

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035174

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.12

(51) Int. Cl. C07D 239/48 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(21) Номер заявки
201591524

(22) Дата подачи заявки
2014.02.20

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ 2-АМИНОПИРИМИДИНА В КАЧЕСТВЕ МОДУЛЯТОРОВ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ TLR7 И/ИЛИ TLR8

(31) 13156167.2

(56) WO-A1-2012136834
WO-A1-2010133885

(32) 2013.02.21

(33) EP

(43) 2015.12.30

(86) PCT/EP2014/053273

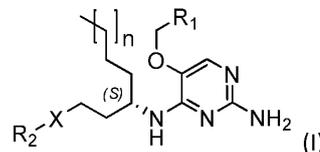
(87) WO 2014/128189 2014.08.28

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

(72) Изобретатель:
Мак Гоуен Дэвид Крейг, Рабуассон
Пьер Жан-Мари Бернар, Йонкерс Тим
Хьюго Мария (BE)

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

(57) Изобретение относится к производным 2-аминопиримидина формулы (I), фармацевтическим композициям и их применению в качестве модуляторов толл-подобных рецепторов TLR7 и/или TLR8.



035174 B1

035174 B1

шему определенное количество атомов углерода.

Как применяется в данном документе, любая химическая формула со связями, показанными только в виде сплошных линий, а не в виде сплошных клиновидных или пунктирных клиновидных связей, или иным образом показанная, как имеющая конкретную конфигурацию (например, R, S) вокруг одного или нескольких атомов, подразумевает каждый возможный стереоизомер или смесь двух или более стереоизомеров.

Термины "стереоизомеры", "стереоизомерные формы" или "стереохимически изомерные формы" выше или ниже в данном документе применяются взаимозаменяемо.

Настоящее изобретение включает все стереоизомеры соединений по настоящему изобретению либо в виде чистого стереоизомера, либо в виде смеси двух или более стереоизомеров.

Энантиомеры являются стереоизомерами, которые представляют собой несовпадающие при наложении зеркальные изображения друг друга. Смесь пары энантиомеров в соотношении 1:1 является рацематом или рацемической смесью.

Диастереомеры (или диастереоизомеры) представляют собой стереоизомеры, которые не являются энантиомерами, т.е. они не соотносятся как зеркальные изображения. Если соединение содержит двойную связь, заместители могут находиться в E- или Z-конфигурации. Если соединение содержит по меньшей мере двузамещенную неароматическую циклическую группу, заместители могут находиться в цис- или транс-конфигурации.

Таким образом, настоящее изобретение включает энантиомеры, диастереомеры, рацематы, E-изомеры, Z-изомеры, цис-изомеры, транс-изомеры и их смеси во всех случаях, когда это возможно с химической точки зрения.

Значения всех этих терминов, т.е. энантиомеры, диастереомеры, рацематы, E-изомеры, Z-изомеры, цис-изомеры, транс-изомеры и их смеси, известны специалисту в данной области.

Абсолютная конфигурация определяется согласно системе Кана-Ингольда-Прелога. Конфигурация при асимметричном атоме определяется как R или как S. Разделенные стереоизомеры, абсолютная конфигурация которых неизвестна, могут быть обозначены как (+) или (-) в зависимости от направления, в котором они вращают плоскополяризованный свет. Например, разделенные энантиомеры, абсолютная конфигурация которых неизвестна, могут обозначаться как (+) или (-) в зависимости от направления, в котором они вращают плоскополяризованный свет.

Если указывают конкретный стереоизомер, это означает, что указанный стереоизомер практически не содержит других стереоизомеров, т.е. связан с менее 50%, предпочтительно с менее 20%, более предпочтительно с менее 10%, еще более предпочтительно с менее 5%, в частности с менее 2% и наиболее предпочтительно с менее 1% таковых. Таким образом, если соединение формулы (I) указывают, например, как (R), это означает, что соединение практически не содержит (S)-изомер; если соединение формулы (I) указывают, например, как E, это означает, что соединение практически не содержит Z-изомер; если соединение формулы (I) указывают, например, как цис-, это означает, что соединение практически не содержит транс-изомер.

Фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I) включают их соли присоединения кислоты и основные соли.

Подходящие соли присоединения кислоты образуются из кислот, которые образуют нетоксичные соли. Подходящие основные соли образуются из оснований, которые образуют нетоксичные соли.

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

Соединения по настоящему изобретению или любая их подгруппа могут быть составлены в различные фармацевтические формы для целей введения. В качестве подходящих композиций могут быть упомянуты все композиции, обычно используемые для системного введения лекарственных средств. Для получения фармацевтических композиций по настоящему изобретению эффективное количество конкретного соединения, необязательно в форме соли присоединения, в качестве активного ингредиента объединяют в однородную смесь с фармацевтически приемлемым носителем, при этом носитель может принимать широкое разнообразие форм в зависимости от формы препарата, требуемого для введения. Данные фармацевтические композиции предпочтительно представлены в виде единичной лекарственной формы, подходящей, например, для перорального, ректального или чрескожного введения. Например, при получении композиций в виде пероральной лекарственной формы можно использовать любую общепринятую фармацевтическую среду, такую как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п., в слу-

чае пероральных жидких препаратов, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, разбавители, смазывающие вещества, связующие вещества, разрыхлители и т.п., в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Благодаря простоте их введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные пероральные формы единиц дозирования, в случае которых, разумеется, применяют твердые фармацевтические носители. Также включены препараты в твердой форме, которые могут быть преобразованы непосредственно перед применением в жидкие формы. В композициях, подходящих для чрескожного введения, носитель необязательно включает средство, способствующее проникновению, и/или подходящее смачивающее средство, необязательно в комбинации с подходящими добавками любой природы в малых количествах, при этом добавки не оказывают значительного вредного влияния на кожу. Указанные добавки могут облегчать введение в кожу и/или могут быть полезными при получении требуемых композиций. Данные композиции можно вводить различными путями, например в виде трансдермального пластыря, в виде точечного нанесения, в виде мази. Соединения по настоящему изобретению можно также вводить посредством ингаляции или инсуффляции с помощью способов и составов, применяемых в данной области для введения таким путем. Таким образом, в основном соединении по настоящему изобретению можно вводить в легкие в форме раствора, суспензии или сухого порошка.

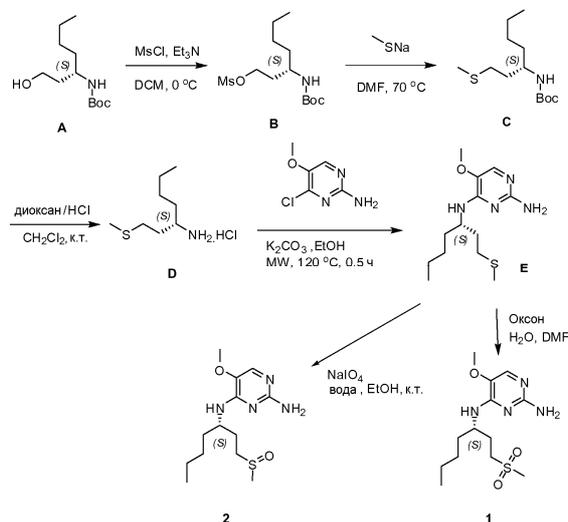
Особенно предпочтительно составление вышеуказанных фармацевтических композиций в виде единичной лекарственной формы для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, как применяется в данном документе, относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве единичных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

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

Точная дозировка и частота введения зависят от конкретного используемого соединения формулы (I), конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, подлежащего лечению, возраста, веса и общего физического состояния конкретного пациента, а также другого медикаментозного лечения, которое может получать индивидуум, что хорошо известно специалистам в данной области. Более того, очевидно, что эффективное количество может быть уменьшено или увеличено в зависимости от реакции подвергаемого лечению субъекта и/или в зависимости от оценки врача, назначающего соединения по настоящему изобретению. Таким образом, вышеупомянутые диапазоны эффективного количества являются только рекомендациями и не предназначены для ограничения, в той или иной мере, объема или применения настоящего изобретения.

Получение соединений формулы (I).

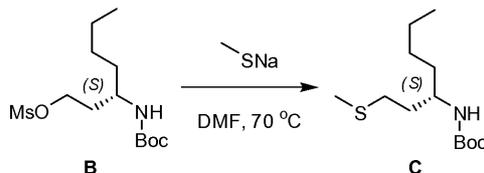
Общая схема. Соединение А получали согласно процедурам, описанным в WO 2008147697 и WO 2009067081.



Экспериментальная часть.

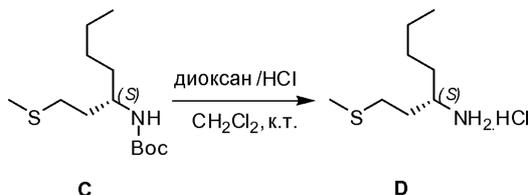


Триэтиламин (10,5 г, 103,75 ммоль, 2,4 экв.) добавляли в раствор А (10 г, 43,23 ммоль, 1 экв.) в CH_2Cl_2 (200 мл) при 0°C . Метансульфонилхлорид (6,4 г, 55,87 ммоль, 1,3 экв.) по каплям добавляли в раствор и помешивали в течение 1,5 ч при 0°C . Добавляли CH_2Cl_2 (500 мл). Раствор промывали водным раствором NaHCO_3 , соевым раствором и сушили над Na_2SO_4 , твердые вещества удаляли с помощью фильтрации, а растворитель из фильтрата удаляли под пониженным давлением с получением В. Использовали как есть, без дополнительной очистки.

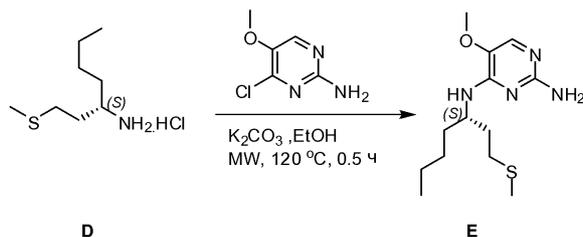


Смесь В (12 г, 38,782 ммоль, 1 экв.) и тиометоксида натрия (4,08 г, 58,17 ммоль, 1,5 экв.) в DMF (60 мл) перемешивали в течение ночи при 70°C . Твердые вещества удаляли с помощью фильтрации, а растворители из фильтрата удаляли под пониженным давлением. Неочищенный продукт растворяли в этилацетате, промывали водой, соевым раствором, сушили над Na_2SO_4 , твердые вещества удаляли с помощью фильтрации, а растворители из фильтрата удаляли под пониженным давлением. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (элюент: петролейный эфир/этилацетат от 40/1 до 3/1) с получением С.

^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ- d) δ ч./млн 0,70-0,85 (м, 5H), 1,15-1,49 (м, 13H), 1,49-1,61 (м, 1H), 1,61-1,80 (м, 1H), 2,05 (с, 3H), 2,38-2,50 (м, 2H), 3,51 (уш. с, 1H), 4,25 (уш. с, 1H).



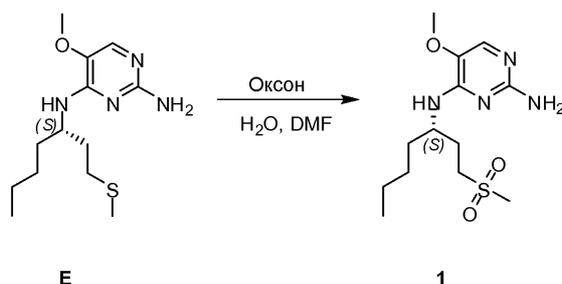
HCl /диоксан (47 мл, 187,43 ммоль, 10 экв.) по каплям добавляли к помешиваемому раствору С (4,9 г, 18,74 ммоль, 1 экв.) в CH_2Cl_2 при 0°C и помешивали в течение 1 ч при 25°C . Раствор концентрировали под пониженным давлением с получением D. Использовали как есть на следующей стадии.



D (0,75 г, 3,79 ммоль, 1 экв.), 2-амино-4-хлор-5-метоксипиримидин (0,908 г, 5,69 ммоль, 1,5 экв.) и K_2CO_3 (1,57 г, 11,38 ммоль, 3 экв.) смешивали в этаноле (20 мл). Смесь помешивали при 120°C в микроволновой печи в течение 30 мин.

Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной тонкослойной хроматографии на силикагеле (элюент: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=20:1$) с получением E.

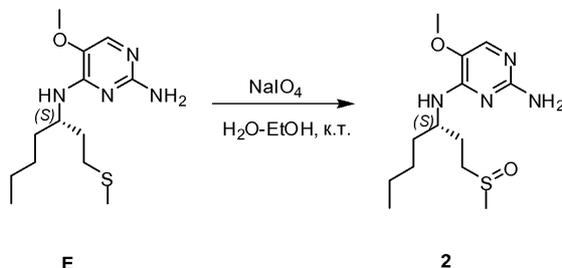
^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ- d) δ ч./млн 1,05-1,15 (м, 3H), 1,40-1,60 (м, 4H), 1,95 (м, 2H), 2,15 (м, 1H), 2,30 (д, 3H), 2,70 (т, 1H), 2,90 (т, 1H), 3,55 (м, 1H), 4,50 (м, 1H), 3,95 (с, 3H), 6,20 (д, 1H), 6,60 (уш. с, 2H), 7,45 (с, 1H).



Оксон (6,959 г, 11,32 ммоль, 3 экв.) добавляли к раствору Е (1,45 г, 3,773 ммоль, 1 экв.) в DMF (100 мл) и воде (100 мл). Смесь помешивали в течение 12 ч при 20°C. Твердые вещества удаляли с помощью фильтрации, а фильтрат ощелачивали до pH 8 с помощью насыщенного водного раствора Na₂CO₃. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (колонка: Gemini 150×30 мм × 5 мкм, C18, подвижная фаза: CH₃CN/вода (0,05% HCl), градиент: 2-32% CH₃CN, 0-8 мин, скорость потока: 30 мл/мин). Самые лучшие фракции объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением 1.

LC-MS 3,88 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, метанол-d₄) δ ч./млн 0,92 (т, J=6,9 Гц, 3H), 1,21-1,50 (м, 4H), 1,69 (кв, J=7,1 Гц, 2H), 1,95-2,28 (м, 2H), 2,98 (с, 3H), 3,09-3,22 (м, 2H), 3,87 (с, 3H), 4,37-4,55 (м, 1H), 7,26 (с, 1H), нестабильные протоны не наблюдали.



Раствор Е (40 мг, 0,14 ммоль, 1 экв.) в этаноле (40 мл) обрабатывали раствором NaIO₄ (0,2 г, 1 ммоль, 7,5 экв.) в воде (10 мл), а затем помешивали в течение ночи при комнатной температуре. Раствор концентрировали в вакууме. Остаток разводили водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали солевым раствором, высушивали над Na₂SO₄, твердые вещества удаляли с помощью фильтрации, а растворители из фильтрата удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (колонка C18, элюент: CH₃CN, H₂O от 3/97 до 33/67, 0,05% HCl). Требуемые фракции объединяли и концентрировали в вакууме с получением 2.

LC-MS 3,78 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, метанол-d₄) δ ч./млн 0,90 (т, J=6,8 Гц, 3H), 1,19-1,49 (м, 4H), 1,67 (д, J=6,5 Гц, 2H), 1,91-2,15 (м, 2H), 2,63 (уш. с, 3H), 2,69-2,96 (м, 2H), 3,85 (с, 3H), 4,46 (уш. с, 1H), 7,25 (с, 1H), нестабильные протоны не наблюдали.

Аналитический способ LC-MS.

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

Биологическая активность соединений формулы (I)

Описание биологических анализов.

Оценка активности TLR7 и TLR8.

Способность соединений активировать TLR7 и/или TLR8 человека оценивали в клеточном анализе с геном-репортером с применением клеток HEK293, временно трансфицированных вектором экспрессии TLR7 или TLR8 и репортерной конструкцией NF κ B-luc.

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

Параллельно определяли токсичность соединений с использованием подобной серии разведений соединения вместе с клетками, трансфицированными только конструкцией CMV-TLR7, из расчета 40 мкл на лунку ($1,25 \times 10^5$ клеток/мл) в 384-луночных планшетах. Жизнеспособность клеток измеряли после 6 ч инкубации при 37°C, 5% CO₂ путем добавления 15 мкл ATP lite (Perkin Elmer) на лунку и считывания на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Данные указывали как CC₅₀.

Параллельно использовали подобную серию разведений соединения (200 нл соединения в 100% DMSO) клетками, трансфицированными только репортерной конструкцией NF κ B-luc, из расчета 40 мкл на лунку ($1,25 \times 10^5$ клеток/мл). Через 6 ч после инкубации при 37°C, 5% CO₂ определяли люциферазную активность путем добавления 15 мкл субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) в каждую лунку и считывания проводили на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Данные обратного скрининга указывали как LEC.

Активация промоторных элементов ISRE.

Способность соединений индуцировать IFN-I также оценивали посредством измерения активации интерферонзависимых регуляторных элементов (ISRE) при помощи сред, кондиционированных PBMC. ISRE-элемент с последовательностью GAAACTGAAACT высокочувствителен к фактору транскрипции STAT1-STAT2-IRF9, активируемому при связывании IFN-I с его рецептором IFNAR (Clontech, PT3372-5W). Плазида pISRE-Luc от Clontech (№ 631913) содержит 5 копий данного ISRE-элемента, за которыми следует ORF люциферазы светлячка. Выращивали клеточную линию HEK293, стабильно трансфицированную pISRE-Luc (HEK-ISREluc), для определения характеристик сред, кондиционированных культурой клеток PBMC.

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

Биологическая активность

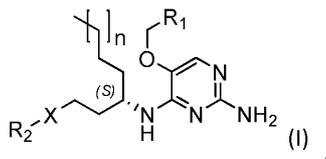
№	TLR 7 человека	TLR 8 человека	HEK-ISRE luc
	(LEC), мкМ	(LEC), мкМ	(LEC), мкМ
1	2,0	1,7	0,65
2	1,4	9,2	4,8
Е	3,9	10	NA

NA = данные отсутствуют.

Все соединения показали отсутствие токсичности вплоть до самой большой тестируемой концентрации. Все соединения показали отсутствие активности (LEC >25 мкМ) в анализе обратного скрининга на HEK293 NF-κB, описанном выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль или стереоизомерные формы, где

X представляет собой S, S=O или O=S=O,

R₁ представляет собой водород,

R₂ представляет собой (C₁₋₃)-алкил и

n=1.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль или стереоизомерные формы по п.1 вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями.

3. Применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомерных форм по п.1 в качестве лекарственного препарата, обладающего активностью модулятора толл-подобных рецепторов TLR7 и/или TLR8.

4. Применение фармацевтической композиции по п.2 в качестве лекарственного препарата, обладающего активностью модулятора толл-подобных рецепторов TLR7 и/или TLR8.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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