

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034927

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.07

(21) Номер заявки
201691625

(22) Дата подачи заявки
2015.02.13

(51) Int. Cl. C07D 401/14 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) АРОМАТИЧЕСКИЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

(31) 61/940,282; 61/941,064

(32) 2014.02.14; 2014.02.18

(33) US

(43) 2017.01.30

(86) PCT/EP2015/053151

(87) WO 2015/121444 2015.08.20

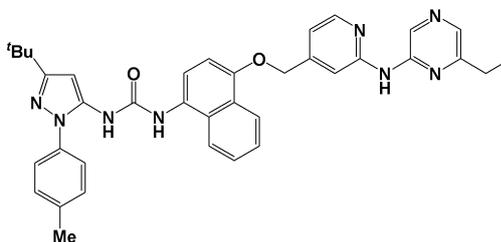
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕСПАЙВЕРТ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Лонгшо Алистер Йен, Фордайс Юэн
Александр Фрэйзер, Онионз Стюарт
Томас, Кинг-Андервуд Джон (GB),
Венэйбл Дженнифер Дайан (US)

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

(56) WO-A1-2013050757
WO-A1-0043384
WO-A2-2011124923
WO-A1-2010112936

(57) Изобретение относится к соединению формулы (I), определенному в описании, которое является ингибитором MAP-киназы p38, для применения в качестве лекарственного средства для лечения, среди прочего, воспалительных заболеваний.



(I)

034927 B1

034927 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к соединению, которое является ингибитором семейства ферментов митогенактивированных протеинкиназ p38 (называемому в настоящем описании ингибиторами MAP-киназ p38), например, их подтипов α и γ , и семейства Src тирозинкиназ, и к его применению в терапии, в том числе в фармацевтических комбинациях, особенно при лечении воспалительных заболеваний, в частности воспалительных заболеваний легких, таких как астма и COPD, а также заболеваний желудочно-кишечного тракта, таких как неспецифический язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника (IBD) и болезнь Крона, и глаз, таких как увеит.

Предпосылки создания изобретения

Идентифицированы четыре изоформы MAPK p38 (α , β , γ и δ соответственно), причем каждая отображает различные картины экспрессии тканей у человека. Изоформы MAPK p38 α и β обнаружены в организме повсеместно, причем присутствуют во многих различных типах клеток. Изоформа α хорошо охарактеризована в смысле ее роли в воспалении. Хотя исследования на мышах с использованием химико-генетического подхода показывают, что изоформа MAPK p38 β не играет роли в воспалении (O'Keefe S.J. et al., *J. Biol. Chem.*, 2007, 282(48), 34663-71), она может быть вовлечена в механизмы болей через регуляцию экспрессии COX2 (Fitzsimmons V.L. et al., *Neuroreport*, 2010, 21(4), 313-7). Такие изоформы ингибируются рядом описанных ранее низкомолекулярных соединений.

Разработанные ранее классы ингибиторов были весьма токсичными из-за широкого распределения таких изоформ в тканях, что приводило к многочисленным действиям соединений мимо цели. Кроме того, разработка значительного числа ингибиторов прерывалась из-за неприемлемых профилей безопасности при клинических исследованиях (Pettus L.H. and Wurz R.P., *Curr. Top. Med. Chem.*, 2008, 8(16), 1452-67). Так как такие вредные действия меняются с хемотипом, и соединения имеют картины различной селективности в отношении киназ, наблюдаемая токсичность может соотноситься со структурой, а не с механизмом на основе p38. Позднее разработаны соединения с большей эффективностью и селективностью в отношении MAPK p38- α/β ; однако уровни эффективности, достигнутые при лечении хронических воспалительных заболеваний, в том числе ревматоидного артрита (SCIO-469, Genovese et al., *J. Rheumatol.*, 2011, 38, 846-54; Pamaipimod, Cohen et al., *Arthritis Rheum.*, 2009, 60, 335-344; BMS-582949, Schieven et al., *Arthritis Rheum.*, 2010, 62, Suppl. 10:1513) и COPD (Losmapimod, Watz et al., *Lancet Resp. Med.*, 2014, 2, 63-72), разочаровывают. Более того, заслуживает внимания то, что обнаружено, что ингибитор MAPK p38 обеспечивает благоприятное действие для пациентов с IBD после лечения одну неделю, которое не продолжается в течение четырехнедельного курса лечения (BIRB-796, Schreiber S. et al., *Clin. Gastro. Hepatology*, 2006, 4, 325-334).

Важным выводом из этих исследований является то, что применение мишеньспецифических ингибиторов киназ может являться недостаточным для достижения и поддержания терапевтического благоприятного действия при сложных воспалительных заболеваниях, где дисрегуляция нескольких иммуновоспалительных путей и биологической адаптации может обойти блокаду единственного механизма-мишени, что приводит к утрате реакции. Можно утверждать, что в случае сложных воспалительных заболеваний, таких как COPD, ревматоидный артрит и IBD, ингибиторы, мишенью которых является набор киназ, которые являются критичными для регуляции различных иммуновоспалительных механизмов, связанных с патологией, будут иметь больший потенциал для достижения эффективной и пролонгированной терапевтической реакции.

Роль MAPK- α p38 в регуляции воспалительных путей широко исследована и хорошо установлена. Меньше известно об изоформах MAPK- γ и - δ p38, которые в отличие от изоформ α и β экспрессируются в специфических тканях и клетках. Изоформа MAPK- δ p38 экспрессируется в большей степени в поджелудочной железе, яичках, легких, тонкой кишке и почках. Она также распространена в макрофагах и детектируется в нейтрофилах, CD4+ T-клетках и в эндотелиальных клетках (Shmueli O. et al., *Comptes Rendus Biologies*, 2003, 326(10-11), 1067-1072; Smith S.J., *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 149, 393-404; Hale K.K., *J. Immunol.*, 1999, 162(7), 4246-52; Wang X.S. et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(38), 23668-23674). Совсем немного известно о распределении MAPK- γ p38, хотя она экспрессируется в большей степени в головном мозге, скелетных мышцах и сердце, а также в лимфоцитах и макрофагах (Shmueli O. et al., *Comptes Rendus Biologies*, 2003, 326(10-11), 1067-1072; Hale K.K., *J. Immunol.*, 1999, 162(7), 4246-52; Court N.W. et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2002, 34(4), 413-26; Mertens S. et al., *FEBS Lett.*, 1996, 383(3), 273-6). Данные, что киназы MAPK- γ p38 и MAPK- δ p38 экспрессируются в иммунологически важных и провоспалительных типах клеток, вызвали интерес к их функциям относительно MAPK- α p38. Селективные низкомолекулярные ингибиторы MAPK- γ p38 и MAPK- δ p38 на сегодняшний день недоступны для того, чтобы оценить роль этих киназ фармакологически, хотя известно, что одно раскрытое ранее соединение BIRB 796 обладает активностью ингибирования пан-изоформы. Ингибирование изоформ MAPK- γ p38 и MAPK- δ p38 наблюдают при более высоких концентрациях соединения, чем концентрации, требуемые для ингибирования MAPK- α p38 и MAPK- β p38 (Kuma Y., *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 19472-19479). Кроме того, BIRB 796 также ухудшает фосфорилирование MAPK p38 или JNK-киназами уровня выше MKK6 или MKK4. Kuma обсуждает возможность того, что конформационные изменения, вызванные связыванием

ингибитора с белком MAPK, могут влиять на структуру как его сайта фосфорилирования, так и сайта "причаливания" для активатора уровня выше, посредством чего ухудшается фосфорилирование MAPK p38 или JNK.

Полагают, что MAP-киназа p38 играет основную роль во многих сигнальных путях, которые вовлечены в инициацию и поддержание хронического постоянного воспаления при заболевании человека, например, при тяжелой астме и при COPD (Chung F., Chest, 2011, 139(6), 1470-1479). Теперь имеется достаточно литературных источников, в которых показано, что MAP-киназа p38 активируется рядом провоспалительных цитокинов, и что ее активация приводит к рекрутменту и высвобождению дополнительных провоспалительных цитокинов. Например, Smith описывает ингибирующее действие ингибиторов MAP-киназы p38 на высвобождение TNF α из человеческих РВМС. Однако продуцирование некоторых цитокинов (IL-8 и GM-CSF) макрофагами ткани легких, выделенными у курящих и бывших курящих, является относительно интенсивным для ингибиторов MAPK p38 α/β , и Smith предполагает, что распространенность MAPK- δ p38, экспрессированной в таких клетках, может отвечать за ослабленное действие соединений (Smith et al., Br. J. Pharmacol., 2006, 149, 393-404). Risco et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2012, 109, 11200-11205) использовали мышей, нокаутированных по гену MAPK- γ p38 и MAPK- δ p38, для исследования роли этих изоформ p38 в метаболических путях, регулирующих продуцирование цитокинов макрофагами. В этих исследованиях установлено, что для мышей обе киназы являются существенными для естественных иммуновоспалительных реакций, включая продуцирование провоспалительных цитокинов. Позднее Criado G. et al. (Arthritis Rheum., 2014, 66(5), 1208-17) показали, что на мышинной модели воспалительного артрита сниженная тяжесть заболевания у мышей p38 γ/δ -/- ассоциируется с более низкими продуцированием цитокинов и иммунологической активацией, чем у нормальных контрольных мышей, что показывает, что MAPK- γ p38 и MAPK- δ p38 являются ключевыми регуляторами патологии воспаления суставов. Такие результаты предполагают, что кроме MAPK- α p38, MAPK- γ p38 и MAPK- δ p38 являются потенциальными терапевтическими мишенями при сложных заболеваниях, которые включают врожденные и адаптивные иммунные реакции, таких как COPD.

Применение ингибиторов MAP-киназы p38 при лечении хронической обструктивной болезни легких (COPD) также исследовано. Показано, что низкомолекулярные ингибиторы, нацеленные на MAPK- α/β p38 являются эффективными при уменьшении различных параметров воспаления в клетках и в тканях, полученных от пациентов с COPD, которые вообще нечувствительны к кортикостероидам (Smith S.J., Br. J. Pharmacol., 2006, 149, 393-404), а также у различных животных моделей in vivo (Underwood D.C. et al., Am. J. Physiol., 2000, 279, L895-902; Nath P. et al., Eur. J. Pharmacol., 2006, 544, 160-167). Irusen с сотрудниками также предположили возможное вовлечение MAPK- α/β p38 в нечувствительность к кортикостероидам через уменьшение аффинности связывания глюкокортикоидного рецептора (GR) в ядрах (Irusen E. et al., J. Allergy Clin. Immunol., 2002, 109, 649-657). Описан клинический опыт с рядом ингибиторов MAP-киназы p38, включая AMG548, BIRB 796, VX702, SCIO469 и SCIO323 (Lee M.R. and Dominguez C., Current Med. Chem., 2005, 12, 2979-2994).

COPD представляет собой состояние, при котором, как сообщается, лежащее в основе воспаление, по существу, резистентно к противовоспалительному действию вдыхаемых кортикостероидов. Следовательно, всеобщей стратегией лечения COPD могла бы быть разработка вмешательства, которое имеет как собственное противовоспалительное действие, так и способность повышать чувствительность тканей легких пациентов с COPD к вдыхаемым кортикостероидам. Последняя публикация Mercado (Mercado N. et al., Mol. Pharmacol., 2011, 80(6), 1128-1135) показывает, что сайленсинг MAPK- γ p38 имеет потенциал для восстановления чувствительности к кортикостероидам. Также сообщается, что MAPK- α p38 (Mercado N. et al., PLoS ONE, 2012, 7(7), e41582, 1-9) и JNK (Pari et al., J. Allergy Clin. Immunol., 2013, 132, 1075-1085) имеют роли в регуляции нечувствительности к кортикостероидам, и Armstrong et al. (JPET, 2011, 338, 732-740) показали, что ингибитор смешанных изоформ p38 BIRB-796 и кортикостероид дексаметазон имеют синергичное противовоспалительное действие на альвеолярные макрофаги при COPD. Следовательно, для пациентов это может быть благоприятным при применении меньшего количества α -специфического ингибитора MAP-киназы p38 для лечения COPD и тяжелой астмы.

Многие пациенты с диагнозом астмы или COPD продолжают страдать от нерегулируемых симптомов и от обострений их состояния, что может привести к госпитализации. Это происходит несмотря на применение наиболее передовых доступных в настоящее время схем лечения, включающих комбинирование продуктов с вдыхаемым кортикостероидом и длительно действующего β -агониста. Данные, накопленные за последнее десятилетие, показывают, что неудача в попытке справиться с лежащим в основе воспалительным компонентом заболевания в легких является наиболее вероятной причиной того, что происходит обострение. Принимая во внимание установленную эффективность кортикостероидов как противовоспалительных средств и, в частности, вдыхаемых кортикостероидов, при лечении астмы, такие результаты побуждают к интенсивному исследованию. Проведенные исследования показали, что некоторые вредные факторы окружающей среды вызывают в легких пациентов изменения, нечувствительные к кортикостероидам. Примером является реакция на вирусопосредованные инфекции верхних дыхательных путей (URTI), которая имеет особое значение в возрастании заболеваемости, связанной с астмой и COPD.

Эпидемиологические исследования показали прочную связь с инфекциями верхних дыхательных путей и значимым процентом обострений, от которых страдают пациенты, уже имеющие диагноз хронических респираторных заболеваний. Некоторые из наиболее впечатляющих данных в этом отношении происходят из длительных исследований детей, страдающих от астмы (Papadopoulos N.G. et al., *Paediatr. Respir. Rev.*, 2004, 5(3), 255-260). Ряд дополнительных исследований подтверждает вывод, что вирусная инфекция может ускорять обострения и повышать тяжесть заболевания. Например, сообщается, что экспериментальные клинические заражения риновирусом вызывали бронхиальную гиперреактивность на гистамин у астматиков, которая нечувствительна к лечению кортикостероидами (Grunberg K. et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, 164(10), 1816-1822). Другие подтверждения получают из связи, наблюдаемой между обострениями заболевания у пациентов с муковисцидозом и заражениями HRV (Wat D. et al., *J. Cyst. Fibros.*, 2008, 7, 320-328). С этим массивом данных также согласуется открытие, что респираторные вирусные инфекции, включая ретровирусные, представляют собой объективный фактор риска, который отрицательно коррелирует с 12-месячным коэффициентом выживания реципиентов при педиатрической пересадке легких (Liu M. et al., *Transpl. Infect. Dis.*, 2009, 11(4), 304-312).

TLR3 является эндосомным рецептором распознавания патогенных образцов, который воспринимает вирусную ДцРНК, которая продуцируется во время заражения вирусом. В клетках бронхиального эпителия человека (BEAS2B) путь TLR3 активируется в ответ на риновирусную инфекцию (RV1B и RV39) (Wang et al., *J. Immunol.*, 2009, 183, 6989-6997). Вдыхаемая ДцРНК и вирусная инфекция вызывают нейтрофильное обострение у мышей с аллергией с установленной экспериментальной астмой (Mahmutovic-Persson et al., *Allergy*, 2014, 69(3), 348-358). На модели аллергической астмы зараженные риновирусом TLR3-нокаутированные мыши показывают уменьшенную инфильтрацию нейтрофилов и макрофагов в легкие и существенно меньшее воспаление дыхательных путей при сравнении с TLR3-положительными контрольными животными (Wang Q. et al., *PLoS Pathog.*, 7(5), e1002070). Все вместе такие наблюдения предполагают, что активация пути TLR3 вероятно играет важную роль в развитии воспаления дыхательных путей и обострениях респираторного заболевания в ответ на опосредованные риновирусом инфекции дыхательных путей.

Показано, что в зараженных риновирусом клетках человека активация TLR3 включает рекрутмент рецепторов и активацию c-Scr-киназы, которая опосредует несколько следующих клеточных эффектов. Появилось небольшое число исследований, в которых связываются активация клеточных киназ семейства Src (Src1 или p60-Src) со специфическими реакциями после заражения вирусами. Они включают сообщение, что аденовирус выявляет опосредуемую киназой P13 активацию Akt через c-Scr-зависимый механизм. Сообщается, что активность Syk-киназы регулируется c-Scr как киназой уровня выше при заражении HRV (Lau et al., *J. Immunol.*, 2008, 180, 870-880). Также предполагается, что вызываемое риновирусом-39 продуцирование IL-8 в эпителиальных клетках зависит от активации Scr-киназы (Bentley J.K. et al., *J. Virol.*, 2007, 81, 1186-1194). Наконец, предполагается, что активация Scr-киназы вовлекается в индукцию продуцирования муцина риновирусом-14 в эпителиальных клетках и подслизистых железах (Inoue D. et al., *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2006, 154 (3), 484-499).

Ранее раскрыто, что соединения, которые ингибируют p59-НСК, эффективны против репликации вирусов гриппа (Charron C.E. et al., WO 2011/070369). Некоторые ингибиторы MAPK p38 также описываются как ингибиторы репликации респираторно-синцитиального вируса (Cass L. et al., WO 2011/158039).

По причинам, перечисленным выше, ожидается, что соединения, созданные для лечения хронических респираторных заболеваний, которые объединяют ингибирование киназ c-Scr и p59-НСК с ингибированием MAPK p38, будут особенно эффективными.

Кроме исполнения ключевых ролей в событиях передачи сигналов клеткой, которые регулируют активность провоспалительных путей, ферменты киназы теперь также узнаются как регулирующие активность ряда клеточных функций. Среди функций, которые обсуждались в последнее время, находятся функции сохранения целостности ДНК (Shilo Y., *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3, 155-168) и координации комплексных процессов деления клеток. Иллюстрацией последних открытий является публикация, в которой описывается влияние набора ингибиторов, действующих на так называемые "киназы Olaharsky", на частоту образования микроядер *in vitro* (Olaharsky A.J. et al., *PLoS Comput. Biol.*, 2009, 5(7), e1000446). Образование микроядер вовлечено в или ассоциируется с нарушением митотических процессов и, следовательно, является нежелательным проявлением потенциальной токсичности. Обнаружено, что ингибирование киназы 3 α -гликогенсинтазы (GSK3 α) является существенным фактором, который повышает вероятность образования микроядер, промотируемого ингибитором киназы (Tighe A. et al., *BMC Cell Biology*, 2007, 8:34).

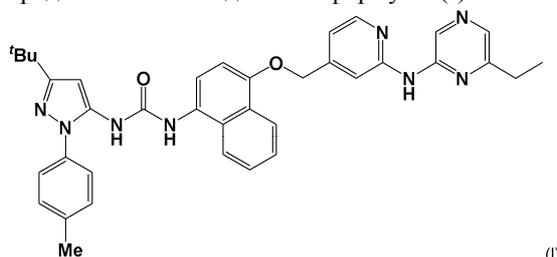
Может быть возможным смягчение вредного действия, возникающего при взаимодействиях лекарственного средства с киназами Olaharsky, такими как GSK3 α , путем оптимизации дозы и/или изменения пути введения. Однако более выгодной могла бы быть идентификация терапевтически полезных молекул, которые показывают низкую или недетектируемую активность против таких ферментов немишеней и, следовательно, добиваются незначительного или отсутствия нарушения митотических процессов

при измерениях в анализах митоза.

Из обзора литературы, цитированной в настоящем описании выше, очевидно, что остается потребность в идентификации и разработке новых ингибиторов MAP-киназы p38, которые имеют улучшенный терапевтический потенциал по сравнению с доступными в настоящее время лечениями. Нужными являются такие соединения, которые показывают превосходный терапевтический индекс за счет проявления действия, по меньшей мере, равно эффективного действию предыдущих средств, но в одном или нескольких отношениях являются менее токсичными в релевантной терапевтической дозе. Поэтому целью настоящего изобретения является такое новое соединение, которое ингибирует ферментативную активность MAP-киназы p38, например, со специфичностью в отношении некоторых подтипов (особенно α и γ), а также ингибирующее ферментативную активность тирозинкиназ семейства Src (таких как p59-HCK и особенно c-Src), обладающее за счет этого хорошими противовоспалительными свойствами, и подходящее для применения в терапии. Соединение по изобретению показывает слабую активность или отсутствие активности ингибирования киназ Olaharsky, таких как GSK3 α , и проявляет слабую активность или отсутствие активности ингибирования SYK-киназы, которая вносит вклад в ожидаемый благоприятный профиль безопасности.

Сущность изобретения

Согласно изобретению представляется соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль.

Соединение формулы (I) вместе с фармацевтически приемлемыми солями иногда в настоящем описании называется "соединением по настоящему изобретению" или похоже.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан ИК-спектр (microATR) образца соли малеата соединения формулы (I), форма 2;
 на фиг. 2 - дифрактограмма образца соли малеата соединения формулы (I), форма 2;
 на фиг. 3 - дифрактограмма образца соли малеата соединения формулы (I), форма 1;
 на фиг. 4 - кривая ДСК образца соли малеата соединения формулы (I), форма 2;
 на фиг. 5 - кривая ТГА образца соли малеата соединения формулы (I), форма 2;
 на фиг. 6 - перекрытие DVS образца соли малеата соединения формулы (I), форма 2;
 на фиг. 7 - график кинетики DVS образца соли малеата соединения формулы (I), форма 2;
 на фиг. 8 - результат проверки химической устойчивости различных композиций, содержащих соединение по изобретению (формы свободного основания и соли малеата);
 на фиг. 9 - действие испытываемых соединений на риновирусиндуцированное высвобождение IL-8 в клетках BEAS2B.

Подробное описание изобретения

Соединение формулы (I) можно получить или использовать в форме фармацевтически приемлемой соли, включая терапевтически активные нетоксичные соли присоединения кислот, которые соединение формулы (I) способно образовывать. Такие фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот обычно можно получить путем обработки формы свободного основания соответствующими кислотами в подходящем растворителе или смеси растворителей. Соответствующие кислоты включают, например, неорганические кислоты, такие как галогеноводородные кислоты, например хлороводородная или бромоводородная кислота, серная, азотная, фосфорная кислоты и т.п.; или органические кислоты, такие как, например, уксусная, пропановая, гидроксуксусная, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, малеиновая, фумаровая, яблочная, винная, лимонная, метансульфоновая, этансульфоновая, бензолсульфоновая, п-толуолсульфоновая, цикламовая, салициловая, п-аминосалициловая, павовая кислота и т.п. Предпочтительно соединение формулы (I) используют в форме соли малеата. Наоборот, указанные солевые формы можно превратить в форму свободного основания путем обработки подходящим основанием.

Настоящее изобретение распространяется на все стереоизомеры соединения формулы (I). Термин "стереоизомеры", используемый в настоящем описании, относится к изомерным молекулам, которые имеют одинаковые молекулярные формулы и последовательность соединенных атомов (строение), но которые различаются только по трехмерным ориентациям своих атомов в пространстве.

Предполагается, что используемое в настоящем описании определение соединения формулы (I) включает все таутомеры указанных соединений и сольваты указанных соединений (включая сольваты солей указанных соединений), если контекст не указывает конкретно иное. Примеры сольватов включают гидраты.

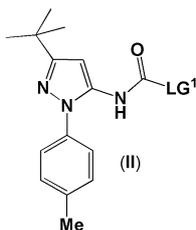
Настоящее изобретение распространяется на пролекарства соединения формулы (I), иначе говоря, на соединения, которые разрушаются и/или метаболизируют *in vivo* с образованием активного соединения формулы (I).

В другом аспекте изобретение относится к одному или нескольким метаболитам соединения формулы (I), в частности метаболиту, который сохраняет одну или больше терапевтических активностей соединения формулы (I). Метаболит, как используется в настоящем описании, представляет собой соединение, которое образуется *in vivo* при метаболизме соединения формулы (I), такое как, без ограничения, окислительные метаболиты и/или метаболиты, образовавшиеся, например, при O-деалкилировании.

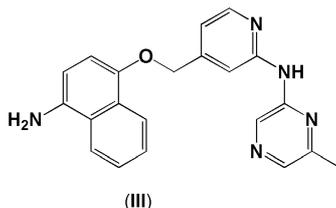
Раскрытое соединение включает соединение, в котором конкретный атом является встречающимся в природе или не встречающимся в природе изотопом. Так, раскрытое соединение включает, например, дейтерийсодержащие соединения и подобные соединения.

Раскрытие также распространяется на все полиморфные формы соединений, определенных в настоящем описании.

Первый способ получения соединения формулы (I) или его защищенного производного включает взаимодействие соединения формулы (II)



или его содержащего защитную группу производного, где в указанной формуле LG^1 представляет собой удаляемую группу, с соединением формулы (III)



или его содержащим защитную группу производным;

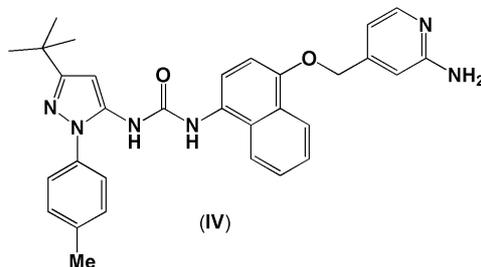
и, необязательно, удаление защитной группы из продукта с образованием соединения формулы (I).

В соединениях формулы (II) примеры удаляемой группы LG включают галоген (в особенности Cl, Br) и арилокси, в особенности фенокси.

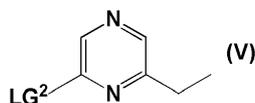
Подходящие защитные группы и способы их удаления описаны ниже.

Подходящие условия взаимодействия соединений формулы (II) и соединений формулы (III) включают обработку смеси (II) и (III) в подходящем растворителе, таком как ТГФ, DCM или изопропилацетат, триэтиламин или основанием Хунига и нагревание реакционной смеси до такой температуры, как 40°C.

Второй способ получения соединения формулы (I) включает взаимодействие соединения формулы (IV)



или его содержащего защитную группу производного, с соединением формулы (V)



где LG^2 представляет собой удаляемую группу, такую как галоген, в особенности Cl,

или его содержащим защитную группу производным,

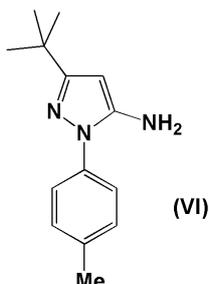
и, необязательно, удаление защитной группы из продукта с образованием соединения формулы (I).

Подходящие защитные группы и способы их удаления описаны ниже.

Подходящие условия взаимодействия соединений формулы (IV) и соединений формулы (V) включают условия, которые обычно используют для реакции Бухвальда, т.е. обработку раствора (IV) и (V) в растворителе, таком как 1,4-диоксан, источником палладия и лигандом, такими как Pd₂(dba)₃ и BINAP, и основанием, таким как трет-бутоксид натрия или карбонат цезия, при повышенной температуре.

Другие лиганды включают дифенилфосфинферроцен и трифенилфосфин; другие источники палладия включают ацетат палладия(II) и тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0); другие основания включают бис(триметилсилил)амид лития и фосфат калия; другие растворители включают ТГФ и толуол. В отношении более широкого ряда условий см. Surry D.S., Buchwald S.L. (2008), "Biaryl Phosphane Ligands in Palladium-Catalyzed Amination", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 6338-6361 и ссылки в указанной работе.

Соединения формулы (II) можно получить взаимодействием соединения формулы (VI)

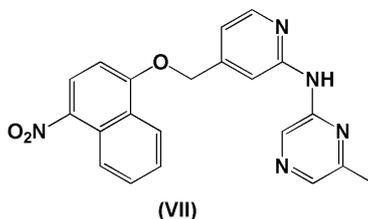


с соединением формулы LG¹C(=O)LG³, где LG³ представляет собой удаляемую группу, такую как галоген, в особенности Cl.

Подходящие условия для взаимодействия соединения формулы (VI) с соединением формулы LG¹C(=O)LG³, где LG¹ представляет собой PhO, и LG³ представляет собой Cl, включают обработку смеси раствора соединения формулы (VI) в таком растворителе, как изопропилацетат, и водного раствора неорганического основания, такого как карбонат натрия, фенилхлорформиатом.

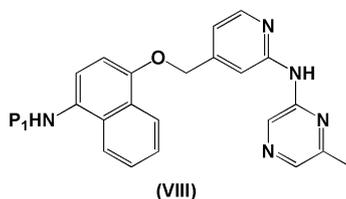
Соединения формулы (VI) известны или могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники.

Первый способ получения соединения формулы (III) включает восстановление соединения формулы (VII)



Подходящие условия для восстановления соединения формулы (VII) включают обработку газом водородом над катализатором платина-на-углероде. Такую реакцию можно осуществить при повышенном давлении в растворителе, таком как ТГФ, подкисленном уксусной кислотой. С другой стороны, ее можно выполнить в растворителе, таком как смесь DCM/MeOH, в условиях потока с использованием газогенератора H-cube.

Второй способ получения соединения формулы (III) включает удаление защитной группы из соединения формулы (VIII)

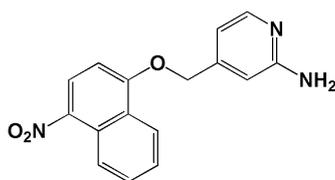


в которой P₁ представляет собой аминозащитную группу.

Подходящие защитные группы и способы их удаления описаны ниже.

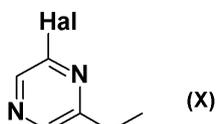
Наиболее подходящей защитной группой является Boc, которую можно удалить обработкой кислотой, такой как ТФК или HCl.

Первый способ получения соединения формулы (VII) включает взаимодействие соединения формулы (IX)



(IX)

с соединением формулы (X)

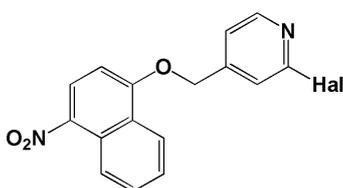


(X)

в которой Hal представляет собой галоген, в особенности Cl.

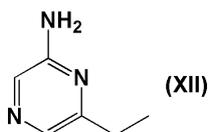
Подходящие условия для взаимодействия соединений формул (IX) и (X) включают условия, указанные выше для взаимодействия соединений формул (IV) и (V).

Второй способ получения соединения формулы (VII) включает взаимодействие соединения формулы (XI)



(XI)

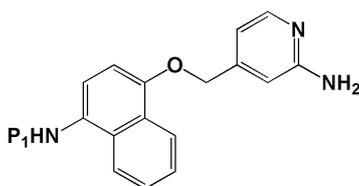
в которой Hal представляет собой галоген, в особенности Cl,
с соединением формулы (XII)



(XII)

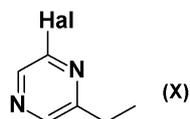
Подходящие условия для взаимодействия соединений формул (XI) и (XII) включают обработку раствора (XI) и (XII) в растворителе, таком как 1,4-диоксан, источником палладия и лигандом, такими как Pd₂(dba)₃ и BINAP, и основанием, таким как трет-бутоксид натрия или карбонат цезия, при повышенной температуре.

Первый способ получения соединения формулы (VIII) включает взаимодействие соединения формулы (XIII)



(XIII)

с соединением формулы (X)

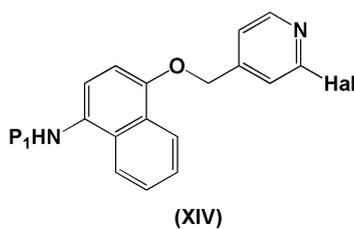


(X)

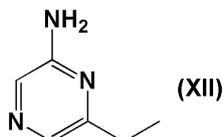
в которой Hal представляет собой галоген, в особенности Cl.

Подходящие условия для взаимодействия соединений формул (XIII) и (X) являются такими же, как условия, описанные выше для взаимодействия соединений формул (IX) и (X).

Второй способ получения соединения формулы (VIII) включает взаимодействие соединения формулы (XIV)

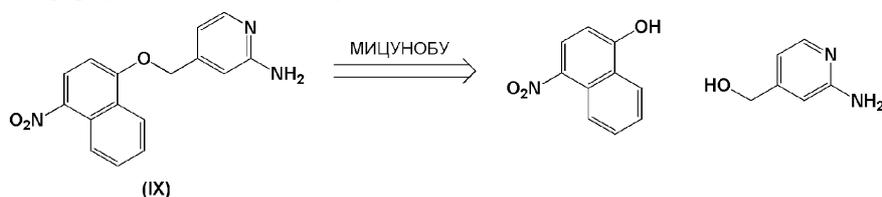


в которой Hal представляет собой галоген, в особенности Cl, с соединением формулы (XII)



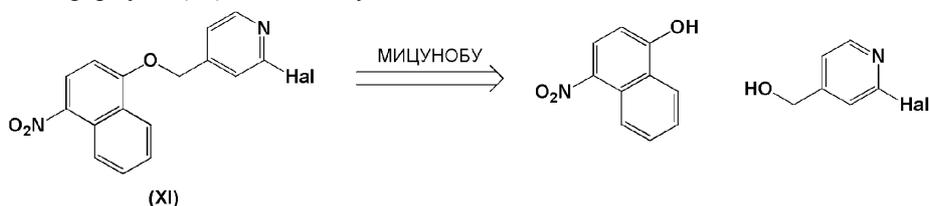
Подходящие условия для взаимодействия соединений формул (XIV) и (XII) являются такими же, как условия, описанные выше для взаимодействия соединений формул (XI) и (XII).

Соединения формулы (IX) можно получить так, как показано на схеме ниже.



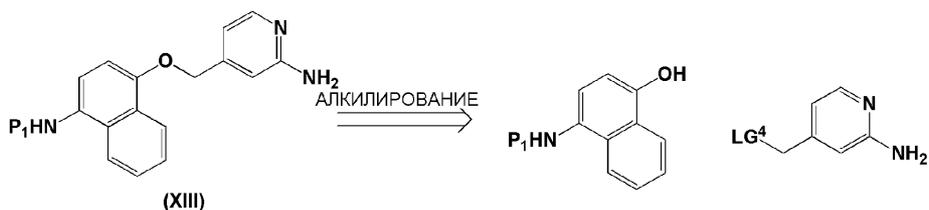
Реагенты для такого способа являются известными соединениями. Условия по Мицунобу включают обработку смеси фенола и спирта трифенилфосфином и диизопропилазодикарбоксилатом в растворителе, таком как ТГФ. О более широком ряде условий см. Swamy K.C; Kumar N.N.; Balaraman E.; Kumar K.V. (2009). "Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications", Chemical Reviews, 109(6): 2551-2651 и ссылки в указанной работе.

Соединения формулы (XI) можно получить так, как показано на схеме ниже.



Реагенты для такого способа являются известными соединениями. Условия по Мицунобу включают условия, указанные выше.

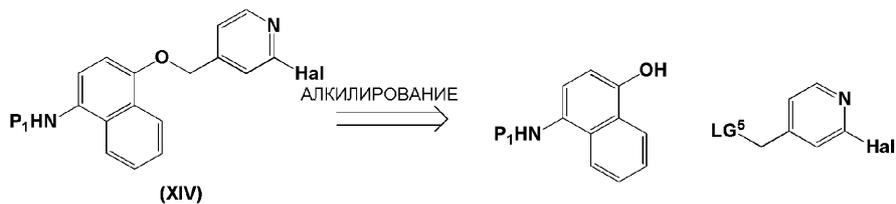
Соединения формулы (XIII) можно получить так, как показано на схеме ниже.



где LG⁴ представляет собой удаляемую группу, такую как галоген, в особенности Cl.

Реагенты для такого способа являются известными соединениями. Условия алкилирования включают обработку смеси фенола и алкилгалогенида основанием, таким как карбонат цезия или калия, в растворителе, таком как ацетонитрил или ДМФА, необязательно, при повышенной температуре.

Соединения формулы (XIV) можно получить так, как показано на схеме ниже.



где LG⁵ представляет собой удаляемую группу, такую как указанные выше для LG⁴.

Реагенты для такого способа являются известными соединениями. Условия алкилирования вклю-

чают условия, указанные выше.

Соединения формул (IV), (V), (VI), (X) и (XII) или являются известными или могут быть получены способами, известными специалисту. В отношении соединения формулы (IV), см., например, WO 2010/067131 и конкретно соединение, структура которого упоминается как "промежуточное соединение А". В отношении соединения формулы (VI), см., например, WO 00/043384 и конкретно соединение формулы LXVII.

Явно устойчивую кристаллическую несольватированную форму формы свободного основания соединения по изобретению можно получить перекристаллизацией из раствора (предпочтительно горячего, например температуры образования флегмы) в ацетонитриле. В случае получения другой формы такую форму можно получить суспендированием в ацетонитриле.

Как отмечалось выше, соль малеат является формой соединения по изобретению, представляющей особый интерес. Соль малеат можно получить путем обработки формы свободного основания соединения по изобретению малеиновой кислотой в подходящем растворителе.

В предпочтительном способе соль малеат получают обработкой раствора соединения по изобретению в 2-бутаноне раствором малеиновой кислоты в 2-бутаноне. Допускают протекание кристаллизации, которой можно способствовать, добавляя затравочный кристалл. Таким путем получают соль малеат в виде ее кристаллического полиморфа формы 2. Кристаллический полиморф формы 2 также можно получить путем охлаждения горячего раствора соли малеата соединения по изобретению в 2-бутаноне, например, от 50°C до комнатной температуры. Допускают протекание кристаллизации, которой можно способствовать, добавляя затравочный кристалл.

Кристаллический полиморф формы 2 соли малеата соединения по изобретению характеризуется наличием положений пиков на порошковой дифрактограмме при 4,2, 8,4, 8,7, 11,0, 11,5, 12,6, 14,4, 14,9, 16,0, 17,0, 17,4, 18,8, 19,5, 20,2, 21,7, 22,4, 23,8, 25,8 и 26,3 ($\pm 0,2$)° 2 θ (см. фиг. 2). Пики (дублет) при 8,4 и 8,7 ($\pm 0,2$)° 2 θ являются особенно характерными для кристаллического полиморфа формы 2, так как пики в указанных положениях отсутствуют на дифрактограммах кристаллического полиморфа формы 1.

Кристаллический полиморф формы 2 имеет высокую температуру плавления (приблиз. 199°C) с пластинчатоподобной морфологией.

После перекристаллизации из ТГФ идентифицирована другая кристаллическая форма соли малеата соединения по изобретению, которая имеет менее благоприятные свойства, чем свойства формы 2. Она имеет иглоподобную морфологию и более низкую температуру плавления - приблиз. 148°C. Эта кристаллическая форма названа формой 1.

Кристаллический полиморф формы 1 соли малеата соединения по изобретению характеризуется наличием положений пиков на порошковой дифрактограмме при 3,8, 6,3, 7,8, 9,3, 9,9, 10,7, 11,2, 12,7, 15,4, 16,5, 17,9, 19,2 и 19,6 ($\pm 0,2$)° 2 θ (см. фиг. 3). Пики при 6,3, 7,8 и 9,9 ($\pm 0,2$)° 2 θ являются особенно характерными для кристаллического полиморфа формы 1, так как пики в указанных положениях отсутствуют на дифрактограммах кристаллического полиморфа формы 2.

Таким образом, полиморф формы 2 характеризуется наличием дифрактограммы, содержащей 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или предпочтительнее 19 положений пиков, выбранных из 4,2, 8,4, 8,7, 11,0, 11,5, 12,6, 14,4, 14,9, 16,0, 17,0, 17,4, 18,8, 19,5, 20,2, 21,7, 22,4, 23,8, 25,8 и 26,3 ($\pm 0,2$)° 2 θ , предпочтительно включающей пики при 8,4 и 8,7 ($\pm 0,2$)° 2 θ и не включающей пики при 6,3, 7,8 и 9,9 ($\pm 0,2$)° 2 θ .

В отношении фиг. 2 и 3 следует иметь в виду, что вариации интенсивности на дифрактограммах могут происходить из-за процессов, которые влияют на интенсивность, таких как история обработки образца.

Соли соединения по изобретению, которые являются кристаллическими, но представляют меньший интерес, чем соль малеат, включают соли гидробромид, фосфат, тартрат, fumarat и мезилат.

Могут потребоваться защитные группы для защиты химически чувствительных групп во время одной или нескольких реакций, описанных выше, для того, чтобы гарантировать, что процесс является эффективным. Так, если желательно или необходимо, промежуточные соединения (включая соединения формул (II)-(V), описанные выше, а также соединения формул (VI)-(XIV)) могут быть защищены путем применения обычных защитных групп. Защитные группы и способы их удаления описаны в "Protective Groups in Organic Synthesis", Theodora W. Greene and Peter G.M. Wuts, published by John Wiley & Sons Inc; 4th Rev Ed., 2006, ISBN-10: 0471697540. Так, примеры аминозащитных групп включают группу Boc, которую можно удалить ТФК, и примером защитных групп для спиртовых групп является ТНР, которую можно удалить HCl.

Соединения формулы (III) (вместе с их производными, в которых аминогруппа защищена, такими как соединение формулы (VIII)) и соединение формулы (VII) являются новыми. Эти новые соединения вместе с их солями (включая фармацевтически приемлемые соли) заявляются как аспекты изобретения.

Соединение формулы (I) является ингибитором MAP-киназы p38 (в частности, подтипа α), и в одном аспекте соединение по настоящему изобретению предлагается для применения в качестве лекарственного средства, например, при лечении воспалительных заболеваний, например COPD и/или астмы.

Ожидается, что соединение формулы (I) будет эффективным *in vivo*.

Типично соединения известного уровня техники, разработанные до настоящего времени, предна-

значались для перорального введения. Такая стратегия включает оптимизацию фармакокинетического профиля лекарственных веществ для того, чтобы достичь адекватной длительности действия. В таком случае устанавливают достаточно высокую концентрацию лекарственного средства и поддерживают между дозами для обеспечения пролонгированного клинического благоприятного действия. Неизбежным следствием такого подхода является то, что все ткани организма, в особенности печень и кишечник, вероятно подвергаются воздействию терапевтически сверхактивных концентраций лекарственного средства, наносят ли они или нет вред заболеванию, от которого лечат.

Альтернативной стратегией является создание примеров лечения, в которых лекарственное средство подается непосредственно в воспаленный орган, т.е. использование топического введения. Хотя такой подход не подходит для всех хронических воспалительных заболеваний, его используют при легочных расстройствах, таких как астма и COPD; при кожных болезнях, например, против атопического дерматита и псориаза; для назальных состояний, типичным примером которых является аллергический ринит; и при желудочно-кишечных заболеваниях, таких как неспецифический язвенный колит, IBD и болезнь Крона, и воспалительных заболеваниях глаз, таких как увеит.

При топической терапии одним из способов достижения эффективности является использование лекарственного средства, которое имеет пролонгированное действие и сохраняется в релевантном органе, посредством чего минимизируется опасность системной токсичности. С другой стороны, в некоторых случаях можно разработать препарат, который генерирует "резервуар" активного лекарственного средства, которое доступно для пролонгирования его нужного действия. Примером первого подхода является антихолинергическое лекарственное средство тиотропий (Spiriva). Такое соединение вводят местно в легкие как лечение в случае COPD, и оно имеет исключительно высокую аффинность к его рецептору-мишени, что приводит к очень низкой скорости высвобождения и впоследствии отображает пролонгированное действие.

В одном аспекте раскрытия соединение формулы (I) является особенно подходящим для топической доставки, такой как топическая доставка в легкие, в частности, для лечения респираторного заболевания, например респираторных заболеваний, таких как COPD и/или астма.

В одном воплощении соединение формулы (I) подходит для сенсбилизации пациентов для лечения кортикостероидом, которые стали резистентными к таким схемам лечения.

Соединение формулы (I) может иметь противовирусные свойства, например способность предотвращать заражение клеток (таких как клетки респираторного эпителия) пикорнавирусом, в частности риновирусом, вирусом гриппа или респираторным синцитиальным вирусом.

Таким образом, полагают, что соединения являются противовирусными средствами, в частности, подходящими для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности пикорнавирусных инфекций, таких как риновирусная инфекция, грипп или заражение респираторным синцитиальным вирусом.

В одном воплощении соединение формулы (I) способно уменьшить воспаление, вызванное вирусной инфекцией, такой как риновирусная инфекция и, в частности, вирусные инфекции, которые приводят к высвобождению цитокинов, таких как IL-8, в особенности *in vivo*. Такую активность можно, например, проверить *in vitro* с использованием анализа риновирусиндуцированного IL-8, как описано в настоящем описании в примерах.

В одном воплощении соединение формулы (I) способно уменьшить риновирусиндуцированную экспрессию ICAM1, в особенности *in vivo*. ICAM1 представляет собой рецепторный механизм, используемый так называемыми major groove серотипами вирусов для заражения клеток. Такую активность можно измерить, например, способом, описанным в настоящем описании в примерах.

Предполагается, что описанные выше свойства сделают соединение формулы (I) особенно подходящим для применения при лечении (включая профилактику) обострений воспалительных заболеваний, в частности вирусных обострений, или при лечении вирусных инфекций у пациентов с одним или несколькими хроническими состояниями, такими как застойная сердечная недостаточность, COPD, астма, диабет, рак, и/или у пациентов с угнетенным иммунитетом, например, после трансплантации органа. Такое применение может состояться в комбинации с противовирусными средствами, такими как занами-вир, озельтамивир (например, озельтамивира фосфат), перамивир или ланинамивир.

Вообще соединение формулы (I) можно применять при лечении одного или нескольких состояний с воспалительной компонентой, которые соответственно можно лечить топической или локальной терапией.

В частности, соединение формулы (I) можно применять при лечении одного или нескольких респираторных расстройств, включая COPD (включая хронический бронхит и эмфизему), астму, детскую астму, муковисцидоз, саркоидоз, идиопатический фиброз легких, аллергический ринит и синусит, в особенности астму или COPD (включая хронический бронхит и эмфизему).

Таким образом, соединение формулы (I) можно применять при лечении воспаления легких (и его симптомов) у субъектов, страдающих от муковисцидоза.

Соединение формулы (I) можно применять при лечении болезней или расстройств глаз, включая сухой кератоконъюнктивит (сухой глаз), аллергический конъюнктивит, конъюнктивит, диабетическую ретинопатию, макулярный отек (включая влажный макулярный отек и сухой макулярный отек), послеоперационное воспаление катаракты или, в частности, увеит (включая задний, передний увеит и панувеит).

Соединение формулы (I) можно применять при лечении кожных болезней или расстройств, включая аллергический дерматит, контактный дерматит, атопический дерматит или псориаз.

Соединение формулы (I) можно применять при лечении желудочно-кишечных заболеваний или расстройств, включая неспецифический язвенный колит, IBD или болезнь Крона.

Соединение формулы (I) можно применять при лечении заболеваний или расстройств суставов, включая ревматоидный артрит или остеоартрит, и особенно воспалений суставов, вторичных к таким состояниям.

Соединение формулы (I) можно применять при лечении онкозаболеваний желудка и при ингибировании роста и метастазирования опухолей, включая онкозаболевания легких, такие как не-мелкоклеточный рак легких, рак желудка, колоректальные онкозаболевания и злокачественную меланому.

Также предполагается, что соединение формулы (I) можно применять при лечении некоторых других состояний, включая периодонтит, гингивит и фарингит.

Соединение формулы (I) также может вернуть сенситивизированное состояние пациента для лечения кортикостероидом, когда состояние пациента становится резистентным к такому лечению.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей соединение согласно раскрытию необязательно в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

Разбавители или носители могут включать разбавители или носители, подходящие для парентерального, перорального, топического, мукозального и ректального введения.

Настоящее изобретение также относится к способу получения такой фармацевтической композиции (например, фармацевтической композиции для парентерального, перорального, топического, мукозального или ректального введения), причем указанный способ включает смешивание ингредиентов.

Как упоминалось выше, такие композиции можно получить, например, для парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, интраартикулярного или периартикулярного введения, в частности, в форме жидких растворов или суспензий; для перорального введения, в частности, в форме таблеток или капсул или в форме жидких растворов или суспензий; для топического, например, легочного или интраназального введения, в частности, в форме порошков, водных растворов или суспензий, капель в нос или водных или неводных аэрозолей, и для трансдермального введения, например, в форме пэччей, кремов, мазей; для мукозального введения, например, в буккальную, сублингвальную или вагинальную слизистую оболочку и для ректального введения, например, в форме суппозитория, крема или пенки.

Композиции обычно можно вводить в стандартных или многодозовых лекарственных формах и можно получить любым из способов, хорошо известных в области фармации, например, как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Препараты для парентерального введения могут содержать эксципиенты, стерильную воду или физиологический раствор, алкиленгликоли, такие как пропиленгликоль, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрированные нафталины и т.п. Препараты для назального введения могут быть твердыми и могут содержать эксципиенты, например лактозу или декстран, или могут представлять собой водные или масляные растворы или суспензии для применения в форме капель в нос или дозированных спреев. Для трансбуккального введения типичные эксципиенты включают сахара, стеарат кальция, стеарат магния, предварительно желатинизированный крахмал и т.п.

Композиции, подходящие для перорального введения, могут включать один или несколько физиологически совместимых носителей и/или эксципиентов и могут находиться в твердой или жидкой форме. Таблетки и капсулы могут быть получены со связующими веществами, например сиропом, аравийской камедью, желатином, сорбитом, трагакантом или поливинилпирролидоном; наполнителями, такими как лактоза, сахароза, кукурузный крахмал, фосфат кальция, сорбит или глицин; лубрикантами, такими как стеарат магния, тальк, полиэтиленгликоль или диоксид кремния; и поверхностно-активными веществами, такими как лаурилсульфат натрия. Жидкие композиции могут содержать обычные добавки, такие как суспендирующие вещества, например сорбитовый сироп, метилцеллюлозу, сахарный сироп, желатин, карбоксиметилцеллюлозу или съедобные жиры; эмульгаторы, такие как лецитин или аравийская камедь; растительные масла, такие как миндальное масло, кокосовое масло, жир печени трески или арахисовое масло; консерванты, такие как бутилированный гидроксанизол (БНА) и бутилированный гидрокситолуол (БНТ). Жидкие композиции могут быть инкапсулированы, например, в желатине для обеспечения стандартной лекарственной формы.

Твердые пероральные лекарственные формы включают таблетки, капсулы с твердой оболочкой из двух частей и мягкие эластичные желатиновые (SEG) капсулы.

Сухая оболочка типично включает желатин в концентрации приблизительно 40-60%, мас./мас., пластификатор (такой как глицерин, сорбит или пропиленгликоль) в концентрации приблизительно 20-30% и воду в концентрации приблизительно 30-40%. Также могут присутствовать другие материалы, такие как консерванты, красители, замутнители и корригенты. Жидкий наполняющий материал включает твердое лекарственное вещество, которое растворено, солюбилизировано или диспергировано (с помощью таких суспендирующих веществ, как пчелиный воск, гидрированное касторовое масло или полиэтиленг-

ликоль 4000), или жидкое лекарственное средство в средах или комбинациях сред, таких как минеральное мало, растительные масла, триглицериды, гликоли, полиолы и поверхностно-активные вещества.

Соответственно соединение формулы (I) вводят топически в легкие, глаза или кишечник. Следовательно, изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей соединение по настоящему изобретению необязательно в комбинации с одним или несколькими топически приемлемыми разбавителями или носителями.

Топического введения в легкие можно достичь с использованием аэрозольного препарата. Аэрозольные препараты типично включают активный ингредиент, суспендированный или растворенный в подходящем для аэрозоля пропелленте, таком как хлорфторуглерод (CFC) или гидрофторуглерод (HFC). Подходящие CFC пропелленты включают трихлормонофторметан (пропеллент 11), дихлортетрафторметан (пропеллент 114) и дихлордифторметан (пропеллент 12). Подходящие HFC пропелленты включают тетрафторэтан (HFC-123a) и гептафторпропан (HFC-227).

Пропеллент типично составляет 40-99,5 мас.%, например 40-90 мас.%, всей композиции для ингаляции. Препарат может включать эксципиенты, включая соразтворители (например, этанол) и поверхностно-активные вещества (например, лецитин, триолеат сорбитана и т.п.). Другие возможные эксципиенты включают полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, глицерин и т.п. Аэрозольные препараты упаковывают в контейнеры и подходящую дозу доставляют с помощью мерного клапана (например, поставляемого Bespak, Valiis или 3M, или, с другой стороны, Aptar, Coster или Vari).

Топического введения в легкие можно также достичь с использованием препаратов без давления, таких как водный раствор или суспензия. Их можно вводить с помощью небулайзера, например небулайзера, который может быть ручным и портативным или для использования дома или в больнице (т.е. непортативным). Препарат может включать эксципиенты, такие как вода, буферы, средства, регулирующие тоничность, средства, регулирующие pH, поверхностно-активные вещества и соразтворители. Суспензионные жидкие и аэрозольные препараты (под давлением или без давления) типично будут содержать соединение по изобретению в тонкоизмельченной форме, например, с D_{50} 5-10 мкм, например, порядка 1-5 мкм. Распределение частиц по размерам можно представить с использованием величин D_{10} , D_{50} и D_{90} . Медианное значение D_{50} в распределении частиц по размерам определяется как размер частиц в микронах, который делит распределение пополам. Измерение, полученное из лазерной дифракции, более точно описывается как распределение по объему, и, следовательно, значение D_{50} , полученное с использованием такой процедуры, правильнее называть значением Dv_{50} (медиана распределения по объему). Используемые в настоящем описании значения Dv_{50} относятся к распределениям частиц по размерам, измеренным с использованием лазерной дифракции. Подобным образом, значения D_{10} и D_{90} , используемые в контексте лазерной дифракции, берутся для обозначения значений Dv_{10} и Dv_{90} и относятся к размеру частиц, в соответствии с чем 10% распределения лежит ниже значения D_{10} и 90% распределения лежит ниже значения D_{90} соответственно.

Топического введения в легкие можно также достичь с использованием сухого порошкового препарата. Сухой порошковый препарат будет содержать соединение по раскрытию в тонкоизмельченной форме, типично с массовым медианным диаметром (MMAD) 1-10 мкм или D_{50} 0,5-10 мкм, например приблизительно 1-5 мкм. Порошки соединения по изобретению в тонкоизмельченной форме можно получить способом микронизации или подобным способом уменьшения размеров. Микронизацию можно выполнить с использованием струйной мельницы, такой как изготавливаемые Hosokawa Alpine. Полученное распределение частиц по размерам можно определить с использованием лазерной дифракции (например, с помощью прибора Malvern Mastersizer 2000S). Препарат типично будет содержать топически приемлемый разбавитель, такой как лактоза, глюкоза или маннит (предпочтительно глюкоза), обычно с частицами сравнительно крупного размера, например с массовым медианным диаметром (MMAD) 50 мкм или больше, например 100 мкм или больше, или D_{50} 40-150 мкм. Используемый в настоящем описании термин "лактоза" относится к лактозосодержащему компоненту, включая моногидрат α -лактозы, моногидрат β -лактозы, безводную α -лактозу, безводную β -лактозу и аморфную лактозу. Лактозные компоненты могут быть переработаны микронизацией, просеиванием, помолом, прессованием, агломерацией или сушкой распылением. Также охватываются коммерчески доступные формы лактозы в различных формах, например продукты Lactohale® (лактоза сорта для ингаляции; DFE Pharma), InhaLac® 70 (просеяная лактоза для ингаляции сухого порошка; Meggle), фарматоза® (DFE Pharma) и респитоза® (просеяная лактоза сорта для ингаляции (DFE Pharma)). В одном воплощении лактозный компонент выбирают из группы, состоящей из моногидрата α -лактозы, безводной α -лактозы и аморфной лактозы.

Предпочтительно лактоза представляет собой моногидрат α -лактозы.

Сухие порошковые препараты также могут содержать другие эксципиенты. Так, в одном воплощении сухой порошковый препарат по настоящему раскрытию включает стеарат магния или кальция. Такие препараты могут иметь превосходную химическую и/или физическую устойчивость, особенно когда такие препараты также содержат лактозу.

Сухой порошковый препарат типично доставляют с использованием ингалятора для сухого порошка (DPI). Примеры систем доставки сухих порошков включают SPINHALER®, DISKHALER®, TUR-

BOHALER®, DISKUS®, SKYEHALER®, ACCUHALER® и CLICKHALER®. Другие системы доставки сухих порошков включают ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, ингалятор для сухого порошка ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR и PROHALER.

В одном воплощении соединение по настоящему изобретению предоставляется в виде микронизованного сухого порошкового препарата, например, включающего лактозу подходящего сорта.

Таким образом аспектом изобретения является фармацевтическая композиция, включающая соединение по изобретению в форме частиц в комбинации с частицами лактозы, причем указанная композиция необязательно включает стеарат магния.

В одном воплощении соединение по настоящему изобретению предоставляется в виде микронизованного сухого порошкового препарата, включающего лактозу подходящего сорта и стеарат магния, загруженный в устройство, такое как DISKUS. Соответственно, такое устройство является многодозовым устройством, например, препаратом наполняют блистеры для применения в многодозовом устройстве, таком как DISKUS.

В другом воплощении соединение по настоящему изобретению предоставляется в виде микронизованного сухого порошкового препарата, например, включающего лактозу подходящего сорта, загруженного в твердые капсулы, для применения в однодозовом устройстве, таком как AEROLISER.

В другом воплощении соединение по настоящему изобретению предоставляется в виде микронизованного сухого порошкового препарата, включающего лактозу подходящего сорта и стеарат магния, загруженный в твердые капсулы, для применения в однодозовом устройстве, таком как AEROLISER.

В другом воплощении соединение по настоящему изобретению предоставляется в виде тонкого порошка для применения в лекарственной форме для ингаляции, где порошок представляет собой мелкие частицы с D_{50} 0,5-10 мкм, например приблизительно 1-5 мкм, который получают способом уменьшения в размере иным, чем микронизация в струйной мельнице, например сушкой распылением, сушкой вымораживанием, микрофлюидизацией, гомогенизацией высокого давления, кристаллизацией из сверхкритических флюидов, ультразвуковой кристаллизацией или комбинацией таких способов или другими подходящими способами образования частиц, известными в технике, которые используются для получения тонких частиц с аэродинамическим размером частиц 0,5-10 мкм. Полученное распределение частиц по размерам можно определить с использованием лазерной дифракции (например, с помощью прибора Malvern Mastersizer 2000S). Частицы могут включать соединение или одно, или в комбинации с подходящими другими эксципиентами, которые могут способствовать переработке. Полученные мелкие частицы могут образовывать конечный препарат для доставки людям или в них, необязательно, могут быть включены дополнительные другие подходящие эксципиенты для облегчения доставки в приемлемой лекарственной форме.

Соединение по изобретению также можно вводить ректально, например, в форме суппозитория или клизм, которые включают водные или масляные растворы, а также суспензий и эмульсий и пенек. Такие композиции получают, следуя стандартным процедурам, хорошо известным специалистам в данной области техники. Например, суппозитории можно получить, смешивая активный ингредиент с обычной основой для суппозитория, такой как масло какао или другие глицериды. В таком случае лекарственное средство смешивают с подходящим нераздражающим эксципиентом, который является твердым при обычных температурах, но жидким при ректальной температуре и поэтому будет плавиться в прямой кишке с высвобождением лекарственного средства. Такими материалами являются масло какао и полиэтиленгликоли.

Как правило, для композиций, предназначенных для топического введения в глаза в форме глазных капель или глазных мазей, общее количество соединения по настоящему изобретению будет составлять приблизительно от 0,0001 до менее 4,0% (мас./мас.).

Предпочтительно в случае топического введения в глаз композиции, вводимые согласно настоящему изобретению, будут составлены в виде растворов, суспензий, эмульсий и других лекарственных форм. Как правило, предпочтительны водные растворы на основании сущности композиции, а также возможности пациента легко вводить такие композиции, закапывая одну или две капли растворов в пораженные глаза. Однако композиции также могут представлять собой суспензии, вязкие или полувязкие гели или другие типы твердых или полутвердых композиций. Суспензии могут быть предпочтительны в случае соединений, которые плохо растворяются в воде.

Альтернативой введения в глаза является интравитреальная инъекция раствора или суспензии соединения по настоящему изобретению. Кроме того, соединение по настоящему изобретению также можно вводить с помощью глазных имплантов или вставок.

Композиции, вводимые согласно настоящему изобретению, также могут включать различные другие ингредиенты, включая, но не ограничиваясь указанным, тонические средства, буферы, поверхностно-активные вещества, стабилизирующий полимер, консерванты, соразтворители и вещества, придающие вязкость. Подходящие фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают соедине-

ние по изобретению в композиции с тоническим средством и буфером. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут дополнительно необязательно включать поверхностно-активное вещество и/или паллиативное средство и/или стабилизирующий полимер.

Различные тонические средства можно использовать для регулирования тоничности композиции предпочтительно до тоничности натуральных слез в случае офтальмических композиций. Например, к композиции могут быть добавлены хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, хлорид кальция, простые сахара, такие как декстроза, фруктоза, галактоза, и/или простые полиолы, такие как сахарные спирты маннит, сорбит, ксилит, лактит, изомальтит, мальтит, и гидрогенизированные гидролизаты крахмала для приближения к физиологической тоничности. Так, количество тонического средства будет изменяться в зависимости от определенного средства, которое добавляют. Однако вообще композиции будут включать тоническое средство в количестве, достаточном для того, чтобы конечная композиция имела офтальмически приемлемую осмоляльность (как правило, приблизительно 150-450 мОсм, предпочтительно 250-350 мОсм и наиболее предпочтительно приблизительно 290 мОсм). Вообще тонические средства для изобретения будут присутствовать в интервале 2-4% мас./мас. Предпочтительные тонические средства для изобретения включают простые сахара или сахарные спирты, такие как D-маннит.

В композицию может быть добавлена подходящая буферная система (например, фосфат натрия, ацетат натрия, цитрат натрия, борат натрия или борная кислота) для предотвращения изменения pH в условиях хранения. Конкретная концентрация будет изменяться в зависимости от используемого средства. Однако предпочтительно буфер будет выбираться для поддержания целевого pH в интервале pH 5-8 и предпочтительнее для целевого pH в интервале pH 5-7.

Поверхностно-активные вещества можно необязательно использовать для доставки более высоких концентраций соединения по настоящему изобретению. Поверхностно-активные вещества функционируют как солюбилизаторы соединения и стабилизаторы коллоидной дисперсии, такой как мицеллярный раствор, микроэмульсия, эмульсия и суспензия. Примеры поверхностно-активных веществ, которые можно необязательно использовать, включают полисорбат, полоксамер, полиозил 40 стеарат, полиоксиэтилированное касторовое масло, тилоксапол, тритон и монолаурат сорбитана. Предпочтительные поверхностно-активные вещества, используемые в изобретении, такие как тритон X114 и тилоксапол, имеют гидрофильно/липофильный баланс "ГЛБ" в интервале 12,4-13,2 и приемлемы для офтальмического применения.

Дополнительными средствами, которые могут быть добавлены в офтальмические композиции соединений по настоящему изобретению, являются демульсенты, которые функционируют как стабилизирующий полимер. Стабилизирующий полимер должен представлять собой пример ионного/заряженного полимера с предпочтением для топического глазного применения, конкретнее, полимер, который несет отрицательный заряд на своей поверхности, который может проявлять зета-потенциал (-)10-50 мВ для физической устойчивости и способствует образованию дисперсии в воде (т.е. является водорастворимым). Предпочтительным стабилизирующим полимером для изобретения может быть полиэлектролит или полиэлектролиты, если их больше одного, из семейства сшитых полиакрилатов, таких как карбомеры и пемулен®, конкретно, карбомер 974r (полиакриловая кислота), при 0,1-0,5%, мас./мас.

Другие соединения также могут быть добавлены в офтальмические композиции соединения по настоящему изобретению для повышения вязкости носителя. Примеры средств, повышающих вязкость, включают, но не ограничиваются перечисленным, полисахариды, такие как гиалуроновая кислота и ее соли, хондроитина сульфат и его соли, декстраны, различные полимеры семейства целлюлоз, виниловые полимеры и полимеры акриловой кислоты.

Топические офтальмические продукты обычно упаковывают в многодозовой форме. Таким образом, требуются консерванты для предотвращения микробного загрязнения во время применения. Подходящие консерванты включают хлорид бензалкония, хлорбутанол, бромид бензододециния, метилпарабен, пропилпарабен, фенилэтиловый спирт, эденат динатрия, сорбиновую кислоту, поликватерний-1 или другие средства, известные специалистам в данной области техники. Такие консерванты обычно используют на уровне от 0,001 до 1,0% мас./об. Однодозовые композиции по настоящему изобретению будут стерильны, но обычно без консервантов. Следовательно, такие композиции обычно не будут содержать консерванты.

Практикующий врач или другой специалист сможет определить подходящую дозировку соединения по настоящему изобретению и, следовательно, количество соединения по изобретению, которое должно быть включено в любой фармацевтический препарат (в стандартной лекарственной форме или другой).

Соединение формулы (I) обладает терапевтической активностью. Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к соединению, описанному в настоящем описании, для применения при лечении одного или нескольких вышеуказанных состояний.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения, описанного в настоящем описании, для изготовления лекарственного средства для лечения одного или нескольких вышеуказанных состояний.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения одного или нескольких вы-

шеуказанных состояний, который включает введение субъекту эффективного количества соединения по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, включающей соединение.

Предполагается, что термин "лечение" включает профилактику, а также лекарственное лечение. Лечение состояний или расстройств также включает лечение их обострений.

Соединение по настоящему изобретению также можно вводить в комбинации с одним или несколькими другими активными ингредиентами, например активными ингредиентами, подходящими для лечения вышеуказанных состояний.

Например, возможные комбинации для лечения респираторных расстройств включают комбинации со стероидами (например, будезонидом, беклометазона дипропионатом, флутиказона пропионатом, мометазона фуоратом, флутиказона фуоратом, циклезонидом), β -агонистами (например, тербуталином, сальбутамолом, сальметеролом, формотеролом, вилантеролом, олодатеролом, индакатеролом, репротеролом, фенотеролом), ксантинами (например, теофилином), антихолинергическими средствами или мускариновыми антагонистами (например, ипратропием, тиотропием, аклидинием, умеклидинием или гликопирронием, например, в виде соли бромида), ингибиторами киназы P13 и противовирусными средствами (например, занамивиром, озельтамивиром, например, в виде фосфата, перамивиром и ланинамивиром).

Одно воплощение относится к соединению по изобретению для применения в качестве лекарственного средства, вводимого в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными ингредиентами, например, выбранными из кортикостероидов, β -агонистов, ксантинов, мускариновых антагонистов и ингибиторов киназы P13. Соответственно, β -агонист представляет собой β -2-агонист.

В одном воплощении соединение по раскрытию вводят ингаляцией и кортикостероид вводят перорально или ингаляцией или в комбинации, или отдельно.

В одном воплощении соединение по раскрытию вводят ингаляцией и β -агонист вводят перорально или ингаляцией или в комбинации, или отдельно.

В одном воплощении соединение по раскрытию вводят ингаляцией и мускариновый антагонист вводят перорально или ингаляцией или в комбинации, или отдельно.

В одном воплощении соединение по раскрытию вводят ингаляцией или в комбинации, или отдельно с одним или несколькими средствами из кортикостероида, β -агониста и мускаринового антагониста, и все вводят или перорально, или ингаляцией.

Кроме того, для лечения желудочно-кишечных расстройств (таких как болезнь Крона или неспецифический язвенный колит) возможные комбинации включают комбинации, например, с одним или несколькими средствами, выбранными из списка, включающего

5-аминосалициловую кислоту или ее пролекарство (такое как сульфасалазин, олсалазин или бисалазид);

кортикостероиды (например, преднизолон, метилпреднизолон или будесонид);

иммунодепрессанты (например, циклоспорин, такролимус, метотрексат, азатиоприн или 6-меркаптопурин);

антитела против TNF- α (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаба пэгол или голимумаб);

антитела против IL12/IL23 (например, устекинумаб) или низкомолекулярные ингибиторы IL12/IL23 (например, апилимод);

антитела против α 4 β 7 (например, ведолизумаб);

блокаторы MAdCAM-1 (например, PF-00547659);

антитела против молекулы клеточной адгезии α 4-интегрин (например, натализумаб);

антитела против субъединицы α рецептора IL2 (например, даклизумаб или базиликсимаб);

ингибиторы JAK3 (например, тофацитиниб или R348);

ингибиторы Syk и их пролекарства (например, фостаматиниб или R-406);

ингибиторы фосфодиэстеразы-4 (например, тетомиласт);

HMPL-004;

пробиотики;

дерсалазин;

семапимод/CPSI-2364 и

ингибиторы протеинкиназы C (например, АЕВ-071).

Для лечения глазных расстройств (таких как сухой кератоконъюнктивит или увеит) возможные комбинации включают комбинации, например, с одним или несколькими средствами, выбранными из списка, включающего

кортикостероиды (например, дексаметазон, преднизолон, триамцинолона ацетонид, дифлупреднат или флуоцинолона ацетонид);

иммунодепрессанты (например, циклоспорин, воклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолата мофетил или такролимус);

антитела против TNF- α (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаба пэгол, ESBA-105 или

голимумаб);

антитела против IL-17A (например, секукинумаб);

ингибиторы mTOR (например, сиролимус);

VGX-1027;

ингибиторы JAK3 (например, тофацитиниб или R348) и

ингибиторы протеинкиназы C (например, АЕВ-071).

Следовательно, другой аспект изобретения относится к соединению формулы (I) в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными ингредиентами, например одним или несколькими дополнительными активными ингредиентами, описанными выше.

Подобным образом, другой аспект изобретения относится к комбинированному продукту, включающему

(А) соединение по настоящему изобретению и

(В) одно или несколько других терапевтических средств, причем каждый из компонентов (А) и (В) входит в композицию в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем.

В таком аспекте изобретения комбинированный продукт может представлять собой или единый (комбинированный) фармацевтический препарат, или набор из частей.

Таким образом, этот аспект изобретения охватывает фармацевтический препарат, включающий соединение по настоящему изобретению и другое терапевтическое средство в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем (такой препарат в настоящем описании далее называется "комбинированным препаратом").

Он также охватывает набор из частей, включающих компоненты (i) фармацевтический препарат, включающий соединение по настоящему изобретению в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем; и (ii) фармацевтический препарат, включающий одно или несколько других терапевтических средств в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем, и такие компоненты (i) и (ii) предоставляются, каждый, в форме, которая подходит для введения в сочетании с другим.

Компонент (i) набора из частей представляет собой описанный выше компонент (А) в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем. Подобным образом, компонент (ii) представляет собой описанный выше компонент (В) в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем.

Одно или несколько других терапевтических средств (т.е. описанный выше компонент (В)) могут представлять собой, например, любое из средств, указанных выше в связи с лечением респираторных, желудочно-кишечных и глазных расстройств.

Если компонент (В) представляет собой более одного дополнительного терапевтического средства, такие дополнительные терапевтические средства могут быть в композиции друг с другом, или в композиции с компонентом (А), или могут быть включены в отдельные композиции.

В одном воплощении компонент (В) представляет собой одно дополнительное терапевтическое средство. В другом воплощении компонент (В) представляет собой два дополнительных терапевтических средства.

Комбинированный продукт (или комбинированный препарат или набор из частей) по данному аспекту изобретения можно использовать при лечении или предупреждении воспалительного заболевания, например воспалительных заболеваний, указанных выше, таких как

респираторные расстройства, включая COPD (вызывающую хронический бронхит и эмфизему), астму, детскую астму, муковисцидоз, саркоидоз, идиопатический фиброз легких, аллергический ринит, ринит и синусит, в особенности астму или COPD (включая хронический бронхит и эмфизему);

глазные болезни или расстройства, включая аллергический конъюнктивит, конъюнктивит, сухой кератоконъюнктивит (сухой глаз), глаукому, диабетическую ретинопатию, макулярный отек (включая диабетический макулярный отек), центральную окклюзию вены сетчатки (CRVO), сухую и/или влажную возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), воспаление после операции катаракты или, в частности, увеит (включая задний, передний увеит и панувеит), пересадку роговицы и отторжение трансплантата лимбальных клеток;

кожные болезни или расстройства, включая аллергический дерматит, контактный дерматит, атопический дерматит или псориаз; и

желудочно-кишечные заболевания или расстройства, включая глютенчувствительную энтеропатию (целиакальную болезнь), эозинофильный эзофагит, болезнь кишечный трансплантат против хозяина или, в особенности, неспецифический язвенный колит или болезнь Крона.

Аспекты изобретения, описанные в настоящем описании (например, вышеуказанное соединение, комбинации, способы и применения), могут иметь такое преимущество, что при лечении состояний, описанных в настоящем описании, они могут быть более подходящими для врача и/или пациента, более эффективными, менее токсичными, более длительного действия, лучшей селективности, с более широким интервалом активности, более сильными, давать меньше побочных действий, иметь более хороший фар-

макокинетический профиль, более хорошую устойчивость или могут иметь другие полезные фармакологические свойства по сравнению со схожими соединениями, комбинациями, способами (лечением) или применениями, известными на уровне техники для применения при лечении указанных или других состояний.

Для сравнения с соединениями известного уровня техники предполагается, что, по меньшей мере, в некоторых воплощениях соединение формулы (I) имеет одну или несколько следующих отличительных черт:

оно проявляет свойства, которые особенно подходят для топического/местного введения (например, после топического/местного введения генерация высокой концентрации в ткани-мишени, но низкая концентрация в плазме или системные концентрации соединения формулы (I), и/или быстрый клиренс соединения формулы (I) из плазмы или большого круга кровообращения);

оно имеет пониженную опасность экстравазального воздействия после внутривенного введения (например, из-за небольшого объема распространения для соединения формулы (I));

оно проявляет превосходную эффективность в отношении выбранных киназ и/или панели киназ, таких как MAPK α p38, MAPK γ p38, Src и p59-НСК;

оно проявляет низкую ингибирующую активность или ее отсутствие против киназ Olaharsky, в частности GSK3 α ;

оно проявляет низкую ингибирующую активность или ее отсутствие против киназы Syk;

оно проявляет уменьшенную индукцию β -катенина и/или ингибирование митоза в клетках;

оно показывает отсутствие или незначительное зависимое от времени ингибирование членов суперсемейства цитохрома P450; и/или

оно продуцирует менее проблемные (например, менее токсичные) метаболиты, например, после введения пациенту.

Экспериментальный раздел

Ниже приводятся аббревиатуры, используемые в настоящем описании (табл. 1). Предполагается, что любые аббревиатуры, которые не определены, имеют свои обычные приданные им значения.

Таблица 1

Аббревиатуры				
AsOH	ледяная уксусная кислота			
As ₂ O	уксусный ангидрид			
Aq	водный			
уш	уширенный			
ВЕН	этилен-мостиковый гибрид			
ВІNAP	1, 1'-бинафтил-2, 2'-диамин			
Вос	трет-бутоксикарбонил			
CSH	charged surface hybrid			
д	Дублет			
Δ	химический сдвиг			
DCM	Дихлорметан			
DIAD	диизопропилазодикарбоксилат			
DMFA	N, N-диметилформамид			
DMCO	диметилсульфоксид			
(ES ⁺)	ионизация	электронным	распылением	по
				положительному типу
(ES ⁻)	ионизация	электронным	распылением	по
				отрицательному типу
Et	этил			
EtOAc	этилацетат			
EtOH	этанол			
час	час (ы)			
HATU	гексафторфосфат			1-
	[бис (диметиламино) метилен] - 1Н-1, 2, 3-			

	триазоло [4, 5-d] пиримидиний-3-оксида
Основание	N, N-диизопропилэтиламин
Хунига	
IPA	изопропиловый спирт
ⁱ PrOAc	изопропилацетат
m	мультиплет
(M+H) ⁺	протонированный молекулярный ион
(M+H) ⁻	депротонированный молекулярный ион
Me	метил
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол
MGц	мегагерц
мин	минута (ы)
m/z	отношение массы к заряду
ЯМР	ядерный магнитный резонанс (спектроскопия)
Pd ₂ (dba) ₃	трис (добензилиденацетон) дипалладий (0)
Ph	фенил
к	квартет
RT	комнатная температура
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
с	синглет
насыщ.	насыщенный
SCX	катионный обмен на твердом носителе (смола)
т	триплет
^t Bu	трет-бутил
THF	тетрагидрофуран
ТФК	трифторуксусная кислота
УФ	ультрафиолет
АКТ	гомолог 1 онкогена вируса мышиной тимомы v-akt
АТФ	аденозин-5'-трифосфат
BALF	бронхоальвеолярная лаважная жидкость
BSA	бычий сывороточный альбумин
CPOD	хроническая обструктивная болезнь легких
CXCL1	лиганд 1 хемокина (мотив C-X-C)

COX2	субъединица II цитохром-с-оксидазы
ДСК	дифференциальная сканирующая калориметрия
DSS	декстран сульфата натрия
DTT	дитиотреитол
Клетки d-U937	дифференцированные клетки u937 PMA
DVS	динамическая сорбция паров
дцРНК	двухцепочечная РНК
ELISA	твёрдофазный иммуноферментный анализ
FACS	флуоресцентно-активированный клеточный сортинг
FBS	сыворотка плода коровы
FRET	резонансный перенос энергии флуоресценции
GM-CSF	CSF2: гранулоцитрано-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GSK3 α	киназа гликогенсинтазы 3 α
GSK3 β	киназа гликогенсинтазы 3 β
HBSS	сбалансированный солевой раствор Хенкса
HСК	киназа гемопоэтических клеток
HRV	риновирус человека
IBD	воспалительное заболевание кишечника
IC50	концентрация ингибирования на 50%
ICAM-1	молекула межклеточной адгезии 1
IFN	интерферон
IL-2	интерлейкин 2
IL-8	интерлейкин 8
JNK	c-jun N-концевая киназа
KC	хемоаттрактант для кератиноцитов
LPMC	моноклеарная клетка в lamina propria
ЛПС	липополисахарид
МАРК	митогенактивируемая протеинкиназа
МАРКАР-K2	активируемая митогенактивируемой протеинкиназой протеинкиназа 2
МКК4	активируемая митогенактивируемой протеинкиназой киназа 4
МКК6	активируемая митогенактивируемой

	протеинкиназой киназа 6
MOI	мультиплетность инфекции
MTT	бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия
OD	оптическая плотность
PBMC	моноклеарная клетка периферической крови
PBS	забуференный фосфатом Дульбекко физиологический раствор
PNA	фитогемагглютинин
P13	фосфоинозитид-3-киназа
PMA	форбол 12-миристат-13-ацетат
REC50	относительная 50% эффективная концентрация
RНК	рибонуклеиновая кислота
RНКи	RНК-интерференция
RSV	респираторно-синцитиальный вирус
SDS	додецилсульфат натрия
SMS	системы измерений поверхности
SRC	гомолог (avian) онкогенного вируса саркомы (Шмидта-Руппина A2) v-src
Syk	тирозинкиназа селезенки
TCID50	доза заражения 50% культуры ткани
TGA	термогравиметрический анализ
TLR3	толл-подобный рецептор 3
TNBS	2,4,6-тринитробензолсульфоная кислота
TNF α	фактор некроза опухоли альфа
URTI	респираторная инфекция верхних дыхательных путей
XPD	порошковая дифракция рентгеновских лучей
XRD	дифракция рентгеновских лучей

Химические примеры

Общие процедуры

Все исходные материалы и растворители получают или из коммерческих источников, или получают согласно описанию в литературе. Если не указано иное, все реакционные смеси перемешивают. Органические растворы обычным образом сушат над безводным сульфатом магния. Гидрирование выполняют в проточном реакторе Thales H-cube в установленных условиях.

Колоночную хроматографию выполняют на картриджах, предварительно заполненных насадкой диоксидом кремния (230-400 меш, 40-63 мкм), с использованием указанного количества. SCX закупают у Supelco и обрабатывают перед использованием 1M хлороводородной кислотой. Если не указано иное, реакционную смесь, которую очищают, сначала разбавляют MeOH и подкисляют несколькими каплями AcOH. Этот раствор непосредственно загружают на SCX и промывают MeOH. Затем элюируют нужный материал, промывая 0,7M NH₃ в MeOH.

Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой.

Выполняют УФ-детекцию при 215 и 254 нм с помощью или Waters X-Select Prep-C18, 5 мкм, колонка 19×50 мм, с элюированием с градиентом H₂O-MeCN, содержащим 0,1% об./об. муравьиной кислоты, в течение 10 мин, или Waters X-Bridge Prep-C18, 5 мкм, колонка 19×50 мм, с элюированием с градиентом H₂O-MeCN, содержащим 0,1% бикарбоната аммония, в течение 10 мин.

Аналитические методы

Высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой.

Метод 1. Waters XSelect CSH C18, 2,5 мкм (4,6×30 мм) при 40°C, скорость потока 2,5-4,5 мл·мин⁻¹, элюирование с градиентом H₂O-MeCN, содержащий 0,1% об./об. муравьиной кислоты, в течение 4 мин, с использованием УФ-детекции при 254 нм. Информация о градиенте: 0-3,00 мин, от 95% H₂O-5% MeCN до 5% H₂O-95% MeCN; 3,00-3,01 мин, удерживание 5% H₂O-95% MeCN, скорость потока повышают до 4,5 мл·мин⁻¹; 3,01-3,50 мин, удерживание 5% H₂O-95% MeCN; 3,50-3,60 мин, возвращение к 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока снижают до 3,50 мл·мин⁻¹; 3,60-3,90 мин, удерживание 95% H₂O-5% MeCN; 3,90-4,00 мин, удерживание 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока снижают до 2,5 мл·мин⁻¹.

Метод 2. Waters XBridge VEN C18, 2,5 мкм (4,6×30 мм), 40°C; скорость потока 2,5-4,5 мл·мин⁻¹, элюирование с градиентом H₂O-MeCN, содержащий 10 mM бикарбоната аммония, в течение 4 мин, с ис-

пользованием УФ-детекции при 254 нм. Информация о градиенте: 0-3,00 мин, от 95% H₂O-5% MeCN до 5% H₂O-95% MeCN; 3,00-3,01 мин, удерживание 5% H₂O-95% MeCN, скорость потока повышают до 4,5 мл·мин⁻¹; 3,01-3,50 мин, удерживание 5% H₂O-95% MeCN; 3,50-3,60 мин, возвращение к 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока снижают до 3,50 мл·мин⁻¹; 3,60-3,90 мин, удерживание 95% H₂O-5% MeCN; 3,90-4,00 мин, удерживание 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока снижают до 2,5 мл·мин⁻¹.

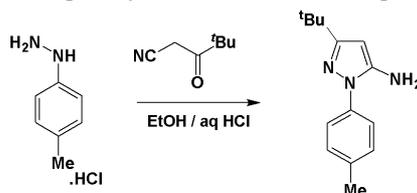
¹H ЯМР-спектроскопия.

Спектры ¹H ЯМР получают на спектрометре Bruker Avance III при 400 МГц с использованием остаточного недеитерированного растворителя в качестве стандарта и проводят, если не указано иное, в DMSO-d₆.

Примеры

Пример 1А. 1-(3-(трет-Бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевина.

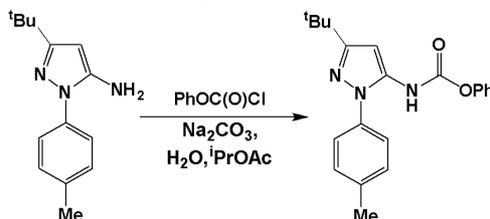
Промежуточное соединение А. 3-трет-Бутил-1-п-толил-1H-пиразол-5-амин



К раствору гидрохлорида п-толилгидразина (100 г, 630 ммоль) в EtOH (1251 мл) при перемешивании добавляют 4,4-диметил-3-оксопентаннитрил (88 г, 699 ммоль) и HCl (62,5 мл, 750 ммоль). Полученную смесь перемешивают при кипячении с обратным холодильником в течение ночи. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и концентрируют в вакууме до с.а. 1/3 исходного объема. Затем реакционную смесь охлаждают на ледяной бане и доводят pH до с.а. 8-9 с помощью 6M водного раствора NaOH. Реакционную смесь экстрагируют диэтиловым эфиром (500 мл) и органическую фазу промывают водой (2×300 мл), затем сушат над сульфатом магния и концентрируют в вакууме, получают оранжевое твердое вещество. Твердое вещество суспендируют в изогексане и перемешивают при кипячении с обратным холодильником в течение 2,5 ч, затем охлаждают и фильтруют в горячем состоянии и получают названный в подзаголовке продукт 3-трет-бутил-1-п-толил-1H-пиразол-5-амин в виде бледно-коричневого твердого вещества (76,5 г, 52%); R^t 1,31 мин (метод 1); m/z 230 (M+H)⁺ (ES⁺);

¹H ЯМР δ: 1,20 (9H, с), 2,32 (3H, с), 5,10 (2H, ушс), 5,35 (1H, с), 7,24 (2H, д), 7,42 (2H, м).

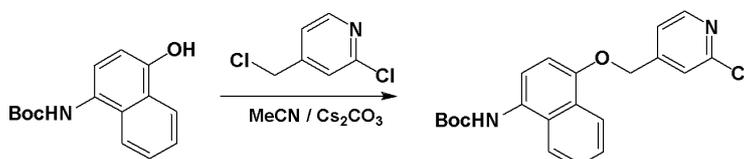
Промежуточное соединение В. Фенил-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)карбамат



К раствору карбоната натрия (11,3 г, 106 ммоль) в воде (80 мл) при перемешивании добавляют раствор 3-(трет-бутил)-1-п-толил-1H-пиразол-5-амина (промежуточное соединение А) (20 г, 87,0 ммоль). Через 10 мин добавляют фенилхлорформиат (12,1 мл, 96 ммоль) и полученную смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют водой (160 мл), слои разделяют и органический слой промывают водой (2×80 мл), рассолом (80 мл), сушат (MgSO₄) и концентрируют в вакууме. Полученное желтое твердое вещество суспендируют в смеси 10% эфира/изогексан (320 мл) и перемешивают до получения однородной суспензии. Твердое вещество собирают фильтрацией и промывают изогексаном, получают названное в подзаголовке соединение фенил-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)карбамат в виде белого порошка (27,3 г, 88%); R^t 2,65 мин (метод 1); m/z 350 (M+H)⁺ (ES⁺);

¹H ЯМР δ: 1,29 (9H, с), 2,37 (3H, с), 6,35 (1H, с), 7,10-7,23 (3H, перекрывающийся м), 7,33-7,46 (6H, перекрывающийся м), 9,99 (1H, с).

Промежуточное соединение С. трет-Бутил-(4-((2-хлорпиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамат

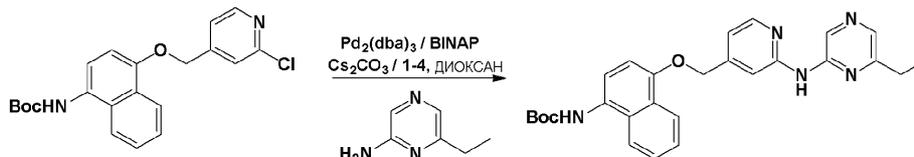


К смеси 2-хлор-4-(хлорметил)пиридина (30 г, 185 ммоль) и трет-бутил-(4-гидроксиафталин-1-

ил)карбамата (40,0 г, 154 ммоль) в ацетонитриле (200 мл) добавляют карбонат цезия (75 г, 231 ммоль) и полученную смесь греют при 55°C. Через 16 ч реакционную смесь разбавляют смесью 30% MeOH в DCM (600 мл) и водой (400 мл). Слои разделяют и водный слой экстрагируют дополнительным количеством смеси 30% MeOH в DCM (2×600 мл), органические слои концентрируют в вакууме и получают сырой продукт реакции. Сырой продукт растирают с MeOH (200 мл), обрабатывают ультразвуком в течение с.а. 5 мин и перемешивают в течение 1 суток. Полученное твердое вещество собирают фильтрацией и промывают MeOH (2×10 мл), получают названное в подзаголовке соединение трет-бутил-4-((2-хлорпиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамат в виде желтого твердого вещества (43 г, 70%); R^t 2,60 мин (метод 1); m/z 383 (M-H)⁻ (ES⁻);

¹H ЯМР δ: 1,47 (9H, с), 5,41 (2H, с), 6,98 (1H, д), 7,36 (1H, д), 7,55-7,61 (3H, перекрывающийся м), 7,65 (1H, м), 7,94 (1H, м), 8,29 (1H, м), 8,45 (1H, м), 9,00 (1H, ушс).

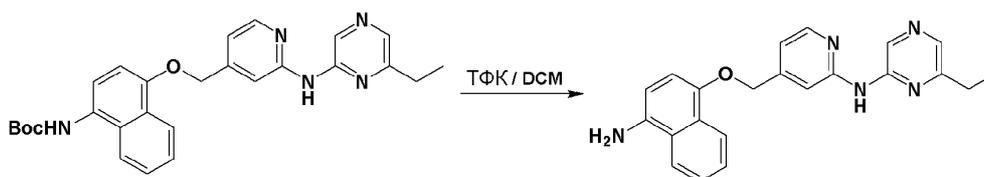
Промежуточное соединение D (с защитной группой). трет-Бутил-4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамат



Смесь трет-бутил-4-((2-хлорпиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамата (промежуточное соединение C) (1050 мг, 2,73 ммоль), 6-этилпиразин-2-амина (437 мг, 3,55 ммоль) и карбоната цезия (1333 мг, 4,09 ммоль) в 1,4-диоксане (15 мл) обезгаживают азотом в течение 5 мин. Добавляют раствор Pd₂(dba)₃ (125 мг, 0,136 ммоль) и BINAP (170 мг, 0,273 ммоль) в 1,4-диоксане (5 мл) и реакционную смесь перемешивают при 90°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждают и перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч, затем разбавляют смесью 10% MeOH/DCM (25 мл) и фильтруют через слой целлита, промывая дополнительно смесью 10% MeOH/DCM (15 мл). Растворитель удаляют в вакууме, сырой продукт реакции соединяют с MeOH (15 мл) и перемешивают в течение 3 ч. Полученное оранжевое твердое вещество извлекают фильтрацией, затем соединяют с раствором MeOH/EtOH (5 мл) и перемешивают в течение 72 ч. Снова полученное оранжевое твердое вещество извлекают фильтрацией, затем добавляют ацетон (20 мл) и смесь перемешивают в течение 2 ч. Оставшееся твердое вещество отфильтровывают и фильтрат упаривают и получают названное в подзаголовке соединение трет-бутил-4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамат (360 мг, 27%); R^t 2,6 мин (метод 2); m/z 472 (M+H)⁺ (ES⁺);

¹H ЯМР δ: 1,18 (3H, т), 1,47 (9H, с), 2,63 (2H, к), 5,36 (2H, с), 6,99 (1H, д), 7,06 (1H, д), 7,36 (1H, д), 7,53-7,63 (2H, м), 7,90-8,06 (3H, перекрывающийся м), 8,29 (1H, д), 8,36 (1H, м), 8,91 (1H, с), 8,96 (1H, с), 10,06 (1H, с).

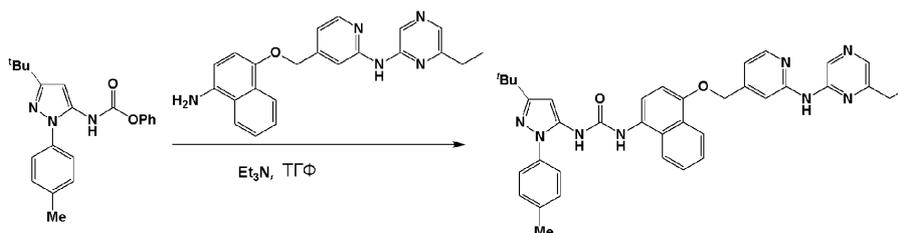
Промежуточное соединение D. N-(4-(((4-Аминонафталин-1-ил)окси)метил)пиридин-2-ил)-6-этилпиразин-2-амин



К раствору трет-бутил-4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамата (промежуточное соединение D (с защитной группой)) (360 мг, 0,763 ммоль) в DCM (15 мл) добавляют TFA (1,485 мл, 19,09 ммоль), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 4 ч и затем концентрируют в вакууме. Остаток соединяют с насыщ. раствором гидрокарбоната натрия и перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч. Твердое вещество отфильтровывают, промывают ацетонитрилом и сушат в вакууме, получают названное в подзаголовке соединение N-(4-(((4-аминонафталин-1-ил)окси)метил)пиридин-2-ил)-6-этилпиразин-2-амин в виде бежевого твердого вещества (200 мг, 69%); R^t 2,14 мин (метод 2); m/z 372 (M+H)⁺ (ES⁺);

¹H ЯМР δ: 1,20 (3H, т), 2,64 (2H, к), 5,18-5,24 (4H, перекрывающийся м), 6,59 (1H, д), 6,82 (1H, д), 7,03 (1H, д), 7,41-7,51 (2H, перекрывающийся м), 7,98-8,01 (2H, м), 8,04 (1H, м), 8,22-8,29 (2H, перекрывающийся м), 8,91 (1H, с), 10,04 (1H, с).

1-(3-(трет-Бутил)-1-(п-толил)-1H-пирозол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевина



К раствору фенил-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)карбамата (промежуточное соединение В) (0,042 г, 0,121 ммоль) и N-(4-(((4-аминонафталин-1-ил)окси)метил)пиридин-2-ил)-6-этилпиразин-2-амина (промежуточное соединение D) (0,093 г, 0,250 ммоль) в ТГФ (1,5 мл) при 40°C добавляют триэтиламин (0,013 мл, 0,093 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 40°C в течение 40 мин, затем охлаждают до RT и перемешивают в течение 3 суток, затем концентрируют в вакууме. Сырой продукт реакции очищают хроматографией на силикагеле (колонка 12 г, 0-5% MeOH в DCM) и получают не совсем белое твердое вещество. Продукт повторно очищают препаративной ВЭЖХ (Gilson, Acidic (0,1% муравьиной кислоты), Acidic, Waters X-Select Prep-C18, 5 мкм, колонка 19×50 мм, 45-75% MeCN в воде), получают названное в заголовке соединение 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевину в виде не совсем белого твердого вещества (0,029 г, 49%); R^t 2,26 мин (метод 1); m/z 627 (M+H)⁺ (ES⁺), 625 (M-H)⁻ (ES⁻);

¹H ЯМР δ: 1,18 (3H, т), 1,28 (9H, с), 2,40 (3H, с), 2,63 (2H, к), 5,36 (2H, с), 6,36 (1H, с), 7,02 (1H, д), 7,07 (1H, дд), 7,37 (2H, м), 7,45 (2H, м), 7,56-7,67 (3H, перекрывающийся м), 7,94 (1H, м), 7,99 (1H, с), 8,02 (1H, с), 8,30 (1H, д), 8,39 (1H, м), 8,60 (1H, с), 8,81 (1H, с), 8,92 (1H, с), 10,08 (1H, с).

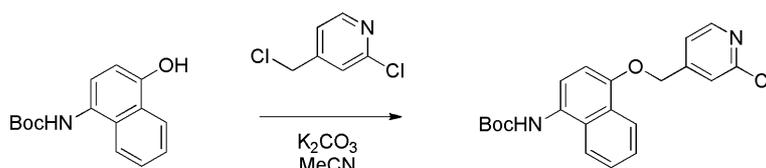
Пример 1В. 1-(3-(трет-Бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевина (другая партия).

1-(3-(трет-Бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевину (10,0 г) перемешивают в ацетонитриле (770 мл) при 22°C. Гетерогенную смесь нагревают до температуры образования флегмы со скоростью 3°C/мин и поддерживают кипение в течение 2,5 ч. В смесь вносят затравку кристаллической 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (100 мг).

Смесь равномерно охлаждают до 20°C в течение 18 ч, затем снова нагревают до температуры образования флегмы, кипятят с обратным холодильником в течение 2 ч и затем равномерно охлаждают до 22°C в течение 18 ч. Твердый продукт реакции отфильтровывают, промывают ацетонитрилом (77 мл) и сушат в течение 18 ч при 45°C в вакууме, получают 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевину (8,73 г).

Пример 2А. Малеат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (форма 2).

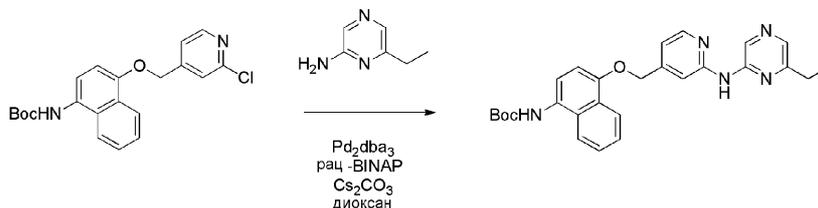
Промежуточное соединение С. трет-Бутил-(4-(((2-хлорпиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамат



К 2-хлор-4-(хлорметил)пиридину (1,05 экв., 59,5 г) добавляют ацетонитрил (420 мл) и смесь перемешивают при 20°C. К смеси добавляют трет-бутил-(4-гидрокси-1-нафталин-1-ил)карбамат (90,8 г), затем добавляют карбонат калия (72,6 г). Гетерогенную смесь нагревают до 55°C со скоростью 1,0 К/мин.

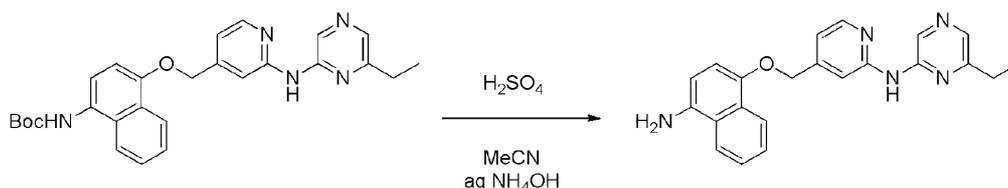
Смесь перемешивают в течение 16 ч при 55°C и затем реакционную смесь охлаждают до 22°C. Добавляют воду (1260 мл) в течение 30 мин, смесь перемешивают в течение 30 мин при 22°C. Выпавшее в осадок вещество отфильтровывают и промывают 200 мл воды. Продукт реакции сушат в вакууме при 50°C в течение 20 ч и получают трет-бутил-(4-(((2-хлорпиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамат (100,0 г, 90,6%).

Промежуточное соединение D (с защитной группой). трет-Бутил-(4-(((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамат



К трет-бутил-4-((2-хлорпиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамату (промежуточное соединение С) (9,6 г) добавляют диоксан (125 мл) и смесь перемешивают при 20°C. К смеси при перемешивании при 20°C добавляют карбонат цезия (2 экв., 16,3 г) и 2-амино-6-этилпиразин (1,5 экв., 4,8 г). Через реакционную смесь пропускают аргон. К реакционной смеси добавляют трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0) (0,05 экв., 1,14 г) и рацемический BINAP (0,10 экв., 1,56 г). Смесь перемешивают еще в течение 15 мин при 20°C. Смесь нагревают до 90°C со скоростью 1,5 К/мин и затем перемешивают в течение 12 ч при 90°C. Смесь охлаждают до 20°C и продолжают перемешивание еще в течение 6 ч. Гетерогенную смесь фильтруют через целит и фильтр промывают диоксаном (дважды по 5 мл). Фильтрат концентрируют в вакууме при 2 кПа (20 мбар) и 50°C. Остаток растворяют в этаноле (150 мл). Происходит спонтанная кристаллизация. Гетерогенную смесь перемешивают в течение 3 ч при 22°C. Выпавшее в осадок вещество отфильтровывают и промывают этанолом (10 мл). Продукт сушат в вакууме при 50°C в течение 20 ч и получают трет-бутил-4-(((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамат (9,05 г, 76,8%).

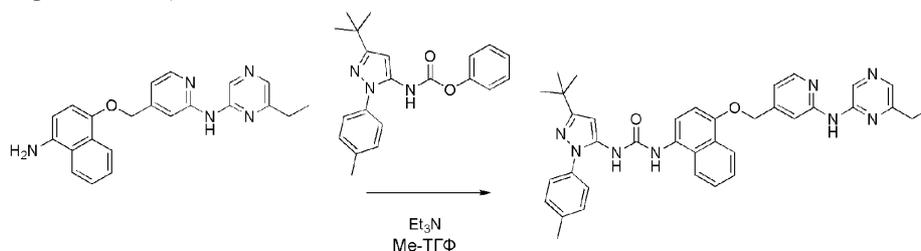
Промежуточное соединение D. N-(4-(((4-Аминонафталин-1-ил)окси)метил)пиридин-2-ил)-6-этилпиразин-2-амин



К трет-бутил-4-((2-(((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)карбамату (промежуточное соединение D (с защитной группой)) (10,5 г) добавляют ацетонитрил (200 мл), и гетерогенную смесь перемешивают при 20°C. Добавляют серную кислоту (4,5 экв., 5,5 мл) в течение 2 ч при 20°C.

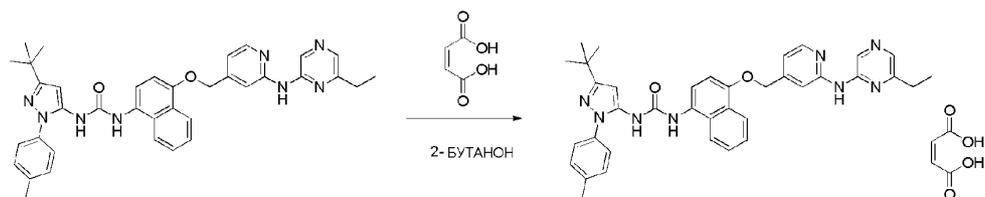
Гетерогенную смесь перемешивают еще 2 ч при 20°C. К реакционной смеси в течение 15 мин добавляют водный раствор аммиака (10 экв., 17 мл) и температуру поддерживают на уровне 20°C путем охлаждения. К гетерогенной смеси добавляют воду (33,4 мл) в течение 5 мин при 20°C. После перемешивания в течение 30 мин при 20°C смесь охлаждают до 5°C и перемешивают в течение еще 2 ч при 5°C. Выпавшее в осадок вещество отфильтровывают и промывают водой (33,4 мл) и 2-пропанолом (18 мл). Продукт сушат при 50°C в вакууме в течение 24 ч и получают N-(4-(((4-аминонафталин-1-ил)окси)метил)пиридин-2-ил)-6-этилпиразин-2-амин (6,2 г, 75%).

1-(3-(трет-Бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(((2-(((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевина



К N-(4-(((4-аминонафталин-1-ил)окси)метил)пиридин-2-ил)-6-этилпиразин-2-амину (промежуточное соединение D) (41,3 г) добавляют 2-метилтетрагидрофуран (1809 мл) и смесь перемешивают при 20°C. К смеси добавляют фенил-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)карбамат (1,2 экв., 51,3 г). Добавляют триэтиламин (0,25 экв., 3,9 мл) и смесь перемешивают еще 10 мин при 20°C. Гетерогенную реакционную смесь нагревают до 48°C в течение 30 мин и выдерживают при 48°C в течение 3,5 ч. Через 10 мин при 48°C смесь становится гомогенной, и в нее вносят затравку кристаллическую 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(((2-(((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевину (60 мг). Реакционную смесь охлаждают до 20°C и перемешивают еще в течение 16 ч. Образовавшееся выпавшее в осадок вещество отфильтровывают и промывают 2-метилтетрагидрофураном (дважды по 139 мл). Продукт сушат в течение 18 ч при 45°C в вакууме и получают 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(((2-(((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевину (54,1 г, 77,5%).

Малеат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(((2-(((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (форма 2)



К 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевине (111,04 г) добавляют 2-бутанон (4442 мл) и перемешивают при 20°C. Гетерогенную смесь нагревают до 65°C и она становится гомогенным раствором. Добавляют тиол SilicaMetS (акцептор металлов) (5,55 г) и смесь перемешивают еще в течение 30 мин при 65°C. Добавляют NoIt A Surpa (активированный уголь) (5,55 г) и смесь перемешивают еще 20 мин при 65°C. Смесь горячей фильтруют через целит. Фильтр промывают горячим 2-бутанолом (1555 мл) (60°C). К фильтрату добавляют 2-бутанон (2887 мл) и при перемешивании доводят до 60°C.

Малеиновую кислоту (1,0 экв., 20,56 г) растворяют в 2-бутаноне (555 мл). Раствор maleиновой кислоты добавляют к раствору 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины в течение 80 мин при 65°C. После добавления 10% раствора maleиновой кислоты в смесь вносят затравку кристаллический maleат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (форма 2). Смесь выдерживают при перемешивании в течение 1 ч при 60°C, затем охлаждают неравномерно по экспоненте 2,3 в течение 6 ч до 5°C. Выпавшее в осадок вещество отфильтровывают и дважды промывают 2-бутанолом (278 мл). Продукт сушат при 45°C в вакууме в течение 20 ч и получают maleат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (форма 2) (113,8 г, 86,5%).

Пример 2В. Maleат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (форма 2) (другая партия).

К 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевине (7,50 г) добавляют 2-бутанон (750 мл) и смесь перемешивают. Смесь нагревают до 60°C в течение 20 мин. К смеси в течение 5 мин добавляют раствор maleиновой кислоты (1,39 г) в 2-бутаноне (12 мл). Происходит спонтанная кристаллизация после того, как добавят приблизительно половину раствора maleиновой кислоты. Смесь перемешивают в течение 30 мин при 60°C, затем охлаждают экспоненциально (экспонента=2,3) в течение 6 ч до 5°C, затем перемешивают в течение 30 мин при 5°C, затем нагревают до 65°C в течение 30 мин, затем перемешивают в течение 30 мин при 65°C, затем охлаждают экспоненциально (экспонента=2,3) в течение 6 ч до 5°C, затем перемешивают в течение 30 мин при 5°C, затем нагревают до 65°C в течение 30 мин, затем перемешивают в течение 30 мин при 65°C, затем охлаждают экспоненциально (экспонента=2,3) в течение 6 ч до 5°C. Продукт отфильтровывают и дважды промывают 2-бутанолом (50 мл), затем сушат при 45°C в вакууме и получают maleат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (форма 2) (7,0 г).

Пример 2С. Maleат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (форма 1).

Maleат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (15 мг) растворяют в ТГФ (100 об.) при 50°C и температуру изменяют циклически между 50°C и комнатной температурой в течение 24 ч (4 ч при каждой температуре). Затем раствор выдерживают в холодильнике в течение 24 ч, после чего извлекают твердый материал (форма 1).

Пример 2D. Maleат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (форма 1) (другая партия).

1-(3-(трет-Бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевину растворяют в ТГФ (40 об.) при 50°C и добавляют 1 экв. maleиновой кислоты. Образец оставляют созреть между RT и 50°C (4 ч при каждой температуре) в течение 2 суток. Извлекают твердый материал (форма 1).

Пример 3. Микронизованные партии.

Пример 3А. 1-(3-(трет-Бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевина в микронизованной форме.

Микронизованную 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевину получают путем микронизации материала из примера 1В в устройстве для микронизации струйной мельнице 50 AS Hosokawa Alpine Spiral (5 см) (давление 100 кПа (1,0 бар)) (ручная загрузка). Параметры объемного распределения частиц по размерам, определенные методом лазерной дифракции с использованием Malvern Mastersizer 2000S (дисперсия в смеси вода/Твин 80, 0,1% мас./об.), приводятся в таблице ниже.

Dv10 (микрон)	Dv50 (микрон)	Dv90 (микрон)
0,15	1,54	10,76

Пример 3В. Малеат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины, форма 2, в микронизованной форме.

Микронизованный малеат 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевины (форма 2) получают путем микронизации материала из примера 2В в устройстве для микронизации струйной мельнице 50 AS Hosokawa Alpine Spiral (5 см) (давление 100 кПА (1,0 бар)) (ручная загрузка). Параметры объемного распределения частиц по размерам, определенные методом лазерной дифракции с использованием Malvern Mastersizer 2000S (дисперсия в смеси вода/Твин 80, 0,1% мас./об.), для материала загрузки и продукта приводятся в таблице ниже.

	Dv10 (микрон)	Dv50 (микрон)	Dv90 (микрон)
Загрузка (пример 2В)	3	9	128
Продукт (пример 3В)	1,21	2,18	4,00

Пример 4. Лактозосодержащие композиции, содержащие 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)-3-(4-((2-((6-этилпиразин-2-ил)амино)пиридин-4-ил)метокси)нафталин-1-ил)мочевину в виде свободного основания и малеата (форма 2), подходящие для ингаляции.

Композиции получают смешиванием указанных далее ингредиентов.

Пример	Активный ингредиент (пример 3В) (малеат (форма 2), микронизован)	Моногидрат лактозы*	Стеарат магния**
4a	75 мг	75 мг	-
4b	75 мг	-	75 мг
4c	75 мг	35 мг	35 мг
Пример	Активный ингредиент (пример 3А) (форма свободного основания, микронизована) **	Моногидрат лактозы*	Стеарат магния**
4d	10 мкг	25 мг	-
4e	10 мкг	25 мг	1%
4f	100 мкг	25 мг	-
Пример	Активный ингредиент (пример 3В) (малеат (форма 2), микронизован)	Моногидрат лактозы*	Стеарат магния**
4g	10 мкг	25 мг	-
4h	10 мкг	25 мг	1%
4i	100 мкг	25 мг	-

*Lactohale LH200

**Источник Peter Greven (сорт Ligamed MF-2V; растительного происхождения)

Пример 5. Характеризация и испытание на устойчивость.

Физическая характеризация активного ингредиента.

Инфракрасная спектроскопия (ИК) - микроослабленная полная отражательная способность (mi-сгоATR).

Образцы анализируют с использованием подходящего вспомогательного оборудования для mi-сгоATR.

Число сканирований 32.

Разрешение 1 см⁻¹.

Интервал длин волн 4000-400 см⁻¹.

Прибор спектрометр Thermo Nexus 670 FTIR.

Детектор DTGS с окнами KBr.

Расщепитель луча Ge на KBr.

Вспомогательное оборудование для Harrick Split Pea с кристаллом Si microATR.

ИК-спектр образца материала примера 2A, показанный на фиг. 1, отражает виды колебаний молекулярной структуры соединения примера 1 в виде его соли малеата.

Порошковая XRD.

Анализ методом порошковой дифракции рентгеновских лучей (XPD) материала формы 2 выполняют на дифрактометре X'PertPRO MPD PANanalytical (Philips). Прибор снабжен рентгеновской трубкой Cu LFF.

Соединение наносят на держатель образца с нулевым фоном.

Параметры прибора.

Напряжение на зажимах генератора 45 кВ.

Сила тока на зажимах генератора 40 мА.

Геометрия Брэгга-Брентано.

Платформа: вращающаяся платформа.

Условия измерения.

Тип сканирования: непрерывное.

Интервал сканирования: 3-50° 2θ.

Размер шага 0,02°/шаг.

Время подсчета 30 с/шаг.

Время оборота спиннера 1 с.

Тип излучения CuKα.

Траектория падающего луча: траектория отклоненного луча.

Запрограмм. щель для 15 мм: большой + расхождения антирассеивающий экран.

Щель Соллера 0,04 рад: щель Соллера 0,04 рад.

Маска для луча 15 мм Ni фильтр +.

Антирассеивающая щель 1°.

Детектор X'Celerator.

Лучевой нож +.

Анализ методом порошковой дифракции рентгеновских лучей (XPD) материала формы 1 выполняют на дифрактометре Bruker AXS C2 GADDS. Соединение слегка спрессовывают на предметном стекле.

Параметры прибора.

Напряжение на зажимах генератора 40 кВ.

Сила тока на зажимах генератора 40 мА.

Геометрия отражение (=Брэгга-Брентано).

Платформа: автоматическая платформа XYZ.

Условия измерения.

Тип сканирования: непрерывное.

Интервал сканирования: 3-30° 2θ.

Размер шага 0,05°/шаг.

Время подсчета 120 с.

Тип излучения CuKα.

Детектор HiStar двумерный.

Одностороннее многослойное зеркало Гебеля в сочетании с коллиматором с точечной апертурой 0,3 мм.

Порошковая дифрактограмма образца материала примера 2A, приведенная на фиг. 2, показывает дифракционные пики в отсутствие гало, указывая, что соединение присутствует в виде кристаллического продукта. Эта дифрактограмма характеризует кристаллический полиморф форму 2.

Порошковая дифрактограмма образца материала примера 2D, приведенная на фиг. 3, показывает дифракционные пики в отсутствие гало, указывая, что соединение присутствует в виде кристаллического продукта. Эта дифрактограмма характеризует кристаллический полиморф форму 1.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).

Приблизительно 3 мг испытываемого соединения переносят в стандартную алюминиевую кювету для образца TA-Instrument. Кювету для образца закрывают соответствующей крышкой и регистрируют кривую ДСК на TA-Instruments Q1000 MTDSC, снабженном охлаждающей ячейкой RCS. Используют параметры, указанные ниже.

Начальная температура 25°C.

Скорость нагревания 10°C/мин.

Конечная температура 300°C.

Поток азота 50 мл/мин.

Кривая ДСК образца материала примера 2A, приведенная на фиг. 4, показывает плавление с разло-

жением продукта при приблизительно 198,6°C (форма 2).

Термогравиметрический анализ (ТГА).

Испытываемое соединение переносят в алюминиевую кювету для образца. Термогравиметрическую кривую регистрируют на термогравиметре TA-Instruments Q500. Используют параметры, указанные ниже.

Начальная температура: комнатная температура.

Скорость нагревания 20°C/мин.

Фактор разрешения 4.

Конечное состояние 300°C или <80 [(мас./мас.)%].

График ТГА образца материала примера 2А показан на фиг. 5. Потерю массы не регистрируют в области температур от комнатной температуры до 175°C. Потеря массы при температуре выше 175°C происходит из-за разложения продукта. Динамическая сорбция паров (DSV).

Приблизительно 20 мг соединения переносят в анализатор динамической сорбции паров SMS, и регистрируют изменение массы относительно атмосферной влажности при 25°C. Используют параметры, указанные ниже.

Сушка 60 мин в атмосфере азота.

Равновесие 60 мин/шаг.

Точки измерения RH (%).

Первый набор: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5.

Второй набор: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 0.

Испытания на DSV выполняют на образце материала примера 2А (см. фиг. 6 и 7). Во время начальной стадии сушки регистрируют потерю массы 0,3%. Оказывается, что продукт не является гигроскопичным.

Продукт после DSV исследуют методом XRD и ИК, и он остается в одной и той же форме твердого состояния до испытания и после испытания (данные не приводятся). Не наблюдают никаких признаков разложения соли.

Сканирующая электронная микроскопия (SEM).

В экспериментах с SEM результаты собирают на сканирующем электронном микроскопе Phenom Pro. Небольшое количество образца закрепляют на алюминиевом выступе с использованием проводящей двусторонней клейкой ленты. Наносят тонкий слой золота с использованием напылительной машины (20 мА, 120 с).

Образцы материала формы 1 и формы 2 соли малеата соединения по изобретению проверяют с помощью SEM. Продукт формы 1 имеет иглоподобную морфологию. Продукт формы 2 имеет пластинчатоподобную морфологию. Пластинчатоподобная морфология формы 2 является более подходящей для получения продукта для ингаляции, чем иглоподобная морфология формы 1.

Итог по результатам физической характеристики активного ингредиента.

Испытанный материал является кристаллическим согласно XRD и плавится с разложением при приблизительно 198,6°C. Потери массы при ТГА не наблюдают между комнатной температурой и 175°C. Материал, как оказывается, не является гигроскопичным. Не имеется доказательств конверсии твердого состояния или разложения соли. Такие свойства подтверждают пригодность соли малеата соединения формулы (I) как кандидата в лекарственное средство.

Физическая характеристика активного ингредиента в микронизованной форме.

Образец материала примера 3В исследуют методами ИК, порошковой рентгенографии, ДСК, ТГА и DVS схоже с исследованиями, описанными выше для материала примера 2А. Результаты ИК и порошковой рентгенографии, по существу, такие же (данные не приводятся). Испытываемый материал является кристаллическим на основании XRD и плавится с разложением при приблизительно 194,6°C согласно ДСК. Как оказывается, материал не является гигроскопичным (данные не приводятся). Не имеется доказательств конверсии твердого состояния или разложения соли (данные не приводятся). Такие свойства подтверждают пригодность соли малеата соединения формулы (I) в микронизованной форме как кандидата в лекарственное средство.

Испытание на физическую устойчивость - устойчивость смесей с лактозой.

Композиции примеров 4а, 4b и 4с хранят в течение 3, 6 и 13 недель в условиях 40°C/75% RH, 50°C/80% RH и 50°C/RH окружающей среды. Рентгенограммы и ИК-спектры получают во время ноль и в три момента времени (параметры испытаний такие же, как описанные выше для характеристики активного ингредиента). Не наблюдают существенных различий в рентгенограммах или ИК-спектрах между временем ноль и любой из трех точек (данные не приводятся). Не наблюдают изменений формы твердого состояния или разложения соли.

Испытание на химическую устойчивость - устойчивость активного ингредиента и смесей.

Метод UPLC для определения разложения.

Образцы экстрагируют смесью растворителей (DMCO/вода, 80:20) (7 мл) в 10-мл сосуде. Хроматографию UPLC выполняют с использованием параметров, следующих далее.

Колонка Supelco Ascentis Express C18, длина 150 мм × вн.д. 3,0 мм, размер частиц 2,7 мкм.

Температура колонки 30°C.

Температура автосемплера 5°C.

Скорость потока 0,40 мл/мин.

Подвижная фаза: растворитель А: 10 мМ ацета аммония (0,771 г/л)+0,1% об./об. трифторуксусной кислоты в воде; растворитель В: смесь ацетонитрил/изопропиловый спирт 70:30 (об./об.).

Градиент

Растворитель	Время в минутах					
	0	20	25	30	31	36
%А	90	35	0	0	90	90
%В	10	65	100	100	10	10

Время выполнения анализа 36 мин.

Время сбора данных 30 мин.

Объем впрыска 5 мкл.

Длина волны сканирования от 200 до 400 нм.

Длина волны для вычисления однородности содержания 334,0 нм.

Композиции примеров 4d, 4e, 4f, 4g, 4h и 4i хранят в течение 14 и 30 дней в условиях 50°C/75% RH, 60°C/30% RH, 60°C/50% RH, 70°C/10% RH, 70°C/75% RH и 80°C/50% RH.

Разложение определяют методом UPLC в момент времени ноль и моменты 7, 14 и 30 дней, и результаты показаны на фиг. 8, графики А-Г.

Процент общего разложения для композиций, содержащих соль малаат, форма 2, активного ингредиента, всегда ниже, чем для эквивалентных композиций, содержащих свободное основание активного ингредиента, что показывает, что соль малаат, форма 2, более устойчива в таких композициях. Процент общего разложения для композиций, содержащих соль малаат, форма 2, активного ингредиента в более высокой концентрации, ниже, чем для композиций, содержащих соль малаат, форма 2, активного ингредиента в таких композициях в более низкой концентрации.

В подобных исследованиях материала примера 1В и примера 2В (т.е. немикронизованного материала и материала вне смеси), в которых образцы хранят до 30 дней в условиях 50°C/75% RH, 60°C/50% RH, 70°C/10% RH, 70°C/75% RH и 80°C/50% RH, получают качественно схожие результаты, т.е. процент общего разложения для соли малаата всегда ниже, чем для свободного основания (данные не приводятся).

Из таких результатов оказывается, что соль малаат соединения по изобретению является химически более устойчивой (одна и в комбинации с лактозой), чем форма свободного основания.

Пример 6. Биологическое исследование.

Экспериментальные методы биологического исследования.

Анализ ингибирования ферментов.

Активность ингибирования ферментов соединения, раскрытого в настоящем описании, определяют FRET с использованием синтетических пептидов, меченных как донорными, так и акцепторными флуорофорами (Z-LYTE, Life Technologies, Paisley, UK).

Ингибирование фермента МАРК α p38.

Ингибирующую активность соединения по изобретению против изоформы МАРК α p38 (МАРК14: Life Technologies) оценивают косвенно путем определения уровня активации/фосфорилирования пептида-мишени молекулы МАРКАР-K2 ниже МАРК α p38. Фермент (40 нг/мл, 2,5 мкл) инкубируют с испытываемым соединением (2,5 мкл раствора 40 мкг/мл, 12 мкг/мл, 4 мкг/мл, 1,2 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,12 мкг/мл, 0,04 мкг/мл, 0,012 мкг/мл, 0,004 мкг/мл или 0,0012 мкг/мл) в течение 2 ч при RT. Затем к смеси фермент/соединение добавляют FRET пептиды (8 мкМ, 2,5 мкл) и неактивную p38 α -мишень МАРКАР-K2 (Life Technologies, 2000 нг/мл) и соответствующий раствор АТФ (2,5 мкл, 40 мкМ) и инкубируют в течение 1 ч при RT. Добавляют проявляющий реагент (протеаза, 5 мкл) за 1 ч до детекции во флуоресцентном микроспектрофотометре (Envision, Perkin Elmer, Waltham, MA, США).

Ингибирование фермента МАРК γ p38.

Ингибирующую активность соединения по изобретению против МАРК γ p38 (МАРК12: Life Technologies) оценивают путем определения уровня активации/фосфорилирования пептида-мишени. Фермент (800 нг/мл, 2,5 мкл) инкубируют с испытываемым соединением (2,5 мкл раствора 40 мкг/мл, 12 мкг/мл, 4 мкг/мл, 1,2 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,12 мкг/мл, 0,04 мкг/мл, 0,012 мкг/мл, 0,004 мкг/мл или 0,0012 мкг/мл) в течение 2 ч при RT. Затем к смесям ферменты/соединение добавляют FRET пептиды (8 мкМ, 2,5 мкл) и соответствующий раствор АТФ (2,5 мкл, 400 мкМ) и инкубируют в течение 1 ч при RT. Добавляют проявляющий реагент (протеаза, 5 мкл) за 1 ч до детекции во флуоресцентном микроспектрофотометре (Envision, Perkin Elmer).

Ингибирование ферментов Hck, c-Scr и Syk.

Ингибирующую активность соединения по изобретению против ферментов Hck, c-Scr и Syk (Life Technologies) оценивают способом, схожим с описанным в настоящем описании выше. Соответствующий фермент (соответственно, 1000 нг/мл, 1400 нг/мл или 2000 нг/мл, 2,5 мкл) инкубируют с испытываемым соединением (40 мкг/мл, 12 мкг/мл, 4 мкг/мл, 1,2 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,12 мкг/мл, 0,04 мкг/мл,

0,012 мкг/мл, 0,004 мкг/мл или 0,0012 мкг/мл, 2,5 мкл каждого раствора) в течение 2 ч при RT. Затем к смесям фермент/соединение добавляют FRET пептиды (8 мкМ, 2,5 мкл) и соответствующие растворы АТФ (2,5 мкл, 800 мкМ для c-Scg и 60 мкМ АТФ для HCK и Syk) и инкубируют в течение 1 ч при RT. Добавляют проявляющий реагент (протеаза, 5 мкл) за 1 ч до детекции во флуоресцентном микроспектрофотометре (Envision, Perkin Elmer).

Ингибирование фермента GSK 3 α .

Ингибирующую активность соединения по изобретению против изоформы фермента GSK 3 α (Life Technologies) оценивают способом, схожим с описанным в настоящем описании выше. Белок GSK3 α (500 нг/мл, 2,5 мкл) инкубируют с испытываемым соединением (2,5 мкл 40 мкг/мл, 12 мкг/мл, 4 мкг/мл, 1,2 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,12 мкг/мл, 0,04 мкг/мл, 0,012 мкг/мл, 0,004 мкг/мл или 0,0012 мкг/мл) в течение 2 ч при RT. Затем к смеси фермент/соединение добавляют FRET пептид (8 мкМ, 2,5 мкл), который является мишенью фосфорилирования для GSK3 α , и раствор АТФ (40 мкМ, 2,5 мкл), и полученную смесь инкубируют в течение 1 ч при RT. Добавляют проявляющий реагент (протеаза, 5 мкл) за 1 ч до детекции во флуоресцентном микроспектрофотометре (Envision, Perkin Elmer).

Во всех случаях сайт-специфическая протеаза расщепляет только нефосфорилированный пептид и устраняет сигнал FRET. Уровни фосфорилирования в каждой реакции вычисляют с использованием отношения испускания кумарина (донор) к испусканию флуоресцеина (акцептор), причем низкие отношения указывают на высокие уровни фосфорилирования и высокие отношения указывают на низкие уровни фосфорилирования. Процент ингибирования в каждой реакции вычисляют относительно неингибированного контроля, и затем вычисляют концентрацию для 50% ингибирования (величина IC₅₀) из кривой зависимости от концентрации.

Клеточные анализы (используемые в примерах).

Для оценки соединения по настоящему изобретению используют следующие клеточные анализы, и результаты приводятся ниже.

ЛПС-индуцированное высвобождение TNF α /IL-8 в клетках d-U937.

Клетки U937 клеточной линии моноцитов человека дифференцируют в клетки типа макрофагов путем инкубации с PMA (100-200 нг/мл) в течение 48-72 ч. Клетки предварительно инкубируют с конечными концентрациями испытываемого соединения в течение 2 ч и затем стимулируют ЛПС (0,1 мкг/мл; из E.Coli: 0111:B4, Sigma) в течение 4 ч. Супернатант собирают для определения концентраций TNF α и IL-8 сэндвич-ELISA (Duo-set, R&D Systems). Ингибирование продуцирования TNF α и IL-8 вычисляют в виде процента от ингибирования, которого достигают с помощью 10 мкг/мл BIRB796 при каждой концентрации испытываемого соединения путем сравнения с контролем средой. Относительную 50% эффективную концентрацию (REC₅₀) определяют из полученной кривой зависимости от концентрации. Ингибирование продуцирования IL-8 вычисляют при каждой концентрации испытываемого соединения путем сравнения с контролем средой. Из полученной кривой зависимости от концентрации вычисляют концентрацию для 50% ингибирования (IC₅₀).

Вызываемая поли-I:C экспрессия ICAM-1 в клетках BEAS2B.

Поли-I:C используют в таких исследованиях, как простой миметик РНК вируса. Смесь поли-I:C-олигофектамин (2% олигофектамина \pm 1 мкг/мл поли-I:C, 25 мкл; Life Technologies и Invivogen Ltd., San Diego, CA соответственно) трансфицируют в клетки BEAS2B (клетки бронхиального эпителия человека, АТСС). Клетки предварительно инкубируют с конечными концентрациями испытываемых соединений в течение 2 ч и определяют уровень экспрессии ICAM-1 на поверхности клеток ELISA на клеточной основе. В момент времени 18 ч после трансфекции поли-I:C клетки фиксируют в 4% растворе формальдегида в PBS (100 мкл) и затем эндогенную пероксидазу блокируют, добавляя буфер для промывки (100 мкл, 0,05% Твин в PBS: PBS-Твин), содержащий 0,1% азида натрия и 1% пероксида водорода. Клетки промывают буфером для промывки (3 \times 200 мкл). После блокады лунок 5% молоком в PBS-твин (100 мкл) в течение 1 ч клетки инкубируют с антителами против человеческого ICAM-1 (50 мкл; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) в 1% BSA в PBS в течение ночи при 4°C.

Клетки промывают PBS-твином (3 \times 200 мкл) и инкубируют с вторичными антителами (100 мкл; антикроличий IgG, конъюгированный с HRP, Dako Ltd., Glostrup, Дания). Затем клетки инкубируют с субстратом (50 мкл) в течение 2-20 мин с последующим добавлением стоп-раствора (50 мкл, 1N H₂SO₄). Сигнал ICAM-1 детектируют, считывая поглощение при 450 нм против эталонной длины волны 655 нм с использованием спектрофотометра. Затем клетки промывают PBS-твином (3 \times 200 мкл), и определяют число клеток в каждой лунке, считывая поглощение при 595 нм после окрашивания кристаллическим фиолетовым (50 мкл 2% раствора в PBS) и элюирования 1% раствором SDS (100 мкл) в PBS. Измеренные показания OD 450-655 корректируют по числу клеток путем деления на показание OD595 в каждой лунке. Ингибирование экспрессии ICAM-1 вычисляют при каждой концентрации испытываемого соединения путем сравнения с контролем средой. Из полученной кривой зависимости от концентрации вычисляют концентрацию для 50% ингибирования (IC₅₀).

Анализ митоза клеток.

Мононуклеоциты из периферической крови (PBMC) от здоровых субъектов выделяют из цельной

крови (Quintiles, London, UK) с использованием градиента плотности (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich, Poole, UK). Затем РВМС (3 млн клеток на образец) обрабатывают 2% РНА (Sigma-Aldrich, Poole, UK) в течение 48 ч с последующим воздействием в течение 20 ч испытываемых соединений в различных концентрациях. За 2 ч до сбора РВМС обрабатывают демеколцином (0,1 мкг/мл; Life Technologies, Paisley, UK) для того, чтобы клетки остались в метафазе. Для того чтобы наблюдать митозные клетки, РВМС пропитывают и фиксируют, добавляя Intraprep (50 мкл; Beckman Coulter, Франция), и окрашивают антифосфогистоном 3 (0,26 нг/л; #9701; Cell Signaling) и иодидом пропидия (1 мг/мл; Sigma-Aldrich), как описано ранее (Muehlbauer P.A. et al., *Mutation Res.*, 2003, 537, 117-130). Флуоресценцию наблюдают с использованием проточного цитометра ATTUNE (Life Technologies), препятствуя лимфоцитам. Процент ингибирования митоза вычисляют для каждой обработки относительно обработки средой (0,5% ДМСО).

Влияние испытываемых соединений на жизнеспособность клеток: анализ с МТТ.

Дифференцированные клетки U937 предварительно инкубируют с каждым испытываемым соединением (конечная концентрация 10 мкг/мл в 200 мкл сред, указанных ниже) по двум схемам: первая в течение 4 ч в средах RPMI1640 с 5% FCS, и вторая в средах RPMI1640 с 10% FCS в течение 24 ч. Супернатант заменяют новыми средами (200 мкл) и в каждую лунку добавляют исходный раствор МТТ (10 мкл, 5 мг/мл). После инкубации в течение 1 ч среды удаляют в каждую лунку добавляют ДМСО (200 мкл), планшеты слегка встряхивают в течение 1 ч и затем считывают поглощение при 550 нм. Процент утраты клетками жизнеспособности вычисляют для каждого соединения относительно обработки средой (0,5% ДМСО). Затем явное возрастание жизнеспособности клеток в случае обработки лекарственным средством относительно среды вносят в таблицу в виде отрицательного процента.

Продукция цитокинов в обработанных ЛПС макрофагах мокроты пациентов с COPD.

Пациенты с COPD вдыхают 3% (мас./об.) гипертонический солевой раствор для небулайзера с использованием ультразвукового небулайзера (DeVibiss, Carthage, MO) с вдохами и выдохами в течение 5 мин. Такую процедуру повторяют максимум три раза, пока не получат достаточно мокроты. Образцы мокроты гомогенизируют и энергично перемешивают с использованием вихревого смесителя в 0,02% об./об. растворе дитиотреитола (DTT). Образцы повторно суспендируют в PBS (40 мл) с последующим центрифугированием при 1500 об/мин при 4°C в течение 10 мин и получают осадки клеток мокроты. Осадки промывают PBS (40 мл). Затем клетки мокроты ресуспендируют в 4 мл свободной от макрофагов среде (macrophage-SFM, Life Technologies, содержащая 20 Е/мл пенициллина, 0,02 мг/мл стрептомицина и 5 мкг/мл амфотерицина В) и высевают в high bound 96-луночный планшет с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37°C и с 5% CO₂, чтобы дать возможность макрофагам присоединиться ко дну лунок планшета. Клетки на планшете промывают свежей macrophage-SFM (200 мкл/лунка) для удаления нейтрофилов и других загрязняющих клеток. Прилипшие клетки (главным образом, макрофаги мокроты) на планшете используют для дальнейшего анализа. Индукции мокроты проводят в Quintiles Drug Research Unit при Guys Hospital, и Quintiles получают одобрение по этике и письменное информированное согласие.

Соответственно, 1 мкл раствора, содержащего или испытываемое соединение или эталон в установленных концентрациях (0,1 мкг/мл, 0,01 мкг/мл или 0,001 мкг/мл), или, с другой стороны, 1 мкл среды ДМСО как контроля, добавляют в каждую лунку (200 мкл) и клетки инкубируют в течение 2 ч. Клетки стимулируют раствором ЛПС (50 мкл, конечная концентрация 1 мкг/мл) и инкубируют в течение 18 ч при 37°C и с 5% CO₂. Затем собирают супернатант и хранят при -80°C. Используют подходящие наборы Lumindex для оценки выбранных аналитов. После оттаивания супернатанта мультиплексируют магнитные гранулы с антителами и инкубируют в 96-луночном планшете со стандартным фоновым раствором или соответствующим объемом образца в течение ночи при встряхивании при 4°C. После двукратной промывки буфером для промывки из набора по 200 мкл на лунку с использованием промывающего устройства для планшета с магнитными частицами гранулы инкубируют при встряхивании в течение 1 ч при RT с раствором антител, конъюгированных с биотином, предоставленным набором. Добавляют раствор стрептавидина в течение 30 мин при RT при встряхивании. После промывки 200 мкл буфера для промывки на лунку гранулы ресуспендируют в Sheath Fluid (150 мкл) и сразу же анализируют. Уровень каждого аналита в супернатанте вычисляют с использованием программы Xcel Fit с уравнением с 4 или 5 параметрами с использованием каждой стандартной кривой. Ингибирование продуцирования каждого цитокина вычисляют при каждой концентрации путем сравнения с контролем средой.

Риновирусиндуцированное высвобождение IL-8.

Риновирус RV16 человека получают из Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA). Вирусные штаммы генерируют путем инфицирования клеток MRC5 HRV до тех пор, пока 80% клеток не подвергнутся цитопатическому действию.

Клетки BEAS2B инфицируют HRV при MOI 1,2 и инкубируют в течение 1 ч при 33°C при осторожном встряхивании для промотирования абсорбции. Затем клетки промывают PBS, добавляют свежие среды и клетки инкубируют дополнительно в течение 72 ч. Собирают супернатант для анализа на концентрации IL-8 с использованием набора DuoSet ELISA development (R&D Systems, Minneapolis, MN). Соединения добавляют за 2 ч до заражения HRV и через 1 ч после заражения, когда вымывают незараженный HRV.

Клеточные анализы (не использованные в примерах).

Можно было бы использовать для оценки соединения по настоящему изобретению следующие далее клеточные анализы.

Риновирусиндуцированное высвобождение IL-8 (вариант вышеописанного способа) и экспрессия ICAM-1.

Риновирус RV16 человека получают из Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA). Вирусные штаммы генерируют путем инфицирования клеток Hela HRV до тех пор, пока 80% клеток не подвергнутся цитопатическому действию.

Клетки BEAS2B инфицируют HRV при MOI 5 и инкубируют в течение 1 ч при 33°C при осторожном встряхивании для промотирования абсорбции. Затем клетки промывают PBS, добавляют свежие среды и клетки инкубируют дополнительно в течение 72 ч. Собирают супернатант для анализа на концентрации IL-8 с использованием набора DuoSet ELISA development (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Уровень экспрессии ICAM-1 на поверхности клеток определяют ELISA на клеточной основе. Через 72 ч после инфицирования клетки фиксируют 4% раствором формальдегида в PBS. После блокады эндогенной пероксидазы путем добавления 0,1% раствора азида натрия и 1% раствора пероксида водорода клетки промывают буфером для промывки (0,05% Твина в PBS: PBS-Твин). После блокады лунки 5% молоком в PBS-Твин в течение 1 ч клетки инкубируют с антителами против человеческого ICAM-1 в 5% BSA в PBS-Твин (1:500) в течение ночи и инкубируют с вторичными антителами (антикроличий IgG, конъюгированный с HRP, Dako Ltd.). Сигнал ICAM-1 детектируют, добавляя субстрат и считывая поглощение при 450 нм с эталонной длиной волны 655 нм с использованием спектрофотометра. Затем лунки промывают PBS-Твин (3×200 мкл), и определяют число клеток в каждой лунке, считывая поглощение при 595 нм после окрашивания кристаллическим фиолетовым и элюирования 1% раствором SDS. Измеренные показания OD₄₅₀₋₆₅₅ корректируют по числу клеток путем деления на показание OD₅₉₅ в каждой лунке. Соединения добавляют за 2 ч до заражения HRV и через 1-2 ч после заражения, когда вымывают незараженный HRV.

ЛПС-индуцированное высвобождение TNF α /IL-8 в клетках PBMC.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от здоровых субъектов выделяют из цельной крови с использованием градиента плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare).

Клетки PBMC высевают в 96-луночные планшеты и обрабатывают соединениями в нужной концентрации в течение 2 ч перед добавлением 1 нг/мл раствор ЛПС (*Escherichia Coli*: O111:B4 от Sigma Aldrich) в течение 24 ч в обычных условиях культивирования тканей (37°C, 5% CO₂). Супернатант собирают для определения концентраций TNF α сэндвич-ELISA (Duo-set, R&D Systems) и считывают на флуоресцентном микроспектрофотометре (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific). Из кривой дозовой зависимости вычисляют концентрацию для 50% ингибирования (IC₅₀) продуцирования IL-8 и TNF α .

Высвобождение IL-2 и IFN- γ в клетках PBMC, стимулированных CD3/CD28.

PBMC от здоровых субъектов выделяют из цельной крови с использованием градиента плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). Клетки вносят в 96-луночные планшеты, предварительно сенсibilизированные моноклональными антителами CD3/CD28 (0,3 мкг/мл, eBioscience, и 3 мкг/мл BD, Pharmingen, соответственно). Затем в лунки добавляют соединение в нужной концентрации и планшет оставляют на 3 суток в нормальных условиях культивирования тканей. Супернатанты собирают и определяют высвобождение IL-2 и IFN- γ сэндвич-ELISA (Duo-set, R&D Systems). Определяют IC₅₀ из кривой дозовой зависимости.

IL-1 β -индуцированное высвобождение IL-8 в клетках HT29.

Клетки HT29 клеточной линии аденокарциномы толстой кишки человека высевают в 96-луночный планшет (24 ч) и предварительно в течение 2 ч обрабатывают соединениями в нужной концентрации, а затем добавляют 5 нг/мл IL-1 β (Abcam) в течение 24 ч. Супернатанты собирают для количественного определения IL-8 сэндвич-ELISA (Duo-set, R&D Systems). Определяют IC₅₀ из кривой дозовой зависимости.

Пролиферация Т-клеток.

PBMC от здоровых субъектов выделяют из цельной крови с использованием градиента плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). Фракцию лимфоцитов сначала обогащают CD4⁺ Т-клетками отрицательным магнитным клеточным сортированием по инструкциям изготовителя (Miltenyi Biotec 130-091-155). Затем отделяют нативные CD4⁺ Т-клетки с использованием положительного магнитного отбора CD45RA⁺ клеток с использованием микрошариков по инструкциям изготовителя (130-045-901). Клетки высевают по 2×10⁵ клеток на лунку в 100 мкл RPMI/10% PBS в 96-луночный планшет с плоскодонными лунками (Corning Costar). Разбавляют 25 мкл испытываемого соединения в соответствующей концентрации (8× конечная конц.) в нормальной среде и добавляют в лунки на планшете по две для достижения интервала зависимости от дозы 0,03 нг/мл - 250 нг/мл. Добавляют ДМСО как отрицательный контроль. Планшеты предварительно инкубируют в течение 2 ч и затем стимулируют 1 мкг/мл анти-CD3 (ОКТ3; eBioscience). Через 72 ч среду в каждой лунке заменяют 150 мкл свежей среды, содержащей 10 мкМ BrdU (Roche). Через 18 ч супернатант удаляют, планшет сушат и клетки фиксируют, добавляя 100 мкл

фиксирующего/денатурирующего раствора в каждую лунку, в течение 20 мин по инструкциям изготовителя (Roche). Планшеты один раз промывают PBS перед добавлением анти-BrdU антител для детекции и инкубируют в течение 90 мин при комнатной температуре. Затем планшеты осторожно промывают 3× предоставленным буфером для промывки и проявляют, добавляя 100 мкл раствора субстрата. Реакцию останавливают, добавляя 50 мкл 1M H₂SO₄, и считывают поглощение при 450 нм на спектрофотометре (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific). Из кривой дозовой зависимости определяют IC₅₀.

Анализ биопсии человека.

Получают биопсии слизистой оболочки кишечника из воспаленных участков толстой кишки больных IBD. Биопсийный материал нарезают на небольшие кусочки (2-3 мм) и помещают на стальные объёмодержатели в камере для органной культуры при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% O₂ в бессывороточные среды. К ткани добавляют контроль ДМСО или испытываемые соединения в нужной концентрации и инкубируют в течение 24 ч в камере для органной культуры. Собирают супернатант для определения уровней IL-6, IL-8, IL-1β и TNFα R&D ELISA. Процент ингибирования высвобождения цитокинов испытываемыми соединениями вычисляют относительно высвобождения цитокинов для контроля ДМСО (100%).

Высвобождение IL-2 и IFNγ в стимулированных CD3/CD28 клетках LPMC от больных IBD.

Мононуклеарные клетки lamina propria (LPMC) выделяют из операционных образцов воспаленной при IBD слизистой оболочки или операционных образцов здоровой слизистой оболочки и очищают следующим образом. Слизистую оболочку снимают с более глубоких слоев операционных образцов скальпелем и нарезают на фрагменты размером 3-4 мм. Эпителий удаляют, промывая фрагменты ткани три раза 1 mM ЭДТК (Sigma-Aldrich, Poole, UK) с перемешиванием с использованием магнитной мешалки, удаляя супернатант после каждой промывки. Затем образец обрабатывают коллагеназой типа 1A (1 мг/мл, Sigma-Aldrich) в течение 1 ч при перемешивании при 37°C. Затем полученную клеточную суспензию фильтруют с использованием фильтра с ячейками 100 мкм, дважды промывают, ресуспендируют в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), содержащей 10% сыворотки плода коровы, 100 Е/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и используют для культивирования клеток.

Свежевыделенные LPMC (2×10⁵ клетки/лунка) стимулируют 1 мкг/мл α-CD3/α-CD28 в течение 48 ч в присутствии или контроля ДМСО или соединения в соответствующих концентрациях. Через 48 ч супернатант извлекают и анализируют на присутствие TNFα и IFNγ R&D ELISA. Процент ингибирования высвобождения цитокинов испытываемыми соединениями вычисляют относительно высвобождения цитокинов, определенного для контроля ДМСО (100%).

Ингибирование высвобождения цитокинов из миофибробластов, взятых у больных IBD.

Миофибробласты из воспаленной при IBD слизистой оболочки выделяют следующим образом.

Слизистую оболочку иссекают и отделяют, образцы слизистой оболочки размером 1 мм культивируют при 37°C во влажной камере с CO₂ в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM, Sigma-Aldrich) с добавлением 20% FBS, 1% незаменимых аминокислот (Invitrogen, Paisley, UK), 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 50 мкг/мл гентамицина и 1 мкг/мл амфотерицина (Sigma-Aldrich). Созданные колонии миофибробластов высевают в 25-см³ колбы для культивирования и культивируют в DMEM с добавлением 20% FBS и антибиотиков по меньшей мере до 4 пассажа для получения достаточного количества для использования в экспериментах по стимуляции.

Затем субконфлюэнтный монослой миофибробластов высевают в 12-луночные планшеты по 3×10⁵ клеток на лунку и подвергают голоданию в бессывороточной среде в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂, перед культивированием в течение 24 ч в присутствии или контроля ДМСО или соединения в соответствующих концентрациях. Через 24 ч супернатант извлекают и анализируют на присутствие IL-8 и IL-6 R&D ELISA. Процент ингибирования высвобождения цитокинов испытываемыми соединениями вычисляют относительно высвобождения цитокинов, определенного для контроля ДМСО (100%).

Дегрануляция нейтрофилов человека.

Нейтрофилы выделяют из периферической крови человека следующим образом.

Кровь собирают венопункцией и для предотвращения свертыванию добавляют смесь 1:1 ЭДТК и стерильного забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS, без Ca⁺/Mg⁺). Добавляют декстран (3%, мас./об.) (1 ч. раствора декстрана на 4 ч. крови), и кровь выстаивают в течение приблизительно 20 мин при RT. Супернатант аккуратно расслаивают в градиенте плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare) и центрифугируют (15 мин, 2000 об/мин, без торможения). Супернатант аспирируют, и клеточный осадок ресуспендируют в стерильном физиологическом растворе (0,2%) не более 60 секунд (для лизиса загрязняющих красных клеток крови). Затем добавляют 10-кратный объем PBS, и клетки центрифугируют (5 мин, 1200 об/мин). Клетки ресуспендируют в HBSS + (сбалансированный солевой раствор Хэнкса (без фенолового красного), содержащий цитохалазин В (5 мкг/мл) и 1 mM CaCl₂) для достижения 5×10⁵ клеток/мл.

В каждую лунку 96-луночного планшета с клетками с V-образным дном добавляют 5×10⁴ клеток и инкубируют (30 мин, 37°C) с испытываемым соединением в соответствующей концентрации (0,3-1000 нг/мл) или средой (ДМСО, конечная конц. 0,5%). Дегрануляцию стимулируют, добавляя fMLP (конечная

конц. 1 мкМ), и после дополнительной инкубации (30 мин, 37°C) клетки удаляют центрифугированием (5 мин, 1500 об/мин), и супернатант переносят в 96-луночный планшет с плоскодонными лунками. Добавляют равный объем тетраметилбензида (ТМВ), через 10 мин реакцию обрывают, добавляя равный объем серной кислоты (0,5М), и считывают поглощение при 450 нм (вычитают фон при 655 нм). Концентрацию для 50% ингибирования определяют из полученной кривой зависимости от концентрации.

Анализ на цитотоксичность.

В соответствующее число лунок 96-луночного планшета добавляют 5×10^4 клеток ТК6 (клеточная линия лимфобластов-Т) в 195 мкл сред (RPMI с добавлением 10% сыворотки плода коровы). В лунки добавляют 5 мкл контроля ДМСО (конечная концентрация 0,5%, об./об.) или раствора испытуемого соединения (конечная концентрация 5 или 1 мкг/мл) и инкубируют при 37°C, 5% CO₂. Через 24 ч планшет центрифугируют при 1300 об/мин в течение 3 мин и супернатант отбрасывают. Затем клетки ресуспендируют в 7,5 мкг/мл растворе иодида пропидия (PI) в PBS. Через 15 мин клетки анализируют проточной цитометрией (BD Accuri). Жизнеспособность, %, вычисляют в виде % клеток, которые являются PI-отрицательными в экспериментальных лунках, нормализованных к контролю ДМСО.

Скрининг *in vivo*: фармакокинетика и противовоспалительная активность (используемый в примерах).

Используют следующие скрининги *in vivo* для оценки соединения по настоящему изобретению, и результаты приводятся ниже.

Накопление ЛПС-индуцированных нейтрофилов у мышей.

Неголодным мышам Balb/C интратрахеальным путем дают дозу или среды или испытуемого вещества в указанное время (в интервале 2-8 ч) и затем стимулируют воспалительную реакцию, применяя стимул ЛПС. В T=0 мышей помещают в камеру для воздействия и воздействуют ЛПС (7,0 мл 0,5 мг/мл раствора в PBS в течение 30 мин). Еще через 8 ч животным дают наркоз, их трахеи канюлируют, и экстрагируют BALF путем инфузии и затем из их легких берут 1,0 мл PBS через трахеальный катетер. Общее и дифференциальное число белых клеток в образцах BALF измеряют с использованием гемоцитометра Neubaur. Мазки BALF образцов с помощью центрифуги получают центрифугированием при 200 об/мин в течение 5 мин при RT и окрашивают с использованием системы красителей DiffQuik (Dade Behring). Клетки считают с использованием иммерсионной микроскопии. Данные о числе нейтрофилов в BAL приводятся как среднее±S.E.M. (среднеквадратическая ошибка). Процент ингибирования накопления нейтрофилов вычисляют для каждой обработки относительно обработки средой.

Модель с сигаретным дымом.

Крыс A/J (самцы в возрасте 5 недель) подвергают воздействию сигаретного дыма (4% сигаретный дым, разбавленный воздухом) в течение 30 мин/день в течение 11 дней с использованием экспериментальной системы для ингаляции табачного дыма для мелких животных (модель SIS-CS; Sibata Science Technology, Токуо, Япония). Испытуемые вещества вводят интраназально (35 мкл раствора в смеси 10% ДМСО/PBS) один раз ежедневно в течение 3 дней после последнего воздействия сигаретного дыма. Через 12 ч после последнего дозирования каждому из животных дают наркоз, трахеи канюлируют и собирают бронхоальвеолярную саважную жидкость (BALF). Определяют число альвеолярных макрофагов и нейтрофилов анализом FACS (EPICS® ALTRA II, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, США) с использованием антимышиных антител MOMA2 (макрофаги) или антимышиных антител 7/4 (нейтрофилы). BALF центрифугируют и собирают супернатант. Уровень кератиноцитного хемоаттрактанта (KC; CXCL1) в BALF определяют количественно с использованием набора Quantikine® mouse KC ELISA kit (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, США).

Скрининг *in vivo*: фармакокинетика и противовоспалительная активность (не используется в примерах).

Следующие скрининги *in vivo* можно использовать для оценки соединения по настоящему изобретению.

DSS-индуцированный колит у мышей.

Неголодным 10-12-недельным самцам мышей BDF1 перорально через зонд дают дважды в день дозу среды или эталонного соединения (5-ASA) или испытуемого соединения за день до (день -1) стимуляции воспалительной реакции путем обработки DSS. В день 0 исследования DSS (5%, мас./об.) вводят в питьевой воде с последующим BID дозированием среды (5 мл/кг), эталона (100 мг/кг) или испытуемого соединения (5 мг/кг) в течение 7 дней. Питьевую воду с DSS восполняют каждые 3 дня. Во время исследования животных взвешивают каждый день, наблюдают за стулом и регистрируют как оценку, основанную на консистенции стула. Во время умерщвления в день +6 толстую кишку извлекают и регистрируют длину и массу. Участки толстой кишки берут для анализа на MPO для определения инфильтрации нейтрофилов или для гистопатологической оценки для определения тяжести заболевания.

TNBS-индуцированный колит у мышей.

Неголодным 10-12-недельным самцам мышей BDF1 перорально через зонд дают дважды в день дозу среды (5 мл/кг), или эталонного соединения (будезонид, 2,5 мг/кг), или испытуемого соединения (1,5 или 50 мг/кг) за день до (день -1) стимуляции воспалительной реакции путем обработки 2,4,6-

тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS) (15 мг/мл в смеси 50% этанола/50% физиологического раствора). В день 0 исследования TNBS (200 мкл) вводят внутрь толстой кишки через пластиковый катетер с последующим BID дозированием среды, эталона или испытываемого соединения в течение 2 или 4 дней. Во время исследования животных взвешивают каждый день, наблюдают за стулом и регистрируют как оценку, основанную на консистенции стула. Во время умерщвления в день 2 (или день 4) толстую кишку извлекают и регистрируют длину и массу. Участки толстой кишки берут для анализа на МРО для определения инфильтрации нейтрофилов или для гистопатологии, включая оценку для определения тяжести заболевания.

Адаптивный перенос у мышей.

В день исследования 0 самок мышей Balb/C terminated и получают селезенки для извлечения клеток CD45RB^{high} (с использованием протокола SCID IBD cell Separation). Затем приблизительно 4×10^5 клеток/мл клеток CD45RB^{high} инъецируют IP (100 мкл/мышь) самкам SCID животных. В день 14 исследования мышей взвешивают и произвольно распределяют на группы обработки на основании массы тела. В день 21 вводят соединения BID через оральный зонд в среде арахисовом масле при уровнях доз, указанных ниже, и объеме дозы 5 мл/кг. Обработку продолжают до дня 42 исследования, в этот день животных вскрывают через 4 ч после a.m. введения. Регистрируют длину и массу толстой кишки и используют в качестве вторичной конечной точки в исследовании как меру отека толстой кишки. Затем толстую кишку делят на шесть секций, четыре из которых используют для гистопатологической оценки (первичная конечная точка) и две гомогенизируют для анализа на цитокины. Данные приводят в % ингибирования индукции окна между наивными животными и животными со средой, где более высокое ингибирование предполагает большую близость к наивному фенотипу без заболевания.

Результаты скрининга in vitro и in vivo.

Результаты скрининга in vitro для соединения по изобретению (форма свободного основания) приводятся ниже в табл. 2, 3, 4 и 5 и на фиг. 9. Сравнение осуществляют со структурно родственными соединениями N-(4-(4-(3-(3-трет-бутил-1-п-толил-1H-пиразол-5-ил)уреидо)нафталин-1-илокси)пиримидин-2-ил)-2-метоксиацетамидом (пример 1 в WO2010/112936), которое ранее описано как сильное противовоспалительное средство с противовирусным действием, а также с пропионатом флутиказона, который является хорошо известным противовоспалительным средством.

Таблица 2

Профиль испытываемых соединений к ферментам p38 MAPK α и γ , HCK, c-Src, Syk и GSK3 α

Испытываемое соединение	Величины IC ₅₀ для ингибирования фермента (нМ)					
	p38 MAPK α	p38 MAPK γ	HCK	c-Src	Syk	GSK3 α
Эталонное соединение	10	87	7	11	42	18
Соединение по изобретению	26	152	55	199	>15955	>15105

Таблица 3

Ингибирование ЛПС-индуцированного высвобождения TNF α и IL-8 и индуцированной поли-IC экспрессии ICAM-1 испытываемыми соединениями

Испытываемое соединение	ЛПС-Индукцированное высвобождение (нМ)		Поли-IC/ICAM1 (нМ)
	IL-8	TNF α	
Испытываемое соединение	IC ₅₀ (dU937)	REC ₅₀ (dU937)	IC ₅₀ (BEAS2B)
Эталонное соединение	1, 2	0, 7	3, 8
Соединение по изобретению	11, 4	5, 5	61, 1

Таблица 4

Влияние испытываемых соединений на жизнеспособность клеток

	Анализ с МТТ ¹		Анализ митоза ²
	Жизнеспособность клеток в указанный момент времени в клетках d-U937		Ингибирование (%) митоза
Испытываемое соединение	4 часа	24 часа	При 5 мкг/мл
Эталонное соединение	-	+	93 ± 5
Соединение по изобретению	-	-	18 ± 7

1. Скрининг жизнеспособности клеток: -ve и +ve показывает величину ниже и выше, соответственно, несущественный пороговый эффект определяется как 30% ингибирование при 10 мкг/мл в указанный момент времени.

2. Среднее±SEM.

Таблица 5

Влияние испытываемых соединений на продуцирование цитокинов в макрофагах обработанной ЛПС мокроте больных COPD

	Процент ингибирования при 0,1 мкг/мл
Испытываемое соединение	IL-6
Пропионат флутиказона	29 ± 21
Соединение по изобретению	48 ± 9

Вывод из результатов скрининга *in vitro* и *in vivo*.

Соединение по изобретению показывает профиль в анализах *in vitro* и *in vivo*, соответствующий противовоспалительной активности. Оно имеет очень слабую активность для киназ Syk и GSK3 α (табл. 2 и 3).

Соединение по изобретению показывает заметную меньшую активность в системе анализов, которые определяют его влияние на жизнеспособность клеток, что указывает, что оно вероятно обладает превосходным терапевтическим индексом по сравнению с эталонным соединением (табл. 4).

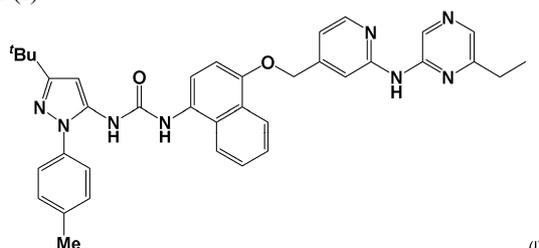
Соединение по изобретению показывает превосходную противовоспалительную активность по сравнению с пропионатом флутиказона в используемой системе анализов (табл. 5).

Соединение по изобретению показывает зависимое от дозы ингибирование HRV-индуцированного IL-8 (фиг. 9).

В итоге такие результаты предполагают, что соединение по изобретению имеет противовоспалительные свойства, схожие с эталонным соединением, раскрытым выше, и, что является преимуществом, ассоциируется с превосходным терапевтическим индексом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

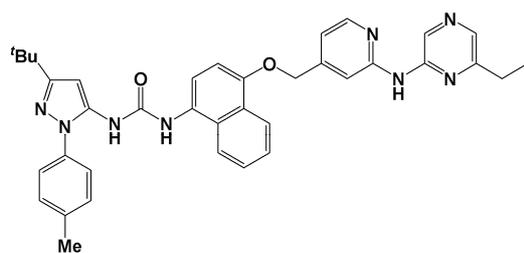
1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1 в форме его соли малеата.

3. Полиморфная форма 2 соли малеата соединения формулы (I)



(I)

которая характеризуется рентгеновской порошковой дифрактограммой, содержащей 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 положений пиков, выбранных из 4,2, 8,4, 8,7, 11,0, 11,5, 12,6, 14,4, 14,9, 16,0, 17,0, 17,4, 18,8, 19,5, 20,2, 21,7, 22,4, 23,8, 25,8 и 26,3 ($\pm 0,2$) $^\circ$ 2 θ .

4. Фармацевтическая композиция, обладающая способностью ингибировать ферментативную активность MAP-киназы p38 и тирозинкиназ семейства Src, включающая эффективное количество соединения формулы (I) по любому из пп.1-3 в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

5. Фармацевтическая композиция, обладающая способностью ингибировать ферментативную активность MAP-киназы p38 и тирозинкиназ семейства Src, включающая эффективное количество соединения формулы (I) по любому из пп.1-3 в форме частиц в комбинации с частицами лактозы.

6. Фармацевтическая композиция по п.5, дополнительно включающая частицы стеарата магния.

7. Применение соединения по любому из пп.1-3 для лечения хронической обструктивной болезни легких, астмы и детской астмы.

8. Применение по п.7, где хроническая обструктивная болезнь легких представляет собой хронический бронхит или эмфизему.

9. Применение соединения по любому из пп.1-3 для изготовления лекарственного средства для лечения хронической обструктивной болезни легких, астмы и детской астмы.

10. Применение по п.9, где хроническая обструктивная болезнь легких представляет собой хронический бронхит или эмфизему.

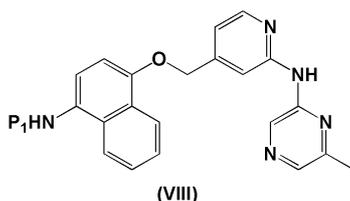
11. Способ лечения состояния, выбранного из хронической обструктивной болезни легких, астмы и детской астмы, который включает введение пациенту эффективного количества соединения по любому из пп.1-3.

12. Способ по п.11, где хроническая обструктивная болезнь легких представляет собой хронический бронхит или эмфизему.

13. Применение соединения по любому из пп.1-3 для лечения вирусных обострений воспалительных заболеваний или для лечения вирусных инфекций у пациентов с одним или несколькими хроническими состояниями, выбранными из застойной сердечной недостаточности, хронической обструктивной болезни легких, астмы, диабета, рака, и/или у пациентов с угнетенным иммунитетом.

14. Применение по п.13, где указанное лечение проводят в комбинации с лечением противовирусными средствами, выбранными из занамивира, озельтамивира, перамивира и ланинамивира.

15. Соединение формулы (VIII)



(VIII)

в которой P₁ представляет собой аминозащитную группу, которая представляет собой трет-бутоксикарбонильную группу; или его соль.

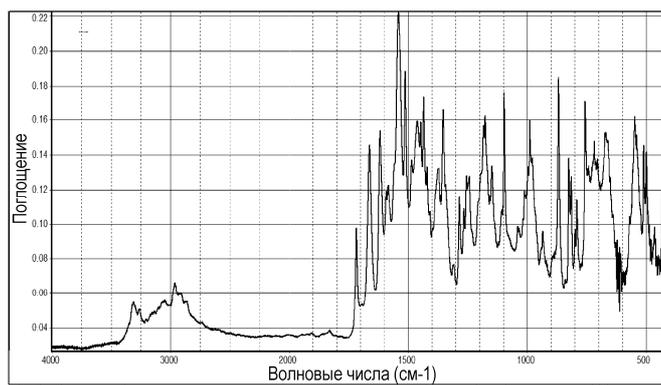
16. Сухой порошковый фармацевтический препарат для лечения заболеваний, опосредованных ферментативной активностью MAP-киназы p38 и тирозинкиназ семейства Src, содержащий соединение формулы (I) по любому из пп.1-3.

17. Сухой порошковый фармацевтический препарат по п.16, в котором соединение находится в тонкоизмельченной форме с массовым медианным диаметром (MMAD) 1-10 мкм.

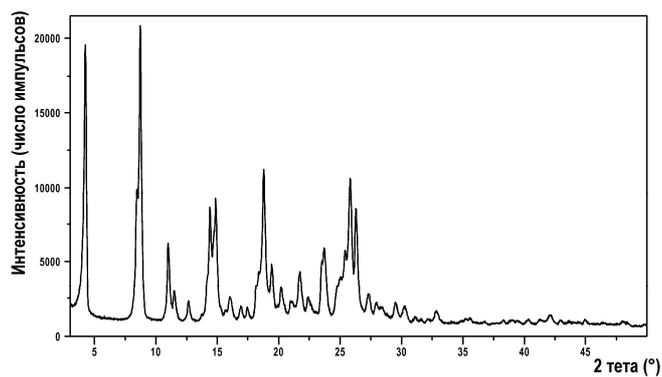
18. Сухой порошковый фармацевтический препарат по п.16, в котором соединение микронизировано.

19. Сухой порошковый фармацевтический препарат по п.16, предназначенный для топического введения в легкие.

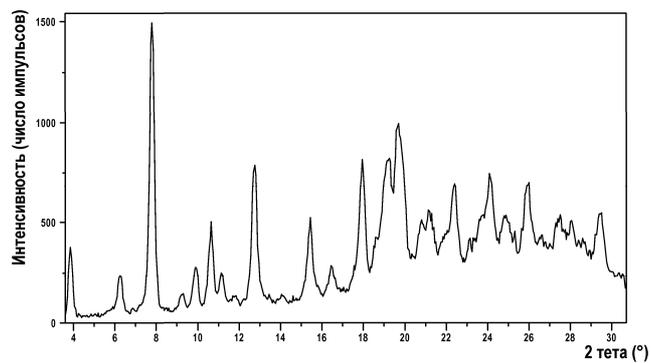
034927



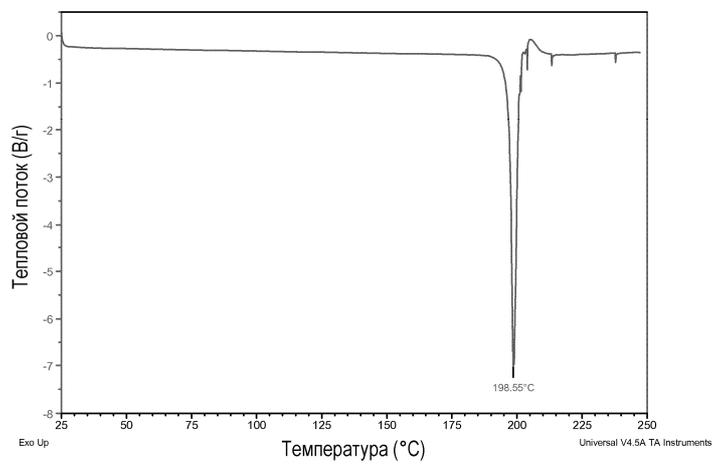
Фиг. 1



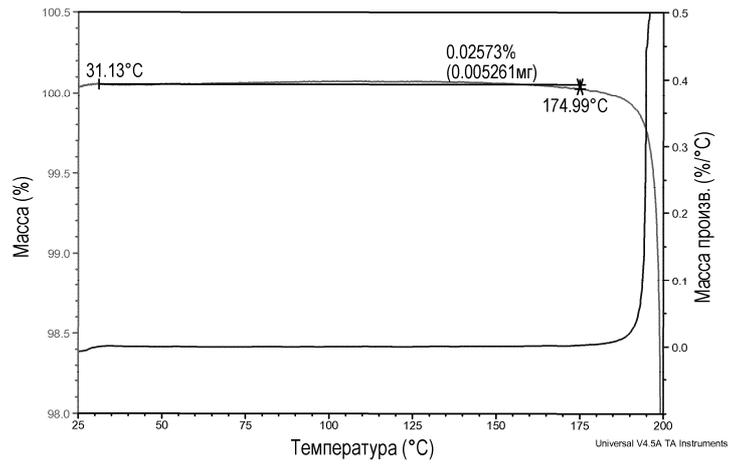
Фиг. 2



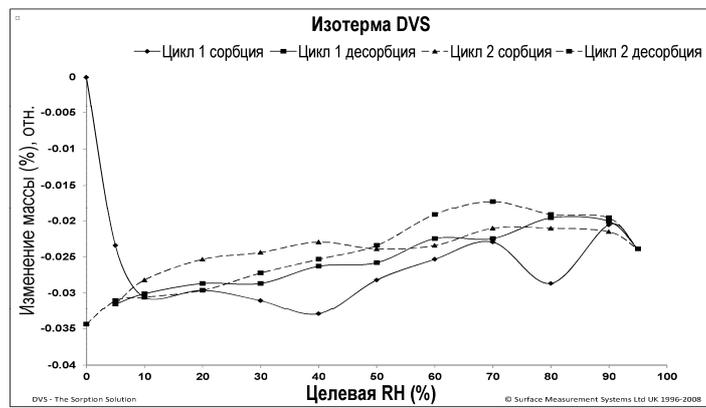
Фиг. 3



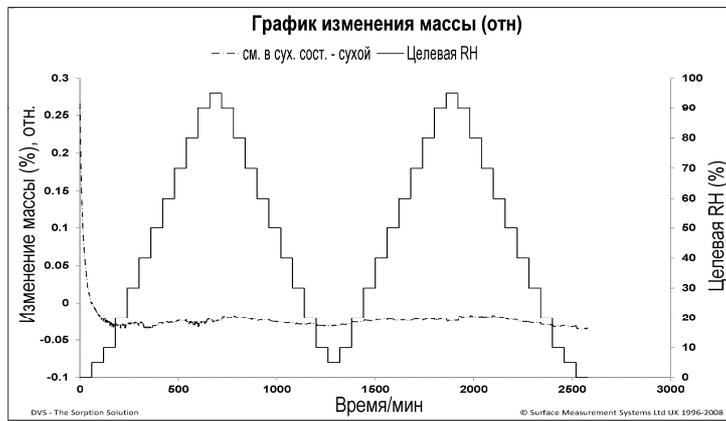
Фиг. 4



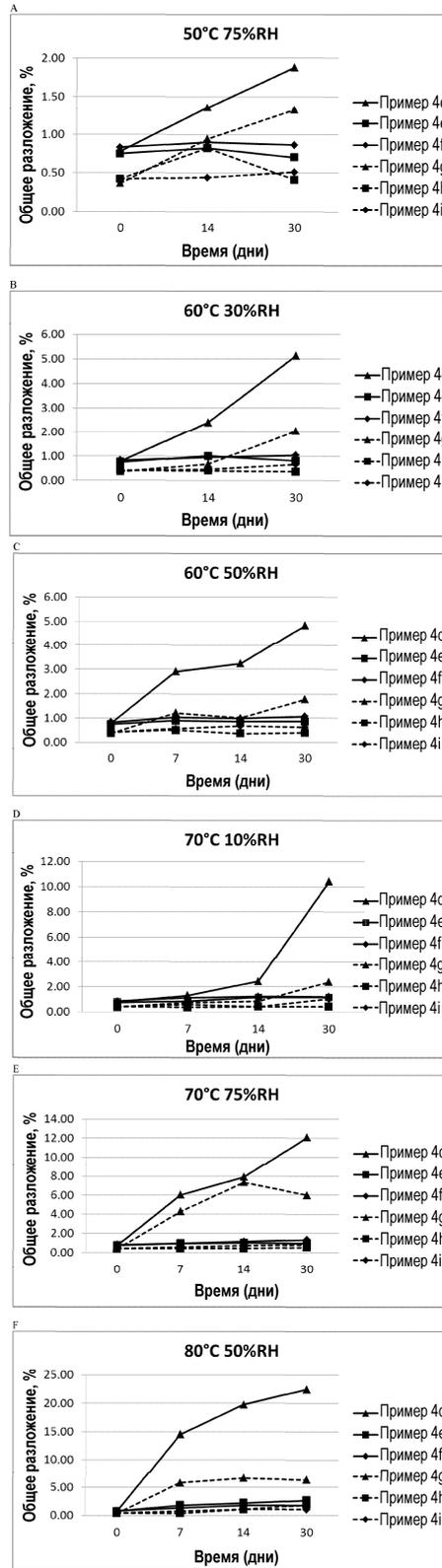
Фиг. 5



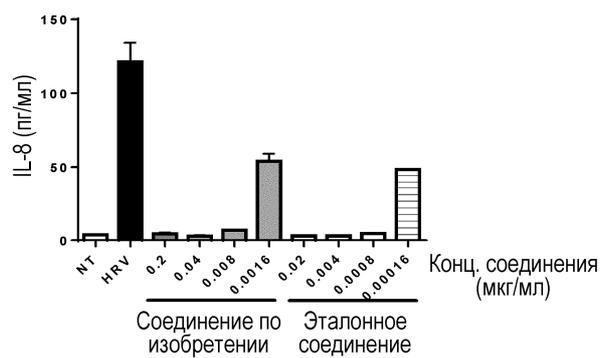
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2