

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034674**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.05

(51) Int. Cl. **C07D 401/06** (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)

(21) Номер заявки
201592242

(22) Дата подачи заявки
2014.05.23

(54) **ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРИДОНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ, В КОТОРОЕ
ВОВЛЕЧЕНЫ МОДУЛЯЦИИ TLR7 И/ИЛИ TLR8**

(31) **13169076.0**

(56) WO-A1-2009067081
WO-A2-2010007116

(32) **2013.05.24**

(33) **EP**

(43) **2016.04.29**

(86) **PCT/EP2014/060603**

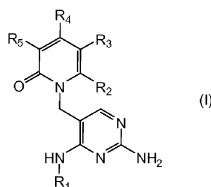
(87) **WO 2014/187932 2014.11.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
ЮСи (IE)**

(72) Изобретатель:
**Мак Гоуен Дэвид Крейг, Рабуассон
Пьер Жан-Мари Бернар (BE)**

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

(57) Изобретение относится к производным пиридона формулы (I), фармацевтическим композициям и их применению в терапии для лечения нарушения, в которое вовлечены модуляции TLR7 и/или TLR8

**B1****034674****034674****B1**

Настоящее изобретение относится к производным пиридона, фармацевтическим композициям и их применению в терапии.

Настоящее изобретение относится к применению производных пиридона в лечении вирусных инфекций, иммунных или воспалительных нарушений, в которое вовлечены модуляция или агонизм толл-подобных рецепторов (TLR). Толл-подобные рецепторы представляют собой основные трансмембранные белки, характеризующиеся внеклеточным лейцин-богатым доменом и цитоплазматическим расширением, которое содержит консервативную область. Врожденная иммунная система может распознавать патогенассоциированные молекулярные паттерны посредством данных TLR, экспрессируемых на клеточной поверхности определенных типов иммунных клеток. При распознавании чужеродных патогенов активируется выработка цитокинов и повышается экспрессия ко-стимулирующих молекул на фагоцитах. Это приводит к модуляции поведения Т-клеток.

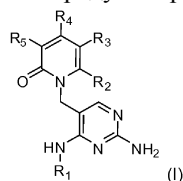
Установлено, что большинство видов млекопитающих имеют от 10 до 15 типов толл-подобных рецепторов. В общей сложности у человека и мыши было идентифицировано 13 TLR (называемых просто TLR1-TLR13), и эквивалентные формы многих из них были обнаружены у других видов млекопитающих. Тем не менее, эквиваленты определенных TLR, обнаруженных у человека, не присутствуют у всех млекопитающих. Например, ген, кодирующий белок, аналогичный TLR10 человека, присутствует у мыши, но, по-видимому, в некоторый момент времени в прошлом был поврежден ретровирусом. С другой стороны, у мыши экспрессируются TLR 11, 12 и 13, ни один из которых не представлен у человека. У других млекопитающих могут экспрессироваться TLR, которые не обнаружены у человека. Другие виды, не являющиеся млекопитающими, могут иметь TLR, отличные от таковых млекопитающих, доказательством этому служит TLR14, обнаруженный у рыбы фугу рода *Takifugu*. Это может осложнить процедуру использования экспериментальных животных в качестве моделей врожденного иммунитета человека.

Для подробного обзора толл-подобных рецепторов см. следующие статьи в журналах: Hoffmann, J.A., *Nature*, 426, p.33-38, 2003; Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T., *Annual Rev. Immunology*, 21, p.335-376, 2003; Ulevitch, R. J., *Nature Reviews: Immunology*, 4, p.512-520, 2004.

Ранее были описаны соединения, проявляющие активность в отношении толл-подобных рецепторов, такие как производные пурина в WO 2006/117670, производные аденина в WO 98/01448 и WO 99/28321 и пиримидины в WO 2009/067081.

Тем не менее, существует острая потребность в новых модуляторах толл-подобных рецепторов, обладающих предпочтительной селективностью, а также улучшенным профилем безопасности по сравнению с соединениями из известного уровня техники.

В соответствии с настоящим изобретением предусмотрено соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль, где

R₁ представляет собой C₁₋₆алкил, необязательно замещенный C₁₋₃алкилом;

R₂, R₃, R₄ и R₅ независимо выбирают из водорода, галогена, C₁₋₃алкила или -CF₃;

или где

R₂ конденсирован с R₃ с образованием фенила.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I), где R₁ представляет собой н-бутил, и где R₂ конденсирован с R₃ с образованием кольцевой структуры.

Соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемая соль обладают активностью фармацевтических препаратов, в частности, как модуляторы активности толл-подобных рецепторов TLR7 и/или TLR8, в особенности активности TLR7.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

Кроме того, соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическую композицию, содержащую указанное соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, можно применять в качестве лекарственного препарата.

Другой аспект настоящего изобретения состоит в том, что соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, или указанную фармацевтическую композицию, содержащую указанное соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, соответственно можно применять в лечении какого-либо нарушения, в которое вовлечены модуляции TLR7 и/или TLR8.

Термин "алкил" относится к насыщенному алифатическому углеводороду с неразветвленной цепью или разветвленной цепью, содержащему определенное количество атомов углерода.

Термин "галоген" относится к фтору, хлору, бром или йоду.

Фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I) включают их соли присоединения кислоты и основные соли. Подходящие соли присоединения кислоты образуются из кислот, которые образуют нетоксичные соли. Подходящие основные соли образуются из оснований, которые образуют нетоксичные соли.

Соединения по настоящему изобретению можно вводить в виде кристаллических или аморфных продуктов. Их можно получать, например, в виде твердой прессованной массы, порошков или пленок посредством таких способов, как осаждение, кристаллизация, сушка вымораживанием, сушка распылением или сушка выпариванием. Их можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими соединениями по настоящему изобретению или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами. Как правило, их будут вводить в виде состава в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями. Термин "наполнитель" используется в данном документе для описания любого ингредиента, отличного от соединения (соединений) по настоящему изобретению. Выбор наполнителя в большей степени зависит от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние наполнителя на растворимость и стабильность и природа лекарственной формы.

Соединения по настоящему изобретению или любая их подгруппа могут быть составлены в различные фармацевтические формы для целей введения. В качестве подходящих композиций могут быть упомянуты все композиции, обычно применяемые для системного введения лекарственных средств. Для получения фармацевтических композиций по настоящему изобретению эффективное количество конкретного соединения, необязательно в форме соли присоединения, в качестве активного ингредиента объединяют в однородную смесь с фармацевтически приемлемым носителем, при этом носитель может принимать самые разнообразные формы в зависимости от формы препарата, требуемой для введения. Данные фармацевтические композиции предпочтительно представлены в виде единичной лекарственной формы, подходящей, например, для перорального, ректального или чрескожного введения. Например, при получении композиций в виде пероральной лекарственной формы можно использовать любую общепринятую фармацевтическую среду, такую как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п., в случае пероральных жидких препаратов, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, разбавители, смазывающие вещества, связующие вещества, разрыхлители и т.п., в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Вследствие простоты их введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные формы единиц дозирования для перорального введения, в случае которых, как очевидно, применяют твердые фармацевтические носители. Также включены препараты в твердой форме, которые могут быть преобразованы непосредственно перед применением в препараты в жидких формах. В композициях, подходящих для чрескожного введения, носитель необязательно содержит средство, повышающее проницаемость, и/или подходящее смачивающее средство, необязательно в комбинации с подходящими добавками любой природы в минимальных пропорциях, при этом добавки не оказывают значительного вредного воздействия на кожу. Указанные добавки могут облегчать введение в кожу и/или могут быть полезными при получении необходимых композиций. Данные композиции можно вводить различными путями, например в форме трансдермального пластыря, в форме точечного нанесения, в форме мази. Соединения по настоящему изобретению также можно вводить посредством ингаляции или инсуффляции с помощью способов и составов, применяемых в данной области для введения таким путем. Таким образом, в основном соединения по настоящему изобретению можно вводить в легкие в форме раствора, суспензии или сухого порошка.

Особенно предпочтительным является составление вышеуказанных фармацевтических композиций в виде единичной лекарственной формы для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, как используется в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз, при этом каждая единица содержит заранее установленное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Примерами таких единичных лекарственных форм являются таблетки (в том числе делимые или покрытые оболочкой таблетки), капсулы, пилюли, пакетики с порошком, пластинки, суппозитории, растворы или суспензии для инъекций и т.п., а также их отдельные множества.

Специалисты в области лечения инфекционных заболеваний смогут определить эффективное количество исходя из результатов тестов, представленных далее в данном документе. В целом, предполагается, что эффективное суточное количество будет составлять от 0,01 до 50 мг/кг массы тела, более предпочтительно от 0,1 до 10 мг/кг массы тела. Может быть целесообразным введение необходимой дозы в виде двух, трех, четырех или более частей дозы через соответствующие интервалы на протяжении дня. Указанные части дозы могут быть составлены в виде единичных лекарственных форм, например, содержащих 1-1000 мг и, в частности, 5-200 мг активного ингредиента на единичную лекарственную форму.

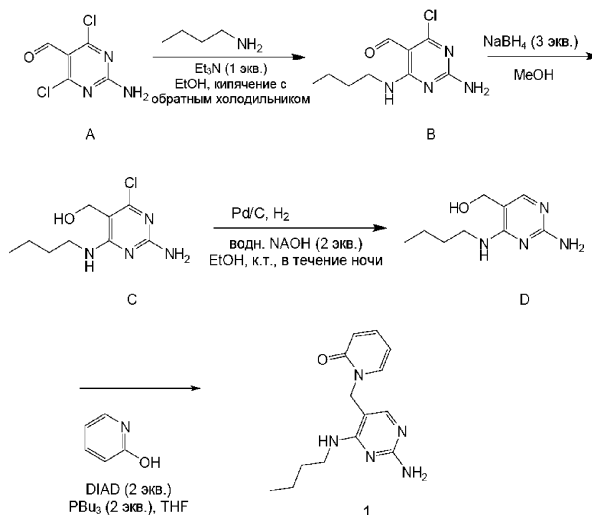
Точная дозировка и частота введения зависят от конкретного используемого соединения формулы (I), конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, подлежащего лечению, возраста, веса и общего физического состояния конкретного пациента, а также другого медикаментозного лечения,

которое может получать индивидуум, что хорошо известно специалистам в данной области. Более того, очевидно, что эффективное количество может быть снижено или увеличено в зависимости от реакции подвергнутого лечению субъекта и/или в зависимости от оценки врача, назначающего соединения по настоящему изобретению. Таким образом, вышеупомянутые диапазоны эффективного количества являются только рекомендациями и не предназначены для ограничения в той или иной мере объема или применения настоящего изобретения.

Получение соединений.

Соединения формулы (I) получают согласно схеме 1.

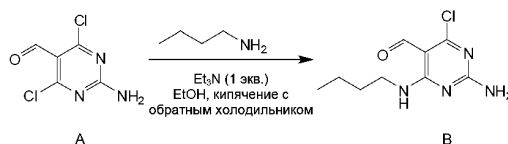
Схема 1 (где получение 1 показано в качестве примера)



Соединения типа А на схеме 1 можно функционализировать с помощью аминов в условиях нагревания в полярном растворителе, например этаноле, с основанием (например, триэтиламино) или без него. Альдегидную группу В можно превращать в спирт с помощью восстановителя, как NaBH_4 , в полярном растворителе (например, метаноле). Хлор в соединениях типа С можно удалять с применением Pd/C в атмосфере водорода и основных условий. Спиртовую группу затем функционализируют при стандартных условиях реакции Мицунобу с получением пиридоновых конечных продуктов.

Получение промежуточных продуктов А и В описано в литературе (Bioorganic and Medicinal Chemistry 11, 2003, p4161; J. Heterocyclic Chem., 20, 41 (1983); Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 13 (2003) p.217).

Получение В

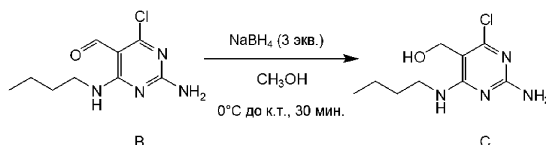


А (10,0 г, 52,08 ммоль) добавляли в этанол (100 мл), затем в раствор добавляли н-бутиламин (3,81 г, 52,08 ммоль) и триэтиламин (5,27 г, 52,08 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 8 ч. Обеспечивали охлаждение раствора до 0°C , и твердое вещество выделяли посредством фильтрации и промывали этанолом, затем высушивали в вакууме с получением В (10 г).

LC-MS масса/заряд=229 (M+H); 1,20 мин.

^1H ЯМР (400 МГц, d-Хлороформ) δ м.д. 0,95 (т, 3H), 1,31-1,42 (м, 2H), 1,53-1,65 (м, 2H), 3,40-3,50 (м, 2H), 5,11 (уш.с, 2H), 9,22 (уш.с, 1H), 10,07 (с, 1H)

Получение С



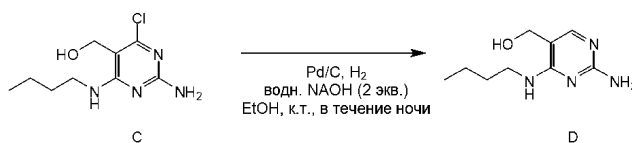
NaBH_4 (4 г, 105,73 ммоль) добавляли небольшими порциями в смесь В (8,0 г, 35 ммоль) в метаноле при 0°C . Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь медленно обрабатывали насыщенным NaHCO_3 (100 мл) и H_2O (100 мл) при 0°C , затем перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Осадок выделяли с помощью фильтрации и промывали водой (50 мл) и с помощью этилацетата:метил-трет-бутилового эфира (1:5). Фильтрат экстрагировали этилацетатом (2×200 мл). Объединенные органические слои промывали соевым раствором, сушили (Na_2SO_4), твердые вещества удаляли с помощью фильтрации, и растворитель из фильтрата удаляли при пониженном давлении. Остаток обрабатывали этилацетатом:метил-трет-бутиловым эфиром (1:5). Осадок выделяли с помощью филь-

трации и промывали метил-трет-бутиловым эфиром. Осадки объединяли и сушили (вакуум, 50°C, 30 мин) с получением С.

LC-MS масса/заряд=231 (M+H), 0,90 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 0,90 (т, 3H), 1,31 (м, 2H), 1,50 (м, 2H), 3,28 (м, 2H), 4,4 (м, 2H), 4,92 (м, 1H), 6,29 (уш.с, 2H), 6,55 (м, 1H).

Получение D

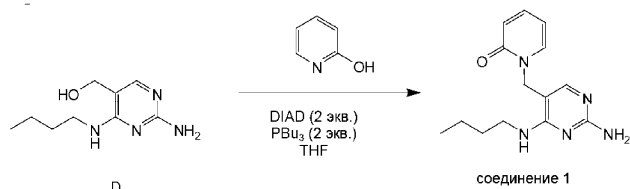


Раствор NaOH (1,6 г, 40 ммоль) в H₂O (5 мл) добавляли в раствор С (5,8 г, 21,37 ммоль, чистота 85%) в этаноле (150 мл) при комнатной температуре. К нему добавляли 10% Pd/C (0,6 г). Колбу герметизировали и подвергали действию газообразного водорода в течение 15 ч. Газообразный водород удаляли и заменяли азотом, катализатор удаляли с помощью фильтрации, и растворитель из фильтрата удаляли при пониженном давлении. Добавляли этилацетат, и смесь промывали H₂O, соевым раствором, сушили (Na₂SO₄). Твердые вещества удаляли посредством фильтрации, и растворитель из фильтрата удаляли при пониженном давлении. Остаток промывали метил-трет-бутиловым эфиром. Осадок выделяли с помощью фильтрации и промывали метил-трет-бутиловым эфиром. Твердое вещество собирали и сушили (вакуум, 50°C, 30 мин) с получением D.

LC-MS масса/заряд=197 (M+H); 3,21 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 0,90 (т, J=7,4 Гц, 3H), 1,24-1,41 (м, 2H), 1,41-1,59 (м, 2H), 3,23-3,34 (м, 2H), 4,21 (уш.с, 2H), 4,85 (уш.с, 1H), 5,87 (с, 2H), 6,19 (т, J=5,3 Гц, 1H), 7,50 (с, 1H).

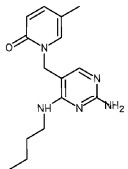
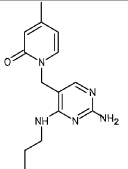
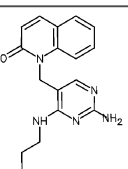
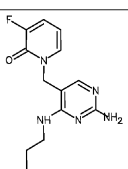
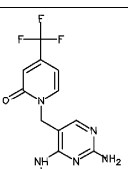
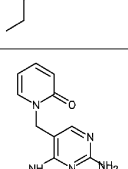
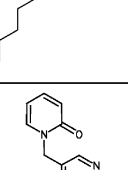
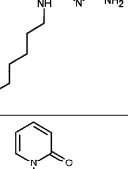
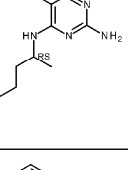
Получение соединения 1



DIAD (1,3 г, 6,429 ммоль) добавляли в смесь D (0,5 г, 2,29 ммоль, чистота 90%), 2-гидроксипиридина (0,326 г, 3,43 ммоль) и трибутилфосфина (1,34 г, 6,62 ммоль) в безводном THF (10 мл) при 0°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и затем кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Смесь выпаривали в вакууме. Остаток обрабатывали петролейным эфиром:метил-трет-бутиловым эфиром (1:1). Смесь выпаривали при пониженном давлении. Добавляли метил-трет-бутиловый эфир. Смесь перемешивали при 0°C в течение 20 мин. Осадок выделяли с помощью фильтрации и промывали метил-трет-бутиловым эфиром. Твердое вещество собирали и сушили (вакуум, 50°C, 30 мин) с получением 1.

Соединения формулы (I)

№ соед.	СТРУКТУРА	¹ H ЯМР	LC-метод, к.т. (минуты)
1		¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d ₆) δ м.д. 0,85 (т, J=7,4 Гц, 3 H), 1,26 (д кв., J=15,0, 7,3 Гц, 2 H), 1,44 (кв, J=7,2 Гц, 2 H), 3,19-3,27 (м, 2 H), 4,79 (с, 2 H), 6,02 (с, 2 H), 6,33 (тд, J=6,7, 1,3 Гц, 1 H), 6,48 (д, J=8,8 Гц, 1 H), 7,30 (т, J=5,0 Гц, 1 H), 7,45 (дд, J=9,0, 6,8, 2,0 Гц, 1 H), 7,74 (дд, J=6,8, 1,5 Гц, 1 H), 7,85 (с, 1 H)	А, 3,77
2		¹ H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ-d ₄) δ м.д. 0,94 (т, J=7,3 Гц, 3 H), 1,29-1,42 (м, 2 H), 1,62 (кв., J=7,3 Гц, 2 H), 2,51 (с, 3 H), 3,52 (т, J=6,9 Гц, 2 H), 5,18 (с, 2 H), 6,43 (д, J=6,8 Гц, 1 H), 6,57 (д, J=9,0 Гц, 1 H), 7,46-7,57 (м, 2 H)	А, 3,82

3		^1H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ- d_4) δ м.д. 0,94 (т, $J=7,4$ Гц, 3 Н), 1,27-1,40 (м, 2 Н), 1,55-1,65 (м, 2 Н), 2,14 (с, 3 Н), 3,49 (т, $J=7,0$ Гц, 2 Н), 4,97 (с, 2 Н), 6,60 (д, $J=9,3$ Гц, 1 Н), 7,50 (дд, $J=9,2$, 2,4 Гц, 1 Н), 7,58 (с, 1 Н), 7,91 (с, 1 Н)	А, 3,84
4		^1H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ- d_4) δ м.д. 0,95 (т, $J=7,4$ Гц, 3 Н), 1,35 (дд, $J=14,9$, 7,4 Гц, 2 Н), 1,52-1,62 (м, 2 Н), 2,25 (с, 3 Н), 3,36 (т, $J=7,0$ Гц, 2 Н), 4,91 (с, 2 Н), 6,37 (дд, $J=7,0$, 2,0 Гц, 1 Н), 6,45 (с, 1 Н), 7,57 (д, $J=7,0$ Гц, 1 Н), 7,82 (с, 1 Н)	А, 3,98
5		^1H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ- d_4) δ м.д. 0,98 (т, $J=7,4$ Гц, 3 Н), 1,34-1,47 (м, 2 Н), 1,67 (кв., $J=7,4$ Гц, 2 Н), 3,53-3,60 (м, 2 Н), 5,34 (с, 2 Н), 6,78 (д, $J=9,5$ Гц, 1 Н), 7,34-7,42 (м, 1 Н), 7,51 (с, 1 Н), 7,58 (д, $J=8,5$ Гц, 1 Н), 7,65-7,73 (м, 1 Н), 7,79 (д, $J=7,8$ Гц, 1 Н), 8,05 (д, $J=9,3$ Гц, 1 Н)	А, 4,29
6		^1H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ- d_4) δ м.д. 0,96 (т, $J=7,3$ Гц, 3 Н), 1,37 (с, $J=7,5$ Гц, 2 Н), 1,58-1,69 (м, 2 Н), 3,53 (т, $J=7,0$ Гц, 2 Н), 5,09 (с, 2 Н), 6,45-6,53 (м, 1 Н), 7,46 (т, $J=8,3$ Гц, 1 Н), 7,66 (уш.с, 1 Н), 7,95 (уш.с, 1 Н)	А, 3,26
7		^1H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ- d_4) δ м.д. 0,92 (т, $J=7,4$ Гц, 3 Н), 1,33 (д кв., $J=15,0$, 7,4 Гц, 2 Н), 1,55 (кв., $J=7,2$ Гц, 2 Н), 3,36 (т, $J=6,9$ Гц, 2 Н), 4,97 (с, 2 Н), 6,61 (дд, $J=7,3$, 2,0 Гц, 1 Н), 6,88 (с, 1 Н), 7,84 (с, 1 Н), 7,89 (д, $J=7,3$ Гц, 1 Н)	А, 4,33
8		^1H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ- d_4) δ м.д. 0,91 (т, $J=7,0$ Гц, 3 Н), 1,18-1,40 (м, 4 Н), 1,59 (кв., $J=7,2$ Гц, 2 Н), 3,35-3,39 (м, 2 Н), 4,96 (с, 2 Н), 6,48 (тд, $J=6,8$, 1,3 Гц, 1 Н), 6,63 (д, $J=9,0$ Гц, 1 Н), 7,57 (ддд, $J=9,0$, 6,8, 2,0 Гц, 1 Н), 7,71 (дд, $J=6,8$, 1,8 Гц, 1 Н), 7,85 (с, 1 Н), способные к обмену протоны не обнаружены.	А, 4,12
9		^1H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ- d_4) δ м.д. 0,87-0,95 (м, 3 Н), 1,28-1,37 (м, 6 Н), 1,53-1,64 (м, 2 Н), 3,37 (т, $J=7,0$ Гц, 2 Н), 4,96 (с, 2 Н), 6,45-6,54 (м, 1 Н), 6,63 (д, $J=9,0$ Гц, 1 Н), 7,57 (ддд, $J=9,0$, 6,8, 2,0 Гц, 1 Н), 7,71 (дд, $J=6,8$, 1,5 Гц, 1 Н), 7,85 (с, 1 Н)	А, 4,47
10		^1H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ- d_4) δ м.д. 0,86 (т, $J=7,2$ Гц, 3 Н), 1,09-1,17 (м, 3 Н), 1,17-1,35 (м, 4 Н), 1,46-1,57 (м, 2 Н), 4,11-4,22 (м, 1 Н), 4,79-4,87 (м, 1 Н), 5,03-5,11 (м, 1 Н), 6,49 (т, $J=6,8$ Гц, 1 Н), 6,63 (д, $J=9,0$ Гц, 1 Н), 7,57 (ддд, $J=9,0$, 6,8, 2,0 Гц, 1 Н), 7,66-7,73 (м, 1 Н), 7,85 (с, 1 Н)	А, 4,31
11		^1H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ- d_4) δ м.д. 0,88 (т, $J=7,3$ Гц, 3 Н), 1,13 (д, $J=6,5$ Гц, 3 Н), 1,16-1,33 (м, 2 Н), 1,39-1,63 (м, 2 Н), 4,09-4,25 (м, 1 Н), 4,86 (д, $J=14,8$ Гц, 1 Н), 5,04 (д, $J=14,8$ Гц, 1 Н), 6,47 (тд, $J=6,8$, 1,3 Гц, 1 Н), 6,62 (д, $J=9,0$ Гц, 1 Н), 7,56 (ддд, $J=9,0$, 6,8, 2,0 Гц, 1 Н), 7,69 (дд, $J=6,9$, 1,6 Гц, 1 Н), 7,84 (с, 1 Н)	А, 4,05

Аналитические методы.

Характеристики всех соединений были получены с помощью LC-MS с применением следующего метода.

Метод А.

Колонка	YMC-PACK ODS-AQ, 50×2,0 мм 5 мкм		
Подвижная фаза	А: H ₂ O (0,1% TFA)		
	В: CH ₃ CN (0,05% TFA)		
Градиент	Время остановки: 10 мин.		
	ВРЕМЯ (мин.)	А%	В%
	0	100	0
	1	100	0
	5	40	60
	7,5	40	60
	8	100	0
Скорость потока	0,8 мл/мин.		
Длина волны	УФ 220 нм		
Температура термостата	50°C		
Полярность MS	положительная		
LCMS	Agilent 1100		

Биологическая активность соединений формулы (I).

Описание биологических анализов.

Оценка активности TLR7 и TLR8.

Способность соединений активировать TLR7 и/или TLR8 человека оценивали в клеточном анализе репортерного гена с использованием клеток HEK293, временно трансфицированных вектором экспрессии TLR7 или TLR8 и репортерной конструкцией NFkB-luc.

Вкратце, клетки HEK293 выращивали в культуральной среде (DMEM, дополненной 10% FCS и 2 mM глутамина). Для трансфекции клеток в 15-см чашках клетки отделяли трипсином-EDTA, трансфицировали смесью плазмиды CMV-TLR7 или TLR8 (1700 нг), плазмиды NFkB-luc (850 нг) и трансфекционного реагента и инкубировали в течение 48 ч при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Трансфицированные клетки затем отмывали в PBS, отделяли трипсином-EDTA и ресуспендировали в среде с плотностью 1,25×10⁵ клеток/мл. 40 мкл клеток затем распределяли в каждую лунку в 384-луночных планшетах, где уже содержалось 200 нл соединения в 100% ДМСО. После 6 ч инкубации при 37°C, 5% CO₂, определяли люциферазную активность путем добавления в каждую лунку 15 мкл субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer), и выполняли считывание показаний на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Кривые зависимости доза-эффект строили на основе измерений, выполненных в четырех повторностях. Для каждого соединения определяли значения наиболее низких эффективных концентраций (LEC), определяемых как концентрация, которая индуцирует эффект, который по меньшей мере в два раза превышает стандартное отклонение анализа.

Токсичность соединений определяли параллельно в 384-луночных планшетах с использованием аналогичной серии разведений соединения с клетками, трансфицированными только конструкцией CMV-TLR7 (1,25×10⁵ клеток/мл), из расчета 40 мкл на лунку. Жизнеспособность клеток измеряли после 6 ч инкубации при 37°C, 5% CO₂, путем добавления 15 мкл ATP lite (Perkin Elmer) на лунку и считывания показаний на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Данные отмечали в виде CC₅₀.

Параллельно использовали аналогичную серию разведения соединения (200 нл соединения в 100% ДМСО) с клетками, трансфицированными только репортерной конструкцией NFkB-luc (1,25×10⁵ клеток/мл), из расчета 40 мкл на лунку. Через 6 ч после инкубации при 37°C, 5% CO₂, определяли люциферазную активность путем добавления 15 мкл субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) в каждую лунку, и выполняли считывание показаний на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Данные обратного скрининга отмечали в виде LEC.

Активация промоторных элементов ISRE.

Способность соединений индуцировать IFN-I также оценивали посредством определения активации интерферонзависимых регуляторных элементов (ISRE) при использовании кондиционированных сред от PBMC. Элемент ISRE с последовательностью GAAACTGAACT высокочувствителен к фактору транскрипции STAT1-STAT2-IRF9, активируемому после связывания IFN-I с его рецептором IFNAR (Clontech, PT3372-5W). Плазмида pISRE-Luc от Clontech (№ по кат. 631913) содержит 5 копий данного элемента ISRE, за которыми следует ORF люциферазы светлячка. Получали клеточную линию HEK293, стабильно трансфицированную pISRE-Luc (HEK-ISREluc), для анализа кондиционированных сред клеточной культуры PBMC.

Вкратце, PBMC получали из лейкоцитарных пленок по меньшей мере двух доноров с применением

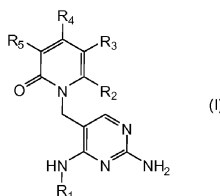
стандартного протокола центрифугирования с фиколлом. Выделенные PBMC ресуспендировали в среде RPMI, дополненной 10% сыворотки АВ человека, и 2×10^5 клеток/лунка распределяли в 384-луночных планшетах, содержащих соединения (общий объем 70 мкл). После инкубации в течение ночи 10 мкл надосадочной жидкости переносили в 384-луночные планшеты, содержащие 5×10^3 клеток HEK-ISREluc/лунка в 30 мкл (высеянных за день до этого). После 24 ч инкубации активацию элементов ISRE измеряли посредством проведения анализа люциферазной активности с использованием 40 мкл/лунка субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) и измеряли с помощью устройства для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Стимулирующую активность каждого соединения в отношении клеток HEK-ISREluc отмечали в виде величины LEC, определяемой как концентрация соединения, вносимая на PBMC, которая приводит к люциферазной активности, превышающей по меньшей мере в два раза стандартное отклонение анализа. LEC, в свою очередь, указывает на степень активации ISRE при переносе определенного количества культуральной среды PBMC. Рекombинантный интерферон α -2a (Roferon-A) использовали в качестве стандартного контрольного соединения.

Биологическая активность соединений формулы (I). Все соединения показали $CC_{50} > 24$ мкМ.

№	TLR 7 человека (LEC), мкМ	TLR 8 человека (LEC), мкМ	HEK-ISRE luc (LEC), мкМ
1	1,8	7,3	0,7
2	1,1	2,1	0,8
3	0,8	10,3	0,3
4	0,5	2,2	0,5
5	0,9	2,7	0,04
6	1,2	6,9	0,5
7	0,5	6,8	0,5
8	1,5	>25	0,6
9	7,3	>25	3
10	1,0	16	0,3
11	1,3	14,6	0,3

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль, где

R_1 представляет собой C_{1-6} алкил, необязательно замещенный C_{1-3} алкилом;

R_2 , R_3 , R_4 и R_5 независимо выбирают из водорода, галогена, C_{1-3} алкила или $-CF_3$;

или где

R_2 конденсирован с R_3 с образованием фенила.

2. Соединение формулы (I) по п.1, где R_1 представляет собой н-бутил, и где R_2 , R_3 , R_4 и R_5 представляют собой водород.

3. Соединение формулы (I) по п.1, где R_1 представляет собой н-бутил, и где R_2 конденсирован с R_3 с образованием фенила.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль по одному из пп.1-3 вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

5. Применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли по одному из пп.1-3 в качестве лекарственного препарата, обладающего активностью модуляторов TLR7 и/или TLR8.

6. Применение фармацевтической композиции по п.4 в качестве лекарственного препарата, обладающего активностью модуляторов TLR7 и/или TLR8.

7. Применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли по одному из пп.1-3 при лечении нарушения, в которое вовлечены модуляции TLR7 и/или TLR8.

8. Применение фармацевтической композиции по п.4 при лечении нарушения, в которое вовлечены модуляции TLR7 и/или TLR8.

9. Соединение формулы (I) по п.1, выбранное из группы, состоящей из

