-le pe cele induse de azbest, și cancerele mutante PTEN.

Este de asemenea divulgat un procedeu pentru prepararea derivaților trisubstituiți de benzotriazol cu formula (I).

Inhibitorii de dehidrogenază dihidroorotată conform formulei (I) pot fi preparați cu ușurință din materii prime disponibile utilizând următoarele metode generale și proceduri. Se va aprecia că unde condițiile experimentale tipice sau preferate (adică temperaturile de reacție, timpul, moliile de reactivi, solvenții etc.) sunt date, alte condiții experimentale pot fi de asemenea utilizate dacă nu se afirmă altfel. Condițiile optime de reacție pot varia cu reacțanții particulari sau solvenții utilizați, dar astfel de condiții pot fi determinate de persoana calificată în domeniu, utilizând proceduri de optimizare de rutină. Mai mult, prin utilizarea procedurilor descrise în detaliu, cineva având calificare obișnuită în domeniu poate prepara compuși suplimentari ai prezentei invenții revendicate aici. Toate temperaturile sunt în grade Celsius (°C) în afară de cazul când s-a specificat altfel.

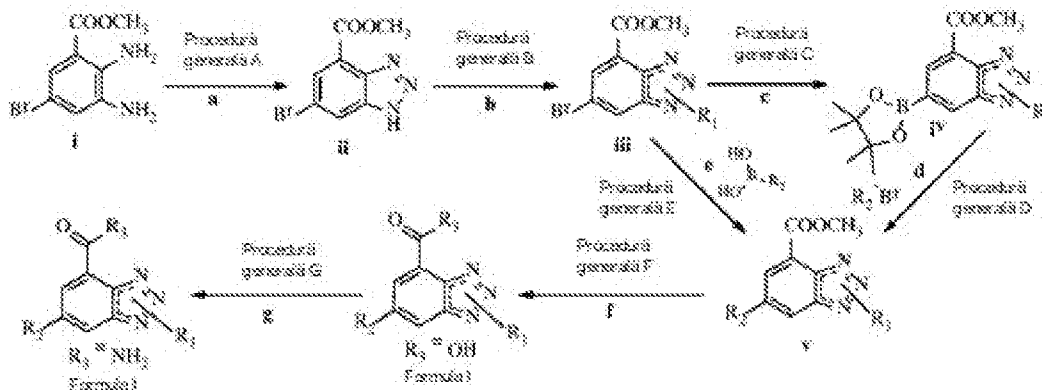
Intr-un alt aspect, compușii prezentei invenții pot conține de asemenea proporții nenaturale de izotopi atomici la unul sau mai mulți din atomii care constituie astfel de compuși. De exemplu, prezenta invenție cuprinde de asemenea variante etichetate izotopic ale prezentei invenții care sunt identice cu cele enumerate aici, dar diferă prin faptul că unul sau mai mulți atomi ai compusului sunt înlocuiți cu un atom care are masa atomică sau număr de masă diferite de masa atomică predominantă sau de numărul de masă uzual găsite în natură pentru atom. Sunt avuți în vedere toți izotopii oricărui atom sau element particular cum s-a specificat în domeniul compușilor invenției, și utilizărilor lor. Exemple de izotopi care pot fi încorporați în compușii invenției includ izotopi de hidrogen, carbon, azot, oxigen, fosfor, sulf, fluor, clor și iod, cum ar fi ^2H ("D"), ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I și ^{125}I . Compușii marcați izotopic ai prezentei invenții pot fi preparați în general urmand proceduri analoge cu cele divulgate în Schemele și/sau în Exemplele de aici de mai jos, prin substituirea unui reactiv marcat izotopic cu un reactiv nemarcat izotopic.

Următoarele abrevieri se referă respectiv la definițiile mai jos:

AcOH (acid acetic), ACN (acetonitril), ATP (trifosfat adenosidă), BSA (albumină din ser bovin), CHCl_3 (cloroform), Cs_2CO_3 (carbonat de cesiu), DCM (diclorometan), DIPEA (di-izopropil etilamină), DMSO (dimetil sulfoxid), DMF (N,N-dimetilformamidă), EDCI.HCl (clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidă), Et_3N (trietilamină), EtOAc (acetat de etil), EtOH (etanol), HOBT (hidroxibenzotriazol), HCl (acid clorhidric), K_2CO_3 (carbonat de potasiu), KOAc (acetat de potasiu), min (minut), MeOH (metanol), MeI (iodură de metil), MgSO_4 (sulfat de magneziu), NH_4Cl (clorură de amoniu), $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ (carbonat de amoniu), $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ ([1,1-bis(difenilfosfino)ferocen]dicloropaladiu (II)), NaH (hidruură de sodiu), NaNO_2 (nitrit de sodiu), NaHCO_3 (bicarbonat de sodiu), PetEter (eter de petrol), PBS (soluție salină tamponată cu fosfat), RT-temperatura camerei (25°C - 35°C), TEA (trietil amină), TFA (acid trifluoroacetic), THF (tetrahidrofuran), *t*-BuOK (terț-butoxid de potasiu), TMSI (iodură de trimetilsilil), TLC (cromatografie în strat subțire), H_2O - apă; mL

-mililitru; ore/h - oră; N - normalitate; M - molaritate; s- singlet; d - dublet; t - triplet; m- multiplu; ¹HNMR - rezonanță magnetică nucleară cu protoni; MS - spectroscopie de masă; LC - cromatografie de lichide; HPLC - cromatografie de lichide de înaltă performanță, J - constantă de cuplare; ¹H - proton; MHz - megaHertz (frecvență); Hz - Hertz; ppm - părți pe milion; bs - singlet mare; ES - electropulverizare; conc.- concentrație; g - gram; mmol sau mM - milimolar; μM - micromolar; nM - nanomolar; UV - ultraviolet; °C - grad Celsius, M⁺- ion molecular, % - procentaj; μ - micron; și δ - delta; anh. - anhidru; pH - potențial de hidrogen;

Metodele utile pentru fabricarea compușilor cu formula (I) sunt stabilite în Exemplele de mai jos și generalizate în Schema-I. O persoană calificată în domeniu va recunoaște că Schema I poate fi adaptată pentru a produce compușii cu formula (I) și sărurile acceptabile farmaceutic ale compușilor cu formula (I) în conformitate cu prezenta invenție. În care toate simbolurile/variabilele sunt cum s-au definit mai devreme dacă nu se afirmă altfel. Procesul este reprezentat prin Schema-I:



Compușii invenției pot fi preparați utilizând transformările sintetice ilustrate în Schema-I. Materiile prime sunt disponibile comercial, pot fi preparate prin procedurile descrise aici, prin procedurile din literatură, sau prin proceduri care ar fi bine cunoscute unei persoane calificate în domeniul chimiei organice. Materia primă metil 2,3-diamino-benzoat 5-substituit este preparată prin procedurile descrise în WO 2010115736A2.

Etapa-a: Compușul-i este reacționat cu nitrit de sodiu în mediu acid utilizând procedura generală-A pentru a da compusul-ii.

Etapa-b: Compușul-ii este supus mai departe la N-alchilare utilizând iodură de metil în condiții bazice cum ar fi cele descrise în procedura generală-B pentru a da compușii cu formula-iii.

Etapa-c: Compușii cu formula-iii sunt reacționați cu diboran bispinacolat în mediu bazic în prezența catalizatorului de paladiu adecvat utilizând procedura generală-C pentru a da compușii cu formula-iv.

Etapa-d: Compușii cu formula-iv sunt tratați cu halogenură aril substituită în prezența catalizatorului de paladiu adecvat utilizând condiții cum ar fi cele descrise în procedura generală-D pentru a da compușii cu formula-v.

Etapa-e: Alternativ, compușii cu formula-v pot fi preparați din compușii cu formula-iii prin utilizarea acizilor boronici adecvați, în condiții adecvate cum ar fi cele descrise în procedura generală-D.

Etapa-f : Compușii rezultanți cu formula-v sunt supuși hidrolizei cu ester în condiții bazice cum ar fi cele descrise în procedura generală-F pentru a da compuși cu formula (I) (în care R₃=OH).

Etapa-g: Acizi carboxilici cu formula (I) au fost tratați cu clorură de amoniu utilizând condițiile care sunt descrise în procedura generală-G pentru a da respectivii compuși cu formula (I) (în care R₃=NH₂).

Dacă setul de mai sus de metode sintetice generale nu este aplicabil pentru a obține compuși conform formulei (I) și/sau intermediari necesari pentru sinteza compușilor cu formula (I), ar trebui să fie utilizate metode adecvate de preparare cunoscute de către o persoană calificată în domeniu. În general, căile de sinteză pentru orice compus individual cu formula (I) vor depinde de substituții specifice fiecărei molecule și de disponibilitatea imediată a intermediarilor necesari; din nou astfel de factori vor fi apreciați de către cei având calificare obișnuită în domeniu.

Compușii acestei invenții pot fi izolați în asociere cu molecule de solvent prin cristalizare din evaporarea unui solvent adecvat. Sărurile de adiție acidă acceptabile farmaceutic ale compușilor cu formula (I), care conțin un centru bazic, pot fi preparate într-o manieră convențională. De exemplu, o soluție de bază liberă poate fi tratată cu un acid adecvat, fie pur sau fie într-o soluție adecvată, și sarea rezultată izolată fie prin filtrare sau fie prin evaporare sub vid al solventului de reacție. Sărurile de adiție bazică acceptabile farmaceutic pot fi obținute într-o manieră analogă prin tratarea unei soluții a unui

compus cu formula (I) cu o bază adecvată. Ambele tipuri de săruri pot fi formate sau interconvertite utilizând tehnici cu rășină și modificare de ioni.

EXEMPLE

General:

5 Datele MS furnizate în exemplele descrise mai jos au fost obținute după cum urmează: spectru de masă: LC/MS Waters ZMD (ESI) sau un Waters Acquity SQD (ESI).

Datele RMN furnizate în exemplele descrise mai jos au fost obținute după cum urmează: ¹H-RMN: Bruker DPX-300MHz sau un Bruker DPX 400 MHz.

Datele HPLC furnizate în exemplele descrise mai jos au fost obținute după cum urmează.

10 Condiția A: Coloană Waters Xbridge™ C₈ 50 mm x 4,6 mm la un debit de 2 mL/min; gradient de 8 min de la 0,1 % TFA în H₂O până la 0,07 % TFA în CH₃CN.

Condiția B: C18 BDS (4,6X250) mm, SC\244 la un debit de 0,7 mL/min; gradient de 10 min de la 0,1 % TFA în H₂O to CH₃CN.

15 Condiții HPLC preparative: coloană- Zorbax Eclipse XDB C18 PrepHT (150 X 21,2mm, 5μ); fază mobilă: (A) 0,01%TFA sau 0,1%TFA; (B) ACN sau ACN: MeOH (1:1); debit: 20ml/min.

Purificările HPLC preparative au fost efectuate cu un Fractionlynx direcționat spre masă de la Waters echipat cu o coloană Sunfire Prep C18 OBD 19x100 mm 5 μm, în afară de cazul când se raportează altfel. Toate purificările prin HPLC au fost efectuate cu un gradient de ACN/H₂O sau ACN/H₂O/HCOOH (0,1%).

20 Compușii invenției au fost denumiți în conformitate cu standardele utilizate în programACD/Numere lot de la „Advanced Chemistry Development Inc., ACD/Labs (versiunea 7.00)”. Versiune produs: 7.10 construit: 15 septembrie 2003.

25 Procedura pentru compușii cu formula (I) este detaliată aici mai jos, procedurile generale incluzând sinteza generală a diferiților intermediari implicați în procedeul de fabricare al compușilor în conformitate cu prezenta invenție.

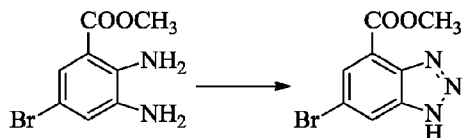
Procedura generală-A: preparare de [1,2,3]benzotriazoli substituiți

Un flacon conținând ester diamino 6-substituit sau substituit (1-3 echiv) în acid acetic este agitat timp de 10-20 min, preferabil 10 min, urmat de adăugarea de (nitrit de sodiu, nitrit de potasiu, preferabil nitrit de sodiu) (2,5-3,5 preferabil 2,5 echiv) în apă. Amestecul de reacție este agitat timp de 30 1-2 ore. Preferabil 1 oră la RT. Solidul separat este colectat prin filtrare și uscat sub vid pentru a obține produsele țintă.

Exemplu ilustrativ al procedurii generale-A:

Preparare # A,1: Sinteză de metil 6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilat:

35



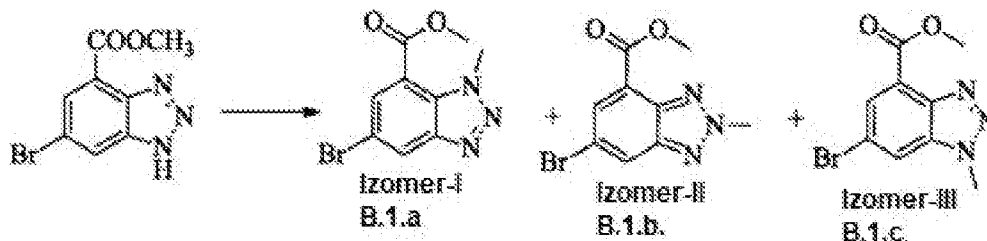
40 O soluție de metil 2,3-diamino-5-bromobenzoat (1,0 g, 4,08 mmol) (Ref:WO2010/115736 A2) în acid acetic (15 mL) a fost agitată timp de 10 min la RT. S-a adăugat nitrit de sodiu (0,309 g, 4,48 mmol) în apă (2 mL) și amestecul de reacție s-a agitat timp de aproximativ 30 min la RT. Solidul precipitat a fost filtrat, spălat cu apă și uscat sub vid pentru a da produsul dorit (0,8 g, 77%); ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 16,19 (s, 1H), 8,70 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 3,99 (s, 3H) și LC-MS m/z: 258 (M+H)⁺.

Procedura generală-B: N-alchilarea benzotriazolilor substituiți

45 La o soluție agitată de derivat de benzotriazol-carboxilat substituit (1 echiv) într-un solvent organic (cum ar fi DMF, THF, dioxan, preferabil DMF) se adaugă o bază adecvată (cum ar fi K₂CO₃, CS₂CO₃, NaH etc., preferabil K₂CO₃, 2 până la 5 echivalenți preferabil 2. echiv) urmată de alchil halogenură (2 până la 5 echiv, preferabil 3 echiv). Amestecul de reacție este agitat la RT timp de aproximativ 1 până la 10 ore (preferabil 3 ore). Amestecul de reacție este turnat în apă rece cu gheață și solidul separat este colectat prin filtrare și uscat sub vid. Regioizomerii au fost separați prin 50 cromatografie pe coloană pentru a obține produsele dorite.

Exemplu ilustrativ al procedurii generale-B:

Preparare # B,1: Sinteză de 5-bromo-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilat de metil, 6-bromo-2-metil-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilat de metil și 6-bromo-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3] triazol-4-carboxilat de metil



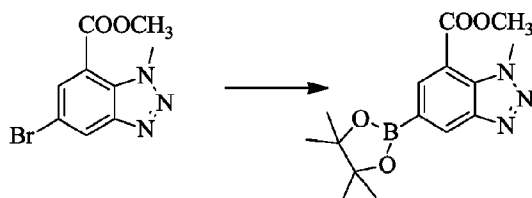
La o soluție agitată de 6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-carboxilat de metil (4,5 g, 17,5 mmol, preparare # A,1) în DMF (25 mL) s-a adăugat carbonat de potasiu (4,85 g, 35,15 mmol) urmat de iodură de metil (7,48 g, 52,73 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la RT timp de 1 oră. Amestecul de reacție a fost stins cu apă rece cu gheață (100 mL) și solidul separat a fost colectat prin filtrare, și uscat sub vid. Compusul brut obținut a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe gel de siliciu (100-200 mesh) utilizand 10% acetat de etil în hexan pentru a da Izomer-I (B.1.a) (1,9 g); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8,40 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 4,57 (s, 3H), 4,01 (s, 3H) și LC-MS m/z: 272 (M+2) $^+$; 15-20% acetat de etil în hexan pentru a da Izomer-II (B.1.b) (1,4 g); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8,26 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 4,58 (s, 3H), 4,04 (s, 3H) și LC-MS m/z: 272,0 (M+2) $^+$; 20-25% acetat de etil în hexan pentru a da Izomer-III (B.1.c) (1,0 g); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,67 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 4,45 (s, 3H), 3,96 (s, 3H) și LC-MS m/z: 272,0 (M+2) $^+$.

Procedura generală-C: prepararea esterului boronic

Un amestec dintr-un derivat halo aril (1,0 până la 3,0 echiv, preferabil 1,0 echiv), o bază anorganică adecvată (cum ar fi KOAC sau Na_2CO_3 sau K_2CO_3 sau Cs_2CO_3 , preferabil KOAC), diboran bispinacolat (1,0 până la 3,0 echiv, preferabil 1,1 echiv) în dioxan este degazat cu azot timp de aproximativ 10 până la 15 min și s-a adăugat [1, 1-bis(difenilfosfino)-ferocen]dicloropaladiu(II) (0,001 până la 0,010 echiv, preferabil 0,05 echiv). Amestecul de reacție este agitat la temperatura de reflux sub azot timp de aproximativ 3 ore până la 12 ore (preferabil aproximativ 6 ore). Amestecul de reacție este răcit la RT și evaporat la sec sub presiune redusă. Reziduul obținut este re-dizolvat în EtOAc, spălat succesiv cu apă și soluție de saramură. Soluția organică este uscată pe Na_2SO_4 , filtrată și concentrată sub presiune redusă. Produsul este purificat prin cristalizare sau triturare dintr-un solvent adecvat sau solvenți sau prin HPLC preparativă sau cromatografie rapidă.

Exemplu ilustrativ al procedurii generale-C:

Preparare # C,1: Sinteză de 1-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilat de metil



Un amestec de 5-bromo-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilat de metil (1,0 g, 3,7 mmol, preparare # B.1.a), acetat de potasiu (0,627 g, 5,92 mmol), diboran bispinacolat (0,93 g, 3,7 mmol) în dioxan (60 mL) a fost degazat cu azot timp de aproximativ 15 min și s-a adăugat [1, 1-bis(difenilfosfino)-ferocen]dicloropaladiu(II) (0,151 g, 0,018 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura de reflux timp de 6 ore sub azot. Amestecul de reacție a fost răcit la RT și evaporat la sec sub presiune redusă. Reziduul obținut a fost redizolvat în EtOAc, spălat succesiv cu apă și soluție de saramură și concentrat. Compusul brut obținut a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe gel de siliciu (60-120 mesh) utilizand 30% acetat de etil în hexan pentru a da produsul dorit (0,9 g, 77%); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,46 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 4,59 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 1,35 (s, 12H) și LC-MS m/z = 318,2 (M+H) $^+$.

Alți compuși sintetizați utilizând procedura generală C sunt descriși în Tabelul C.1

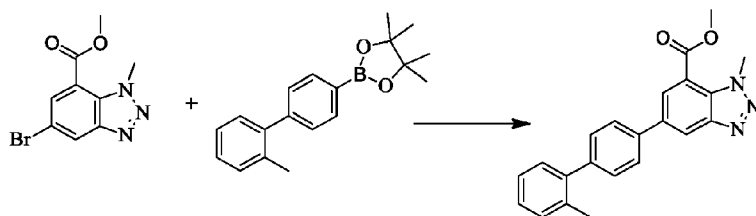
Procedura generală-D: reacție Suzuki

Un amestec de acetonitril și apă (8:2) este degazat cu azot timp de aproximativ 10 până la 15 min apoi s-a adăugat o bază adecvată (cum ar fi Na_2CO_3 sau K_2CO_3 sau Cs_2CO_3 , preferabil Na_2CO_3) urmată de derivat bromo aril (1,0 până la 3,0 echiv, preferabil 1,0 echiv) și acid boronic adecvat (1,0 până la 3,0 echiv, preferabil 1,5 echiv). Amestecul de reacție este din nou degazat timp de 15 min și în final s-a adăugat [1, 1-bis(difenilfosfino)-ferocen]dicloropaladiu(II) (0,001 până la 0,010 echiv, preferabil 0,05 echiv). Amestecul de reacție este agitat la temperatura de reflux sub azot timp de

aproximativ 3 ore până la 12 ore (preferabil aproximativ 4 ore). Amestecul de reacție este răcit la RT și evaporat la sec sub presiune redusă. Reziduul obținut este re-dizolvat în EtOAc, spălat succesiv cu apă și soluție de saramură. Soluția organică este uscată pe Na₂SO₄, filtrată și concentrată sub presiune redusă. Produsul este purificat prin cristalizare sau triturare dintr-un solvent adecvat sau solvenți sau prin HPLC preparativă sau cromatografie rapidă.

Exemplu ilustrativ al procedurii generale-D:

Preparare # D,1: Sinteză de 1-metil-5-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilat de metil



Un amestec de acetonitril (80 mL) și apă (15 mL) a fost degazat cu azot timp de 10 min. S-a adăugat carbonat de sodiu (2,74 g, 25,9 mmol) urmat de 5-bromo-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilat de metil (3,5 g, 12,9 mmol) și 4,4,5,5-tetrametil-2-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1,3,2-dioxaborolan (3,81 g, 12,0 mmol) (C,1,5). Amestecul de reacție a fost din nou degazat timp de 15 min. În final s-a adăugat [1,1-bis(difenilfosfino)-ferocen]dicloropaladiu(II) (0,526 g, 0,64 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura de reflux timp de 5 ore sub azot. Amestecul de reacție a fost răcit la RT și evaporat la sec sub presiune redusă. Reziduul obținut a fost redizolvat în EtOAc, spălat succesiv cu apă și soluție de saramură și concentrat. Compusul brut obținut a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe gel de siliciu (60-120 mesh) utilizând 30% acetat de etil în hexan pentru a da produsul dorit (3,6 g, 77%); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,52 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 7,76-7,74 (d, J=8,0 Hz, 2H), 7,48-7,46 (d, J=7,6, 2H), 7,31-7,28 (m, 4H), 4,63 (s, 3H), 4,08 (s, 3H), 2,34 (s, 3H) și LC-MS m/z = 358,2 (M+H)⁺.

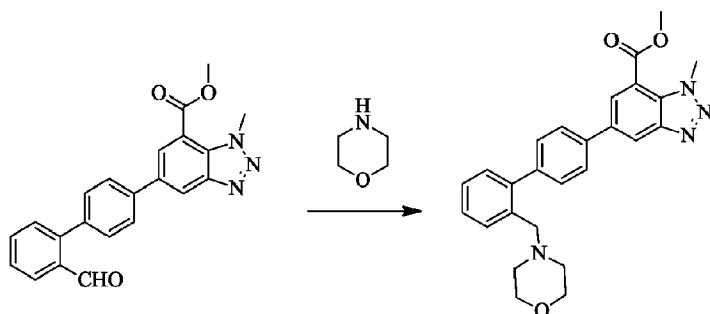
Alți compuși sintetizați utilizând procedura generală D sunt descriși în Tabelul D.1.

Procedura generală-E: Aminare reductivă

Un amestec de aldehydă adecvată și amină în solvent organic (cum ar fi DCM, THF, ACN, DMF, DCE, sau dioxan) este agitat la temperatura camerei timp de 30 min până la 4 ore. Amestecul de reacție rezultat este răcit la 0°C și se adăugă agent reductiv cum ar fi triacetoxiborohidruură de sodiu în porții mici urmat de o cantitate catalitică de acid acetic. Amestecul de reacție rezultat este agitat la temperatura camerei timp de 2-4 ore. Progresul reacției este monitorizat prin TLC, și amestecul de reacție este stins cu o soluție apoasă de bicarbonat de sodiu. Mai departe este extras cu acetat de etil, straturile organice combinate sunt uscate pe sulfat de sodiu și concentrate sub vid pentru a da compusul țintă. Opțional, compusul țintă poate fi purificat prin cristalizare sau triturare dintr-un solvent sau solvenți adecvați, sau prin HPLC preparativă sau cromatografie rapidă.

Exemplu ilustrativ al procedurii generale-E:

Preparare #E,1: Sinteză de 1-metil-5-(2'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilat de metil



O soluție de 5-(2'-formil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1-metil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilat de metil (0,300 g, 0,8 mmol, D,1,8) și morfolină (0,070 g, 0,8 mmol) în DCE (15 mL) a fost agitată timp de 30 min la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost răcit la 0°C, s-a adăugat borohidruură triacetoxi de sodiu (0,342 g, 1,6 mmol) urmată de acid acetic (0,2 mL). Amestecul de reacție a fost agitat timp de 2 ore la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost stins cu o soluție apoasă de

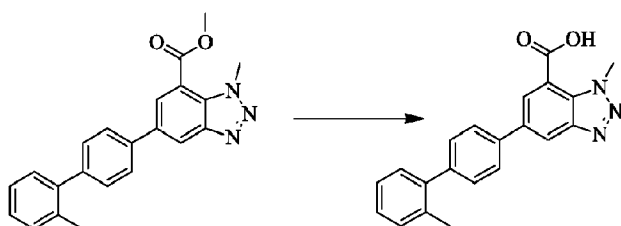
bicarbonat de sodiu (50 mL). A fost extras cu acetat de etil (3 x 50 mL), straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și concentrate sub presiune redusă. Brutul obținut a fost luat în etapa următoare fără purificare (0,200 g); ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,69 (s, 1H), 8,696 (s, 1H), 8,424-8,422 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7,912-7,891 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7,607 (m, 1H), 7,531-7,324 (m, 3H), 4,50 (s, 3H), 4,0 (s, 3H), 3,560 (m, 4H), 3,55 (s, 2H), 3,308 (m, 4H) și LC-MS $m/z = 443,3$ (M+H) $^+$.

Procedura generală-F: hidroliza esterului

La un flacon conținând un ester alchil adecvat într-un solvent apos organic (cum ar fi THF sau metanol, 1,4 dioxan, preferabil 1,4 Dioxan) se adaugă 1,5 echiv. de soluție apoasă de hidroxid de sodiu și amestecul de reacție este refluxat timp de 1-8 ore (preferabil 4 ore). Terminarea reacției este monitorizată prin TLC. Solventul în exces este îndepărtat sub vid și soluția este acidulată cu 10% soluție de HCl. Solidul separat este colectat prin filtrare și uscat sub vid pentru a obține derivatul de acid carboxilic țintă. Opțional, compusul țintă poate fi purificat prin cristalizare sau triturare dintr-un solvent sau solvenți adecvați, sau prin HPLC preparativă sau cromatografie rapidă.

Exemplu ilustrativ al procedurii generale-F:

Exemplu # 1: Sinteză de acid 1-metil-5-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic (Compus-1)



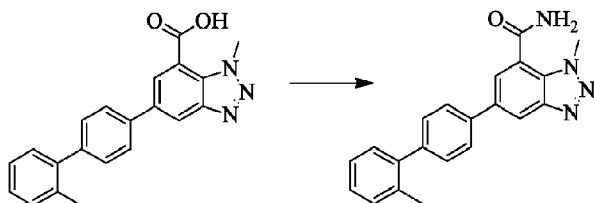
La o soluție agitată de 1-metil-5-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilat de metil (1,2 g, 3,361 mmol, D,1) în 1,4 dioxan (15 mL) s-a adăugat 2N NaOH apos (15 mL). Amestecul de reacție a fost refluxat timp de 4 ore. După terminarea reacției, amestecul de reacție a fost răcit la temperatura camerei, solventul în exces a fost îndepărtat sub presiune redusă și soluția a fost acidulată cu 10% soluție de HCl (pH \square 2). Solidul separat este colectat prin filtrare și uscat sub vid pentru a da compusul din titlu ca un solid alburii (1,1 g, 95%); ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 13,35 (bs, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,89-7,87 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 7,51-7,49 (d, $J=8,4$ Hz, 2H), 7,32-7,25 (m, 4H), 4,58 (s, 3H) 2,30 (s, 3H) și LC-MS $m/z = 344,1$ (M+H) $^+$.

Procedura generală-G: formarea amidei

La un flacon conținând derivat de acid carboxilic adecvat (1,0 echiv) într-un solvent organic (cum ar fi DMF, THF sau CH₂Cl₂) se adaugă EDCI.HCl (1,5 echiv), HOBT (1,5 echiv) și *N*-etil-*N*-izopropilpropan-2-amină (3 echiv). După agitare timp de aproximativ 10 min la aproximativ 25°C, se adaugă amina adecvată (1,5 echiv) și reacția este agitată timp de încă 8-12 ore suplimentare (preferabil 12 ore). Solidul separat după adăugarea de apă este colectat prin filtrare și uscat sub vid pentru a obține derivatul de amidă. Opțional, compusul obținut poate fi purificat prin cristalizare sau triturare dintr-un solvent sau solvenți adecvați, sau prin HPLC preparativă sau cromatografie rapidă.

Exemplu ilustrativ al procedurii generale-G:

Exemplu # 2: Sinteză de 1-metil-5-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxamidă (Compus-2)



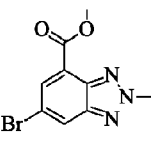
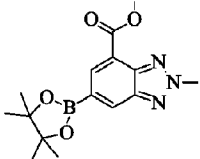
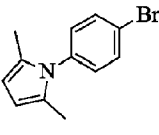
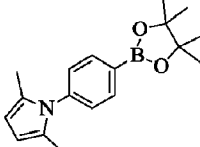
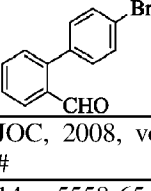
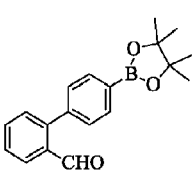
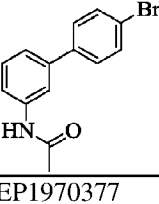
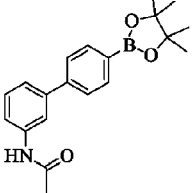
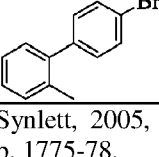
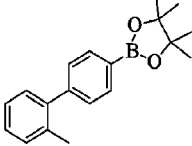
La un flacon care conține acid 1-metil-5-(2'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-7-carboxilic (0,150 g, 0,43 mmol, Compus-1) în DMF (3 mL) s-a adăugat EDCI.HCl (0,100 g, 0,52 mmol), HOBT (0,070 g, 0,52 mmol) și *N*-etil-*N*-izopropilpropan-2-amină (0,168 g, 1,31 mmol). Amestecul a fost agitat la aproximativ 25°C timp de aproximativ 10 min și s-a adăugat clorură de amoniu (0,070 g, 1,31 mmol). Reacția a fost apoi agitată timp de aproximativ 12 ore suplimentare și a fost stinsă cu apă (50 mL). Solidul separat a fost colectat prin filtrare și uscat sub vid pentru a da compusul dorit ca un solid alburii (0,08 g, 53%); ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,47 (s, 1H), 8,37

(s, 1H), 8,05 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,90-7,88 (d, J=8,0 Hz, 2H), 7,51-7,49 (d, J=7,6 Hz, 2H), 7,35-7,27 (m, 4H), 4,61 (s, 3H), 2,30 (s, 3H) și LC-MS m/z = 343,2 (M+H)⁺.

Intermediarii de mai jos au fost preparați printr-o procedură similară cu cea descrisă în procedura generală-C cu variații adecvate în reactanți, cantitățile de reactivi și condițiile de reacție.

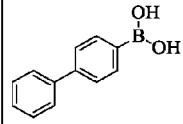
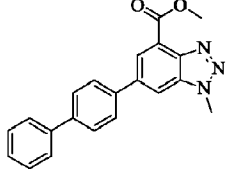
5 Caracteristicile fiziochimice ale compușilor sunt rezumate aici mai jos în Tabelul C.1.

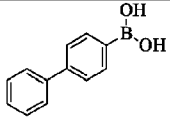
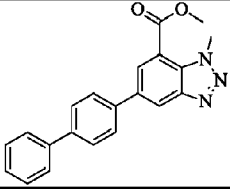
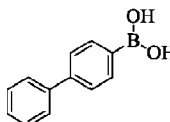
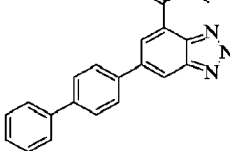
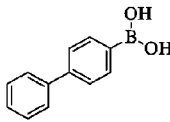
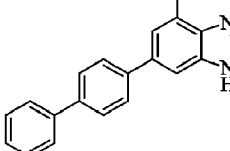
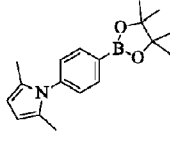
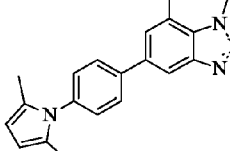
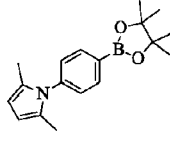
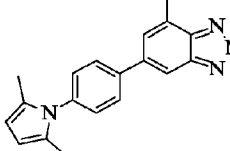
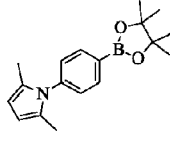
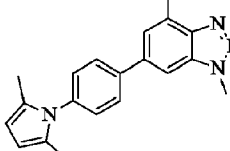
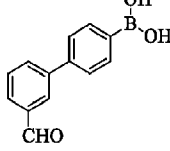
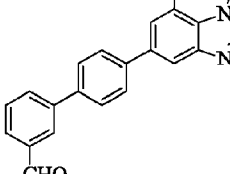
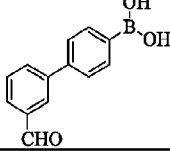
Tabelul C.1.

Nr. int	Reactant/ Sursă	Structură intermediară	Date analitice
C.1.1			¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,46 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 4,59 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 1,35 (s, 12H) și LC-MS m/z = 318,2 (M+H) ⁺ .
C.1.2			¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 7,80-7,78 (d, J=8 Hz, 2H), 7,27-7,25 (d, J=8 Hz, 2H), 5,80 (m, 2H), 1,96 (s, 6H), 1,31 (s, 12H) și LC-MS m/z = 298,2 (M+H) ⁺ .
C.1.3	 JOC, 2008, vol .73, # 14 p. 5558-65		¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 9,88 (s, 1H), 7,94 (d, J=7,2 Hz, 1H), 7,81-7,75 (m, 3H), 7,63-7,45 (m, 4H), 1,32 (s, 12H) și LC-MS m/z = 298,2 (M+H) ⁺ .
C.1.4	 EP1970377		¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 10,04 (s, 1H), 7,92-7,91 (d, J=4 Hz, 1H), 7,83-7,58 (m, 4H), 7,41-7,33 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 1,31 (s, 12H) și LC-MS m/z = 338,2 (M+H) ⁺ .
C.1.5	 Synlett, 2005, # 11, p. 1775-78.		¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 7,87-7,85 (d, J=8 Hz, 2H), 7,35-7,33 (d, J=8 Hz, 2H), 7,26-7,24 (m, 4H), 2,26 (s, 3H), 1,36 (s, 12H) și LC-MS m/z = 295,2 (M+H) ⁺ .

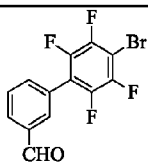
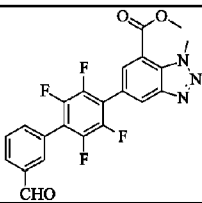
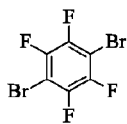
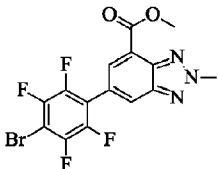
Intermediarii de mai jos au fost preparați printr-o procedură similară cu cea descrisă în procedura generală-D cu variații adecvate în reactanți, cantitățile de reactivi și condițiile de reacție.

10 Caracteristicile fiziochimice ale compușilor sunt rezumate aici mai jos în Tabelul-D.1.

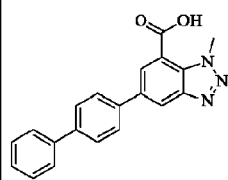
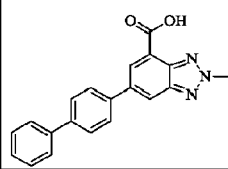
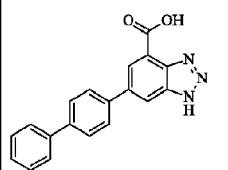
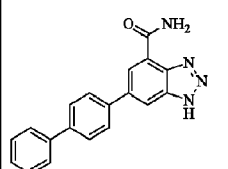
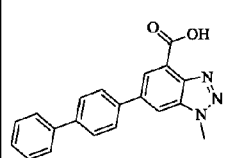
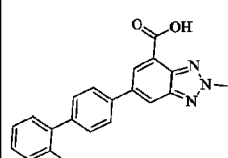
Tabelul D.1.			
Nr. int	Reactant/ Sursă	Structură intermediară	Date analitice
D.1.1			¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 8,50 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,79-7,65 (m, 6H), 7,48-7,38 (m, 3H), 4,62 (s, 3H), 4,08 (s, 3H) și LC-MS m/z = 344 (M+H) ⁺ .
D.1.2			¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 8,48-8,46 (d, J=8,8 Hz, 2H), 7,78-7,65 (m, 6H), 7,48-7,37 (m, 3H), 4,62 (s, 3H), 4,04 (s, 3H) și LC-MS m/z = 344 (M+H) ⁺ .

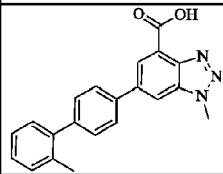
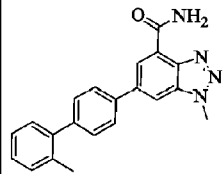
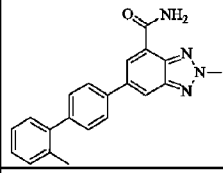
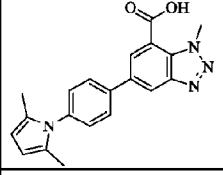
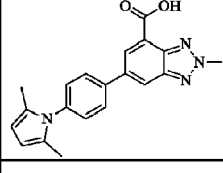
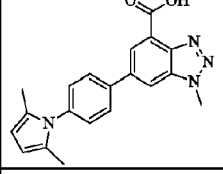
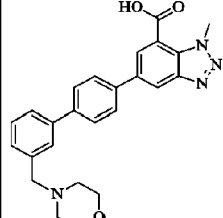
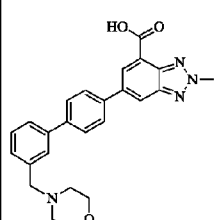
Tabelul D.1.			
Nr. int	Reactant/ Sursă	Structură intermediară	Date analitice
			
D.1.3			LC-MS m/z = 344 (M+H) ⁺ .
D.1.4			¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 16,05 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,94-7,92 (d, J=8 Hz, 2H), 7,84-7,82 (d, J=8 Hz, 2H), 7,76-7,74 (m, 2H), 7,53-7,38 (m, 3H), 4,03 (s, 3H) și LC-MS m/z = 330,2 (M+H) ⁺ .
D.1.5			¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,69 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,96-7,94 (d, J=8 Hz, 2H), 7,41-7,39 (d, J=8 Hz, 2H), 5,8 (s, 2H), 4,50 (s, 3H), 4,00 (s, 3H), 2,02 (s, 6H) și LC-MS m/z = 361,2 (M+H) ⁺ .
D.1.6			¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,58 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,95-7,93 (d, J=8 Hz, 2H), 7,41-7,39 (d, J=8 Hz, 2H), 5,83 (s, 2H), 4,59 (s, 3H), 4,00 (s, 3H), 2,02 (s, 6H) și LC-MS m/z = 361,1 (M+H) ⁺ .
D.1.7			¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,57 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 7,95-7,93 (d, J=8 Hz, 2H), 7,41-7,39 (d, J=8 Hz, 2H), 5,83 (s, 2H), 4,59 (s, 3H), 4,00 (s, 3H), 2,02 (s, 6H) și LC-MS m/z = 361,2 (M+H) ⁺ .
D.1.8			¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 10,13 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,12-8,10 (d, J=8 Hz, 1H), 7,994-7,905 (m, 5H), 7,75-7,72 (m, 1H), 4,49 (s, 3H), 4,00 (s, 3H) și LC-MS m/z = 372,1 (M+H) ⁺ .
D.1.9			¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 10,13 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,3 (s, 1H), 8,13-8,11 (d, J=8 Hz, 1H), 7,99-7,92 (m, 5H), 7,76-7,72 (m, 1H), 4,60 (s, 3H), 4,01 (s, 3H) și LC-MS m/z = 372,2 (M+H) ⁺ .

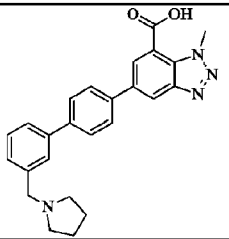
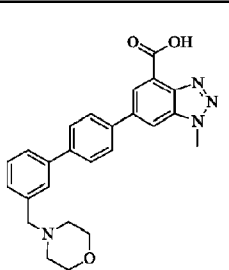
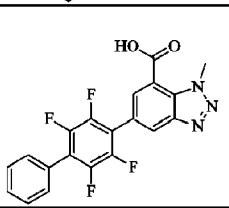
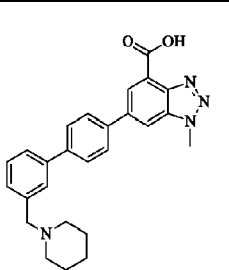
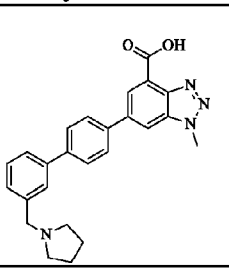
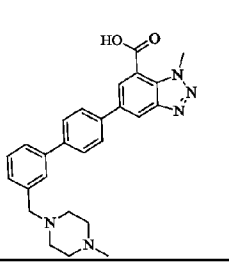
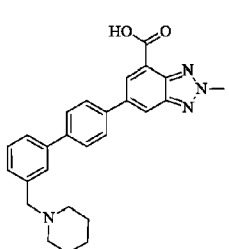
Tabelul D.1.			
Nr. int	Reactant/ Sursă	Structură intermediară	Date analitice
D.1.10			$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 10,14 (s, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,14-8,12 (d, J=8 Hz, 1H), 8,031-7,93 (m, 5H), 7,77-7,73 (m, 1H), 4,43 (s, 3H), 4,01 (s, 3H) și LC-MS m/z = 372,2 (M+H) ⁺ .
D.1.11			$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 10,08 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,04-7,92 (m, 8H), 4,49 (s, 3H), 4,00 (s, 3H) și LC-MS m/z = 372,1(M+H) ⁺ .
D.1.12			$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 9,98 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 7,99-7,97 (m, 3H), 7,82-7,80 (m, 1H), 7,784-7,61 (m, 4H), 4,50 (s, 3H), 4,00 (s, 3H) și LC-MS m/z = 372,1 (M+H) ⁺ .
D.1.13			$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 9,98 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 7,98-7,96 (m, 3H), 7,80-7,79 (m, 1H), 7,64-7,59 (m, 4H), 4,60 (s, 3H), 3,98 (s, 3H) și LC-MS m/z = 372,2 (M+H) ⁺ .
D.1.14			$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,30-8,28 (m, 2H), 7,54-7,50 (m, 5H), 4,65 (s, 3H), 4,07 (s, 3H) și LC-MS m/z = 416,1 (M+H) ⁺ .
D.1.15			LC-MS m/z = 416,1 (M+H) ⁺ .
	Organic Letters, 2009, vol. 11, # 15, p. 3346 - 49.		
	Organic Letters, 2009		
	vol. 11, # 15 p. 3346 - 49.		
D.1.16			$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 10,12 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,13-8,11 (m, 2H), 7,96 -7,83 (m,

Tabelul D.1.			
Nr. int	Reactant/ Sursă	Structură intermediară	Date analitice
			2H), 4,53 (s, 3H), 4,0 (s, 3H); LC-MS m/z = 444,1 (M+H) ⁺ .
D.1.17			¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,52 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 4,64 (s, 3H), 4,10 (s, 3H); LC-MS m/z = 418 (M+H) ⁺ .

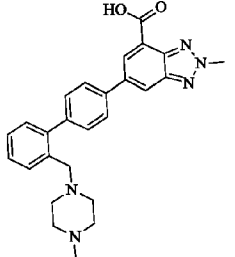
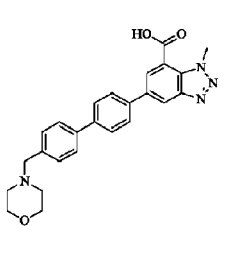
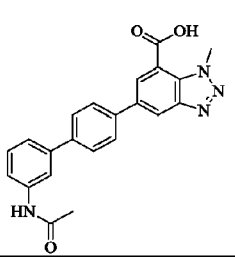
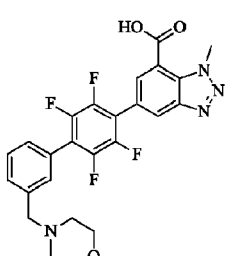
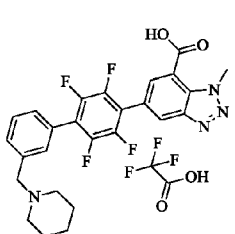
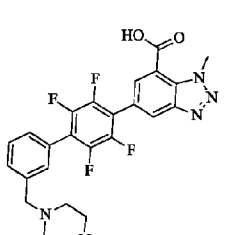
Compușii de mai jos au fost preparați printr-o procedură similară cu cea descrisă în procedurile generale-E, F și G cu variații adecvate în reactanți, cantitățile de reactivi și condițiile de reacție. Caracteristicile fiziochimice ale compușilor sunt rezumate aici mai jos în tabel.

Nr. compus	Structură	Procedură generală	Date analitice
3		F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,34 (bs, 1H), 8,53 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,93-7,91 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,84-7,82 (d, J=8,8 Hz, 2H), 7,76-7,74 (d, J=7,6 Hz, 2H), 7,53-7,40 (m, 3H), 4,58 (s, 3H) și LC-MS m/z = 330,1 (M+H) ⁺ .
4		F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,34 (bs, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 7,97-7,95 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,87-7,85 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,78-7,76 (d, J=7,6 Hz, 2H), 7,53-7,41 (m, 3H), 4,42 (s, 3H) și LC-MS m/z = 330,1 (M+H) ⁺ .
5		F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,34 (bs, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 7,92 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,86 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,76 (d, J=7,2 Hz, 2H), 7,55-7,41 (m, 3H) și LC-MS m/z = 316,1 (M+H) ⁺ .
6		F și G	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 15,9 (bs, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,98 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,84 (d, J=8 Hz, 2H), 7,77-7,75 (m, 3H), 7,52-7,38 (m, 3H) și LC-MS m/z = 315,1 (M+H) ⁺ .
7		F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,9 (bs, 1H), 8,63 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 7,94-7,92 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,83-7,81 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,76-7,74 (d, J=7,2 Hz, 2H), 7,52-7,40 (m, 3H), 4,52 (s, 3H) și LC-MS m/z = 330,1 (M+H) ⁺ .
8		F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,39 (bs, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 7,93-7,91 (d, J=7,6 Hz, 2H), 7,54-7,52 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,35-7,27 (m, 4H), 4,41 (s, 3H), 2,30 (s, 3H) și LC-MS m/z = 344,1 (M+H) ⁺ .
9		F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,64 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,90-7,88 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,51-7,49 (d, J=7,6 Hz, 2H), 7,32-7,27 (m,

Nr. compus	Structură	Procedură generală	Date analitice
			4H), 4,52 (s, 3H) 2,30 (s, 3H) și LC-MS m/z = 344,2 (M+H) ⁺ .
10		G	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,54 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,93 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,54 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,34 -7,28 (m, 4H), 4,45 (s, 3H), 2,30 (s, 3H) și LC-MS m/z = 343,2 (M+H) ⁺ .
11		F și G	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,54 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,93-7,91 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,54-7,52 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,34-7,28 (m, 4H), 4,45 (s, 3H), 2,30 (s, 3H) și LC-MS m/z = 343,2 (M+H) ⁺ .
12		F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,8 (bs, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,97 (d, J=8 Hz, 2H), 7,42 (d, J=8,4 Hz, 2H), 5,83 (s, 2H), 4,52 (s, 3H), 2,03 (s, 6H) și LC-MS m/z: 347,2 (M+H) ⁺ .
13		F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,38 (bs, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,96 (d, J=8 Hz, 2H), 7,42 (d, J=8,4 Hz, 2H), 5,83 (s, 2H), 4,58 (s, 3H), 2,03 (s, 6H) și LC-MS m/z: 347,2 (M+H) ⁺ .
14		F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,38 (bs, 1H), 8,53 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 7,98 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,45 (d, J=8,4 Hz, 2H), 5,84 (s, 2H), 4,41 (s, 3H), 2,03 (s, 6H) și LC-MS m/z: 347,2 (M+H) ⁺ .
15		E și F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,38 (bs, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,93 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,82 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,67-7,63 (m, 3H), 7,48-7,44 (m, 1H), 7,35 (d, J=8 Hz, 1H), 4,5 (s, 3H), 3,61 (m, 6H), 2,43 (m, 4H) și LC-MS m/z: 429,2 (M+H) ⁺ .
16		E și F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,38 (bs, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,93 (d, J=8 Hz, 2H), 7,83 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,67-7,64 (m, 2H), 7,48-7,45 (t, J=7,6 Hz, 1H), 7,36 (d, J=8 Hz, 1H), 4,58 (s, 3H), 3,60 (m, 6H), 2,43 (m, 4H) și LC-MS m/z: 429,2 (M+H) ⁺ .
17		E și F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 11,82 (bs, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,83-7,61 (m, 6H), 7,44 (t, J=7,6 Hz, 2H), 7,34 (d,

Nr. compus	Structură	Procedură generală	Date analitice
			J=7,6 Hz, 1H), 4,54 (s, 3H), 3,74 (s, 2H), 1,74 (m, 4H), 1,23 (m, 4H) și LC-MS m/z: 413,2 (M+H) ⁺ .
18		E și F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,2 (bs, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 7,96 (d, J=8 Hz, 2H), 7,85 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,67-7,64 (m, 2H), 7,48-7,46 (m, 1H), 7,44-7,34 (m, 1H), 4,44 (s, 3H), 3,60-3,57 (m, 6H), 2,41 (m, 4H) și LC-MS m/z = 429,2 (M+H) ⁺ .
19		F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,8 (bs, 1H), 8,60 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,65-7,55 (m, 5H), 4,45 (s, 3H) și LC-MS m/z = 402,1 (M+H) ⁺ .
20		E și F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,37 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,81 (s, 1H), 7,71-7,66 (m, 5H), 7,50-7,46 (m, 1H), 7,38-7,37 (m, 1H), 4,45 (s, 3H), 3,88 (s, 2H), 2,80-2,65 (m, 4H), 1,72-1,61 (m, 4H), 1,458 (m, 2H) și LC-MS m/z = 427,3 (M+H) ⁺ .
21		E și F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 12,2 (bs, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,91-7,81 (m, 4H), 7,70-7,63 (m, 2H), 7,46-7,36 (m, 2H), 4,40 (s, 3H), 3,73 (s, 2H), 3,45-3,40 (m, 4H), 1,80-1,65 (m, 4H) și LC-MS m/z = 413,3 (M+H) ⁺ .
22		E și F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 12,2 (bs, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,92 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,81 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,67-7,65 (m, 2H), 7,49-7,45 (m, 1H), 7,35-7,33 (m, 1H), 4,52 (s, 3H), 3,65 (s, 2H), 2,87-2,67 (m, 4H), 2,62-2,56 (m, 4H), 2,50 (s, 3H) și LC-MS m/z = 442,3 (M+H) ⁺ .
23		E și F	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 12,36 (bs, 1H), 8,51 (m, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,92-7,80 (m, 4H), 7,68-7,64 (m, 2H), 7,48-7,44 (m, 1H), 7,35-7,33 (m, 1H), 4,58 (s, 3H), 3,63 (s, 2H), 2,56-2,45 (m, 4H), 1,54-1,23 (m, 6H) și LC-MS m/z = 427,3 (M+H) ⁺ .

Nr. compus	Structură	Procedură generală	Date analitice
24		F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,33 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,59-7,45 (m, 5H), 4,59 (s, 3H) și LC-MS m/z = 402,1 (M+H) ⁺ .
25		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,67 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 7,96-7,94 (m, 3H), 7,54-7,50 (m, 4H), 7,41-7,40 (m, 1H), 4,53 (s, 3H), 4,38 (bs, 2H), 3,77-3,72 (m, 4H), 3,15 (m, 2H), 2,82 (m, 2H) și LC-MS m/z = 429,3 (M+H) ⁺ .
26		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,36 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,95 (d, J=8 Hz, 2H), 7,81 (m, 1H), 7,59-7,51 (m, 4H), 7,44-7,42 (m, 1H), 4,59 (s, 3H), 4,40 (bs, 2H), 3,82-3,72 (m, 4H), 3,18 (m, 2H), 2,82 (m, 2H) și LC-MS m/z = 429,3 (M+H) ⁺ .
27		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,78 (bs, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,04 (m, 1H), 7,97 (d, J=8 Hz, 2H), 7,53-7,40 (m, 4H), 7,39-7,38 (m, 1H), 4,52 (s, 3H), 4,39 (s, 2H), 3,4 (m, 2H), 2,79 (m, 2H), 1,81 (m, 4H) și LC-MS m/z = 413,2 (M+H) ⁺ .
28		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,36 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,96 (d, J=8 Hz, 2H), 7,91-7,89 (m, 1H), 7,55-7,39 (m, 5H), 4,59 (s, 3H), 4,41 (s, 2H), 3,32 (m, 2H), 2,81 (m, 2H), 1,81 (m, 4H) și LC-MS m/z = 413,3 (M+H) ⁺ .
29		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,21 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,92 (d, J=8 Hz, 2H), 7,55 (d, J=8 Hz, 2H), 7,47 (m, 2H), 7,37 (m, 2H), 4,52 (s, 3H), 3,56 (s, 2H), 3,40 (m, 2H), 3,14 (m, 4H), 2,74 (s, 3H) și LC-MS m/z = 442,3 (M+H) ⁺ .
30		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,26 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,92 (d, J=8 Hz, 2H), 7,56 (d, J=8 Hz, 2H), 7,48 (m, 2H), 7,38 (m, 2H), 4,59 (s, 3H), 3,93 (m, 2H), 3,44-3,42 (m, 4H), 3,16-3,14 (m, 4H), 2,77 (s, 3H) și LC-MS m/z = 442,3 (M+H) ⁺ .

Nr. compus	Structură	Procedură generală	Date analitice
			
31		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,63 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 7,92 (d, J=8 Hz, 2H), 7,82 (d, J=8 Hz, 2H), 7,73 (d, J=8 Hz, 2H), 7,45 (d, J=8 Hz, 2H), 4,52 (s, 3H), 3,61 (m, 6H), 2,74-2,61 (m, 4H) și LC-MS m/z = 429,3 (M+H) ⁺ .
32		F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,8 (bs, 1H), 10,06 (s, 1H), 8,63 (d, J=1,6 Hz, 1H), 8,38 (d, J=1,6 Hz, 1H), 7,98-7,93 (m, 3H), 7,75 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,61-7,58 (m, 1H), 7,42-7,40 (m, 2H), 4,52 (s, 3H), 2,05 (s, 3H) și LC-MS m/z = 387,1 (M+H) ⁺ .
33		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,98 (bs, 1H), 8,63 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,78-7,70 (m, 4H), 4,55 (s, 3H), 4,53 (s, 2H), 3,93-3,79 (m, 4H), 3,21 (m, 4H) și LC-MS m/z = 501,2 (M+H) ⁺ .
34		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 8,39 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,65-7,54 (m, 4H), 4,54 (s, 3H), 3,87 (s, 2H), 2,68 (m, 4H), 1,63 (m, 4H), 1,47 (m, 2H) și LC-MS m/z = 499,2 (M+H) ⁺ .
35		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 12,4 (bs, 1H), 8,4 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,51-7,49 (m, 4H), 4,55 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 2,74-2,67 (m, 6H), 2,25-2,22 (m, 4H) și LC-MS m/z = 514,2 (M+H) ⁺ .
36		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 9,8 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,64-7,53 (m, 3H), 4,53 (s, 3H), 4,24 (s, 2H), 3,36-3,16 (m, 1H), 1,34 (d, J=6,4 Hz, 6H) și LC-MS m/z = 473,2 (M+H) ⁺ .

Nr. compus	Structură	Procedură generală	Date analitice
37		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,98 (bs, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,63 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,71-7,65 (m, 4H), 4,55 (s, 3H), 4,26 (s, 2H), 2,63 (s, 3H) și LC-MS m/z = 445,1 (M+H) ⁺ .
38		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,46 (bs, 1H), 8,53 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 7,82-7,69 (m, 4H), 4,62 (s, 3H), 4,37 (s, 2H), 2,88-2,66 (m, 2H), 1,79-1,68 (m, 5 H), 1,38-1,23 (m, 2H) și LC-MS m/z = 499,2 (M+H) ⁺ .
39		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,48 (bs, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 7,81-7,72 (m, 4H), 4,62 (s, 3H), 4,46 (s, 2H), 3,98 (m, 2H), 3,78-3,72 (m, 2H), 3,15 (m, 4H) și LC-MS m/z = 501,2 (M+H) ⁺ .
40		E și F	$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 13,8 (bs, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,78-7,70 (m, 4H), 4,55 (s, 3H), 4,38 (s, 2H), 2,75 (s, 6H) și LC-MS m/z = 459,2 (M+H) ⁺ .

ACTIVITATE FARMACOLOGICĂ

Măsurarea activității enzimei inhibitoare DHODH (teste in vitro)

- 5 Testul de activitate DHODH este un test de enzimă cuplat în care oxidarea DHO și reducerea ulterioară de ubichinonă sunt echivalente stoichiometric cu reducerea de DCIP (2,6-diclorofenol). Reducerea de DCIP este însoțită de o pierdere de absorbantă la 610nm.

Preparare de soluții/reactivi:

- Preparare tampon: 50 mM tris HCl, 150 mM KCl, și pH 8,0, 0,8% triton.
 Soluție stoc de acid L-dihidroorotic de 20 mM în tampon.
 10 Soluție stoc de hidrat de sare de 2, 6-dicloroindofenol de sodiu de 20 mM în tampon.
 Soluție stoc de decilubichinonă de 20 mM în tampon.
 DMSO utilizat ca vehicul.

Procedură

- 5 μL de sulfoxid de dimetil sau un compus cu formula (I) în soluție DMSO a fost adăugat la godeurile unei plăci cu 96 de godeuri. Compușii cu formula (I) au fost măsurați la 10 μM .
 15 S-au adăugat proteina împreună cu tamponul, astfel încât volumul total incluzând DMSO a fost de 87 μL . Compusul și proteina au fost incubate timp de jumătate de oră la temperatura camerei după

amestecare. S-au adăugat 5 µL de 20 mM soluție de acid L-dihidroorotic, 5 µL de 2 mM soluție de decilubichinonă și 3 µL de 2 mM soluție de hidrat de sare de 2, 6-dicloroindofenol de sodiu la soluția de mai sus (volum total de test de 100 µL). Amestecul a fost agitat timp de 2 min și s-a înregistrat absorbanta la fiecare 10 min la 610 nanometri.

5 Procentajul de inhibare este calculat după cum urmează:

$$100 \cdot \frac{(\text{Abs}_{610} \text{ pentru reacția care conține compusul}) - (\text{Abs}_{610} \text{ pentru control pozitiv})}{(\text{Abs}_{610} \text{ pentru reacția fără enzime}) - (\text{Abs}_{610} \text{ pentru control pozitiv})}$$

Reacția care conține compusul are compus, tampon, enzimă și substraturi

Controlul pozitiv conține DMSO, tampon, enzimă și substraturi

Reacția fără enzimă conține DMSO, tampon și substraturi

10 **Determinarea IC₅₀**

A fost preparată o soluție stoc de 2 mM DMSO de benzoimidazol trisubstituit selectat și derivați de benzotriazol cu formula (I) din prezenta invenție pentru a fi examinată. Ulterior s-au făcut diluții 1/3.

15 5 µL din fiecare stoc al compusului cu formula (I) au fost utilizați pentru fiecare test de 100 µL. Prin urmare, 5 µL de stoc de 2 mM au furnizat 100 µL de 100 µM soluție a compusului cu formula (I), când a fost alcătuită din tampon, proteină și substrat. Vezi de asemenea: Ulrich și colab. (2001) Eur. J. Biochem, 268, 1861-1868.

20 Valorile IC₅₀ ale compușilor selectați ai prezentei invenții au fost furnizate în tabelul de mai jos, compușii care prezintă valori IC₅₀ ≤ 0,1 µM au fost grupați ca 'a', compușii care prezintă valori IC₅₀ în intervalul de la 0,101 µM până la 1,0 µM au fost grupați ca 'b' și compușii care prezintă valori IC₅₀ > 1,0 µM au fost grupați ca 'c'.

Tabelul: Activitatea de inhibare DHODH a compușilor selectați.

Grup	Nr. compuși
a	1, 2, 8, 12, 19, 24.
b	3, 4, 11, 13, 25, 29, 33, 34, 36, 38, 39, 40.
c	15, 16, 17, 20, 26, 27, 30, 31, 32, 35, 37.

ACTIVITATE PE BAZĂ DE CELULĂ

25 **Test de proliferare Ramos (teste *in vitro*)**

30 Testul de proliferare celulară este o metodă sensibilă de cuantificare a celulelor viabile în testul de citotoxicitate sau proliferare. Sistemul XTT (sare interioară de 2,3-bis[2-Metoxi-4-nitro-5-sulfonil]-2 H-tetrazolium-5-carboxianilidă) este un mijloc de măsurare a activității celulelor vii prin dehidrogenaza mitocondriilor. Dehidrogenaza mitocondriilor celulelor viabile scindează inelul tetrazoliu de XTT, rezultând cristale portocalii de formazon care sunt solubile în soluții apoase. Soluția XTT este potențiată prin adăugarea unui agent de cuplare al electronilor, fenazin metosulfat (PMS) la reacție. Culoarea portocalie rezultată este măsurată spectrofotometric la 450 nm. O creștere sau o scădere a numărului de celule conduce la o modificare concomitentă a cantității de formazon formată, care indică gradul de citotoxicitate cauzat de materialul de testat.

35 **Preparare de soluții/reactivi**

Prepararea mediului

Se dizolvă 17,7g pulbere IMDM (mediu Dulbecco modificat Iscove), 1,5 g bicarbonat de sodiu pH 7,2-7,4 în 1L de apă MiliQ, se adaugă 1% pencilină/streptomycină și 10% FBS.

40 Se dizolvă 10,6g pulbere F12 Ham, 1,5 g bicarbonat de sodiu pH 7,2-7,4 în 1L de apă MiliQ, se adaugă 1% pencilină/streptomycină.

DMSO s-a utilizat ca vehicul.

1X PBS (soluție salină tamponată cu fosfat): se dizolvă 5 tablete de PBS (Sigma: Cat#P4417) în 1L de apă MiliQ.

Procedură (determinarea IC₅₀)

45 Celulele Ramos au fost resuspendate la o densitate de 1 x10⁵ celule/ml în mediu IMDM complet. 95 µL din această suspensie de celule au fost adăugați la placa cu 96 de godeuri pentru a însămânța □ 10.000 celule pe godeu. Plăcile au fost incubate la 37°C sub a atmosferă umidificată de 5% CO₂ timp de □ 1 oră înainte de adăugarea compusului.

50 Compușii testați (cu referire la Tabelul 1) au fost dizolvați în 100% DMSO pentru a genera o soluție stoc 2/6/10/20 mM. O concentrație 200X de concentrații finale necesare a fost preparată în DMSO. 10 µL din fiecare concentrație (200X) au fost apoi diluați în 90 µL de mediu F12 Ham fără ser pentru a da o concentrație intermediară de 20X în mediu. Concentrația DMSO în această etapă este de 10% (diluție intermediară). 5 µL din fiecare diluție intermediară au fost apoi adăugați în triplicate în placa cu 96 de godeuri însămânțată anterior. Concentrația de DMSO finală a fost de 0,5% în godeurile

experimentale. Celulele tratate cu 0,5% DMSO au servit ca control pozitiv. 100 µL de mediu IMDM complet au servit ca mediu blanc pentru analiza datelor. S-au adăugat 200 µL de 1X PBS în toate colțurile godeurilor plăcii de test. Plăcile au fost apoi incubate timp de 72 ore într-un incubator cu 5% CO₂ la 37°C.

5 În ziua terminării, 100 µl de soluție XTT (1 mg/ml XTT suplimentat cu 25 µM PMS în mediu F12 Ham) au fost adăugați la fiecare godeu. Plăcile au fost incubate timp de 2 ore. Cantitatea de formazon produsă a fost determinată prin citirea absorbantei plăcii utilizând cititorul de placă multimarcat VICTOR X5 la lungimea de undă de 450 nm. Valorile IC₅₀ au fost determinate ca concentrații care au redus viabilitatea celulară cu 50% și curba a fost reprezentată grafic cu GraphPad Prism 6.0.

10 Procentajul de inhibare este calculat după cum urmează: procentajul (%) de inhibare a fost calculat prin normalizarea valorilor de control DMSO la 100% utilizand formula:

$$\% \text{ Inhibare} = 100\% - (\text{Abs}_{450} \text{compus de test} - \text{blanc}) / (\text{Abs}_{450} \text{control pozitiv} - \text{blanc}) * 100$$

15 Compusul de testat conține celule, compus de testat, mediu IMDM și 0,5% DMSO

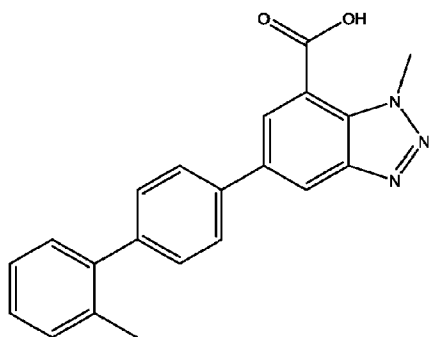
Controlul pozitiv conține celule, mediu IMDM și 0,5% DMSO

Blanc conține mediu IMDM

Nr. compus	% inhibare maximă la 30 µM	IC ₅₀ (µM)
1	107	0,049
2	95	1,086
3	113	0,524
4	107	1,453
8	103	0,154
11	67 (la 10 µM)	ND
12	103	0,362
13	100	3,882
15	96	8,406
16	124	6,141
17	50	ND
19	106	0,07
20	129	3,717
24	104	0,4
25	120	2,819
26	133	4,255
27	89	3,05
29	81	8,968
30	56	ND
31	81 (la 10 µM)	1,349
32	74	14,58
34	111 (la 10 µM)	0,675
38	92	1,601
39	96	1,869
40	84	11,85

Creșterea inhibării *in vitro* a liniilor celulare canceroase umane multiple de către Compusul 1

20 Selecția panoului liniei celulare tumorale a vizat identificarea subseturilor de celule tumorale care au fost în special sensibile la efectuarea inhibării DHODH cu Compusul 1. Compusul 1 este reprezentat prin următoarea formulă structurală:



Aceste linii celulare au fost tratate cu Compusul 1 pentru un total de 72 ore.

5 Evaluarea ratelor de creștere tumorale după tratamentul de 72 de ore, așa cum se arată în FIG. 1 și Tabelul 1, a dezvăluit că un subset distinct de linii celulare (reprezentate prin puncte gri în FIG. 1) a fost sensibil la Compusul 1. Majoritatea liniilor celulare care prezintă sensibilitate ridicată la Compusul 1 sunt de origine hematopoietică deși unele tumori solide au prezentat de asemenea sensibilitate ridicată (Tabelul 1). În scopul generării FIG. 1, liniile celulare sensibile au fost definite ca prezentând $\geq 75\%$ inhibare a creșterii maxime și o valoare GI_{50} de $< 1,5 \mu M$. Tabelul 1 este o listă a unora dintre linii celulare sensibile la Compusul 1 împreună cu valorile GI_{50} și răspunsul de creștere maximă. O inhibare maximă de 100 reprezintă inhibarea completă a creșterii; o valoare de inhibare maximă > 100 reprezintă ucidere celulară.

15 A fost efectuată o selecție de monitorizare pe un panou expandat de linii celulare ale descendenței heme în a 4-a zi a testului de creștere. Creșterea a fost evaluată prin măsurători Celulă-Titru Glo în ziua 0 și ziua 4. Așa cum se arată în FIG. 2, 25% din liniile heme selectate (20/80) au prezentat sensibilitate la Compusul 1, din care liniile limfomului difuz cu celule B mari (DLBCL) au fost în special sensibile (8/11 sau 73%). Un subset de linii heme care au fost de sensibilitate intermediară (definite ca inhibare a ratei de creștere $> 50\%$ și $< 75\%$) sau insensibile (definite ca inhibare a ratei de creștere $< 50\%$) la Compusul 1 în această selecție de monitorizare au fost supuse la teste de creștere extinsă pentru a evalua dacă timpul crescut de tratament a modulat profilul lor de sensibilitate. Specific, aceste linii heme au fost pretratate cu Compusul 1 timp de trei zile la concentrațiile indicate și apoi replacate pentru un test de creștere standard de 4 zile în mediu/medicament proaspăt. Marea majoritate a liniilor heme retestate au prezentat o sensibilitate puternică la Compusul 1 după 7 zile de tratament cu Compusul 1 (Tabelul 2).

Tabelul 1. GI_{50} și inhibarea creșterii maxime ale diferitelor linii celulare tratate cu Compusul 1

Linie celulară	Situs primar	Boală	GI_{50} (μM)	Inhibarea creșterii maxime
OCILY8	Țesut hematopoietic și limfoid	Limfom difuz cu celule B mari	0,02	148,2
SUDHL5	Țesut hematopoietic și limfoid	Limfom difuz cu celule B mari	0,02	117,2
JVM13	Țesut hematopoietic și limfoid	Leucemie B-prolimfocitară	0,02	112,0
MINO	Țesut hematopoietic și limfoid	Limfom cu celule manta	0,03	144,9
SUDHL1	Țesut hematopoietic și limfoid	Limfom anaplazic cu celule mari	0,04	186,5
SR786	Țesut hematopoietic și limfoid	Limfom anaplazic cu celule mari	0,05	96,3
MOLM13	Țesut hematopoietic și limfoid	Leucemie mieloidă acută	0,06	133,8
RL	Țesut hematopoietic și limfoid	Limfom non-Hodgkin	0,08	87,0
DU4475	San	Cancer la san triplu negativ	0,10	137,4
JYSE150	Esofag	Cancer de esofag (carcinom la esofag cu celule scuamoase)	0,10	78,4
KYSE510	Esofag	Cancer de esofag (carcinom la esofag cu celule scuamoase)	0,13	97,5

Linie celulară	Situs primar	Boală	GI ₅₀ (μM)	Inhibarea creșterii maxime
SUM159PT	San	Cancer la san triplu negativ	0,14	91,2
MV411	Țesut hematopoietic și limfoid	Leucemie mieloidă acută la copii	0,27	835
DU145	Prostată	Cancer la prostată	0,48	84,9
CJM	Piele	Melanom	0,62	77,4

Tabelul 2. Sensibilitatea in a 4-a zi și în a 7-a zi a diferitelor linii celulare heme tratate cu Compusul 1

Linie celulară	Boală	Sensibilitate	
		a 4-a zi	a 7-a zi
REC-1	Limfom cu celule manta	*	***
SUDHL4	Limfom difuz cu celule B mari	**	***
U266B 1	Mielom multiplu	*	***
LP1	Mielom multiplu	*	***
MOLP-2	Mielom multiplu	**	***
KG-1	Leucemie mieloidă acută	*	***
KMS12BM	Mielom multiplu	**	***
BDCM	Leucemie mieloidă acută	**	***
HuNS1	Mielom multiplu	*	***
GDM-1	Leucemie mieloidă acută	*	**
SKNO-1	Leucemie mieloidă acută	*	**
Kasumi-3	Leucemie mieloidă acută	*	*
Kasumi-6	Leucemie mieloidă acută	*	*
F36P	Leucemie mieloidă acută	**	***
THP-1	Leucemie mieloidă acută	**	***
AML-193	Leucemie mieloidă acută	**	***
TF1	Leucemie mieloidă acută	*	***
HEL	Leucemie mieloidă acută	**	***
* - insensibil			
** - intermediar			
*** - sensibil			

Inhibarea creșterii celulei canceroase de către Compusul 1 este atribuită inhibării de DHODH

5 DHODH catalizează a patra etapă în biosinteza *de novo* a pirimidinei, oxidând dihidroorotatul la orotat în membrana mitocondrială internă. Orotatul se combină apoi cu pirofosfatul fosforibozil (PRPP) pentru a forma orotidină-5'-monofosfat (OMP). Monofosfatul de uridină (UMP) este produs în final din OMP în citosol unde este utilizat pentru a face pirimidină pentru biosinteza ARN/ADN precum și pentru alte funcții biosintetice importante cum ar fi glicozilarea proteinei/lipidei și producerea de fosfolipide pentru biosinteza membranei.

15 Pentru a confirma că efectele Compusului 1 în afectarea creșterii /viabilității celulei s-au datorat inhibării specifice a DHODH, testele de creștere celulară au fost efectuate cu cantități variabile de uridină suplimentată în mediu. Mediul suplimentat cu concentrații de uridină aproape de fiziologic (5 μM) a salvat parțial efectele Compusului 1 în timp ce concentrațiile suprafizice (25 μM și 100 μM) au salvat complet efectele asupra creșterii de până la 10 μM a Compusului 1. Aceste rezultate au indicat că efectele Compusului 1 asupra creșterii sunt pe-țintă (FIG. 3).

Comparația profilului de sensibilitate al Compusului 1 cu profilurile de sensibilitate ale citarabinei și doxorubicinei

20 Profilul de sensibilitate al Compusului 1 împotriva unui subset de linii heme a fost comparat cu profilul de sensibilitate al altor agenți care sunt utilizați ca standard de îngrijire (SOC) în malignitățile heme. În mod consistent cu diferitele sale mecanisme de acțiune, Compusul 1 a afișat un profil de sensibilitate (FIG. 4A) distinct față de profilul de sensibilitate al citarabinei (FIG. 4B) și doxorubicinei (FIG. 4C).

25 Compusul 1 inhibă eficient DHODH in vivo și blochează creșterea tumorii în modelul de xenogrefă AML

Studiile de eficacitate *in vivo* cu Compusul 1 au fost efectuate pentru a evalua translația de la *in vitro* la *in vivo* a efectelor asupra blocării DHODH și inhibării creșterii celulei tumorale. Celulele 1 ×

10⁶ MOLM-13 au fost implantate subcutanat în șoareci CB17 SCID. Șoarecii (n = 15/grup) au fost tratați cu vehicul sau Compus 1 la 100 mg/kg BID PO odată ce tumorile au atins o medie de -150 mm³. La sfârșitul studiului, țesuturile au fost colectate la momentele de timp indicate după ultima doză pentru analizele farmacocinetice (PK) și de biomarker ale căii.

5

Compusul 1 administrat la 100 mg/kg BID a fost bine tolerat și a condus aproape la inhibarea completă a creșterii tumorale (TGI) a modelului de xenogrefă de leucemie mieloidă acută MOLM-13 (AML) (FIG. 5A). Profilurile farmacocinetice măsurate în plasmă și tumoare prezintă o scădere a concentrațiilor de medicament în 12 ore, care susțin regimul de dozare BID (FIG 5B). Dovada clară a angajamentului țintă a fost observată prin creșterea dramatică a nivelurilor tumorale ale dihidroorotatului (DHO), substratului DHODH (FIG. 5C). Nivelurile DHO ale liniei de bază au fost sub limita cuantificabilă (BQL < 120ng/g). Grupurile de uridină tumorală au fost reduse concomitent cu -60% depinzând de momentul de timp de evaluare (FIG. 5D).

10

15 **Compusul 1 inhibă eficient DHODH *in vivo* și blochează creșterea tumorii la modelele de xenogrefă AML și DLBCL derivate de la pacient**

A fost efectuată apoi o selecție utilizând un mic număr de șoareci/grup pentru a evalua eficacitatea Compusului 1 în modelele de xenogrefă derivate de la pacient de AML și DLBCL. Șoarecii purtători de tumori (n = 3/grup) au fost tratați cu vehicul sau Compus 1 la 100 mg/kg BID PO.

20

Așa cum se arată în FIGURILE 6A-6E și 7A-7B, activitatea anti-tumorală a Compusului 1 a fost observată în toate modelele testate, cu TGI >60% în două din cinci modele AML (adică, AML_2 și AML_5) și unul din două modele DLBCL (DLBCL_1). Modelul DLBCL_1 este caracterizat ca model DLBCL cu triplu impact.

25 **Inhibarea creșterii *in vitro* a liniilor celulare canceroase umane de limfom difuz cu celule B mari de către Compusul 1**

Trei linii celulare de limfom DLBCL derivate de la pacient clasificate ca DLBCL cu dublu impact, și anume OCILY18, SC-1 și CARNAVAL, au fost găsite ca fiind puternic sensibile la inhibare de către Compusul 1 într-un test de creștere de 96 de ore (FIG. 8).

30 **Compusul 1 blochează eficient creșterea tumorii în modelul de xenogrefă DLBCL derivat de la pacient**

O blocare puternică a creșterii tumorii *in vivo* a fost observată cu Compusul 1 în modelul de xenogrefă OCILY-19 al limfomului difuz cu celule B mari (DLBCL). 7 × 10⁶ celule OCILY-19 au fost implantate subcutanat în șoarecii CB17 SCID. Șoarecii (n = 15-18/grup) au fost tratați cu vehicul sau Compus 1 la doza/frecvența indicate odată ce tumorile au atins o medie de -150 mm³. Țesuturile au fost colectate la momentele de timp indicate după ultima doză pentru analizele de PK și biomarker.

35

Gradul de modulare al căii și de inhibare a creșterii tumorale a fost demonstrat ca fiind dependent de doză și program (FIG. 9A). Regimul de dozare de 100 mg/kg BID a condus la o eficiență superioară în comparație cu ramurile de dozare de 10 și 30 mg/kg BID și acest lucru s-a corelat cu o creștere mai mare a DHO tumorală (FIG. 9C) precum și cu o scădere a grupărilor totale de uridină tumorală (FIG. 9D). Regimul de 200 mg/kg QD a fost mai puțin eficient decât regimul de dozare cu 100mg/kg BID din cauza perioadei scurte de înjumătățire a Compusului 1 la șoareci, conducând la concentrații mai scăzute de medicament în circulație cu dozarea QD (vezi FIG. 9B).

45

45 **Inhibarea creșterii *in vitro* a liniilor celulare de cancer la sân triplu negativ umane de către Compusul 1**

Un panou de linii celulare de cancer triplu negativ (TNBC) a fost selectat pentru a evalua dacă un subset de TNBC ar putea beneficia potențial de tratamentul cu Compusul 1 ca un agent singur. Tratamentul cu Compusul 1 timp de 96 de ore a alterat robust viabilitatea/creșterea celulară în DU4475 până la un grad comparabil cum s-a observat în liniile celulare de origine hemă (vezi FIG. 10), în timp ce patru alte linii TNBC (HCC1143, HCC38, BTS49 și HCC1806) au fost insensibile în condițiile testate.

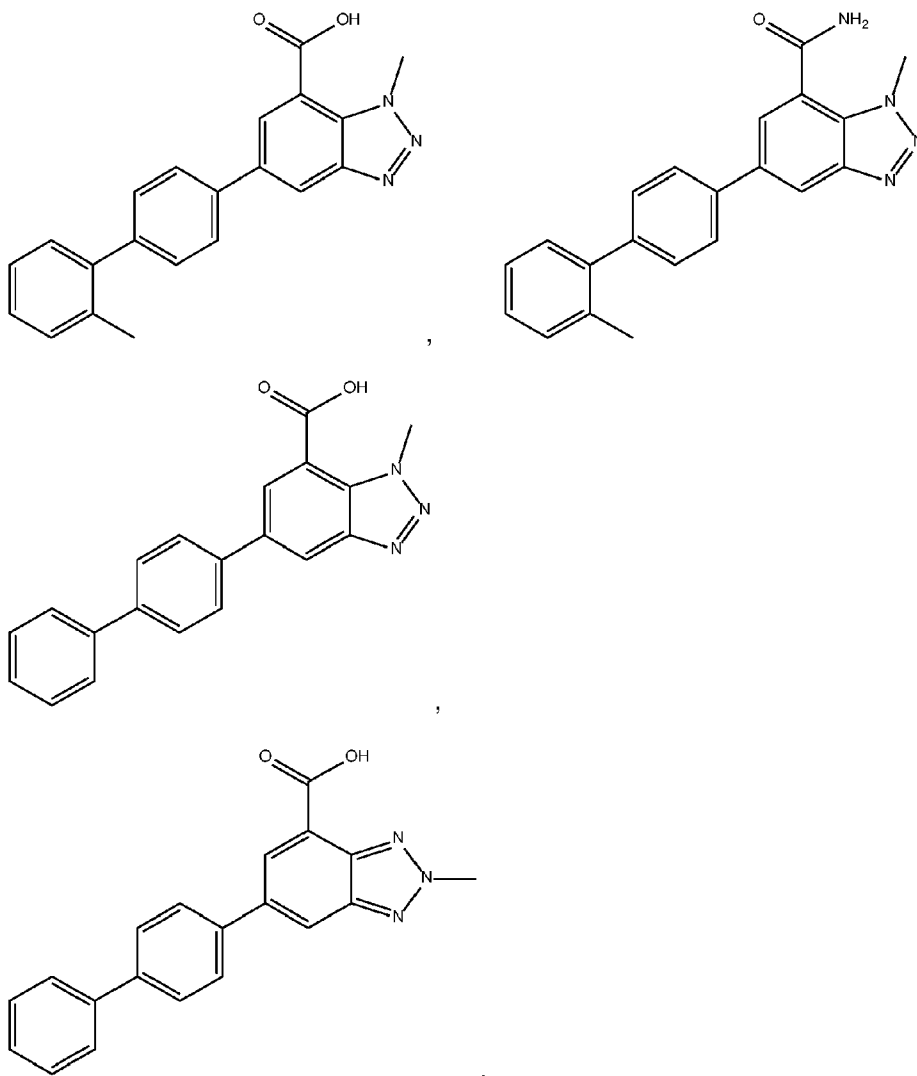
50

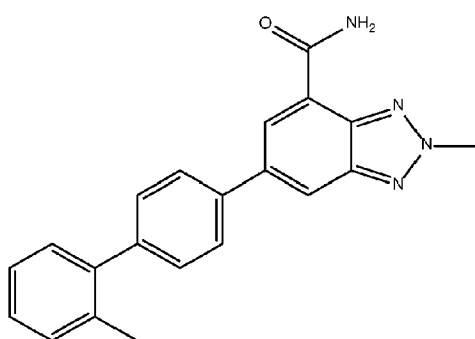
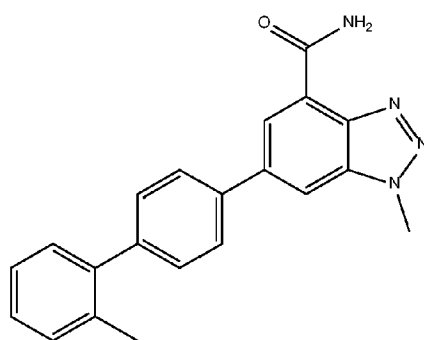
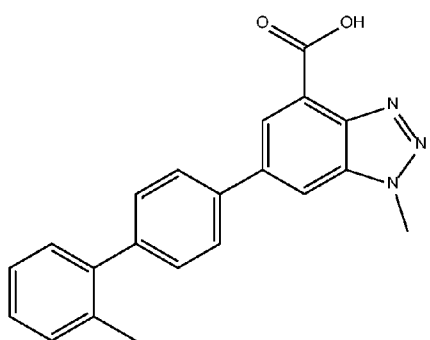
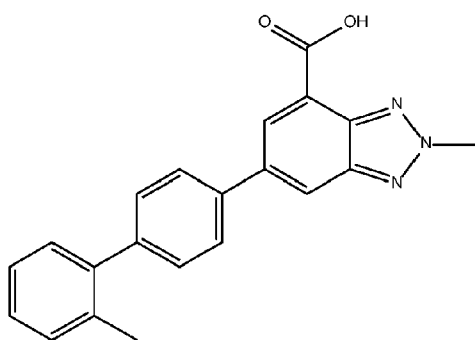
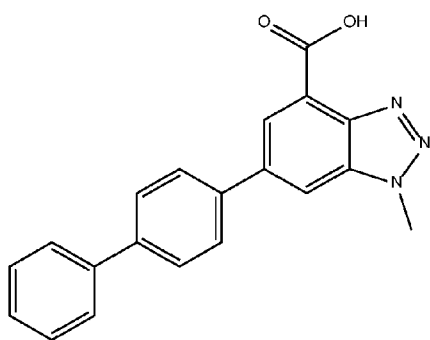
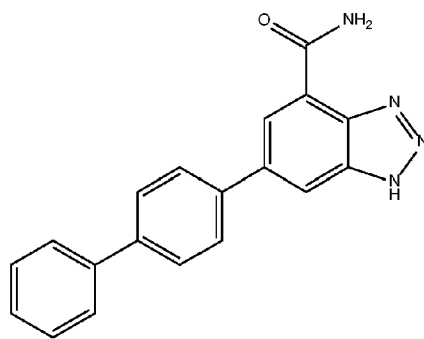
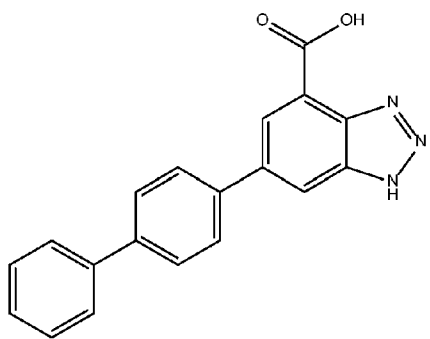
(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

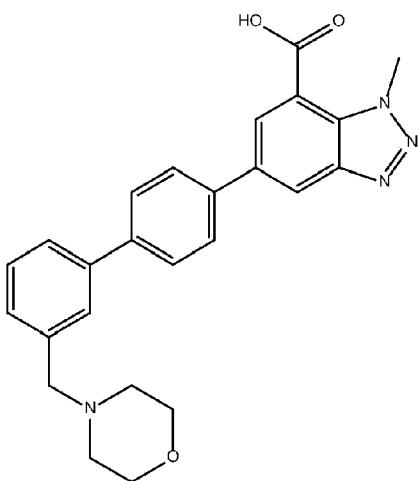
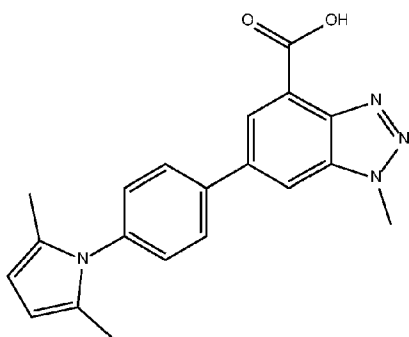
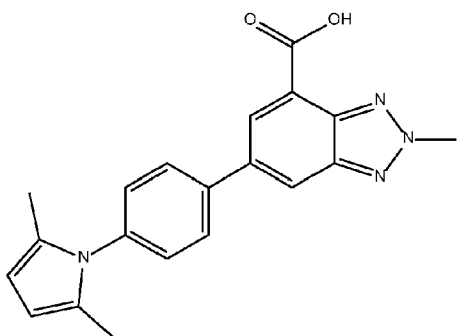
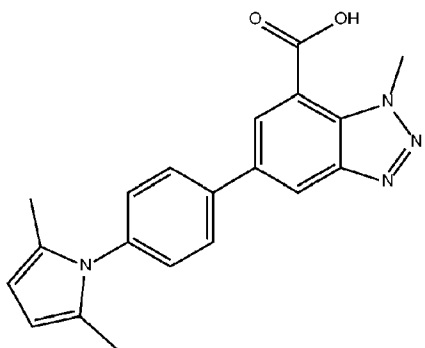
- WO-A2-2014/128669
- VYAS V K ET AL: "Recent Developments in the Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential of Dihydroorotate Dehydrogenase (DHODH) Inhibitors", MINI REVIEWS IN MEDICINAL CHEMI, BENTHAM SCIENCE PUBL, NL, vol. 11, no. 12, 1 October 2011 (2011-10-01), pages 1039-1055, XP009185054, ISSN: 1389-5575, DOI: 10.2174/138955711797247707

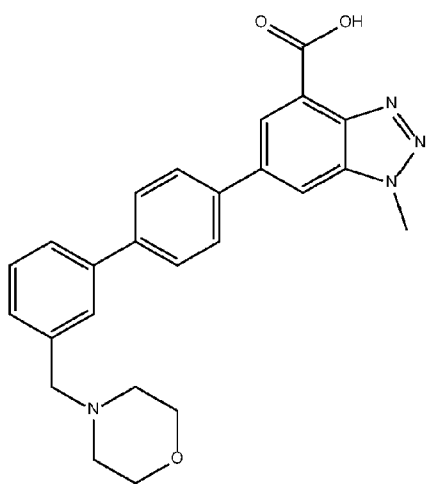
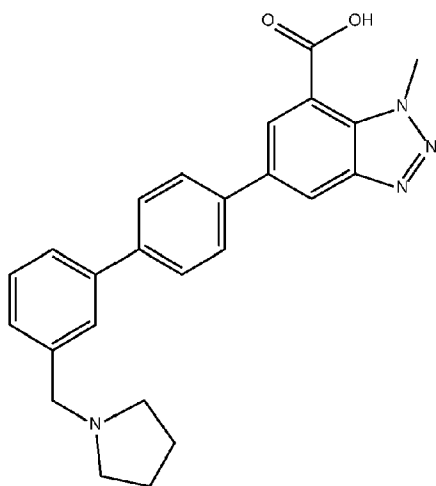
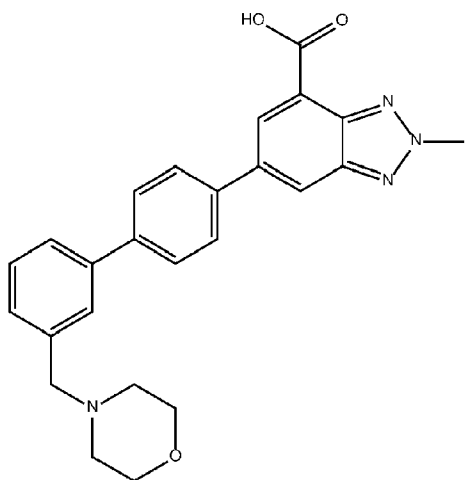
(57) Revendicări:

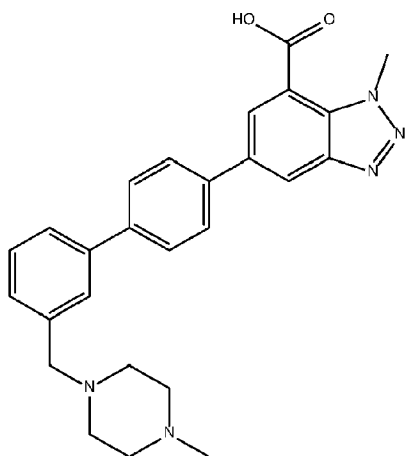
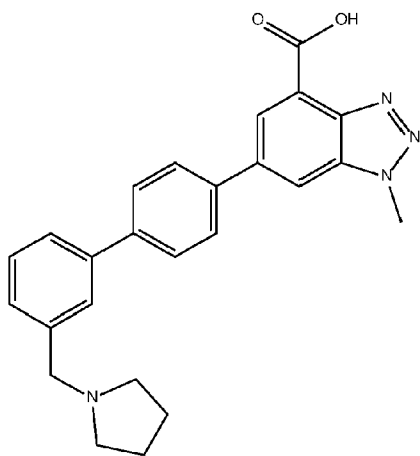
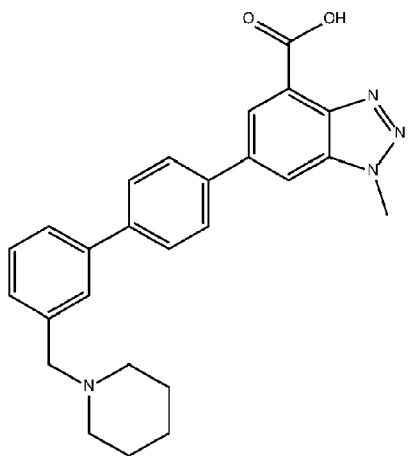
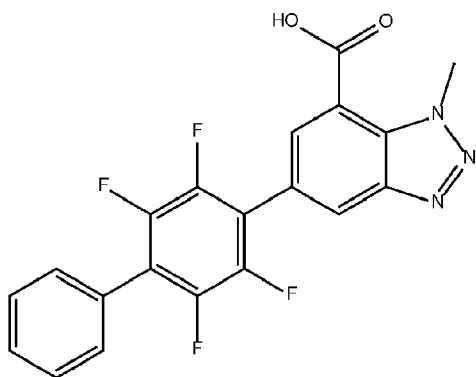
1. Un compus pentru utilizare în tratamentul leucemiei mieloid acute, mielomului multiplu, leucemiei B-prolimfocitare, limfomului non-Hodgkin, limfomului difuz cu celule B mari, limfomului anaplastic cu celule mari, limfomului cu celule manta, cancerului la sân triplu negativ, melanomului, cancerului la prostată, sau cancerului la esofag, în care compusul este selectat dintre:

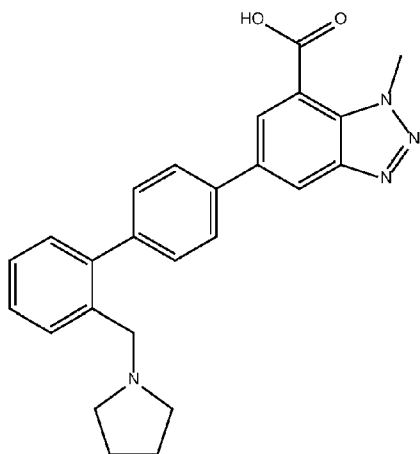
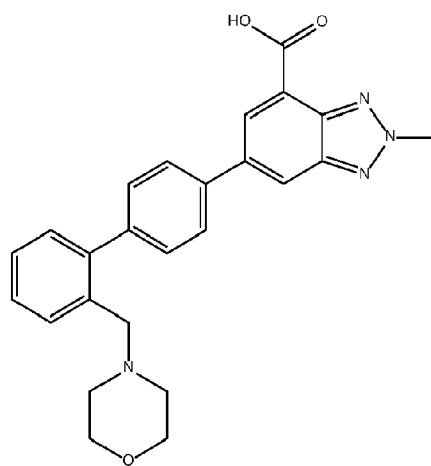
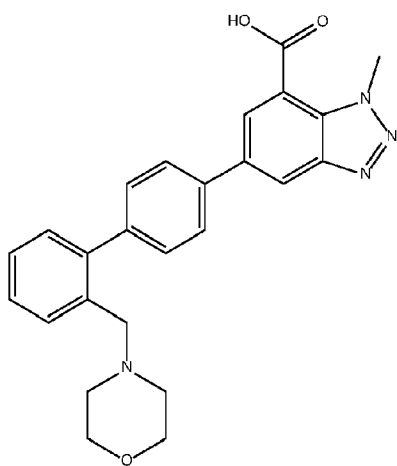
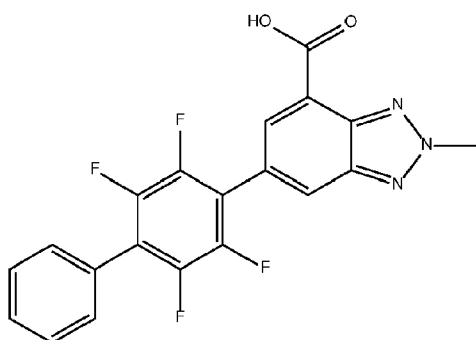
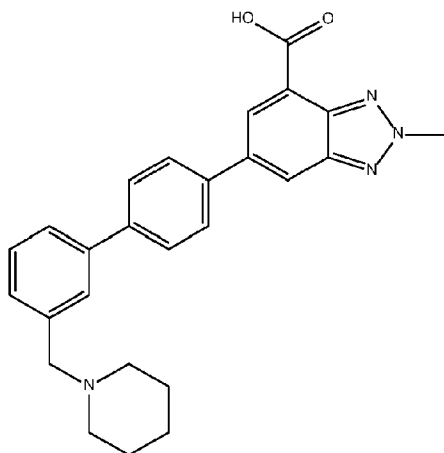


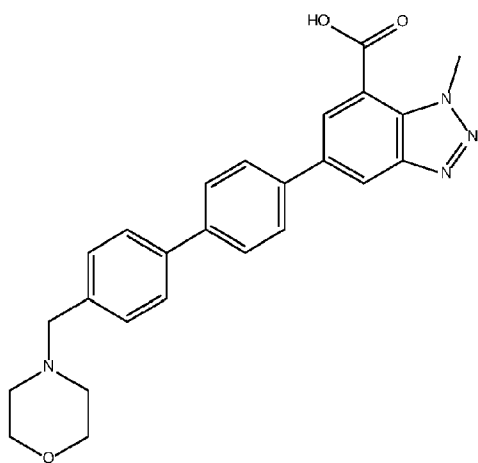
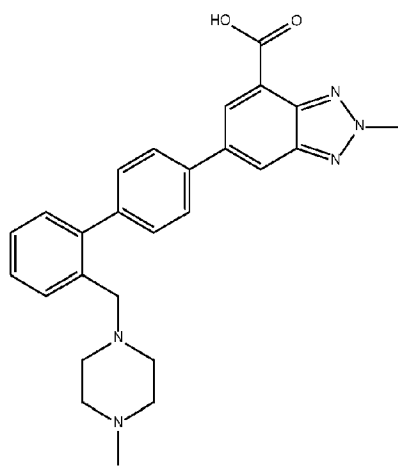
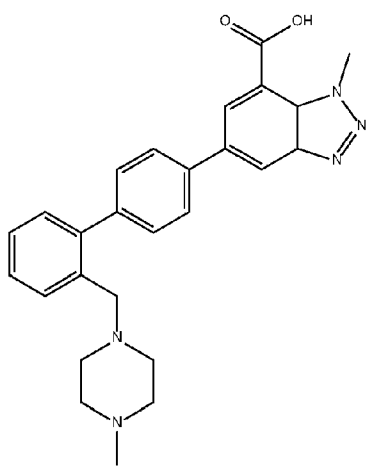
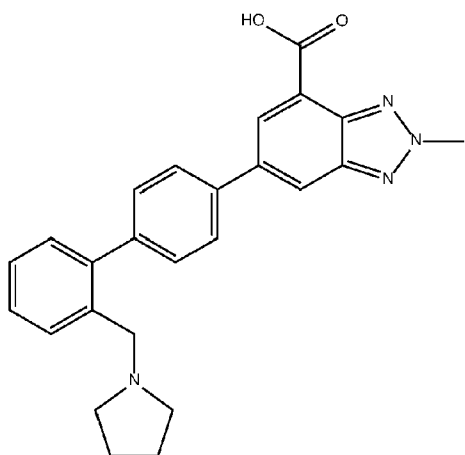


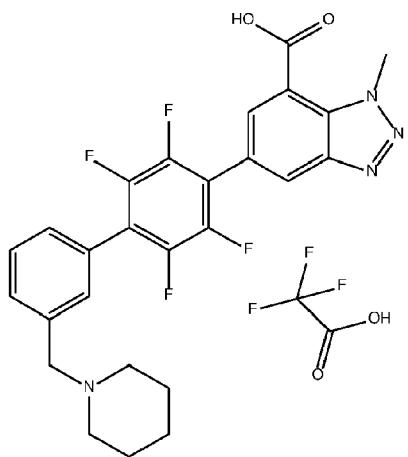
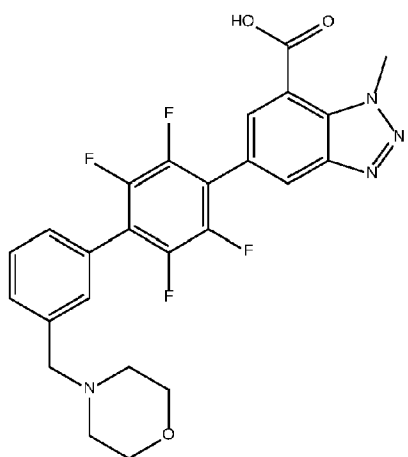
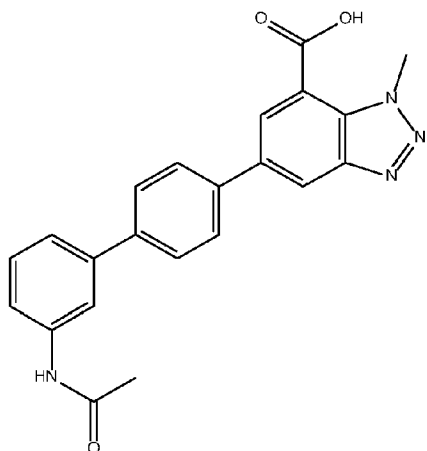


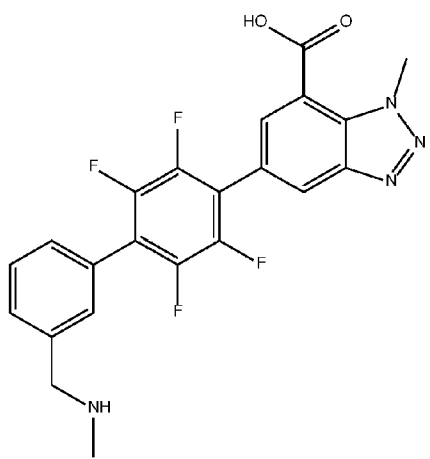
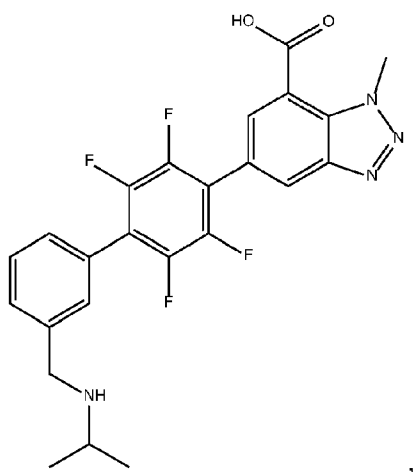
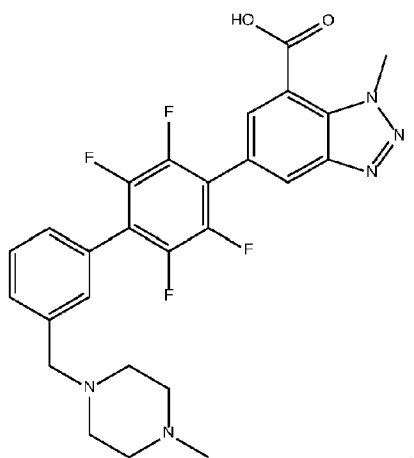


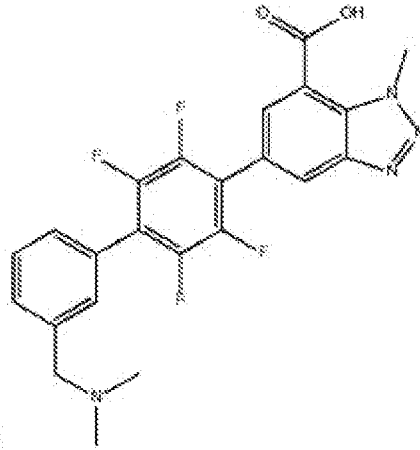
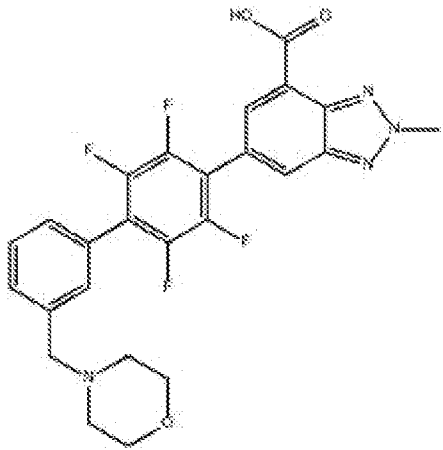
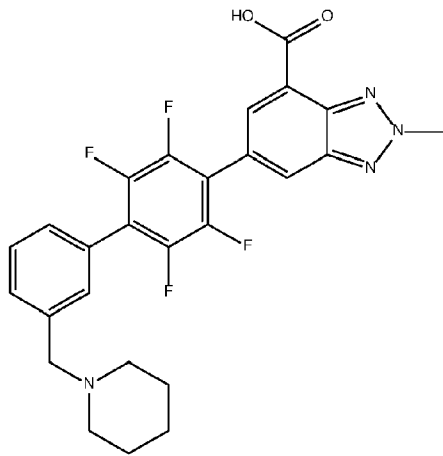












sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

2. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul leucemiei mieloide acute.

3. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul mielomului multiplu.

4. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul leucemiei B-prolimfocitare.

5. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul limfomului non-Hodgkin.

6. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul limfomului difuz cu celule B mari.

7. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul limfomului anaplastic cu celule mari.

8. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul limfomului cu celule manta.

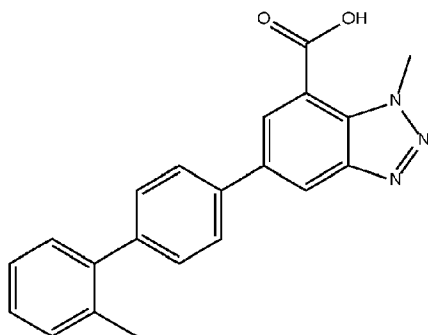
9. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul cancerului la san triplu negativ.

10. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul melanomului.

11. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul cancerului la prostată.

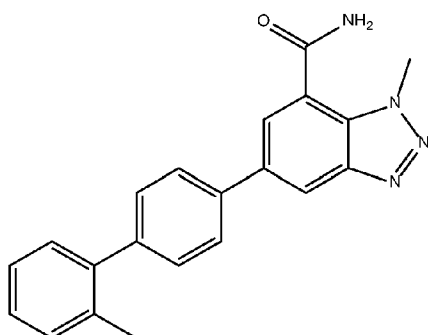
12. Compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în tratamentul cancerului la esofag.

13. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-12, în care compusul este



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

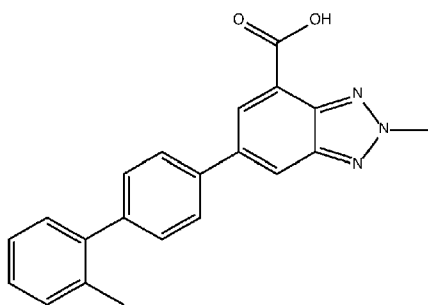
14. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-12, în care compusul este



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

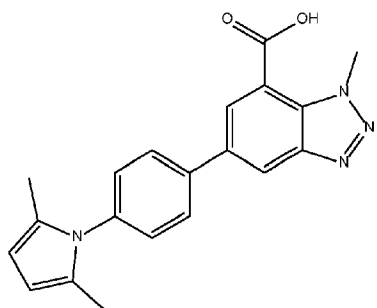
15. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-12, în care compusul este:

a)

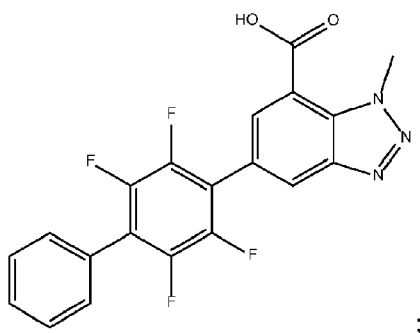


;

b)

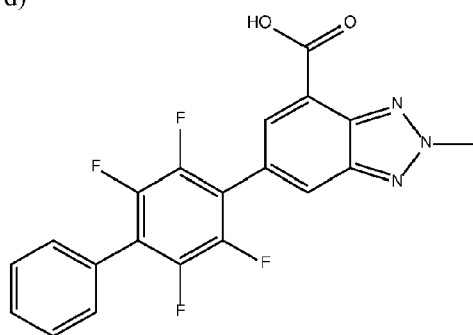


c)



sau

d)



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

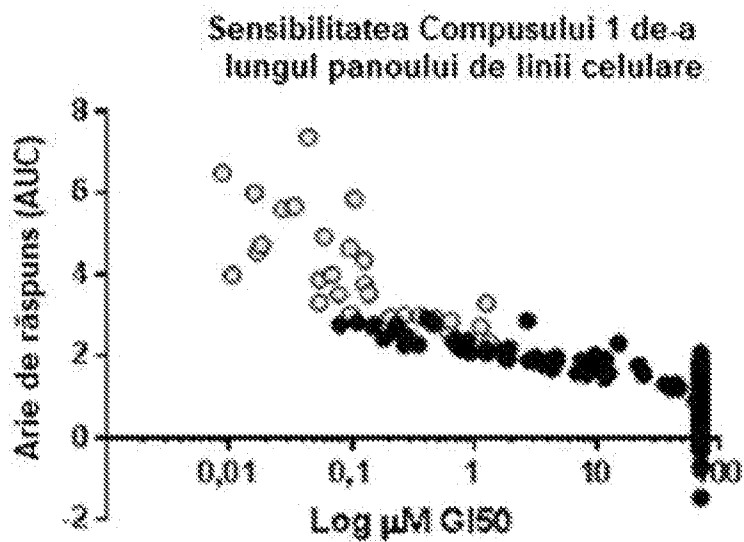


FIG. 1

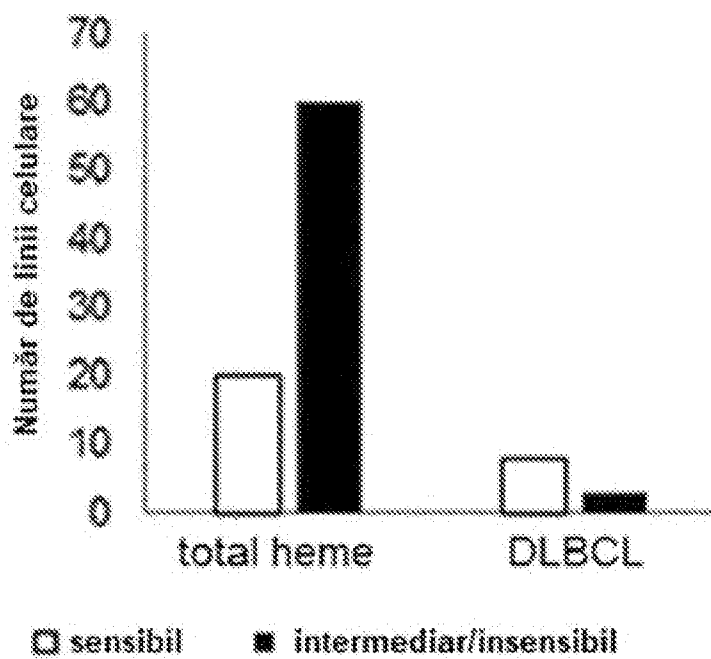


FIG. 2

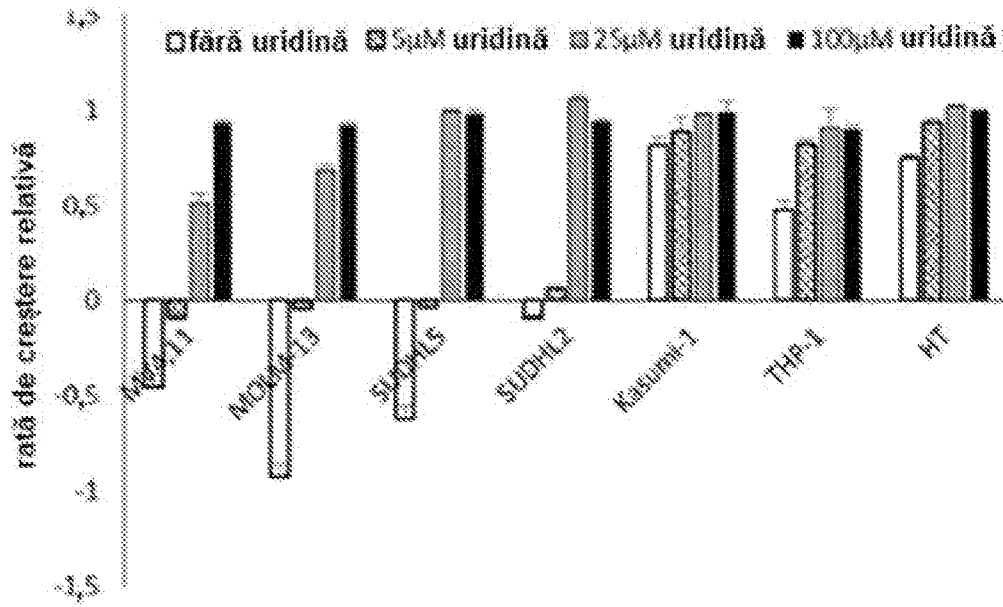


FIG. 3

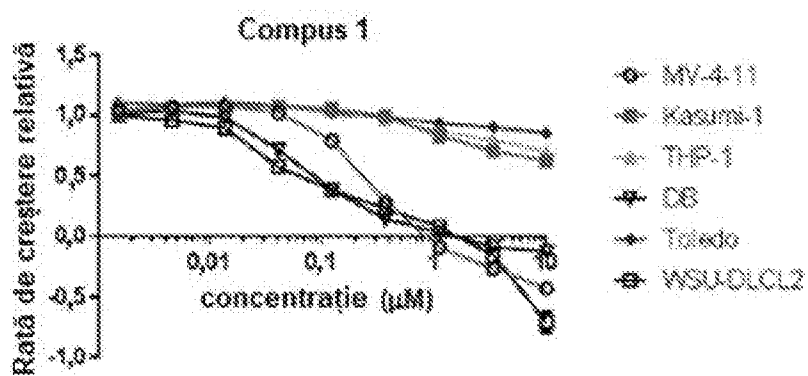


FIG. 4A

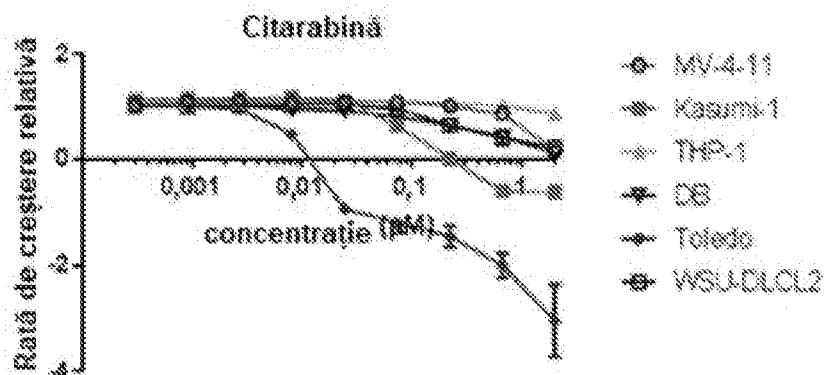


FIG. 4B

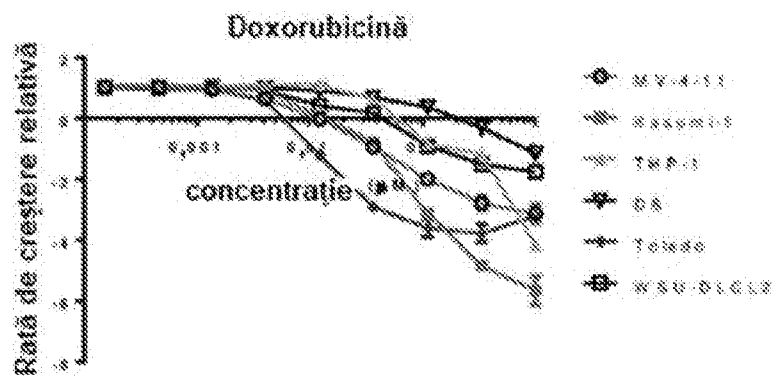


FIG. 4C

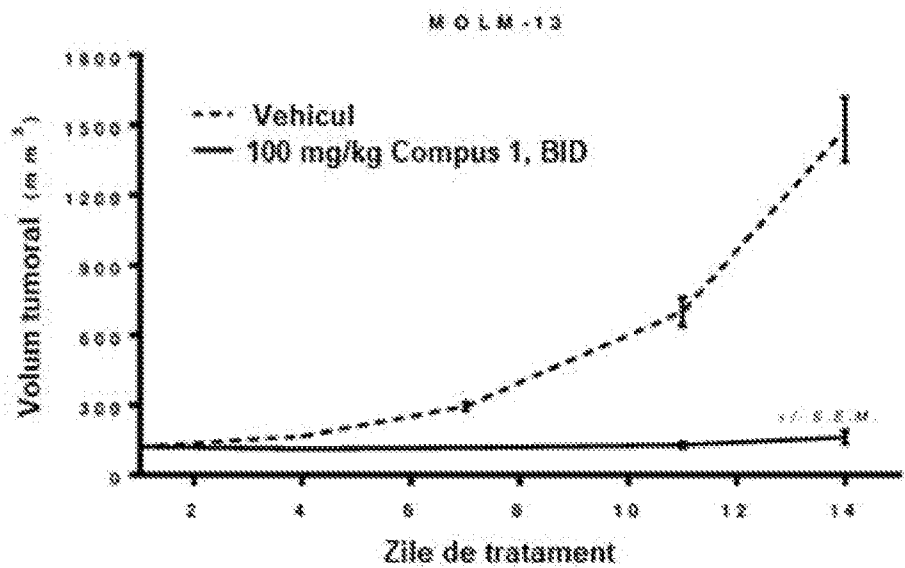


FIG. 5A

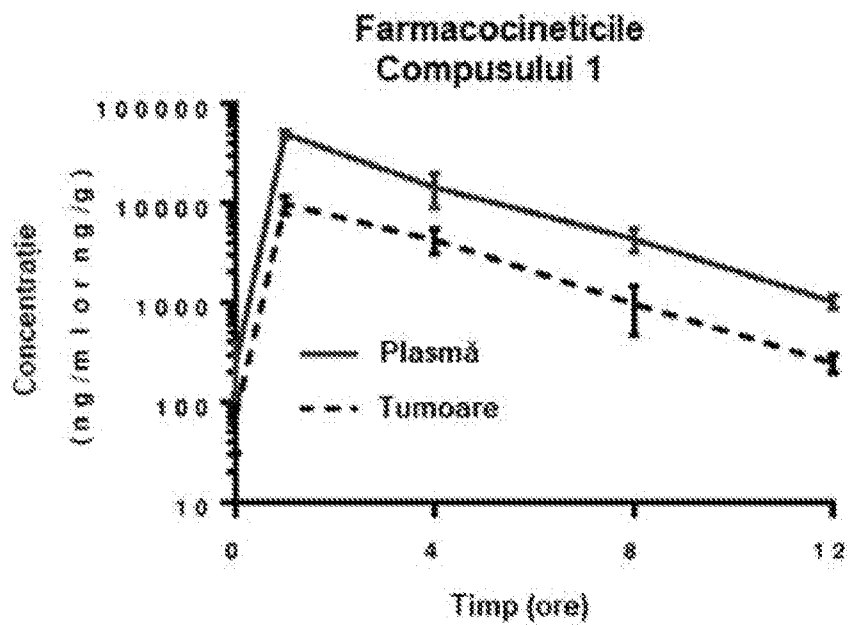


FIG. 5B

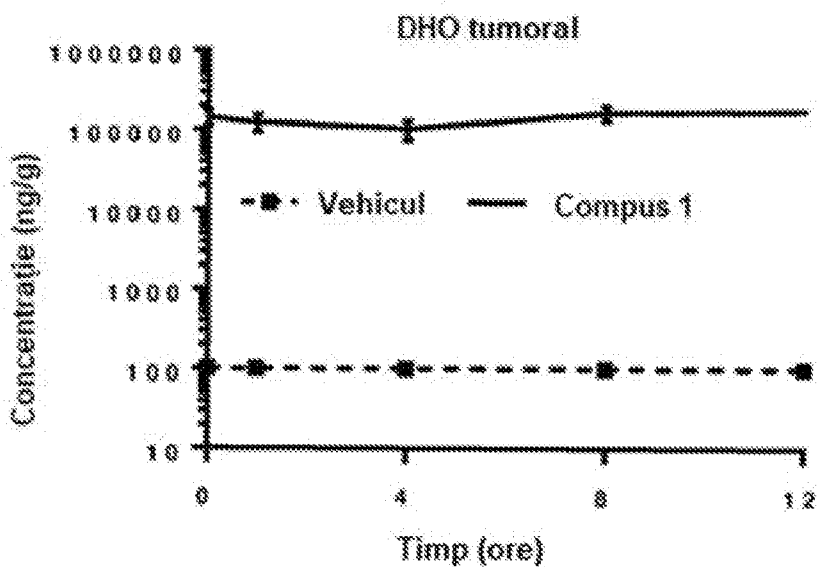


FIG. 5C

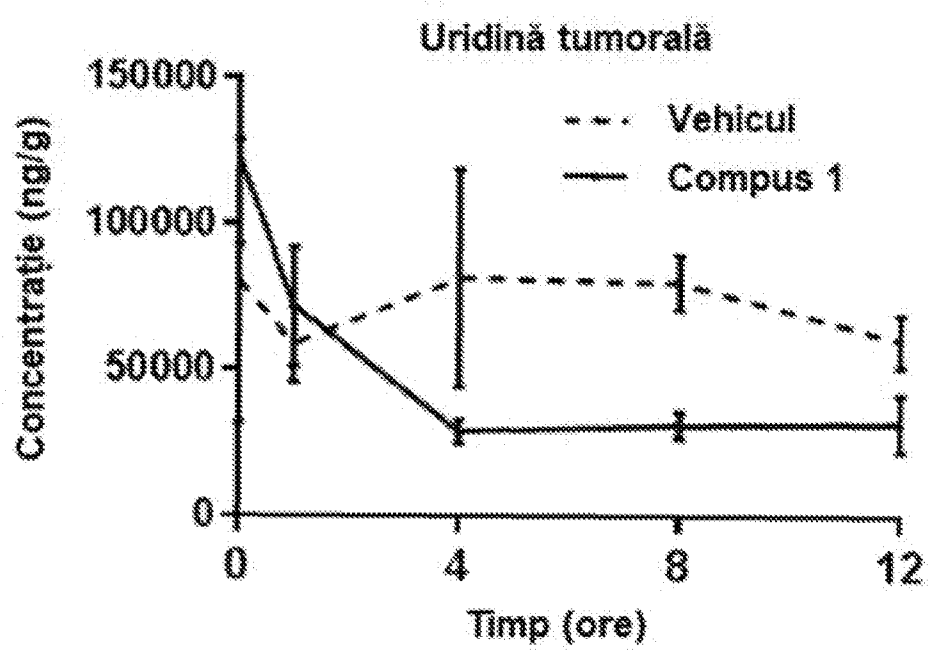


FIG. 5D

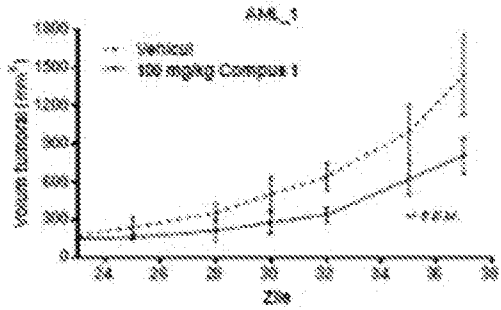


FIG. 6A

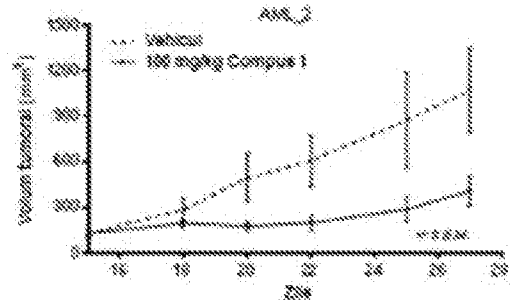


FIG. 6B

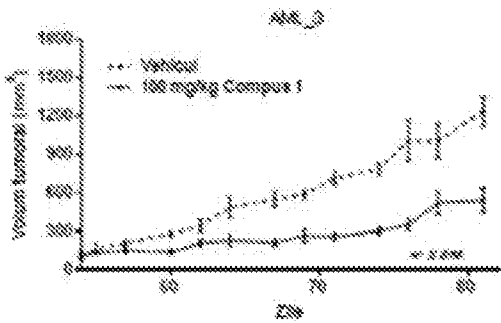


FIG. 6C

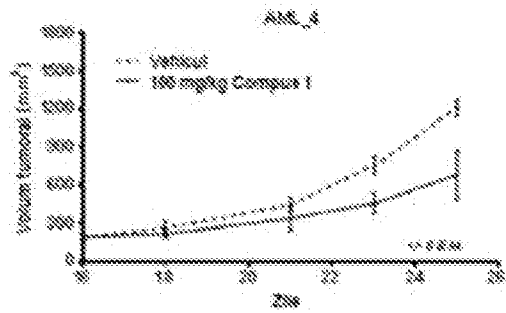


FIG. 6D

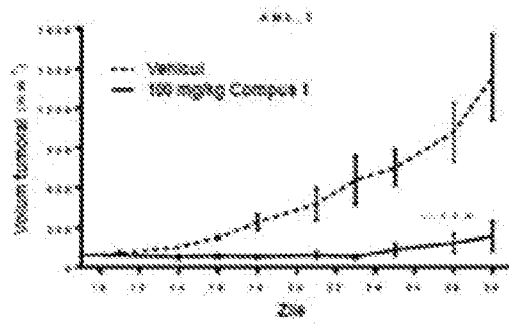


FIG. 6E

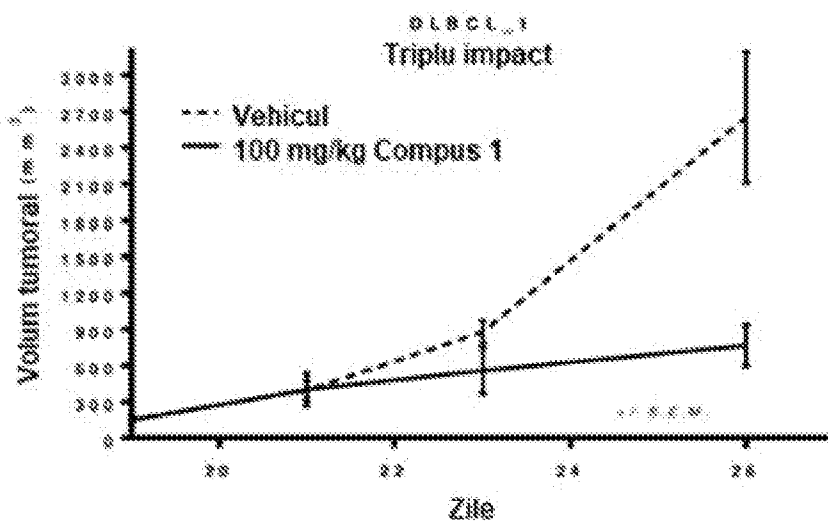


FIG. 7A

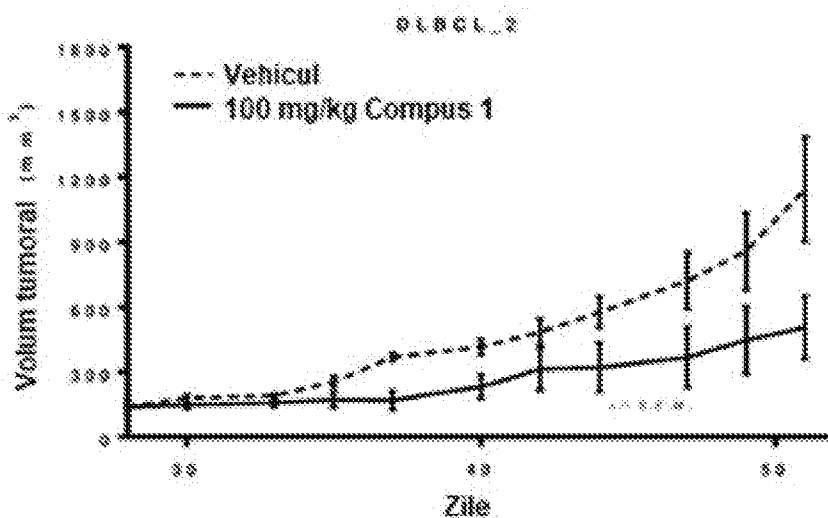


FIG. 7B

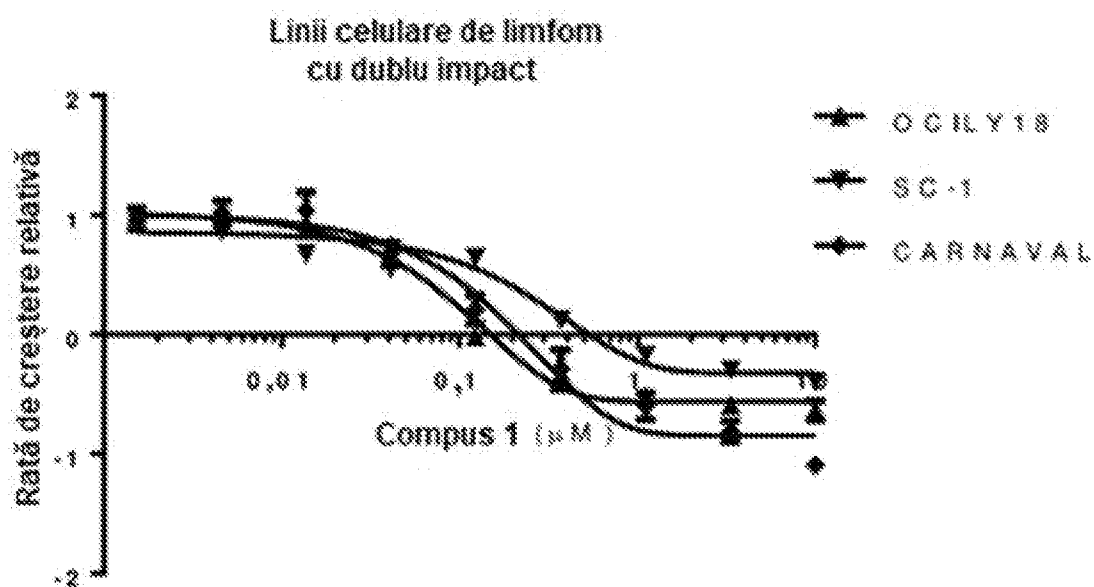


FIG. 8

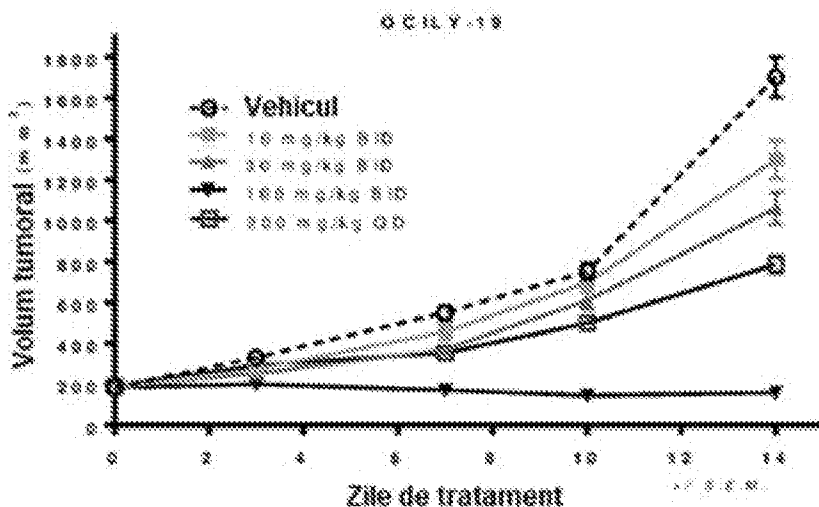


FIG. 9A

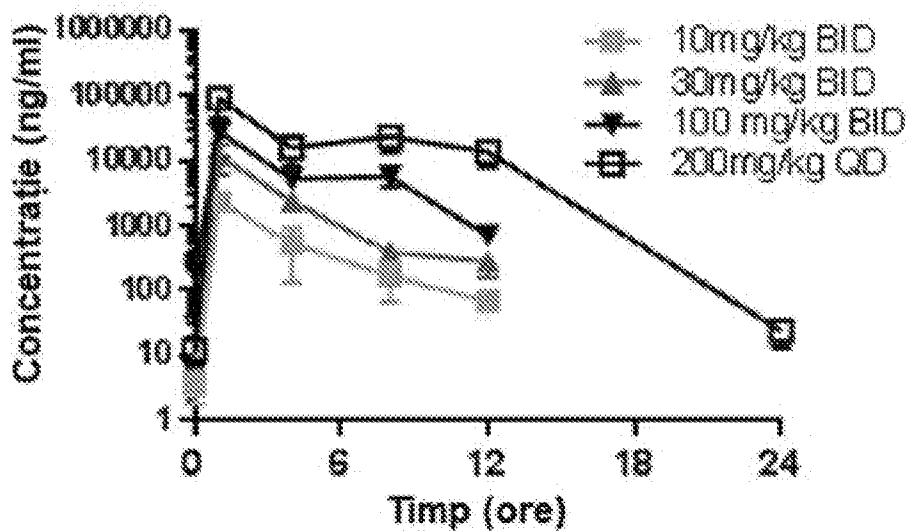


FIG. 9B

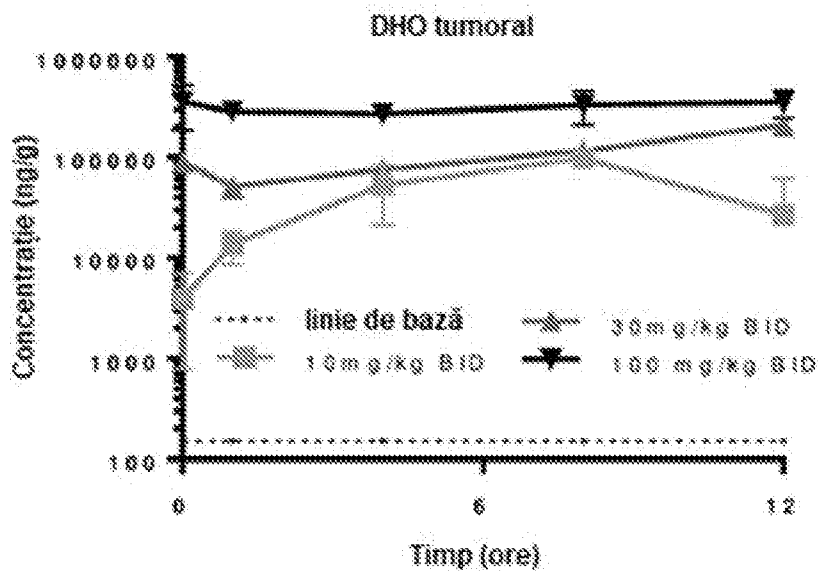


FIG. 9C

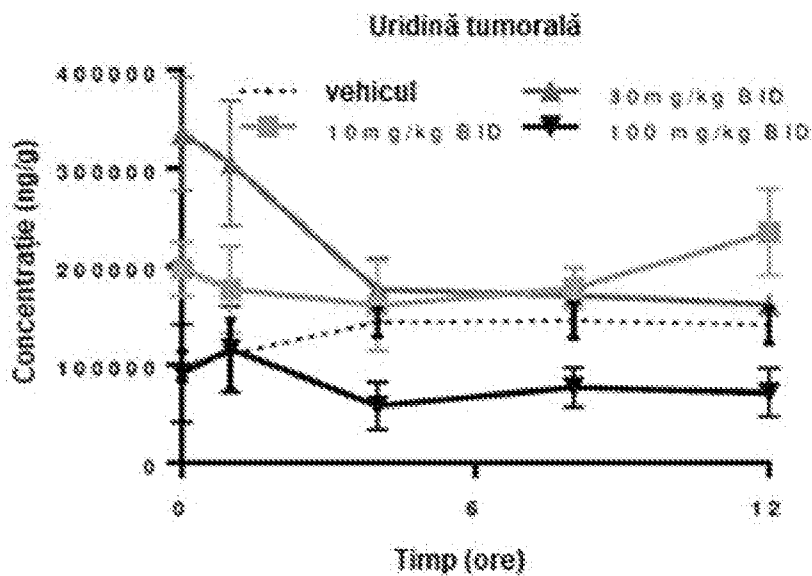


FIG. 9D

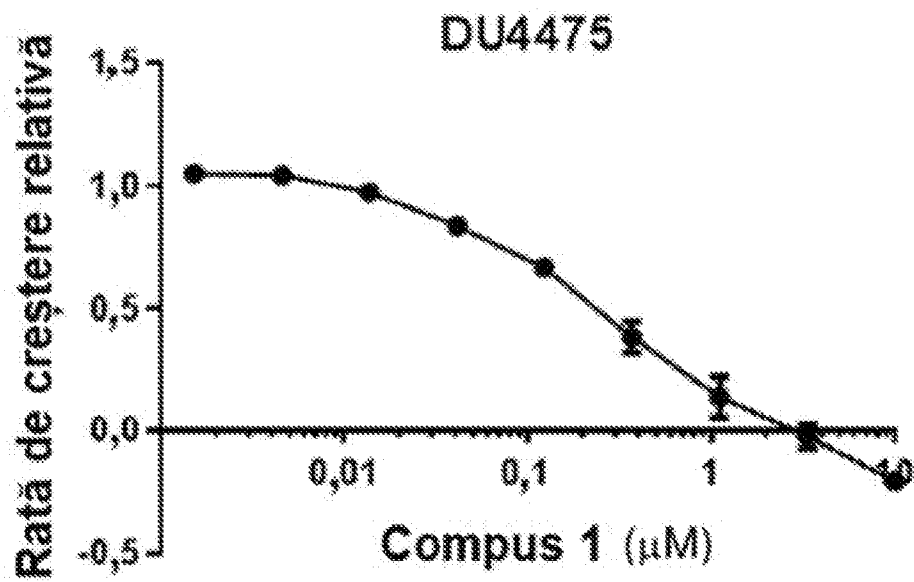


FIG. 10