

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035816**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.08.14**

**(21)** Номер заявки  
**201891248**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.11.22**

**(51)** Int. Cl. **C07H 15/26** (2006.01)  
**C07D 487/04** (2006.01)  
**A61K 31/7052** (2006.01)  
**A61P 1/04** (2006.01)

**(54) ПРОЛЕКАРСТВА ЯК-ИНГИБИРУЮЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА**

**(31)** 62/259,273

**(32)** 2015.11.24

**(33)** US

**(43)** 2018.10.31

**(86)** PCT/US2016/063254

**(87)** WO 2017/091544 2017.06.01

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ТЕРЕВАНС БАЙОФАРМА Ар энд Ди  
АйПи, ЭлЭлСи (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Хадсон Райан, Лонг Дэниэл Д., Уилтон  
Донна А.А., Лу Менди, Брэссил  
Патрик Дж. (US)**

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

**(56)** JAMES D. CLARK ET AL.: "Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 57, no. 12, 26 June 2014 (2014-06-26), pages 5023-5038, XP055276727, US, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm401490p, the whole document

WO-A1-2011097087

US-A1-2014357557

SCOTT C. JEFFREY ET AL.: "Expanded Utility of the [beta]-Glucuronide Linker: ADCs That Deliver Phenolic Cytotoxic Agents", ACS MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 1, no. 6, 9 September 2010 (2010-09-09), pages 277-280, XP055225196, United States, ISSN: 1948-5875, DOI: 10.1021/ml100039h, the whole document

**(57)** Изобретение предлагает соединения, которые являются пролекарствами ЯК-ингибитора, для направленной доставки ЯК-ингибитора к желудочно-кишечному тракту млекопитающего. Изобретение также предлагает фармацевтические композиции, содержащие такие соединения, способы применения таких соединений для лечения воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, а также способы и промежуточные соединения, приемлемые для получения соединений.

**035816 B1**

**035816 B1**

### Уровень техники изобретения

#### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к соединениям, разработанным для направленной доставки JAK-ингибитора к желудочно-кишечному тракту. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, способам применения таких соединений для лечения воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, а также к способам и промежуточным соединениям, пригодным для получения таких соединений.

#### Уровень техники

Воспалительное заболевание кишечника, которое прежде всего включает язвенный колит и болезнь Крона, вызывает хроническое воспаление всего или части желудочно-кишечного тракта. Язвенный колит характеризуется воспалением и язвообразованием слизистого слоя прямой кишки и толстого кишечника, тогда как болезнь Крона преимущественно поражает подвздошную кишку, но может возникать где угодно по ходу кишечника. Общие симптомы включают диарею, кровавый стул и боль в области живота. Клиническое течение язвенного колита является рецидивирующим, отличающимся чередующимися периодами обострения болезни и ремиссии. Частота возникновения заболевания судя по всему выше в развитых, чем в развивающихся странах. По оценкам 1,3 млн людей в основных промышленно развитых странах страдает от язвенного колита, и это количество, как считают, растет вместе с ростом численности населения. Больные с язвенным колитом находятся в зоне повышенного риска развития колоректального рака, (см., например, Danese et al. *N. Engl. J. Med.*, 2011, 365, 1713-1725). Кроме того, по оценкам 1 млн людей в промышленно развитых странах страдает от болезни Крона.

Хотя существует ряд возможных методов лечения, которые стимулируют и поддерживают у больных ремиссию язвенного колита (ЯК (UC)), ни один не является идеальным. Связанные с применением сульфасалазина методы лечения часто являются эффективными при легкой форме ЯК, но значительно менее эффективны при форме заболевания от умеренной до тяжелой. Кортикостероиды часто используют, чтобы обеспечить быстрое проявление ремиссии у больных с умеренным и тяжелым ЯК. Однако длительное применение стероидов для поддержания ремиссии не приветствуется из-за их связи с долгосрочными побочными эффектами (например, остеопороз и переломы костей, инфекции, помутнения хрусталика, более медленное заживление ран и подавление продуцирования гормонов надпочечниками). Системные иммуносупрессанты, такие как азатиоприн, циклоспорин и метотрексат, отличаются медленным наступлением эффекта и невысокой эффективностью у больных с ЯК от умеренного до тяжелого, а длительное применение может быть проблематичным вследствие долговременной системной иммуносупрессии (например, повышенный риск инфекций и лимфома). Анти-TNF $\alpha$  антитела (например, инфликсимаб и адалимумаб), хотя являются дорогими и требуют подкожного или внутривенного введения, эффективны приблизительно у 60-70% больных ЯК с формой заболевания от умеренной до тяжелой. Однако до одной трети больных не в состоянии реагировать адекватно, при этом у другой трети пациентов с начальной терапевтической реакцией развивается устойчивость в течение нескольких недель (Allez et al., *J. Crohn's Colitis*, 2010, 4, 355-366; Rutgeerts et al., *N. Engl. J. Med.*, 2005, 353, 2462-2476). Наиболее недавно одобренный метод лечения ЯК ведолизумабом, анти- $\alpha_4\beta_7$ -интегрин антитело, является эффективным у больных с умеренным и тяжелым ЯК, хотя его парентеральный путь передачи является субоптимальным и последствия длительной иммуносупрессии через такой механизм еще предстоит определить. Несмотря на существующие возможные методы лечения приблизительно от 10 до 20% больных ЯК все еще требуется колэктомия на протяжении 10 лет после постановки диагноза (Targownik et al., *Am. J. Gastroenterol.*, 2012, 107, 1228-1235). Очевидно, что остается нереализованной потребность медицины в эффективном лечении с целью стимуляции и поддержания ремиссии ЯК в форме от умеренного до тяжелого без опасения за безопасность лечения, возникающего вследствие хронической, системной иммуносупрессии.

Несмотря на то что механизм, лежащий в основе язвенного колита, полностью не понят, полагают, что факторы окружающей среды у генетически восприимчивых людей вызывают ненадлежащую (избыточную) реакцию иммунной системы на микробиоту кишечника, приводя к воспалению толстой кишки, повреждению тканей и сопутствующим симптомам, типичным для заболевания.

Хотя точный патогенез ЯК не ясен, понятно, что про-воспалительные цитокины играют ключевую роль в иммунном ответе (Strober et al., *Gastroenterol.*, 2011, 140, 1756-1767). Многие из про-воспалительных цитокинов, обычно имеющих повышенный уровень при ЯК (например, IL-4, IL-6, IL-13, IL-15, IL-23, IL-24, IFN $\gamma$  и лептин), опираются на семейство JAK тирозинкиназ (т.е. JAK1, JAK2, JAK3 и Tyk2) для трансдукции сигнала. Лиганд, связывающийся с цитокиновым рецептором, запускает автофосфорилирование его сопутствующей JAK, что, в свою очередь, приводит к фосфорилированию белка трансдуктора сигнала и активатора трансдукции (STAT). Различные STAT образуют гетеро- или гомодимеры и активируют транскрипцию их целевых генов в ядрах клеток для регулирования таких функций, как клеточный рост, дифференциация и гибель (Clark et al., *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 5023-5038).

Ингибирование семейства ферментов JAK может подавлять передачу сигнала многих ключевых про-воспалительных цитокинов. Таким образом, ингибиторы JAK, по-видимому, полезны при лечении

язвенного колита и других воспалительных заболеваний, таких как болезнь Крона, аллергический ринит, астма и хроническое обструктивное заболевание легких (COPD). Однако вследствие модулирующего влияния сигнального пути JAK/STAT на иммунную систему системное воздействие ингибиторов JAK может оказывать побочный системный иммуносупрессивный эффект.

Тофацитиниб-цитрат (Xeljanz®), пероральный, системно доступный пан-JAK-ингибитор, одобрен в Соединенных Штатах в ноябре 2012 г. для лечения взрослых с активным ревматоидным артритом в форме от умеренного до тяжелого, которые проявляют неудовлетворительную реакцию на метотрексат или которые не переносят его. При проявлении превосходной эффективности в более высоких дозах при клинических исследованиях тофацитиниб был одобрен только в дозе 5 мг дважды в день (BID) на основании лимитирующих дозу, системно-опосредуемых, отрицательных событий (например, повышенные уровни холестерина, возросшая скорость оппортунистических инфекций, нейтропения, лимфоцитопения, лимфома и плотные опухоли). Лекарство имеет особое предупреждение в США, подробно информирующее о рисках безопасности, и было отклонено в Европе на основании "существенных и нерешенных вопросов" относительно общего профиля безопасности. Тофацитиниб находится в активной разработке для лечения ЯК, проявляя клиническую реакцию на фазе 2 (8 недель) исследований ЯК (Sandborn et al., N. Engl. J. Med., 2011, 365, 1713-1725), особенно в дозе 10 и 15 мг BID (см. также Panes et al., BMC Gastroenterol., 2015, 15, 14), дозах, не одобренных в настоящее время для любых показаний к применению. Спонсор также сообщает, что большая популяция больных, принимающих тофацитиниб, 10 мг BID, при сравнении с плацебо, находится в стадии ремиссии на фазе 3 (8 недель) изучения индукции ремиссии ЯК, а также в случае больных, принимающих тофацитиниб, 5 и 10 мг BID, в фазе 3 (52 недели) изучения поддерживающего лечения при ЯК.

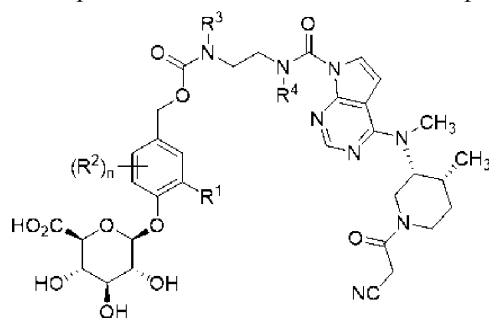
Для лечения язвенного колита и других воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта было бы желательно разработать соединение, которое при пероральном введении обеспечивает достаточно высокое воздействие тофацитиниба в желудочно-кишечном тракте, чтобы оптимизировать клиническую эффективность, исключив одновременно общее дозо-лимитирующее системное воздействие.

#### Сущность изобретения

В одном аспекте изобретение предлагает новые глюкуронид-содержащие пролекарства JAK-ингибитора тофацитиниба. Такие пролекарства извлекают преимущества кишечной микробиомы, которая содержит или продуцирует избыток  $\beta$  глюкуронидазы, которая селективно расщепляет фрагмент глюкуронид-содержащего пролекарства, запуская высвобождение тофацитиниба в желудочно-кишечном тракте, в частности в толстой кишке.

Неожиданно глюкуронид-содержащее пролекарство по настоящему изобретению является достаточно стабильным для выделения, рецептурирования в виде фармацевтической композиции и введения пациенту, нуждающемуся в лечении. Однако они также достаточно подвижны для того, чтобы расщепляться с помощью  $\beta$  глюкуронидазы и дополнительно распадаться с эффективным высвобождением тофацитиниба. Напротив, когда фрагмент глюкуронид-содержащего пролекарства, используемый в настоящем изобретении, прикрепляют к некоторым другим лекарствам, известным или потенциально полезным для лечения ЯК, лекарства не высвобождаются при контакте с  $\beta$  глюкуронидазой (как более полно описано ниже). Следовательно, глюкуронид-содержащее пролекарство по настоящему изобретению особенно полезно для доставки и высвобождения тофацитиниба.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению формулы (I)



(I),

где n имеет значения 0, 1 или 2;

$R^1$  выбирают из атома водорода,  $C_{1-4}$ алкила,  $C_{1-3}$ алкокси-, amino-, нитрогруппы, атома галогена, циано-, гидроксигруппы и трифторметила;

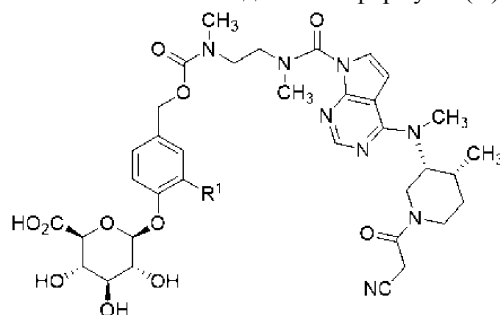
каждый заместитель  $R^2$ , когда присутствуют, независимо выбирают из  $C_{1-4}$ алкила,  $C_{1-3}$ алкокси-, amino-, нитрогруппы, атома галогена, цианогруппы, гидроксильной группы и трифторметила;

$R^3$  представляет собой атом водорода, метил или этил;

$R^4$  представляет собой атом водорода, метил или этил;

или к его фармацевтически приемлемой соли.

В другом аспекте изобретение относится к соединению формулы (II)



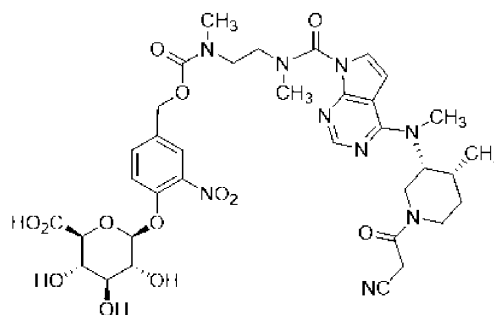
(II),

где  $R^1$  выбирают из атома водорода,  $C_{1-4}$ алкила,  $C_{1-3}$ алкокси-, amino-, нитрогруппы, атома галогена, циано-, гидроксигруппы и трифторметила;

или к его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления изобретение предлагает соединение формулы (II), где  $R^1$  выбирают из атома водорода, метила, метокси-, amino-, нитрогруппы и атома хлора, или его фармацевтически приемлемую соль.

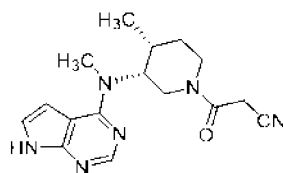
В другом аспекте изобретение относится к соединению формулы 1



1,

или к его фармацевтически приемлемой соли.

Соединение формулы 1 проявляет низкую биодоступность при пероральном введении и надежное высвобождение тофацитиниба (2)



2

in vivo при пероральном введении в доклинических видах, приводя к заметному повышению отношения содержания вещества в толстой кишке к содержанию вещества в плазме по сравнению с отношением, полученным при пероральном приеме самого тофацитиниба.

В одном варианте осуществления соединение формулы 1 образует тофацитиниб или его соль при контакте с  $\beta$ -глюкуронидазой.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение формулы (I), (II) или 1, или его фармацевтически приемлемую соль; или к любым конкретным вариантам ее осуществления, описанным в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта у млекопитающих, и такой способ включает введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение формулы (I), (II) или 1, или его фармацевтически приемлемую соль; или к любым конкретным вариантам его осуществления, описанным в данном документе.

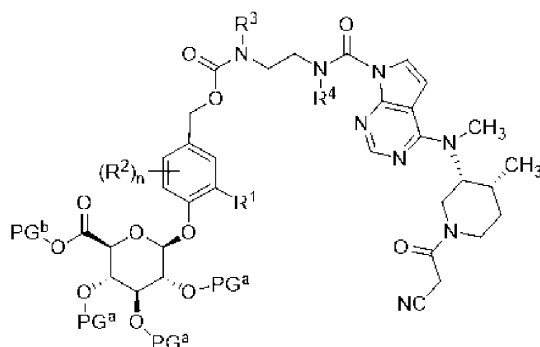
В одном варианте осуществления воспалительным заболеванием желудочно-кишечного тракта является язвенный колит. В другом варианте осуществления заболеванием желудочно-кишечного тракта является болезнь Крона. В другом варианте осуществления заболеванием желудочно-кишечного тракта является колит, вызванный лечением ингибиторами иммунных контрольных точек.

В другом аспекте изобретение относится к способу доставки тофацитиниба к желудочно-кишечному тракту млекопитающего, в частности к толстой кишке, причем способ включает пероральное

введение млекопитающему глюкуронид-содержащего пролекарства тофацитиниба, и это пролекарство расщепляется  $\beta$  глюкуронидазой в желудочно-кишечном тракте с высвобождением тофацитиниба.

В отдельных и отличных вариантах осуществления глюкуронид-содержащее пролекарство тофацитиниба представляет собой соединение формулы (I), (II) или 1, или его фармацевтически приемлемую соль; или любые его конкретные варианты осуществления, описанные в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, причем способ включает удаление защитных групп соединения формулы (I-A)



(I-A),

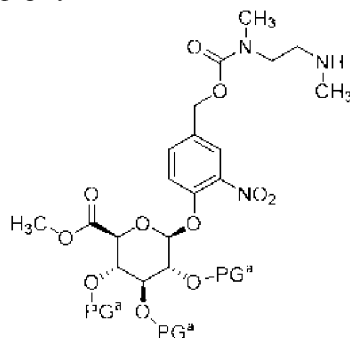
или его соли; где  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  и  $n$  принимают значения, определенные в данном документе; каждая группа  $PG^a$  независимо представляет собой защитную группу для гидроксильной группы; и группа  $PG^b$  представляет собой защитную группу для карбоксильной группы; с получением соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления этого способа  $R^1$  представляет собой нитрогруппу;  $R^3$  и  $R^4$  представляют собой метил; каждая группа  $PG^a$  представляет собой ацетил; группа  $PG^b$  представляет собой метил; и  $n$  принимает значение 0.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединению формулы (I-A) или к его соли; или к любым конкретным вариантам осуществления, описанным в документе.

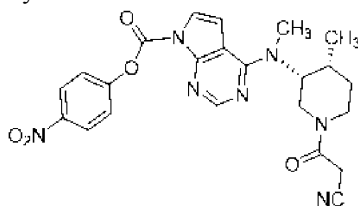
В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы 1 или его фармацевтически приемлемой соли, включающий:

(a) взаимодействие соединения формулы 12'



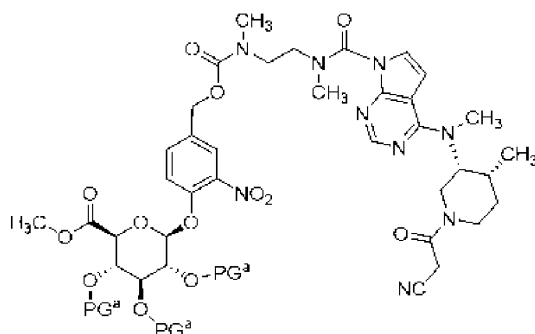
12'

или его соли; где каждая группа  $PG^a$  независимо представляет собой защитную группу для гидроксильной группы, с соединением формулы 13



13

с получением соединения формулы 14'



14'

и (b) снятие защитной группы соединения формулы 14' с получением соединения формулы 1 или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления этого способа группа PG<sup>a</sup> представляет собой ацетил.

В отдельных и отличных аспектах настоящее изобретение также относится к соединению формулы 13 или к его соли; и к соединению формулы 14' или к его соли; или к любым их конкретным вариантам осуществления, описанным в документе.

В отдельных и отличных аспектах настоящее изобретение также относится к другим способам синтеза и промежуточным соединениям, описанным в данном документе, которые полезны для получения соединений по изобретению.

В отдельных и отличных аспектах настоящее изобретение также относится к соединению формулы (I), (II) или 1, или к его фармацевтически приемлемой соли; или к любым их конкретным вариантам осуществления, описанным в документе; для применения в лекарственной терапии; или для применения при производстве лекарственного средства или препарата. В одном варианте осуществления медикамент или препарат предназначены для лечения воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта у млекопитающего.

В настоящем документе описаны другие аспекты и варианты осуществления изобретения.

#### Краткое описание чертежей

Фигура иллюстрирует концентрацию активных метаболитов, тофацитиниба и соединений C-1M и C-2M, соответственно, в виде функции времени в результате инкубации соединения по изобретению (соединение 1) и соединений сравнения C-1 и C-2 с содержимым толстой кишки крысы.

#### Подробное описание изобретения

Наряду с другими аспектами изобретение предлагает глюкуронидные пролекарства ингибитора JAK-киназы тофацитиниба, их фармацевтически приемлемые соли и промежуточные соединения для их получения.

Химические структуры названы в данном документе в соответствии с правилами ИЮПАК, которые реализованы в программном обеспечении ChemDraw (PerkinElmer, Inc., Cambridge, MA). В соответствии с правилами соединение формулы 1 может быть идентифицировано как (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота, тогда как тофацитиниб (2) может быть определен как 3-((3R,4R)-4-метил-3-(метил(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-амино)пиперидин-1-ил)-3-оксопропаннитрил.

Соединения по изобретению содержат множество хиральных центров. Изображение или наименование конкретного стереоизомера означает, что указанный стереоцентр имеет обозначенную стереохимию, при понимании, что небольшие количества других стереоизомеров также могут присутствовать, если не указано иное, при условии, что функциональность изображенного или названного соединения не исключает присутствия другого стереоизомера.

Определения.

При описании настоящего изобретения, включая его различные аспекты и варианты осуществления, следующие термины имеют приведенные ниже значения, если не указано иное.

Форма единственного числа терминов включает соответствующие формы множественного числа терминов, если контекст применения ясно не диктует иное.

Термин "алкил" означает одновалентную насыщенную углеводородную группу, которая может быть линейной или разветвленной, или их комбинации. Если не указано иное, такие алкильные группы, как правило, содержат от 1 до приблизительно 10 атомов углерода. Типичными алкильными группами являются, например, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, н-гексил, 2,2-диметилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 2-этилбутил, 2,2-диметилпентил, 2-пропилпентил и т.д.

Когда определенное число атомов углерода предусмотрено для конкретного термина, число атомов

углерода показано предшествующим определением. Например, термин "C<sub>1-3</sub>алкил" означает алкильную группу, имеющую от 1 до 3 атомов углерода, где атомы углерода находятся в любой химически приемлемой конфигурации, включая линейные или разветвленные конфигурации.

Термин "алкоксигруппа" означает одновалентную группу -О-алкил, где алкил имеет значения, определенные выше. Типичные алкоксигруппы включают, например, метокси-, этокси-, пропокси-, бutoкси-группы и т.д.

Термин "галоген" означает атом фтора, хлора, брома или йода.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество, достаточное для эффективного лечения при введении пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

Термин "лечение", используемый в данном документе, означает лечение заболевания, нарушения или патологического состояния (такого как воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта), у пациента, такого как млекопитающее (особенно человека), которое включает одно или несколько положений из числа следующих:

(a) предупреждение возникновения заболевания, нарушения или патологического состояния, т.е. предупреждение повторного проявления заболевания или патологического состояния, или профилактическое лечение больного, который предрасположен к заболеванию или патологическому состоянию;

(b) уменьшение интенсивности заболевания, нарушения или патологического состояния, т.е. устранение или иницирование ремиссии заболевания, нарушения или патологического состояния у больного, в том числе противодействие эффектам других терапевтических агентов;

(c) подавление заболевания, нарушения или патологического состояния, т.е. замедление или купирование развития заболевания, нарушения или патологического состояния у пациента; или

(d) облегчение симптомов заболевания, нарушения или патологического состояния у пациента.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, которая приемлема для введения пациенту или млекопитающему, такому как человек (например, соли, имеющие приемлемую безопасность для млекопитающего в случае данного режима приема лекарства). Типичные фармацевтически приемлемые соли, полученные из кислот, включают соли уксусной, аскорбиновой, бензол-сульфоновой, бензойной, камфорсульфоновой, лимонной, этан-сульфоновой, эдизиловой, фумаровой, гентизиновой, глюконовой, глюкороновой, глютаминовой, гиппуровой, бромистоводородной, хлористоводородной, изэтионовой, молочной, лактобионовой, малеиновой, яблочной, миндальной, метансульфоновой, слизиной, нафталинсульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, нафталин-2,6-дисульфоновой, никотиновой, азотной, оротовой, памовой, пантотеновой, фосфорной, янтарной, серной, винной, п-толуол-сульфоновой и ксинафоевой кислоты и т.д.

Соли, полученные из фармацевтически приемлемых неорганических оснований, включают аммониевые, кальциевые, магниевые, калиевые, натриевые, цинковые соли и т.д. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических оснований, включают соли аргинина, холина, глюкамина, лизина, бенетамина, бензатина, бетаина, 2-диметиламиноэтанола, 2-диэтиламиноэтанола, гидабамина, морфолина, трометамина, диэтанолamina, этанолamina, этилендиамина, триэтанолamina, 1Н-имидазола, пиперазина и т.д.

Термин "его соль", используемый в данном документе, означает ионное соединение, в котором форма соединения формулы (I) представляет собой либо анион, либо катион ионной формы соединения. Например, анионом ионного соединения может быть карбоксилат-анион, который представляет собой депротонированную форму соединения формулы (I). Катион может представлять собой протонированную форму соединения формулы (I), т.е. форму, где аминогруппа протонирована кислотой. Как правило, соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль, хотя это не требуется для солей промежуточных соединений, которые не предназначены для введения пациенту.

Нейтральные соединения формулы (I) необязательно могут принимать форму цвиттер-иона, где термин "цвиттер-ион" означает нейтральную молекулу как с положительным, так и с отрицательным зарядами.

Термин "защитная группа для гидроксильной группы" означает защитную группу, приемлемую для предотвращения нежелательных реакций на гидроксильной группе. Типичные защитные группы для гидроксильной группы включают, но без ограничения ими, алкильные группы, такие как метил, этил и трет-бутил; аллильные группы; ацильные группы, например, алканоильные группы, такие как ацетил; арилметильные группы, такие как бензил (Bn), п-метокси-бензил (PMB), 9 флуоренилметил (Fm) и дифенилметил (бензгидрил, DPM); силильные группы, такие как триметилсилил (TMS) и трет-бутилдиметилсилил (TBS); и т.д.

Термин "защитная группа для карбоксильной группы" означает защитную группу, приемлемую для предупреждения нежелательных реакций на карбоксильной группе. Типичные защитные группы для карбоксильной группы включают, но без ограничения, алкильные группы, такие как метил, этил, трет-бутил и т.д.; арилметильные группы, такие как бензил, 4-нитробензил, 4-метоксибензил и т.д.; тиольные группы, такие как -S-трет-бутил и т.д.; силильные группы, такие как триметилсилил, трет-бутилдиметилсилил и т.д.; оксазолины; и др.

Все другие термины, используемые в данном документе, как подразумевается, имеют значения, ко-

торые понятны обычным специалистам в области техники, к которой они относятся.

Типичные варианты осуществления и охват субтипичных групп.

Приведенные ниже заместители и значения, как подразумевают, предлагают характерные примеры различных аспектов и вариантов осуществления данного изобретения. Такие характерные значения, как полагают, дополнительно определяют и иллюстрируют такие аспекты и варианты осуществления и, как подразумевают, не исключают другие варианты осуществления, или не ограничивают объем данного изобретения.

В одном варианте осуществления  $R^1$  представляет собой атом водорода,  $C_{1-4}$ алкил,  $C_{1-3}$ алкокси-, amino-, нитрогруппу, атом галогена, циано-, гидроксигруппу или трифторметил. В другом варианте осуществления  $R^1$  представляет собой атом водорода,  $C_{1-4}$ алкил,  $C_{1-3}$ алкокси-, amino-, нитрогруппу или атом хлора. В другом варианте осуществления  $R^1$  представляет собой атом водорода, метил, метокси-, amino-, нитрогруппу или атом хлора. В конкретном варианте осуществления  $R^1$  представляет собой атом водорода. В другом конкретном варианте осуществления  $R^1$  представляет собой нитрогруппу.

В одном варианте осуществления  $n$  принимает значение 0. В другом варианте осуществления  $n$  имеет значение 1. В еще одном варианте осуществления  $n$  равно 2.

Когда  $n$  равно 1, в одном варианте осуществления  $R^2$  представляет собой  $C_{1-4}$ алкил,  $C_{1-3}$ алкокси-, amino-, нитрогруппу, атома галогена, цианогруппу, гидроксильную группу или трифторметил. В другом варианте осуществления  $R^2$  представляет собой  $C_{1-4}$ алкил,  $C_{1-3}$ алкокси-, amino-, нитрогруппу, фтор или хлор. В другом варианте осуществления  $R^2$  представляет собой метил, метокси-, amino-, нитрогруппу, фтор или хлор. В конкретном варианте осуществления  $R^2$  представляет собой фтор.

Когда  $n$  равно 1, заместитель  $R^2$  может находиться в любом доступном положении фенильного кольца, к которому присоединен  $R^1$ . В одном варианте осуществления  $R^2$  находится в орто-положении к  $R^1$ . В другом варианте осуществления  $R^2$  находится в мета-положении к  $R^1$ . В еще одном варианте  $R^2$  находится в пара-положении к  $R^1$ .

Когда  $n$  равно 2, в одном варианте осуществления каждый  $R^2$  независимо представляет собой  $C_{1-4}$ алкил,  $C_{1-3}$ алкокси-, amino-, нитрогруппу, атом галогена, цианогруппу, гидроксильную группу или трифторметил. В другом варианте осуществления каждый  $R^2$  независимо представляет собой  $C_{1-4}$ алкил,  $C_{1-3}$ алкокси-, amino-, нитро-группу, фтор или хлор. В еще одном варианте каждый  $R^2$  независимо представляет собой метил, метокси-, amino-, нитрогруппу, фтор или хлор. В конкретном варианте осуществления каждый из  $R^2$  представляет собой фтор.

Когда  $n$  равно 2, заместители  $R^2$  могут находиться в любом доступном положении фенильного кольца, к которому присоединен  $R^1$ . В одном варианте осуществления заместители  $R^2$  находятся в орто- и мета-положении к  $R^1$ . В другом варианте осуществления заместители  $R^2$  находятся в орто- и пара-положении к  $R^1$ . В еще одном варианте заместители  $R^2$  находятся в мета- и пара-положении к  $R^1$ .

В одном варианте осуществления  $R^3$  представляет собой атом водорода. В другом варианте осуществления  $R^3$  представляет собой метил. В еще одном варианте  $R^3$  представляет собой этил.

В одном варианте осуществления  $R^4$  представляет собой атом водорода. В другом варианте  $R^4$  представляет собой метил. В еще одном варианте осуществления  $R^4$  представляет собой этил.

В одном варианте осуществления как  $R^3$ , так и  $R^4$  представляют собой метил. В другом варианте осуществления один из  $R^3$  и  $R^4$  представляет собой атом водорода, а другой представляет собой метил.

В одном варианте осуществления  $n$  имеет значение 0;  $R^1$  представляет собой атом водорода, метил, метокси-, amino-, нитрогруппу или хлор;  $R^3$  представляет собой метил; и  $R^4$  представляет собой метил.

В другом варианте осуществления  $n$  имеет значение 0;  $R^1$  представляет собой атом водорода, метил, метокси-, amino-, нитрогруппу или хлор;  $R^3$  представляет собой атом водорода; и  $R^4$  представляет собой метил.

В другом варианте осуществления  $n$  имеет значение 0;  $R^1$  представляет собой атом водорода, метил, метокси-, amino-, нитрогруппу или атом хлора;  $R^3$  представляет собой метил; и  $R^4$  представляет собой атом водорода.

В другом варианте осуществления  $n$  имеет значение 0;  $R^1$  представляет собой атом водорода, метил, метокси-, amino-, нитрогруппу или атом хлора;  $R^3$  представляет собой этил; и  $R^4$  представляет собой этил.

В другом варианте осуществления  $n$  имеет значение 1;  $R^1$  представляет собой атом водорода, метил, метокси-, amino-, нитрогруппу или атом хлора;  $R^2$  представляет собой метил, метокси-, amino-, нитрогруппу, атом фтора или хлора;  $R^3$  представляет собой метил; и  $R^4$  представляет собой метил.

В другом варианте осуществления  $n$  имеет значение 1;  $R^1$  представляет собой атом водорода, метил, метокси-, amino-, нитрогруппу или атом хлора;  $R^2$  представляет собой метил, метокси-, amino-, нитрогруппу, атом фтора или хлора;  $R^3$  представляет собой атом водорода; и  $R^4$  представляет собой метил.

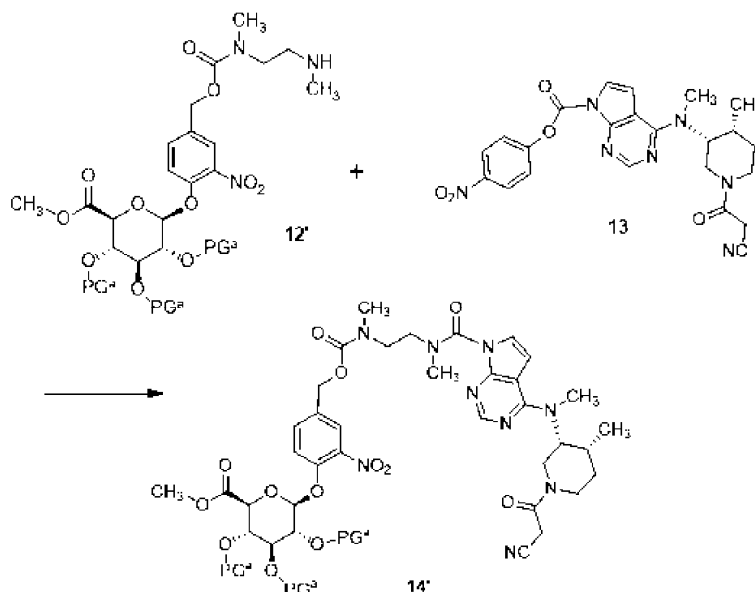
В другом варианте осуществления  $n$  имеет значение 1;  $R^1$  представляет собой атом водорода, метил, метокси-, amino-, нитрогруппу или атом хлора;  $R^2$  представляет собой метил, метокси-, amino-, нитрогруппу, атом фтора или хлора;  $R^3$  представляет собой метил; и  $R^4$  представляет собой атом водорода.

Методики синтеза.

Соединения формулы (I) могут быть получены в соответствии с методиками синтеза, описанными

подробно в прилагаемых примерах. Как показано на схеме 1, например, для получения соединения формулы 1 ключевой стадией синтеза является образование мочевиного мостика между тофацитинибом и защищенной формой остатка глюкуронидного пролекарства 12'. На схеме 1 PG<sup>a</sup> означает защитную группу для гидроксильной группы, предпочтительно аллил или ацетил, хотя также могут быть использованы другие защитные группы для гидроксильной группы, такие как трет-бутилдиметил-силил.

Схема 1

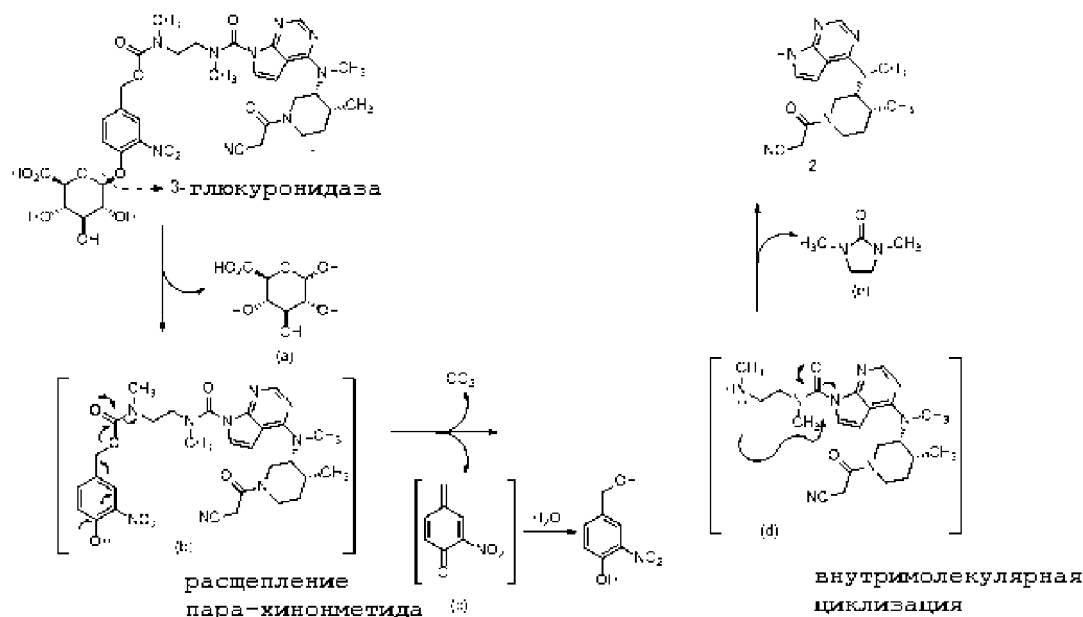


Формирование такой ключевой мочевиной мостиковой связи изначально сосредоточено на использовании тофацитиниба в качестве нуклеофила; однако стадия образования такой связи, как установлено, несостоятельна, так как реакция тофацитиниба с рядом различных электрофилов приводит к образованию целевого продукта только с низким выходом. Поэтому кажется желательным переключить роль двух участников реакции и сделать производное тофацитиниба электрофильным участником реакции, а глюкуронидный фрагмент пролекарства нуклеофилом. После изучения большого числа реагентов было определено, что тофацитиниб может быть дериватизирован и сделан электрофильным, когда его объединяют с реакционноспособным пара-нитрофенильным или пентафторфенильным фрагментом через карбаматный мостик. Например, реагенты пара-нитрофенилхлорформиат, бис(4-нитрофенил)карбонат или бис(пента-фторфенил)карбонат способны обеспечивать необходимый баланс, являясь достаточно реакционноспособными, чтобы повлиять на образование связи с тофацитинибом, и при этом также давать промежуточное соединение, которое не является настолько реакционноспособным, чтобы оно разлагалось до взаимодействия с глюкуронидными фрагментами. На следующей стадии с полученного защищенного промежуточного соединения 14' снимают защитную группу, например, когда PG<sup>a</sup> представляет собой ацетатную группу, с помощью гидроксида лития с получением соединения формулы 1.

Таким образом, в одном аспекте изобретение предлагает способ получения соединения 1, причем этот способ включает (а) взаимодействие защищенного фрагмента глюкуронидного пролекарства 12' с электрофильным производным тофацитиниба 13 с получением соединения 14', и (б) снятие защитной группы с соединения 14' с получением соединения формулы 1. В другом аспекте изобретение предлагает электрофильное соединение тофацитиниба 13.

Действие фермента β глюкуронидазы на пролекарства по изобретению показано для соединения формулы 1. Как видно на схеме 2, при действии фермента β глюкуронидазы на соединение формулы 1 тофацитиниб высвобождается за счет многоступенчатого процесса.

Схема 2



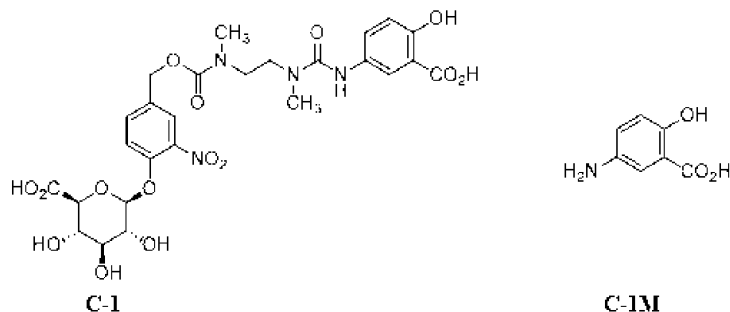
На начальной стадии фермент  $\beta$ -глюкуронидазы расщепляет гликозидную связь соединения формулы 1, вызывая высвобождение глюкуроновой кислоты (a) и образование агликонового промежуточного соединения (b). Агликон самопроизвольно разлагается, давая хинонметидное соединение (c), которое может быть захвачено водой, а неустойчивая карбаминная кислота, которая теряет диоксид углерода, дает диамин (d).

Внутримолекулярная циклизация приводит к образованию имидазолидинового производного (e) и высвобождению тофацитиниба.

Как описано ниже в экспериментальной части, превращение соединения формулы 1 в тофацитиниб через промежуточные ступени, проиллюстрированное на схеме 2, наблюдается в инкубациях с очищенной  $\beta$ -глюкуронидазой (биологическое исследование 2) и со свежеприготовленным гомогенатом содержимого толстой кишки крысы (биологическое исследование 3). В этих последних опытах концентрации соединения формулы 1, агликонового промежуточного соединения b, диаминного промежуточного соединения d и тофацитиниба отслеживают в виде функции времени. Быстрое исчезновение соединения формулы 1 сопровождается быстрым и кратковременным образованием агликона b и более медленным, определяющим скорость, появлением диамина d и конечного активного метаболита тофацитиниба.

В настоящем изобретении установлено, что многоступенчатое разложение соединения глюкуронидного пролекарства, начинающееся с бактериального ферментативного расщепления гликозидной связи  $\beta$ -глюкуронидазой для успешной доставки целевого активного фрагмента непосредственно к сайту действия, к прямой кишке, чувствительно зависит от природы мостиковой связи и от конкретного активного фрагмента. Месаламин, 5-аминосалициловая кислота (5-ASA) (соединение C-1M), представляет собой давний агент, длительно используемый для лечения язвенного колита в форме от легкого до умеренного. Однако рассматриваемый прием с глюкуронидным пролекарством, как оказывается, не применим для доставки 5-ASA непосредственно к прямой кишке.

Глюкуронидное пролекарство 5-ASA (соединения C-1)

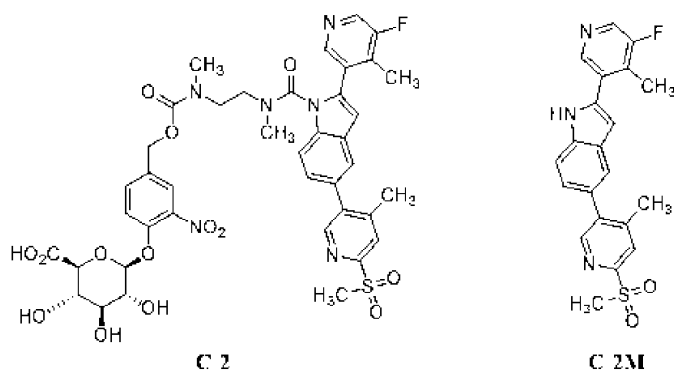


инкубируют с гомогенатом содержимого прямой кишки крысы в опыте, аналогичном опыту, который рассмотрен выше. Хотя неустойчивый агликоновый аналог агликону b на схеме 2 и более медленное исчезновение аналога диамина d наблюдают на отрезке времени, аналогичном отрезку времени для соединения формулы 1, никакого доказательства присутствия активного метаболита 5 ASA не смогли найти.

Недавняя публикация US 2013/0109720 раскрывает 2-(5-фтор-4-метилпирдин-3-ил)-5-(4-метил-6-

(метилсульфонил)пиридин-3-ил)-1H-индол (соединение С-2М) в качестве ингибитора активируемых высвобождением кальция кальциевых каналов (CRAC). Ингибиторы CRAC также, как полагают, полезны для лечения воспалительных заболеваний. Однако рассматриваемый прием с глюкуронидным пролекарством, как оказывается, также не применим для целевой доставки такого ингибитора CRAC.

Распад пролекарства ингибитора CRAC С-2



также изучен в гомогенате содержимого прямой кишки крысы с результатом, аналогичным результату, полученному в случае соединения С-1. Хотя промежуточные продукты распада наблюдают, никакого доказательства высвобождения активного ингибитора CRAC С-2М, найти не удалось.

Такие факты подтверждают, что пролекарства по изобретению исключительным образом приемлемы для использования преимущества бактериального инициируемого  $\beta$ -глюкуронидазой механизма распада с высвобождением тофацитиниба в прямой кишке.

Фармацевтические композиции.

Соединения по изобретению и их фармацевтически приемлемые соли, как правило, используют в форме фармацевтической композиции или препарата. Таким образом, в одном из аспектов по объекту "композиции" изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель и соединение формулы (I), (II) или 1, или его фармацевтически приемлемую соль. Необязательно такие фармацевтические композиции могут содержать другие терапевтические и/или препаратобразующие агенты, если желательно.

Фармацевтические композиции по изобретению, как правило, содержат терапевтически эффективное количество соединения настоящего изобретения. Специалисту в данной области техники будет понятно, однако, что фармацевтическая композиция может содержать больше чем терапевтически эффективное количество, т.е. нерасфасованные композиции, или меньше чем терапевтически эффективное количество, т.е. дискретные стандартные дозы, выполненные для многократного введения для достижения терапевтически эффективного количества.

Как правило, такие фармацевтические композиции будут содержать приблизительно от 0,1 до 95 мас.% соединения формулы (I); в том числе приблизительно от 5 до 70 мас.%; например приблизительно от 10 до 60 мас.% соединения формулы (I).

Любой обычный носитель или наполнитель может быть использован в фармацевтических композициях по изобретению. Выбор конкретного носителя или наполнителя, или комбинаций носителей или наполнителей, будет зависеть от способа введения, который используют для лечения конкретного пациента, или от типа патологического состояния или стадии заболевания. В этом плане получение подходящей фармацевтической композиции для конкретного способа введения находится в рамках опыта специалиста в фармацевтической области. Кроме того, носители или наполнители, используемые в фармацевтической композиции настоящего изобретения, являются коммерчески доступными. В качестве дополнительной иллюстрации обычные методики рецептурирования описаны в публикациях "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); и H.C. Ansel et al., "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Типичные примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают, но без ограничения, следующие: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза, такая как микрокристаллическая целлюлоза и ее производные, например натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; наполнители, такие как масло какао и суппозиторные воски; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатно-буферные растворы; и другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических

композициях.

Фармацевтические композиции, как правило, готовят путем тщательного и однородного смешения или перемешивания соединения по изобретению с фармацевтически приемлемым носителем и одним или несколькими необязательными ингредиентами. Полученной однородно перемешанной смеси затем может быть придана определенная форма или смесь может быть загружена в таблетки, капсулы, пилюли и т.д. с использованием обычных методик и обычного оборудования.

Фармацевтические композиции по изобретению предпочтительно упаковывают в стандартные дозированные лекарственные формы. Термин "стандартная дозированная лекарственная форма" относится к физически дискретной единице, приемлемой для приема дозы лекарства пациентом, т.е. к каждой единице, содержащей заданное количество настоящих соединений, рассчитанное для продуцирования желаемого терапевтического эффекта, или отдельно или в комбинации с одной или несколькими дополнительными единицами. Например, такие стандартные дозированные формы могут представлять собой капсулы, таблетки, пилюли и т.п., или стандартные упаковки, приемлемые для парентерального введения.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции по изобретению являются приемлемыми для перорального введения. Подходящие фармацевтические композиции для перорального введения могут находиться в форме капсул, таблеток, пилюль, пастилок для рассасывания, пакетиков, драже, порошков, гранул, или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле; или в виде эликсира или сиропа; и т.д.; причем каждая содержит заданное количество соединения настоящего изобретения в качестве активного ингредиента.

Когда препарат предназначен для перорального введения в твердой дозированной лекарственной форме (т.е. в виде капсул, таблеток, пилюль и т.п.), фармацевтические композиции по изобретению, как правило, будут содержать соединение по изобретению и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, таких как цитрат натрия или дикальцийфосфат. Необязательно или в качестве альтернативы такие твердые дозированные формы также могут содержать: наполнители или разбавители, такие как крахмалы, микрокристаллическая целлюлоза, лактоза, дикальцийфосфат, сахароза, глюкоза, маннит и/или салициловая кислота; связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; увлажнители, такие как глицерин; средства для улучшения распадаемости таблеток, такие как кроскармеллоза натрия, агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал тапиоки, альгиновая кислота, определенные силикаты и/или карбонат натрия; задерживающие растворение агенты, такие как парафин; ускорители всасывания, такие как четвертичные аммонийные соединения; смачивающие агенты, такие как цетиловый спирт и/или моностеарат глицерина; абсорбенты, такие как каолиновая и/или бентонитовая глина; смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и/или их смеси; красящие агенты; и буферные агенты.

Антиадгезивные агенты, смачивающие агенты, покрывающие агенты, подслащивающие, вкусовые и ароматизирующие агенты, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в фармацевтической композиции по изобретению. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфат натрия, сульфит натрия и т.п.; растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и металл-хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота, сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п. Покрывающие агенты для таблеток, капсул, пилюль и т.д. включают агенты, используемые для кишечнорастворимых покрытий, такие как ацетат-фталат целлюлозы, поливинилацетатфталат, фталат гидроксипропилметил-целлюлозы, метакриловая кислота, сополимеры сложных эфиров метакриловой кислоты, ацетат-тримеллитат целлюлозы, карбоксиметилэтилцеллюлоза, ацетат-сукцинат гидроксипропилметил-целлюлозы и т.п.

Фармацевтические композиции по изобретению также могут быть рецептурированы таким образом, чтобы получать медленное или контролируемое высвобождение активного агента с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в переменных пропорциях; или других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Кроме того, фармацевтические композиции по изобретению необязательно могут содержать придающие непрозрачность агенты и могут быть рецептурированы так, чтобы они высвобождали активный ингредиент только или преимущественно в некоторых отделах желудочно-кишечного тракта, необязательно с отсроченным действием. Примеры задерживающих композиций, которые могут быть использованы, включают полимерные вещества и воски. Активный агент также может находиться в микрокапсулированной форме, если это целесообразно, с одним или несколькими описанными выше наполнителями.

Подходящие жидкие дозированные лекарственные формы для перорального введения включают, например, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Жидкие дозированные формы, как правило, содержат активный агент и инертный разбавитель, такой как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (особенно хлопковое, арахисовое, кукурузное, за-

родышевое, оливковое, касторовое и кунжутные масла), олеиновая кислота, глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирной кислоты и сорбитана и их смеси. С другой стороны, некоторые жидкие препараты могут быть преобразованы, например, распылительной сушкой, в порошок, который используют для получения твердых лекарственных форм по обычным методикам.

Суспензии помимо активного ингредиента могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также их смеси.

Приведенные ниже неограничивающие примеры иллюстрируют типичные фармацевтические композиции настоящего изобретения.

Таблетированная твердая лекарственная форма для перорального применения.

Соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль смешивают сухим способом с микрокристаллической целлюлозой, поливинилпирролидоном и кроскармеллозой натрия в соотношении 4:5:1:1 и прессуют в таблетки, получают стандартную дозу, например 4, 10 или 20 мг активного агента на таблетку.

Таблетированная твердая лекарственная форма для перорального применения.

Соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль (40 г) тщательно смешивают с микрокристаллической целлюлозой (445 г), высокодисперсным диоксидом кремния (10 г) и стеариновой кислотой (5 г). Смесь затем прессуют на таблеточном прессе с получением таблеток весом 100 мг каждая. Каждая таблетка содержит 8 мг активного агента на стандартную дозу, подходящую для перорального введения.

Таблетированная твердая лекарственная форма для перорального применения

Соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль (10 г) тщательно смешивают с кукурузным крахмалом (50 г), кроскармеллозой натрия (25 г), лактозой (110 мг) и стеаратом магния (5 мг). Смесь затем прессуют на таблеточном прессе, получают таблетки весом 200 мг каждая. Каждая таблетка содержит 10 мг активного агента на стандартную дозу, подходящую для перорального введения.

Капсулированная твердая лекарственная форма для перорального применения.

Соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль объединяют с микрокристаллической целлюлозой, поливинилпирролидоном и кроскармеллозой натрия в соотношении 4:5:1:1 путем мокрого гранулирования и загружают в желатиновые капсулы или капсулы из гидроксипропилметилцеллюлозы, получают стандартную дозу, например 4, 10 или 20 мг активного агента на капсулу.

Порошок в капсулах.

Соединением по изобретению или его фармацевтически приемлемой солью (от 1 до 50 мг) заполняют пустую капсулу из гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПСЦ (НРМС)), предназначенной для перорального введения.

Жидкий препарат.

Соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль (50 мг) смешивают со 100 мл низкокалорийного спортивного напитка из ягодного ассорти в бутылке с крышкой и полностью растворяют в нем. Отмеряют разные объемы такого раствора, чтобы получать разные уровни дозы.

Жидкий препарат.

Жидкий препарат, содержащий соединение по изобретению (0,1%), воду (98,9%) и аскорбиновую кислоту (1,0%), получают путем добавления соединения по изобретению к смеси воды и аскорбиновой кислоты.

Лекарственная форма с кишечнорастворимым покрытием для перорального применения.

Соединение по изобретению растворяют в водном растворе, содержащем поливинилпирролидон, и наносят распылением на микрокристаллическую целлюлозу или сахарные бусины в соотношении 1:5 мас./мас. (активный агент):бусины и затем приблизительно с 5%-ным увеличением веса наносят кишечнорастворимое покрытие, содержащее акриловый сополимер, например, комбинацию акриловых сополимеров, доступных под торговым наименованием Eudragit-L® и Eudragit S®, или ацетат-сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы. Покрытые кишечнорастворимым покрытием бусины загружают в желатиновые капсулы или капсулы из гидроксипропилметилцеллюлозы, получают стандартную дозу, например 5 мг активного агента на капсулу.

Лекарственная форма с кишечнорастворимым покрытием для перорального применения.

Кишечнорастворимое покрытие, содержащее комбинацию Eudragit-L® и Eudragit S® или ацетат-сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы, наносят на таблетированную лекарственную форму для перорального применения или капсулированную лекарственную форму для перорального применения, описанные выше.

Полезность.

Рассматриваемые соединения разработаны для доставки клинически эффективного агента непосредственно к сайту действия в желудочно-кишечном тракте для лечения воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта, в частности для лечения воспалительного заболевания кишечника, такого

как язвенный колит и болезнь Крона. Соединения, как ожидают, также могут быть использованы для лечения колитов, ассоциированных с методами лечения ингибиторами иммунных контрольных точек. В частности, глюкуронидные пролекарства по изобретению разработаны для использования преимущества обильного количества бактериального  $\beta$ -глюкуронидного фермента в желудочно-кишечном тракте, в частности в толстой кишке, с целью высвобождения JAK-ингибитора тофацитиниба преимущественно в нижнем отделе желудочно-кишечного тракта. Кроме того, приводимые в качестве примеров соединения по изобретению, как показано, имеют плохое системное всасывание, в результате сводя до минимума риск иммуносупрессии.

Рассматриваемые пролекарственные соединения разработаны с целью понижения биологической активности. Например, соединение формулы 1 не имеет сродства или не обладает активностью по отношению к семейству ферментов Янус-киназ (JAK), не-JAK ферментов или ряду G-белок-сопряженных рецепторов, ионных каналов и транспортеров, которые могут быть экспрессированы в желудочно-кишечном (ЖК) тракте или системно. Биологическую активность после введения настоящих соединений приписывают образуемому тофацитинибу.

Как описано ниже в экспериментальной части, настоящие соединения широко изучены в одном или нескольких доклинических биологических исследованиях. Соединения, как показано, разлагаются в присутствии  $\beta$ -глюкуронидазы, находящейся в фекалиях толстой кишки крыс. Например, метаболическая стабильность соединения формулы 1 и образование тофацитиниба исследованы в инкубациях гомогената содержимого просвета кишечника, выделенного из двенадцатиперстной кишки, подвздошной кишки, тонкого кишечника и толстой кишки крысы. Соединение проявляет градиент растущей оборачиваемости от стабильного в содержимом двенадцатиперстной кишки и тонкого кишечника (время полураспада  $>60$  мин) до умеренной оборачиваемости в содержимом подвздошной кишки (время полураспада 34 мин) и до быстрой оборачиваемости в содержимом толстой кишки (время полураспада  $<5$  мин) при доказательстве образования тофацитиниба. Градиент растущей оборачиваемости соединения отражает нарастающее присутствие бактерий от верхних отделов ЖКТ к нижним отделам ЖКТ.

Высвобождение тофацитиниба из настоящих соединений при пероральном приеме изучено на мышах, крысах и яванских макаках. Как описано ниже в биологических исследованиях 4, 5, 9 и 10, во всех видах пролекарства показывают значительно более высокое содержание тофацитиниба в толстой кишке, чем в плазме. В частности, высвобождение тофацитиниба из соединения формулы 1 в определенных отделах желудочно-кишечного тракта изучено в крысе и обезьяне и сравнено с концентрацией, полученной при пероральном приеме самого тофацитиниба в эквивалентных дозах. Соединение 1 не только показывает значительно более высокое содержание на всем протяжении желудочно-кишечного тракта, чем содержание в плазме (например, соотношения больше чем 500 у крысы и приблизительно между 60 и 150 у обезьян в отделах прямой кишки), но также показывает увеличением концентрации в тканях ЖКТ и увеличением отношения концентрации в тканях ЖКТ к концентрации в плазме относительно отношения, полученного в случае перорального приема самого тофацитиниба. Например, у обезьян наблюдают повышение концентрации тофацитиниба от пяти- до семикратного в слепой кишке, проксимальной и дистальной ткани толстой кишки при пероральном введении пролекарства по сравнению с концентрацией, полученной при пероральном приеме тофацитиниба.

Эффективность некоторых соединений по изобретению также испытана в модели оксазолон-индуцированного колита у мышей. Соединения формулы 1 и 4 демонстрируют активность в модели оксазолон-индуцированного колита у мышей при более низких пероральных дозах, чем требуется при прямом введении тофацитиниба для достижения эквивалентного эффекта. Кроме того, эффективные дозы соединения формулы 1 сопровождаются пониженным системным воздействием тофацитиниба в сравнении с системным воздействием, полученным в результате приема самого тофацитиниба при его эффективной дозе. В модели иммуносупрессии у мышей соединение 1 демонстрирует минимальный эффект иммуносупрессии при той же дозе, необходимой, чтобы показать сравнимую эффективность в оксазолоновой модели (терапевтический индекс  $> 3$ -кратного), тогда как тофацитиниб является иммуносупрессивным при дозе ниже чем его эффективная доза (терапевтический индекс  $\leq 0,3$ ).

Соответственно, глюкуронидные пролекарства тофацитиниба по изобретению, как ожидают, являются полезными для лечения воспалительного заболевания, в частности язвенного колита. Настоящие соединения, как ожидают, также полезны для лечения болезни Крона и для лечения колита, ассоциированного с терапией ингибиторами иммунных контрольных точек, потенциально серьезного последствия иммунотерапии рака. Методы лечения ингибиторами иммунных контрольных точек включают, но без ограничения ими, цитотоксичные Т-лимфоциты, ассоциирующиеся с ингибиторами антигена 4 (CTLA-4), такими как ипилимумаб (Yervoy®) и тремелиумаб; ингибиторами запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), такими как пембролизумаб (Keytruda®) и ниволумаб (Opdivo®); и ингибиторами лиганда запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1), такими как атезолизумаб (Tecentriq®), дурвалумаб и авелумаб. В частности, соединения, как ожидается, полезны для лечения колита, индуцированного ингибиторами CTLA-4. Соединения также могут найти применение при лечении вторичных состояний, таких как желудочно-кишечные побочные действия при реакции "трансплантат против хозяина", целиакии-

спру, микроскопическом колите, паучите и аутоиммунной энтеропатии.

В одном аспекте, следовательно, изобретение предлагает способ лечения заболевания желудочно-кишечного тракта у млекопитающего (например, человека), включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения по изобретению или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение по изобретению.

В одном варианте осуществления заболеванием желудочно-кишечного тракта является язвенный колит. В другом варианте осуществления заболеванием желудочно-кишечного тракта является болезнь Крона. И в еще одном варианте осуществления заболеванием желудочно-кишечного тракта является колит, ассоциирующийся с терапией ингибиторами иммунных контрольных точек.

Изобретение также предлагает способ лечения язвенного колита у млекопитающего, включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения по изобретению или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение по изобретению.

При использовании для лечения язвенного колита соединение по изобретению, как правило, будут вводить перорально в однократной суточной дозировке или в многократных дозировках в день, хотя могут быть использованы и другие формы введения. Количество активного агента, введенного на дозу, или суммарное количество, введенное в день, как правило, будет определяться практикующим врачом с учетом существующих обстоятельств, включая состояние, которое поддается лечению, выбранный способ введения, фактически существующее введенное соединение и его относительная активность, возраст, вес и реакция отдельного пациента, серьезность симптомов у пациента и т.д.

Приемлемые дозы для лечения язвенного колита и других воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, как полагают, находятся в интервале приблизительно от 2 до 60 мг/день соединения формулы (I), в том числе приблизительно от 4 до 50 мг/день и приблизительно от 4 до 40 мг в день для среднего человека весом 70 кг.

Комбинированная терапия.

Соединения по изобретению также могут быть использованы в комбинации с одним или несколькими агентами, которые действуют по таким же механизмам или по другим механизмам, для проведения лечения воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Полезные классы средств для комбинированной терапии включают, но не ограничиваются ими, аminosалицилаты, стероиды, системные иммуносупрессанты, анти-TNF $\alpha$  антитела, антиальфа4 (анти-VLA-4) антитела, антиинтегрин  $\alpha_4\beta_7$  антитела, противобактериальные агенты и противодиарейные медикаменты.

Аminosалицилаты, которые могут быть использованы в комбинации с настоящими соединениями, включают, но без ограничения ими, мезаламин, олсалазин и сульфасалазин. Примеры стероидов включают, но без ограничения ими, преднизон, преднизолон, гидрокортизон, будесонид, беклометазон и флутиказон. Системные иммуносупрессанты, полезные для лечения воспалительных заболеваний, включают, но без ограничения ими, циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, 6-меркаптопурин и такролимус. Кроме того, анти-TNF $\alpha$  антитела, которые включают, но без ограничения ими, инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб, могут быть использованы в комбинированной терапии. Полезные соединения, действующие по другими механизмам, включают антиальфа4 антитела, такие как натализумаб, антиинтегрин  $\alpha_4\beta_7$  антитела, такие как ведолизумаб, антибактериальные агенты, такие как рифаксимин, и противодиарейные медикаменты, такие как лоперамид. (Mozaffari et al. Expert Opin. Biol. Ther., 2014, 14, 583-600; Danese, Gut, 2012, 61, 918-932; Lam et al., Immunotherapy, 2014, 6, 963-971.)

В другом аспекте, таким образом, изобретение предлагает терапевтическую комбинацию для лечения воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, причем комбинация содержит соединение по изобретению и один или несколько других терапевтических агентов, полезных для лечения воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Например, изобретение предлагает комбинацию, содержащую соединение по изобретению и один или несколько агентов, выбираемых из аminosалицилатов, стероидов, системных иммуносупрессантов, анти-TNF $\alpha$  антител, антиальфа4 антител, антиинтегрин  $\alpha_4\beta_7$  антител, антибактериальных агентов и противодиарейных медикаментов. Вторичный(е) агент(ы), когда он(и) включен(ы), присутствует(ют) в терапевтически эффективном количестве, т.е. в любом количестве, которое продуцирует терапевтически благоприятный эффект при совместном введении с соединением по изобретению.

Кроме того, в аспекте по объекту "способ" изобретение предлагает способ лечения воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, включающий введение млекопитающему соединения по изобретению и одного или нескольких других терапевтических агентов, полезных для лечения воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

При использовании в комбинированной терапии агенты могут быть рецептурированы в одной фармацевтической композиции, как раскрыто выше, или агенты могут быть представлены в отдельных композициях, которые вводят одновременно или в разное время с помощью одного и того же или с помощью разных способов введения. При введении по отдельности агенты могут введены достаточно близко по времени с тем, чтобы обеспечивать желаемый терапевтический эффект. Такие композиции могут быть

упакованы по отдельности или могут быть упакованы в виде набора. Два или несколько терапевтических агентов в наборе могут быть введены путем одного и того же способа введения или за счет различных способов введения.

### Примеры

Представленные далее примеры синтеза и биологические примеры служат для иллюстрации изобретения, и их не следует рассматривать ни коим образом в качестве ограничивающих объем изобретения. Ниже в примерах следующие сокращения имеют приведенные ниже значения, если не указано иное. Сокращения, не обозначенные ниже, имеют их общепринятые значения.

Ас - ацетил;  
 АСN - ацетонитрил;  
 Allos - аллилоксикарбонил;  
 d - день (дни);  
 ДХМ (DCM) - дихлорметан;  
 DIPEA - N,N-диизопропилэтиламин;  
 DMAP - 4-диметиламинопиридин;  
 Et<sub>3</sub>N - триэтиламин;  
 EtOAc - этилацетат;  
 EtOH - этанол;  
 ч - час;  
 ИПС (IPA) - изопропиловый спирт;  
 MeOH - метанол;  
 мин - мин;  
 к.т. (RT) - комнатная температура;  
 tBu - трет-бутил;  
 ТФУК (TFA) - трифторуксусная кислота;  
 ТГФ (THF) - тетрагидрофуран.

Реагенты и растворители приобретают у коммерческих поставщиков (Sigma-Aldrich, Fluka и др.) и используют без дополнительной очистки. Изменения в реакционной смеси контролируют с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ (TLC)), аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (анал. ВЭЖХ (HPLC)) и масс-спектрометрии. Реакционные смеси обрабатывают так, как описано конкретно для каждой реакции; обычно их очищают с помощью экстракции и других способов очистки, таких как зависимость от температуры и зависимость от растворителя кристаллизация и осаждение. Кроме того, реакционные смеси обычным путем очищают колоночной хроматографией или препаративной ВЭЖХ, как правило, с использованием наполнителей колонок C18 или BDS и обычных элюентов. Типичные условия препаративной ВЭЖХ описаны ниже.

Описание продуктов реакции проводят обычным путем с помощью масс-спектрометрии и аналитической ВЭЖХ. Масс-спектрометрическую идентификацию соединений проводят методом ионизации электроспреем (ESMS) с помощью прибора Applied Biosystems (Foster City, CA), модель API 150 EX, или прибора Waters (Milford, MA) 3100, соединений с системами самоочищения.

Условия препаративной ВЭЖХ.

Колонка: C18, 5 мкм, 21,2×150 мм; или C18, 5 мкм, 21×250; или C14, 5 мкм 21×150 мм.

Температура колонки: комнатная температура.

Скорость потока: 20,0 мл/мин.

Подвижные фазы:

A=вода+0,05% ТФУК,

B=ACN+0,05% ТФУК.

Объем вводимой пробы: (100-1500 мкл).

Длина волны детектора: 214 нм.

Сырые соединения растворяют в смеси 1:1 вода:(уксусная кислота) приблизительно из расчета 50 мг/мл. Пробный опыт с 4-минутной аналитической шкалой проводят с использованием колонки C18 2,1×50 мм, после чего следует 15- или 20-минутный опыт с подготовительной шкалой с использованием 100 мкм вводимого объема с градиентом, основанном на %B удерживания пробного опыта с аналитической шкалой. Точные градиенты являются образец-зависимыми. Образцы с близко проходящими примесями проверяют с помощью колонки C18 21×250 мм и/или колонки C14 21×150 мм для наилучшего разделения. Фракции, содержащие целевой продукт, идентифицируют с помощью масс-спектрометрического анализа.

Условия аналитической ВЭЖХ.

Метод А.

Прибор: Agilent 1260 HPLC.

Колонка: LUNA C18 (2), 150×4,60 мм, 3 мкм.

Температура колонки: 35°C.

Скорость потока: 1,2 мл/мин.

Объем вводимой пробы: 5 мкл.

Приготовление образца: растворить в смеси 1:1 ACN:вода до получения раствора ~0,5 мг/мл.

Подвижные фазы:

A=вода:ACN:ТФУК (98:2:0,05).

B=вода:ACN:ТФУК (30:70:0,05).

Длина волны детектора: 230 нм.

Градиент: всего 28 мин (время (мин)/%B): 0/10, 20/100, 22/100, 23/10, 28/10.

Метод В.

Прибор: Agilent 1260 HPLC.

Колонка: Zorbax-Bonus RP C14, 30×2,1 мм, 1,8 мкм.

Температура колонки: 60°C.

Скорость потока: 1,2 мл/мин.

Объем вводимой пробы: 3 мкл.

Приготовление образца: растворить в смеси 1:1 ACN:вода до получения раствора ~1,0 мг/мл.

Подвижные фазы:

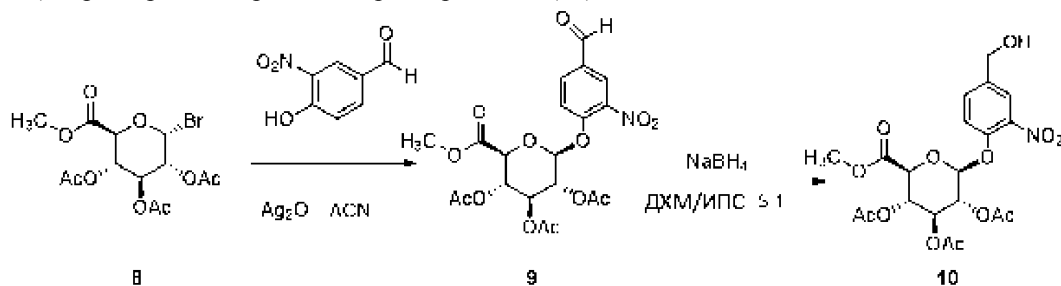
A=вода:ТФУК (99,9%:0,1%),

B=ACN:ТФУК (99,9%:0,1%).

Длина волны детектора: 214 нм.

Градиент: всего 3,0 мин (время (мин)/%B): 0/5, 1,5/65, 1,8/95, 2,1/95, 2,5/5, 3,0/5.

Методика получения 1. (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(Гидроксиметил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетат (10)



(а) (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-Формил-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетат (9).

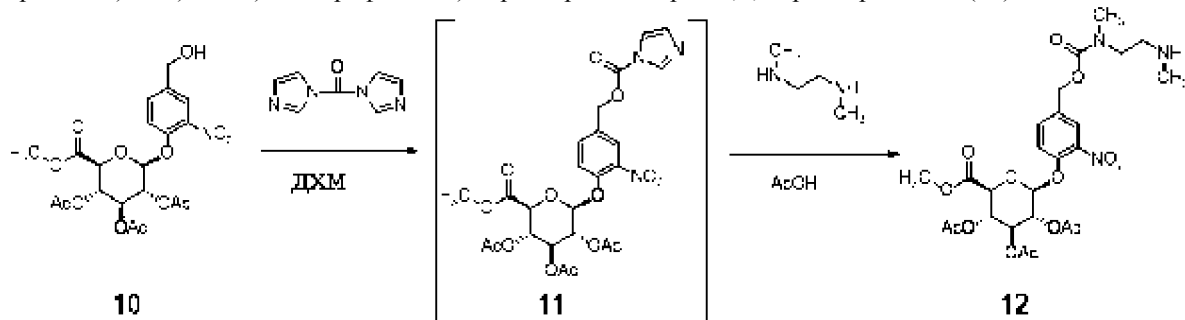
В 3-горлую колбу объемом 2 л, снабженную механической мешалкой, добавляют (2S,3R,4S,5S,6S)-2-бром-6-(метоксикарбонил)-тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетат (8) (51 г, 128,4 ммоль), 4 гидрокси-3-нитробензальдегид (20,98 г, 125,5 ммоль) и оксид серебра (37,7 г, 162,7 ммоль), после чего ACN (750 мл). Реакционную смесь перемешивают в темноте 18 ч и фильтруют через диатомовую землю (Celite®). Твердый продукт промывают ACN (3×100 мл) и фильтрат подвергают отгонке при пониженном давлении до 100 мл. К фильтрату добавляют EtOAc (1750 мл) и насыщенный раствор бикарбоната натрия (1 л) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение 30 мин, фильтруют через Celite и дают возможность осесть. Органический слой промывают насыщенным раствором бикарбоната натрия (1 л) и рассолом (1 л), сушат над сульфатом натрия (100 г) 2 ч, фильтруют и отгоняют при пониженном давлении досуха, получают сырое соединение 9 в виде желтого твердого вещества (55 г, выход 90%, чистота 97,4%).

ВЭЖХ: время удерживания 15,61 мин.

(б) (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(Гидроксиметил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетат (10).

В 3-горлую колбу объемом 1 л, снабженную механической мешалкой, добавляют соединение 9 (32,7 г, 67,6 ммоль), затем ДХМ (350 мл) и ИРС (70 мл). Реакционную смесь перемешивают, чтобы растворить твердое вещество, и затем охлаждают до 0°C. К раствору добавляют боргидрид натрия (1,54 г, 40,6 ммоль) за три порции, поддерживая температуру ниже 5°C, реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 1 ч и медленно выливают в ледяную воду (400 мл). К раствору добавляют ДХМ (350 мл) и смесь перемешивают 30 мин, дают отстояться 30 мин и слои разделяют. Водный слой опять экстрагируют ДХМ (100 мл). Объединенные органические слои промывают рассолом (500 мл). Через 30 мин слои разделяют и слой рассола снова экстрагируют ДХМ (100 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия (50 г) в течение 2 ч, фильтруют через Celite и отгоняют при пониженном давлении досуха. Полученное твердое вещество перемешивают с 95%-ным денатурированным EtOH (130 мл) при 50°C в течение 30 мин и при к.т. в течение 12 ч, получают кристаллическое твердое вещество, которое промывают EtOH (30 мл) и сушат в вакууме при к.т. 16 ч, получают названное соединение в виде белого твердого вещества (21 г, выход 66%, чистота 98%) ВЭЖХ, метод А: время удерживания 13,18 мин.

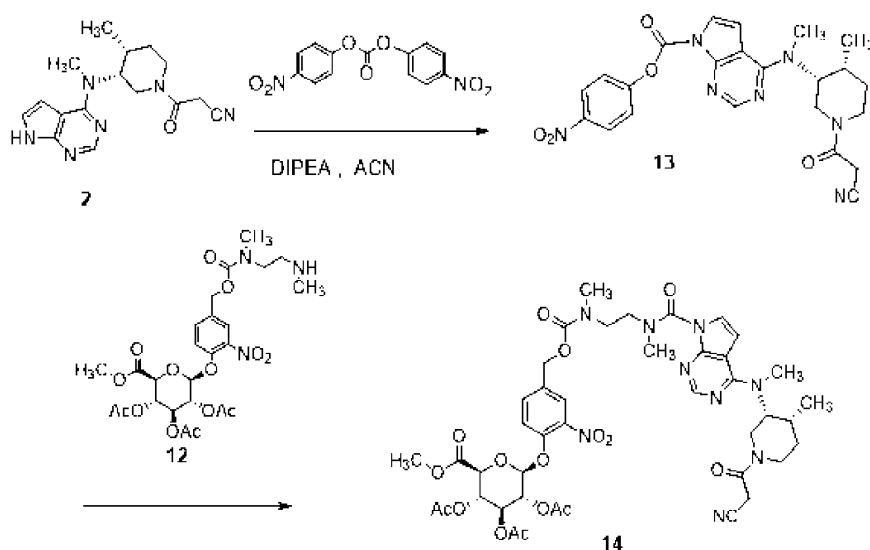
Методика получения 2. (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(Метоксикарбонил)-6-(4-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (12)



В колбу объемом 100 мл, снабженную магнитной мешалкой, добавляют (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(гидроксиметил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (10) (4,86 г, 10 ммоль) и карбонилдиимидазол (2,11 г, 13 ммоль), затем добавляют ДХМ (50 мл). Реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение 3 ч, получают раствор (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((1Н-имидазол-1-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетата (11).

В 3-горлую колбу объемом 250 мл, снабженную магнитной мешалкой, добавляют N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-димилэтан-1,2-диамин (3,09 г, 35 ммоль, 3,76 мл), а затем ДХМ (30 мл). Реакционную смесь охлаждают до 0°C и медленно при температуре <5°C добавляют уксусную кислоту (2,1 г, 35 ммоль, 2 мл), получают суспензию. К суспензии медленно добавляют раствор промежуточного соединения 11; реакционную смесь перемешивают при 0-5°C в течение 30 мин и затем при к.т. в течение 3 ч. Добавляют ДХМ (30 мл) и воду (60 мл) и реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение 10 мин. Органический слой промывают водой (2×60 мл), сушат над сульфатом натрия 2 ч и фильтруют, получают названное соединение в растворе (выход ~70%), который хранят при 0-4°C и используют без очистки. ВЭЖХ метод А: время удерживания 11,04 мин.

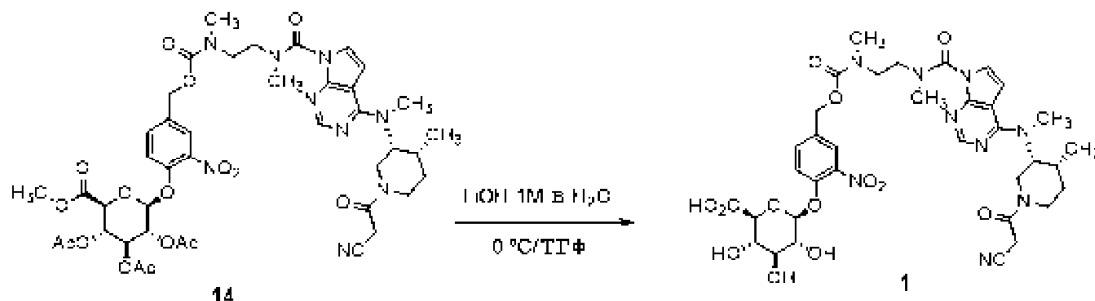
Методика получения 3. (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамида)этил)(метил)-карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)-тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (14)



В 3-горлую колбу объемом 1 л, снабженную магнитной мешалкой, добавляют 3-((3R,4R)-4-метил-3-(метил(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)амино)пиперидин-1-ил)-3-оксoproпаннитрил (2) (9,65 г, 31 ммоль), бис(4-нитрофенил)карбонат (12,22 г, 40 ммоль) и ACN (240 мл) и реакционную смесь охлаждают до 0°C. По каплям добавляют DIPEA (5,59 г, 43 ммоль), реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение 4 ч и охлаждают до 0°C. К охлажденной реакционной смеси добавляют раствор (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(метоксикарбонил)-6-(4-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)тетрагидро-2Н-пиран-3, 4, 5-триилтриацетата (12) в ДХМ (350 мл, 30 ммоль) при температуре <10°C, реакционную смесь перемешивают при 15°C в течение 1 ч и затем гасят уксусной кислотой (2,5 г, 42 ммоль). Добавляют ДХМ (200 мл) и воду (300 мл), слои разделяют и органический слой промывают 3%-ным раствором карбоната натрия (2×350 мл), затем 0,5М HCl (2×200 мл) и 10%-ным раствором хлорида натрия (200 мл), сушат над сульфатом натрия (50 г) в течение 5 ч, фильтруют и концентрируют до

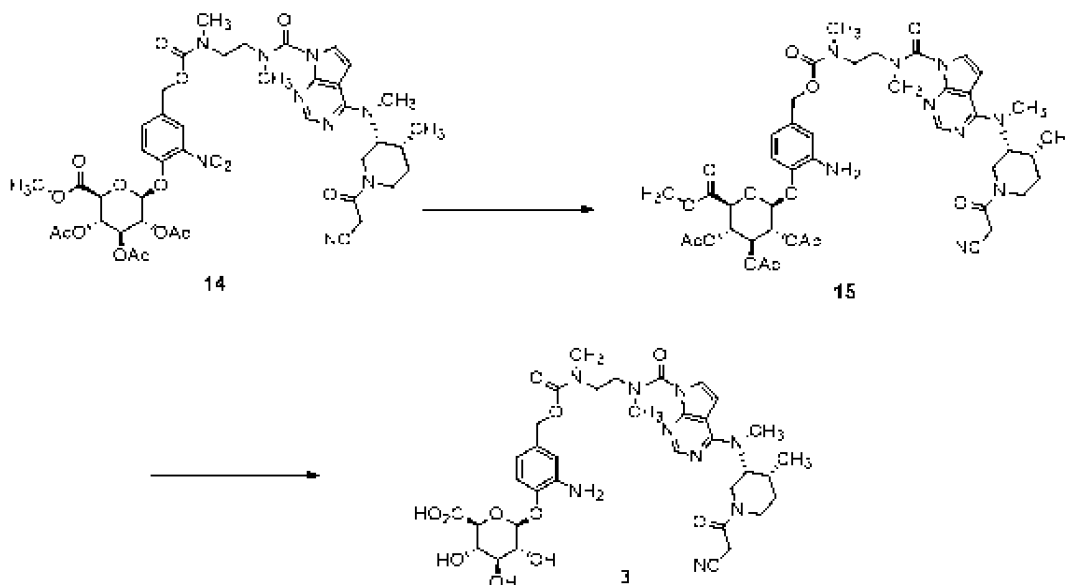
~100 мл. Концентрированный раствор очищают с помощью хроматографии на силикагеле (колонка 600 г диоксида кремния, скорость потока 60 мл/мин, градиент: от 40% ДХМ в EtOAc до 100% EtOAc в течение 5 мин, 100% EtOAc в течение 60 мин, от 3% MeOH до 5% MeOH в EtOAc в течение 30 мин, от 5% MeOH в EtOAc до окончания). Чистые фракции объединяют и отгоняют досуха в вакууме, получают названное соединение (21,2 г, чистота 97%, выход 73%). ВЭЖХ, метод А: время удерживания 13,92 мин.

Пример 1. (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)-окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (1)



В 3-горлую колбу объемом 500 мл, снабженную магнитной мешалкой, добавляют (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (14) (20,9 г, 22 ммоль) и ТГФ (210 мл). Реакционную смесь охлаждают до 0 °С и добавляют в течение 20 мин 1М раствор LiOH в воде (46 мл, 47 ммоль) и реакционную смесь перемешивают 20 мин. Добавляют вторую равную порцию раствора LiOH в течение 30 мин и реакционную смесь перемешивают 2 ч. Добавляют уксусную кислоту (5,6 г, 93 ммоль) и реакционную смесь переносят в круглодонную колбу объемом 2 л. В колбу добавляют ACN (500 мл) и смесь подвергают отгонке при пониженном давлении, удаляют 600 мл растворителя. Процесс повторяют дважды, причем третью отгонку проводят досуха. Полученное твердое вещество растворяют в 2% ACN в воде (350 мл) и очищают в партиях по 90 мл с помощью хроматографии с обращенной фазой (колонка C18 с диоксидом кремния, 450 г, скорость потока 40 мл/мин, растворитель А: 0,5%-ная уксусная кислота в воде; растворитель В: ACN, градиент: всего 110 мин (время (мин)/%В): 0/2, 10/2, 100/28, 110/28, после этого промывают 90% В. Фракции продукта объединяют, процедуру повторяют три раза, объединенные фракции концентрируют приблизительно до 600 мл и лиофилизируют, получают названное соединение в виде твердого вещества (11,2 г, выход 60%, чистота 99%). ВЭЖХ, метод А: время удерживания 7,95 мин.

Пример 2. (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-Амино-4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (3)



(а) (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-Амино-4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (15).

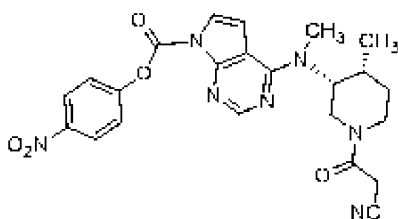
К раствору (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(ме-

тил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидоэтил)(метил)карбамоил)-окси)метил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетата (14) (1,55 г, 1,65 ммоль) в EtOH (50 мл) добавляют гидроксид палладия на угле (11,57 мг, 0,08 ммоль). Реакционный раствор перемешивают в атмосфере водорода при комнатной температуре 3 дня, фильтруют через слой Celite, промывают EtOH и концентрируют в вакууме. Сырой материал выделяют в виде коричневой пены и используют без дополнительной очистки. (m/z):[M+H]<sup>+</sup>. Вычислено для C<sub>42</sub>H<sub>53</sub>N<sub>9</sub>O<sub>14</sub> 908,37; найдено 908,8.

(b) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-Амино-4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидоэтил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (3).

К раствору продукта предыдущей стадии (0,95 г, 1,05 ммоль) в смеси 1:1:1 MeOH (3,49 мл), ТГФ (3,49 мл) и воды (3,49 мл) добавляют LiOH (63 мг, 2,62 ммоль) и смесь перемешивают при комнатной температуре 1 ч. Реакционный раствор концентрируют в вакууме и сырой материал очищают колоночной хроматографией с обращенной фазой, получают названное соединение (96 мг, выход 12%) в виде белого твердого вещества. ВЭЖХ, метод В: время удерживания 0,85 мин.

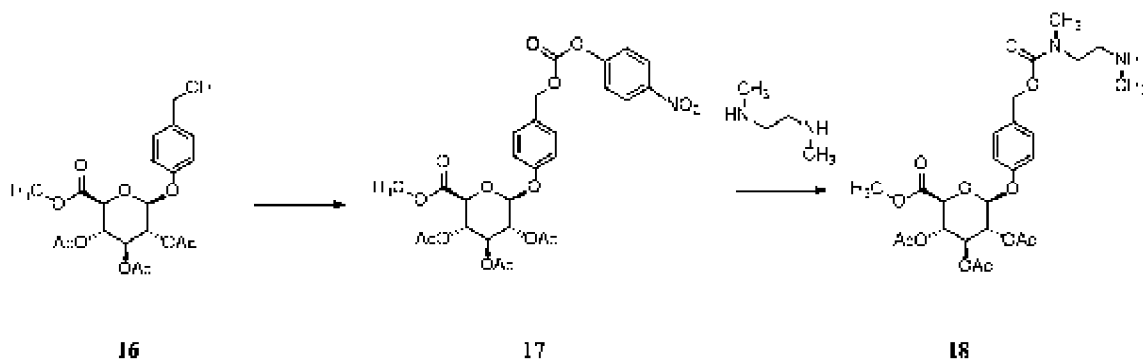
Методика получения 4. 4-Нитрофенил-4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-7Н-пирроло[2,3-d-пиримидин-7-карбоксилат (13)



## 13

К раствору 3-(((3R,4R)-4-метил-3-(метил(7Н-пирроло[2,3-d-пиримидин-4-ил)амино)пиперидин-1-ил)-3-оксопропаннитрила (2) (0,75 г, 2,40 ммоль) в ДХМ (12 мл) добавляют раствор гидроксида натрия (0,29 г, 7,20 ммоль) в воде (4,00 мл) и тетрабутил-аммонийбромид (0,08 г, 0,24 ммоль). Медленно добавляют раствор 4-нитрофенилхлорформиата (0,97 г, 4,80 ммоль) в ДХМ (4 мл). Реакционную смесь перемешивают при к.т. 1 ч, экстрагируют ДХМ и органический слой промывают насыщенным раствором хлорида аммония и рассолом, сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют в вакууме. Сырой остаток очищают колоночной хроматографией (0-100% EtOAc в гексанах), получают названное соединение (0,94 г, выход 82%) в виде светло-желтого твердого вещества, (m/z):[M+H]<sup>+</sup>. Вычислено для C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub> 478,18; найдено 478,2.

Методика получения 5. (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(Метоксикарбонил)-6-(4-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (18)



(a) (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(Метоксикарбонил)-6-(4-(((4-нитро-фенокси)карбонил)окси)метил)фенокси)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (17).

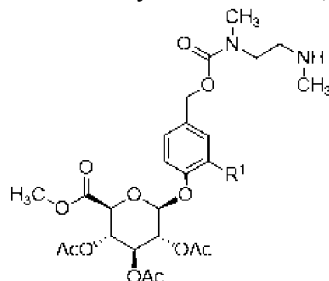
К раствору (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(гидроксиметил)фенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетата (16) (27,0 г, 61,3 ммоль) и Et<sub>3</sub>N (25,5 мл, 17,0 ммоль) в ДХМ (250 мл) медленно добавляют раствор п-нитрофенилхлорформиата (18,53 г, 91,9 ммоль) в ДХМ (100 мл). Раствор перемешивают при к.т. 1 ч, разбавляют водой (100 мл) и экстрагируют ДХМ (3×100 мл).

Объединенные органические слои концентрируют при пониженном давлении и сырой остаток очищают колоночной хроматографией (35% EtOAc в гексанах), получают названное соединение (37,0 г, выход 56%).

(b) (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(Метоксикарбонил)-6-(4-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)фенокси)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (18).

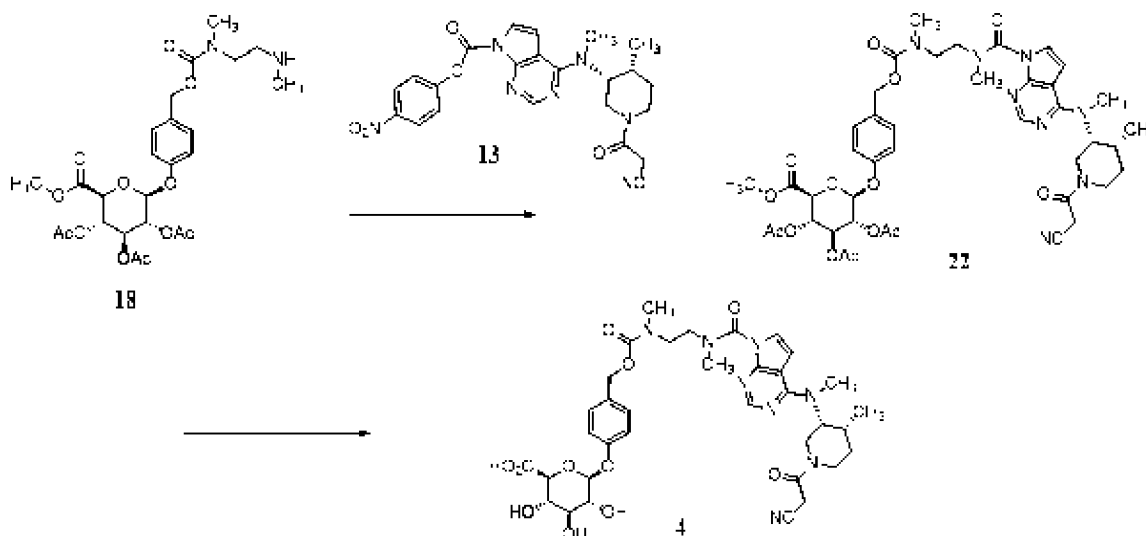
К раствору (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(метоксикарбонил)-6-(4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)метил)фенокси)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетата (17) (0,50 г, 0,83 ммоль) в ДХМ (8,26 мл) при к.т. добавляют N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-диметилэтан-1,2-диамин (0,44 мл, 4,13 ммоль). Через 1,5 ч реакционный раствор фильтруют и промывают ДХМ. Фильтрат концентрируют в вакууме и остаток очищают колоночной хроматографией (0–10% MeOH в ДХМ), получают названное соединение (354 мг, выход 77%) в виде бесцветного твердого вещества, (m/z):[M+H]<sup>+</sup>. Вычислено для C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub> 555,21; найдено 555,6.

Следующие промежуточные соединения получают способом, аналогичным методике получения 5:



| R <sup>1</sup> | Соединение, № | (m/z): [M+H] <sup>+</sup> . Вычислено для                                              |
|----------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Метил          | 19            | C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> 569,23; найдено 569,7   |
| Хлор           | 20            | C <sub>25</sub> H <sub>33</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>12</sub> 591,17; найдено 591,4 |
| Метокси        | 21            | C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub> 585,22; найдено 585,5   |

Пример 3. (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (4)



(a) (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетат (22).

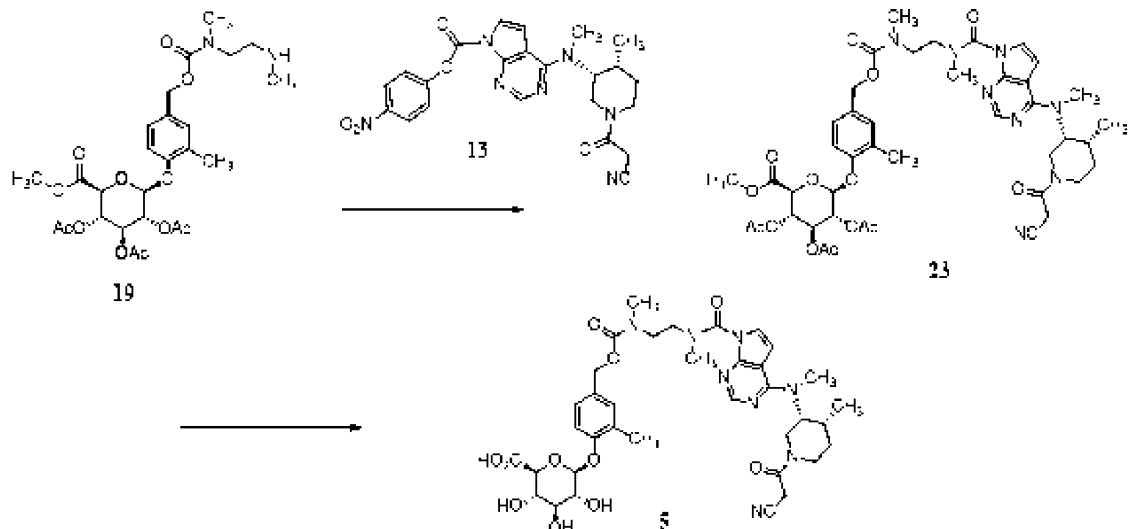
К раствору (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(метоксикарбонил)-6-(4-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетата (18) (0,35 г, 0,63 ммоль) и 4-нитрофенил-4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метил-пиперидин-3-ил)(метил)амино)-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксилата (13) (0,30 г, 0,63 ммоль) в ДМФА (5,05 мл) добавляют Et<sub>3</sub>N (0,13 мл, 0,95 ммоль) и полученную смесь перемешивают при 40°C. Через 1,5 ч данные ЖХ/МС указывают на образование чистого продукта. Реакционный раствор охлаждают до к.т. и концентрируют в вакууме. Сырой продукт выделяют в виде желтого остатка, который используют без дополнительной очистки. (m/z):[M+H]<sup>+</sup>. Вычислено для C<sub>42</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>14</sub> 893,36; найдено 893,9.

(b) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (4).

К раствору продукта предыдущей стадии (0,56 г, 0,63 ммоль) в смеси 1:1:1 MeOH (2,10 мл), ТГФ (2,10 мл) и воды (2,10 мл) добавляют LiOH (40 мг, 1,70 ммоль) и раствор перемешивают при к.т., концентрируют в вакууме и сырой остаток очищают колоночной хроматографией с обращенной фазой, получа-

ют названное соединение (0,12 г, выход 27%) в виде белого твердого вещества. (m/z):  $[M+H]^+$ . Вычислено для  $C_{35}H_{44}N_8O_{11}$  753,31; найдено 753,8. ВЭЖХ, метод В: время удерживания 0,98 мин.

Пример 4. (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)-окси)метил)-2-метилфенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (5)



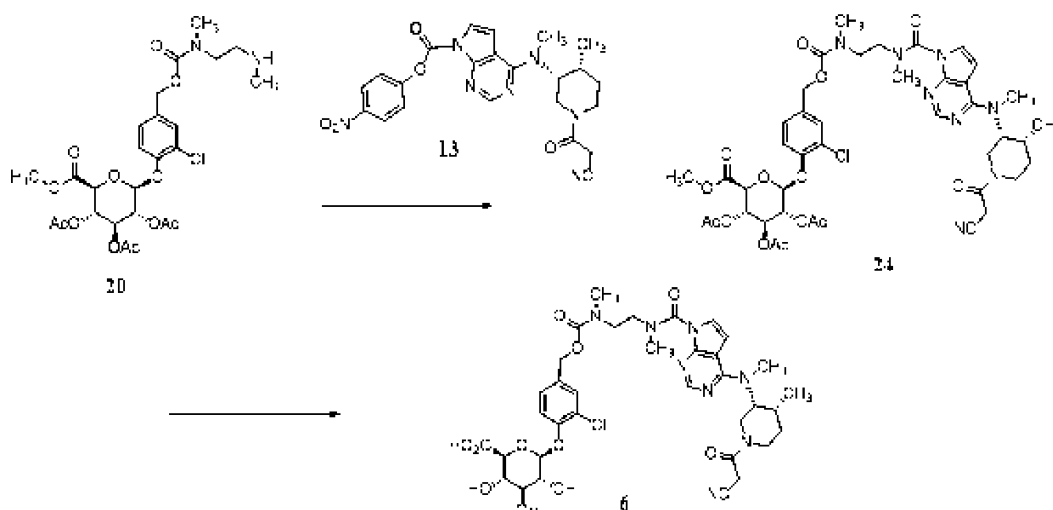
(а) (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло-[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)-метил)-2-метилфенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (23).

К раствору (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(метоксикарбонил)-6-(2-метил-4-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)фенокси)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетата (19) (0,46 г, 0,81 ммоль) в ДХМ (8,00 мл) медленно добавляют раствор 4-нитрофенил-4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксилата (13) (0,39 г, 0,81 ммоль) в ДХМ (3,00 мл) и раствор перемешивают при к.т. в течение 1,5 ч, концентрируют в вакууме и желтое твердое вещество используют без дополнительной очистки. (m/z):  $[M+H]^+$ . Вычислено для  $C_{43}H_{54}N_8O_{14}$  907,38; найдено 907,6.

(б) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло-[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)-метил)-2-метилфенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (5).

К охлажденному льдом раствору продукта предыдущей стадии (0,73 г, 0,81 ммоль) в MeOH (29 мл) медленно добавляют водный раствор LiOH (4,04 мл, 4,04 ммоль). После перемешивания при 0°C в течение 1,5 ч реакционный раствор доводят до pH 5-6 путем медленного добавления 1н. раствора HCl. Реакционный раствор концентрируют в вакууме и сырой материал очищают колоночной хроматографией с обращенной фазой, получают названное соединение (0,47 г, выход 76%) в виде белого твердого вещества. (m/z):  $[M+H]^+$ . Вычислено для  $C_{36}H_{46}N_8O_{11}$  767,33; найдено 767,8. ВЭЖХ, метод В: время удерживания 1,02 мин.

Пример 5. (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-Хлор-4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (6).



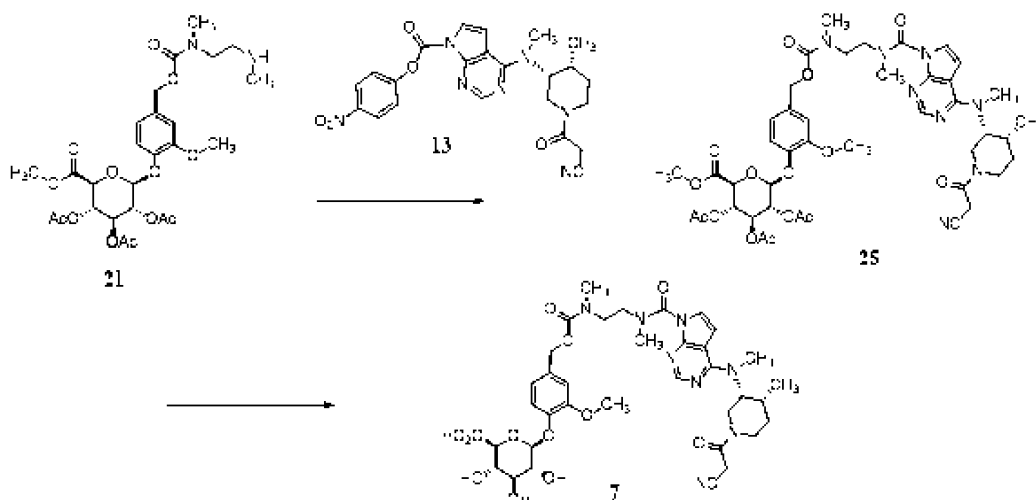
(а) (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-Хлор-4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиридин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (24).

К раствору (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-хлор-4-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-6-(метоксикарбонил)-тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетата (20) (0,33 г, 0,57 ммоль) и 4-нитрофенил-4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-7Н-пирроло[2,3-d]пиридин-7-карбоксилата (13) (0,27 г, 0,57 ммоль) в ДМФА (4,52 мл) добавляют Et<sub>3</sub>N (0,12 мл, 0,85 ммоль) и полученный раствор перемешивают при 40°C. Через 1 ч раствор концентрируют в вакууме. Продукт выделяют в виде желтого остатка, который используют без дополнительной очистки. (m/z): [M+H]<sup>+</sup>. Вычислено для C<sub>42</sub>H<sub>51</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>14</sub> 927,32; найдено 927,7.

(б) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-Хлор-4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиридин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (6).

К раствору (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-хлор-4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиридин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетата (0,52 г, 0,57 ммоль) в смеси 1:1:1 MeOH (1,88 мл), ТГФ (1,88 мл) и воды (1,88 мл) добавляют LiOH (40 мг, 1,53 ммоль) и раствор перемешивают при к.т. 2 ч. Реакционный раствор концентрируют в вакууме и сырой материал очищают колоночной хроматографией с обращенной фазой, получают конечный продукт (0,22 г, выход 49%) в виде белого твердого вещества, (m/z): [M+H]<sup>+</sup>. Вычислено для C<sub>35</sub>H<sub>43</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>11</sub> 787,27; найдено 787,8. ВЭЖХ, метод В; время удерживания 1,04 мин.

Пример 6. (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиридин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)метил)-2-метоксифенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (7)



(а) (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиридин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)-метил)-2-метоксифенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2Н-пиран-3,4,5-триилтриацетат (25).

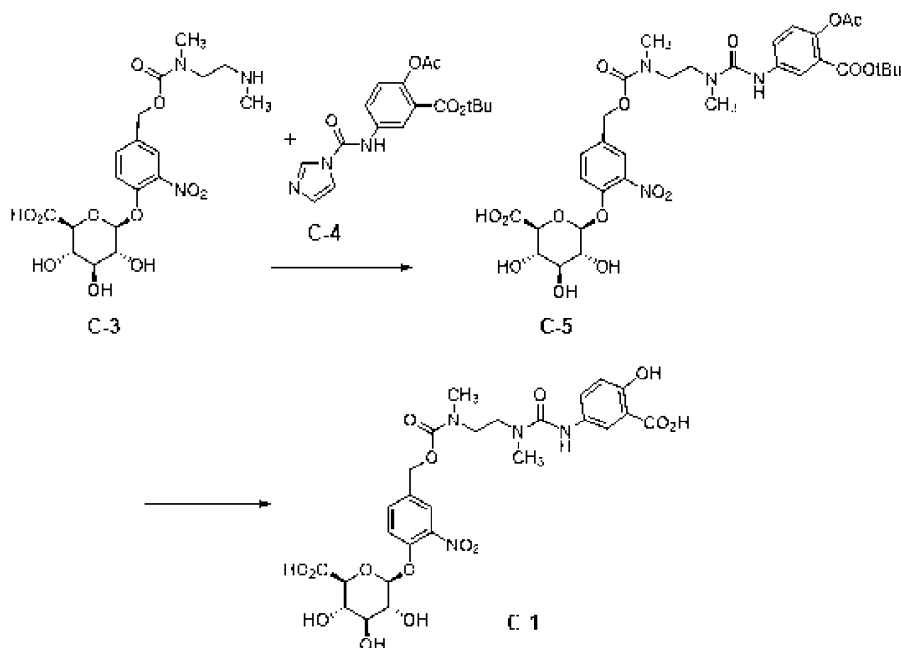
К раствору (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-метокси-4-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетата (21) (0,60 г, 1,02 ммоль) в ДХМ (10,00 мл) медленно добавляют раствор 4-нитрофенил-4-(((3R,4R)-1-(2-цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-7-карбоксилата (13).

(0,49 г, 1,02 ммоль) в ДХМ (3,00 мл) и полученную смесь перемешивают при к.т. 1,5 ч. Реакционный раствор концентрируют в вакууме и полученное желтое твердое вещество используют без дополнительной очистки. (m/z):  $[M+H]^+$ . Вычислено для  $C_{43}H_{54}N_8O_{15}$  923,37; найдено 924,1.

(b) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(((3R,4R)-1-(2-Цианацетил)-4-метилпиперидин-3-ил)(метил)амино)-N-метил-7H-пирроло-[2,3-d]пиримидин-7-карбоксамидо)этил)(метил)карбамоил)окси)-метил)-2-метоксифенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (7).

К охлажденному льдом раствору продукта предыдущей стадии (0,94 г, 1,02 ммоль) в MeOH (36,80 мл) медленно добавляют водный раствор LiOH (5,12 мл, 5,12 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 2 ч, затем pH раствора доводят до значения 5-6 путем медленного добавления 1н. HCl. Смесь концентрируют в вакууме и сырой остаток очищают колоночной хроматографией с обращенной фазой, получают названное соединение (0,46 г, выход 57%) в виде белого твердого вещества. (m/z):  $[M+H]^+$ . Вычислено для  $C_{36}H_{46}N_8O_{12}$  783,32; найдено 783,8. ВЭЖХ, метод В: время удерживания 0,99 мин.

#### Пример C-1



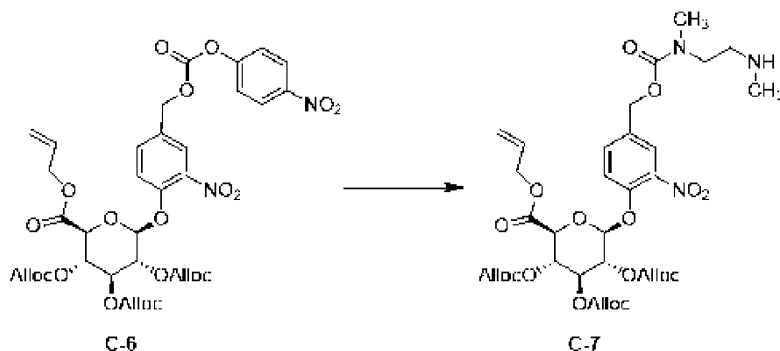
#### (a) Соединение C-5.

В колбу добавляют соль ТФУК соединения C-3 (285 мг, 0,497 ммоль) и соединение C-4 (445 мг, 1,289 ммоль), затем ДМФА (2,485 мл) и триэтиламин (0,416 мл, 2,98 ммоль). На следующий день реакционную смесь концентрируют путем роторного испарения и очищают колоночной хроматографией с нормальной фазой (0-15% MeOH в ДХМ в течение 15 мин, затем продолжают 15% в течение 5 мин), получают названное соединение (90 мг).

#### (b) Соединение C-1.

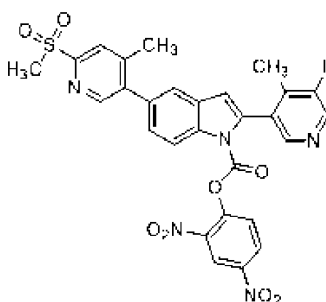
Продукт предыдущей стадии (45 мг, 0,061 ммоль) и карбонат калия (33,8 мг, 0,244 ммоль) растворяют в MeOH (0,8 мл) и воде (0,4 мл) и перемешивают при к.т. Через 2 ч добавляют MeOH с образованием анизотропа с водой, добавляют ДХМ (0,4 мл), а затем ТФУК (0,4 мл, 5,19 ммоль). Реакционную смесь концентрируют путем роторного испарения, растворяют в смеси 1:1 вода:ACN, фильтруют и очищают препаративной ВЭЖХ, получают названное соединение (17,7 мг, чистота 97%) в виде почти белого порошка. (m/z):  $[M+H]^+$ . Вычислено для  $C_{26}H_{30}N_4O_{15}$  639,17; найдено 639,2.

## Получение соединения C-7



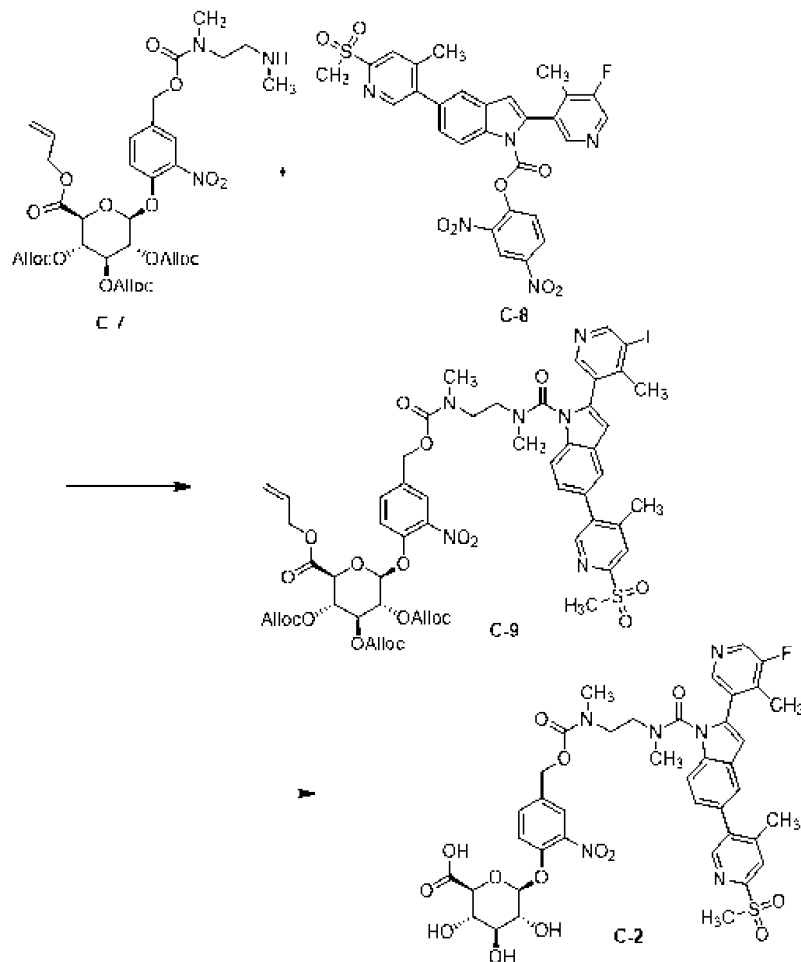
К раствору соединения C-6 (300 мг, 0,374 ммоль), растворенного в ДХМ (3,74 мл), при 0°C в одну порцию добавляют N,N'-диметилендиамин (159 мкл, 1,495 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 30 мин, разбавляют в ДХМ (15 мл) и промывают водой (3×10 мл). Органический слой промывают рассолом, разделяют, сушат над сульфатом натрия и фильтруют, получают названное промежуточное соединение в виде желтого масла, которое используют без дополнительной очистки. (m/z): [M+H]<sup>+</sup>. Вычислено для C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>17</sub> 752,24; найдено 752,4.

## Получение соединения C-8



К раствору гидрида натрия (36,4 мг, 0,9105 ммоль), растворенного в смеси ТГФ (3,372 мл) и ДМФА (1,686 мл), добавляют бис(2,4-динитрофенил)карбонат (299 мг, 0,759 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 1 ч и затем медленно добавляют раствор 2-(5-фтор-4-метилпиридин-3-ил)-5-(4-метил-6-(метилсульфонил)пиридин-3-ил)-1H-индола (соединение C-2M) (200 мг, 0,506 ммоль), растворенного в ТГФ (1,2 мл), и реакционную смесь нагревают до к.т. Через 9 ч добавляют насыщенный раствор бикарбоната натрия и реакционную смесь промывают рассолом. Органический слой отделяют, сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют. Сырой остаток очищают колоночной хроматографией (элюируют 0-80% EtOAc в гексанах), получают названное промежуточное соединение (109 мг) в виде коричневого окрашенного масла. (m/z): [M+H]<sup>+</sup>. Вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S 606,10; найдено для 606,3.

## Пример C-2



## (a) Соединение C-9.

К раствору соединения C-8 (250 мг, 0,413 ммоль) в ДХМ (4,13 мл) добавляют соединение C-9 (310 мг, 0,413 ммоль), затем 4-диметиламинопиридин (22 мг, 0,180 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 40°C в течение 1 ч, охлаждают до к.т. и концентрируют, получают названное промежуточное соединение, которое используют напрямую на следующей стадии без очистки, (m/z): [M+H]<sup>+</sup>. Вычислено для C<sub>55</sub>H<sub>57</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>20</sub>S 1173,33; найдено 1173,4.

## (b) Соединение C-2.

К дегазированному раствору продукта предыдущей стадии (4 85 мг, 0,413 ммоль), растворенного в ТГФ (4,13 мл), добавляют тетраис(трифенилфосфин)палладий(0) (47,7 мг, 0,041 ммоль) и морфолин (360 мкл, 4,13 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при к.т. в течение 45 мин, затем добавляют воду и слои разделяют. Органический слой сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют в вакууме. Сырой остаток очищают препаративной ВЭЖХ и лиофилизируют, получают названное соединение (136 мг, чистота 99%) в виде белого порошка, (m/z): [M+H]<sup>+</sup>. Вычислено для C<sub>40</sub>H<sub>41</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S 881,24; найдено 881,2.

## Биологические исследования.

Соединения по изобретению характеризуют в одном или нескольких из приведенных ниже биологических исследований. При описании биологических исследований соединение формулы 1 в другом варианте может быть названо соединением 1 и аналогично для дополнительных соединений по изобретению.

## Биологическое исследование 1. Биохимическое исследование JAK-киназы.

Проводят панель биохимических испытаний LanthaScreen JAK (JAK1, 2, 3 и Tyk2) в обычном буфере для киназной реакции (50 mM HEPES, pH 7,5, 0,01% Brij-35, 10 mM MgCl и 1 mM EGTA).

Рекомбинантные GST-меченные JAK-ферменты и GFP-меченный STAT1 пептидный субстрат получают от компании Life Technologies.

Последовательно разведенные соединения предварительно инкубируют с каждым из четырех JAK-ферментов и субстратом в белых 384-луночных микропланшетах (Corning) при температуре окружающей среды в течение 1 ч. Затем добавляют АТФ (АТР), чтобы инициировать киназные реакции, в суммарном объеме 10 мкл с 1% ДМСО (DMSO). Конечные концентрации фермента в случае JAK1, 2, 3 и Tyk2 составляют 4,2, 0,1, 1 и 0,25 нМ соответственно; соответствующие используемые концентрации K<sub>m</sub>

АТФ составляют 25, 3, 1,6 и 10 мкМ; тогда как концентрация субстрата равна 200 нМ для всех четырех испытаний. Активность киназы JAK1 также испытывают при концентрации АТФ 1 мМ. Киназным реакциям позволяют протекать в течение 1 ч при температуре окружающей среды перед добавлением 10 мкл препарата ЭДТУК (конечная концентрация 10 мМ) и Tb-анти-pSTAT1 (pTyr701) антитела (Life Technologies, конечная концентрация 2 нМ) в буфере для разведения TR-FRET (Life Technologies). Планшеты перед считыванием на планшет-ридере Envision (Perkin Elmer) инкубируют при температуре окружающей среды в течение 1 ч. Сигналы отношения эмиссии (520/495 нм) записывают и используют для расчета значений процента ингибирования в пересчете на контроли ДМСО и фона.

Анализ зависимости доза-эффект, данные по проценту ингибирования, наносят на график относительно концентраций соединения и определяют значения  $IC_{50}$  из 4-параметрической модели надежности с помощью программного обеспечения Prism software (GraphPad Software). Результаты выражают в виде  $pIC_{50}$  (отрицательный логарифм  $IC_{50}$ ) и затем преобразуют в  $pK_i$  (отрицательный логарифм константы диссоциации  $K_i$ ) с использованием уравнения Ченга-Прусоффа. В табл. 1 обобщены результаты для соединения 1 и тофацитиниба (соединение 2).

Таблица 1. Ферментативная активность

| Свойство                        | Соединение 1 | Тофацитиниб |
|---------------------------------|--------------|-------------|
| JAK1 ( $pK_i$ )                 | <6,3         | 9,1         |
| JAK2 ( $pK_i$ )                 | <6,2         | 9,2         |
| JAK3 ( $pK_i$ )                 | <6,8         | 9,5         |
| TYK2 ( $pK_i$ )                 | <6           | 7,9         |
| JAK1 ( $pIC_{50}$ при 1 мМ АТФ) | <5           | 7,7         |

Биологическое исследование 2. Метаболическая стабильность соединения 1 в  $\beta$ -глюкуронидазе из E.Coli.

Для описания промежуточных метаболитов и конечного продукта соединения 1 в присутствии фермента  $\beta$ -глюкуронидазы соединение 1 (30 мкМ в ДМСО) инкубируют при 37°C в присутствии очищенной  $\beta$ -глюкуронидазы из E.coli (100 ед./мл в 0,1М калий-фосфатном буфере) в течение периода действия 0-90 мин. Инкубационные среды гасят при временных точках 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 60 и 90 мин путем добавления 100 мкл АСН. Образцы разбавляют смесью (вода+1% муравьиная кислота) (4-кратно) и анализируют с использованием системы ЖХ-МС Thermo Q-Exactive™ LC-MS. Концентрации соединения 1 и тофацитиниба оценивают количественно путем сравнения со стандартными кривыми, полученными при использовании в качестве образцов таких же разбавлений.

Быстрое исчезновение соединения 1 (период полураспада <5 мин) сопровождается быстрым и кратковременным образованием агликонового промежуточного соединения (соединение b на схеме 2). Превращение агликонового промежуточного соединения в его следующее диаминоное промежуточное соединение (соединение d) и конечный активный метаболит (тофацитиниб), как установлено, является замедляющей скоростью лимитирующей стадией. Концентрация тофацитиниба, как наблюдают, растет постепенно в течение 90-минутного периода опыта до конечной концентрации приблизительно 20 мкМ.

Чтобы показать, что наблюдаемое превращение соединения 1 в тофацитиниб происходит вследствие взаимодействия с ферментом глюкуронидазы, соединение 1 (30 мкМ) инкубируют с  $\beta$  глюкуронидазой (45 ед./мл) и известным ингибитором бактериальной  $\beta$ -глюкуронидазы амоксапином (100 мкМ). Через 60 мин инкубации конечная концентрация тофацитиниба составляет 1 мкМ в присутствии ингибитора по сравнению с 7 мкМ (без ингибитора).

Биологическое исследование 3. Метаболическая стабильность в гомогенатах, приготовленных из содержимого верхнего отдела и нижнего отдела кишечника крысы.

Превращение соединения 1 в тофацитиниб оценивают в содержимом просвета кишечника, полученном из различных отделов ЖКТ, выделенных из только что умерщвленных крыс. Содержимое каждого отдела из двенадцатиперстной кишки, тонкого кишечника, подвздошной кишки и толстой кишки разбавляют 1:10 в растворе фосфатно-солевого буфера Дюльбекко (DPBS). Исходный раствор (10 мМ в ДМСО) соединения 1 разбавляют в DPBS до получения конечной концентрации субстрата 10 мкМ. Инкубацию проводят в водяной бане при 37°C и временные точки устанавливают при 0, 5, 10, 20, 40 и 60 мин. Суммарный объем инкубационной среды составляет 400 мкл, и аликвоты 40 мкл отбирают в каждой временной точке и разбавляют в 160 мкл смеси (97% АСН+3% муравьиной кислоты+внутренний стандарт). Образцы центрифугируют при 2200 gcf (относительное ускорение центрифуги) в течение 10 мин и 50 мкл надосадочной жидкости разбавляют в 150 мкл смеси (вода+1% муравьиная кислота). Образцы анализируют на масс-спектрометре API 4000 на соединение 1 и тофацитиниб. Время полураспада, определенное по исчезновению соединения 1, показано ниже.

Таблица 2

| Содержимое кишечника крыс | Соединение 1<br>Период полураспада |
|---------------------------|------------------------------------|
| Двенадцатиперстная кишка  | >60 мин                            |
| Тонкая кишка              | >60 мин                            |
| Подвздошная кишка         | 34 мин                             |
| Толстая кишка             | < 5 мин                            |

Биологическое исследование 4. Фармакокинетика при пероральном введении соединения 1 для крысы.

Цель данного исследования состоит в том, чтобы сравнить фармакокинетику соединения 1 и тофацитиниба в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта и в плазме после разового перорального введения дозы. Самцам крыс Sprague Dawley (n=3/временная точка) через желудочный зонд вводят дозу 3 мг/кг соединения 1 и дозу нормализуют 1,2 мг меченного тритием тофацитиниба (D<sub>3</sub> тофацитиниба), приготовленного в виде раствора в смеси (5% ДМСО+1% гидроксипропилметилцеллюлозы в воде). В каждой временной точке (0,5, 1, 3, 6, 8 и 24 ч) отбирают образцы плазмы с помощью иглы для пункции сердца и собирают следующие ткани: желудок, верхний отдел желудочно-кишечного тракта (разделенный приблизительно на три части [U-1, U-2, U-3]), слепая кишка и нижний отдел желудочно-кишечного тракта (разделенный приблизительно пополам [L-1, L-2]). Образец каждой ткани промывают водой, высушивают путем промокания, переносят в тарированный контейнер, взвешивают, разбавляют в 3 раза по массе ткани объемом (мас./об.) подкисленной водой, гомогенизируют при 6500 об/мин (3×45 с) и замораживают. Концентрации тофацитиниба, высвобожденные из соединения 1 и D<sub>3</sub>-тофацитиниба в каждом образце ткани, определяют следующим образом. Образцы ткани перемешивают вихревым способом, объединяют с аликвотой 50 мкл плазмы крысы, экстрагируют 200 мкл ACN, содержащего внутренний стандарт, и определяют количественно относительно внутреннего стандарта с помощью ЖХ-МС. Концентрации тофацитиниба, высвобожденного из соединения 1, могут быть измерены в плазме между 3 и 8 ч, в желудке и на участках U-1, U-2 и U-3 в течение 8 ч, а в слепой кишке и на участках L-1 и L-2 между 3 и 24 ч. Концентрации D<sub>3</sub>-тофацитиниба могут быть измерены в плазме между 0,5 и 8 ч, в желудке и на участках U-1, U-2 и U-3 в течение 8 ч, а в слепой кишке и на участках L-1 и L-2 между 3 и 24 ч. Полученные стандартные фармакокинетические параметры, C<sub>макс</sub> (максимальная концентрация) и AUC (0-t) (площадь под кривой зависимости концентрации от времени, интегрированная к последней измеренной временной точке) представлены в табл. 3.

Таблица 3. Концентрация тофацитиниба и D<sub>3</sub>-тофацитиниба в крысе

|              | Введенное соединение/Анализируемое вещество |                          |                           |                                                         |                          |                           |
|--------------|---------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
|              | Соединение 1/Тофацитиниб                    |                          |                           | D <sub>3</sub> -Тофацитиниб/D <sub>3</sub> -Тофацитиниб |                          |                           |
| Образец      | C <sub>макс</sub><br>(мг/мл)                | AUC (0-t)<br>(мг·час/мл) | Отношение<br>ткань/плазма | C <sub>макс</sub><br>(мг/мл)                            | AUC (0-t)<br>(мг·час/мл) | Отношение<br>ткань/плазма |
| Плазма       | 0,009                                       | 0,044                    |                           | 0,094                                                   | 0,21                     |                           |
| Желудок      | 2,83                                        | 4,68                     | 106                       | 6,95                                                    | 9,41                     | 45                        |
| U-1          | 3,51                                        | 6,39                     | 145                       | 5,40                                                    | 7,01                     | 33                        |
| U-2          | 6,56                                        | 11,40                    | 259                       | 3,20                                                    | 7,06                     | 34                        |
| U-3          | 10,40                                       | 37,90                    | 859                       | 3,39                                                    | 11,20                    | 53                        |
| Слепая кишка | 6,39                                        | 71,20                    | 1615                      | 0,85                                                    | 10,10                    | 48                        |
| L-1          | 2,28                                        | 25,90                    | 587                       | 0,33                                                    | 3,98                     | 19                        |
| L-2          | 2,41                                        | 23,70                    | 537                       | 0,31                                                    | 3,33                     | 16                        |

Биологическое исследование 5. Фармакокинетика при пероральном введении соединения 1 для яванской макаки.

Цель данного исследования состоит в том, чтобы сравнить фармакокинетику соединения 1 и тофацитиниба в толстой кишке и в плазме после разового перорального введения дозы. Самцам яванских макак (n=1/временная точка) через желудочный зонд вводят дозу 3 мг/кг соединения 1 и 2,1 мг/кг меченного тритием тофацитиниба (D<sub>3</sub> тофацитиниба), приготовленного в виде раствора в смеси (98,5% лимоннокислого буфера, pH 6+1% гидроксипропил-метилцеллюлозы+0,5% Tween 20). В каждой временной точке (0,5, 1, 3, 6, 9 и 24 ч) образцы плазмы отбирают из бедренной вены и собирают следующие ткани: желудок, верхний отдел желудочно-кишечного тракта (разделенный на три части [U-1, U-2, U-3]), слепая кишка, проксимальный отдел толстой кишки, дистальный отдел толстой кишки и прямая кишка. Образец каждой ткани промывают водой, высушивают путем промокания, переносят в тарированный контейнер, взвешивают, мгновенно замораживают, превращают в порошок и хранят при -70°C. Аликвоту прибли-

тельно 2 г разбавляют в 3 раза по массе ткани по объему (мас./об.) с помощью плазмы контрольной крысы в воде, гомогенизируют и хранят при -70°C. Концентрации тофацитиниба, высвобожденного из соединения 1, и D<sub>3</sub>-тофацитиниба в образце каждой ткани определяют следующим образом. Образцы перемешивают вихревым способом, аликвоту 50 мкл плазмы или приготовленного образца ткани экстрагируют 200 мкл АСН, содержащего внутренний стандарт, и определяют количественно относительно внутреннего стандарта с помощью ЖХ-МС. Концентрации тофацитиниба, высвобожденного из соединения 1, могут быть измерены в плазме и во всех образцах ткани между 0,5 и 24 ч. Концентрации D<sub>3</sub> тофацитиниба могут быть измерены в плазме и в желудке между 0,5 и 9 ч и на всех других участках ткани между 0,5 и 24 ч. Полученные стандартные фармакокинетические параметры, С<sub>макс</sub> (максимальная концентрация) и AUC (0-t) (площадь под кривой концентрации относительно времени, интегрированная к последней измеренной временной точке) представлены в табл. 4.

Таблица 4. Концентрация тофацитиниба и D<sub>3</sub>-тофацитиниба в макаке

|                                   | Введенное соединение/Анализируемое вещество |                          |                           |                                                         |                          |                           |
|-----------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                                   | Соединение 1/Тофацитиниб                    |                          |                           | D <sub>3</sub> -Тофацитиниб/D <sub>3</sub> -Тофацитиниб |                          |                           |
| Образец                           | С <sub>макс</sub><br>(мг/мл)                | AUC (0-t)<br>(мг·час/мл) | Отношение<br>ткань/плазма | С <sub>макс</sub><br>(мг/мл)                            | AUC (0-t)<br>(мг·час/мл) | Отношение<br>ткань/плазма |
| Плазма                            | 0,14                                        | 0,78                     |                           | 0,35                                                    | 0,83                     |                           |
| Желудок                           | 8,01                                        | 10,5                     | 13,4                      | 17,9                                                    | 17,1                     | 20,7                      |
| U-1                               | 19,6                                        | 21,5                     | 27,5                      | 18,5                                                    | 15,7                     | 19,0                      |
| U-2                               | 28,8                                        | 40,6                     | 51,9                      | 7,96                                                    | 11,1                     | 13,4                      |
| U-3                               | 21,7                                        | 55,7                     | 71,1                      | 8,96                                                    | 16,4                     | 19,9                      |
| Слепая кишка                      | 31,7                                        | 152                      | 194                       | 4,75                                                    | 22,8                     | 27,6                      |
| Проксимальный отдел толстой кишки | 19,5                                        | 117                      | 149                       | 3,63                                                    | 15,9                     | 19,2                      |
| Дистальный отдел толстой кишки    | 14,4                                        | 46,7                     | 59,6                      | 3,30                                                    | 8,86                     | 10,7                      |
| Прямая кишка                      | 1,99                                        | 26,3                     | 33,6                      | 1,00                                                    | 7,63                     | 9,24                      |

#### Биологическое исследование 6. Мышиная модель индуцированного оксазолоном колита.

Индуцированный оксазолоном колит представляет собой экспериментальную модель, которая имеет гистологическое сходство с язвенным колитом человека (Heller et al. Immunology, 2002, 11, 629-638). В этом исследовании используют взрослых мышей BALB/C (25-28 г, возраст 9-12 недель) от компании BioNeeds (India). На день 1 животных легко анестезируют изофлураном и волосы между лопатками тщательно удаляют, затем для сенсibilизации кожи медленно наносят оксазолон (6 мг/мышь, 100 мкл, препарат в смеси 4:1 ацетон:(оливковое масло)) или раствор носителя. Через шесть дней после сенсibilизации кожи мышей не кормят в течение ночи, анестезируют кетаминном, внутрибрюшинно вводят кеилазин и шприц объемом 1 мл, заполненный раствором оксазолона, осторожно вставляют на ~3,8 см в толстую кишку мыши. Животных удерживают в положении лежа головой вниз и оксазолон (0,5 мг/50 мкл/мышь в 50%-ном этаноле) или смесь 50% этанола/(физиологический раствор) ректально впускают по каплям очень медленно в течение минуты. Мышей держат вертикально (головой вниз) в течение еще минуты, чтобы весь раствор оксазолона остался внутри толстой кишки. Лечение лекарством (перорально, два раза (BID) или три раза в день (TID)) или носителем начинают вечером перед интаректальной (и/р) провокацией оксазолоном. Как на первый (день 1), так и на второй (день 2) дни после и/р провокации оксазолоном оценивают индекс активности болезни (ИАБ (DAI)) с помощью экспериментаторов, от которых скрыты варианты лечения, для каждой мыши в соответствии со следующими суббаллами: консистенция кала (0, нормальный; 2, понос; 4, диарея); обильное кровотечение и гемокульт-тест (0, отсутствует; 2, кровянистый; 4, явное присутствие крови); и потеря веса (0, нет; 1, 1-5%; 2, 6-10%; 3, 11-15%; 4, больше чем 15%); ИАБ=среднее значение (баллов консистенция стула+наличие крови+потеря веса).

Проводят расчет площади-под-кривой (AUC) на основании суммарных баллов ИАБ, чтобы проследить развитие болезни в ходе эксперимента. Для каждой экспериментальной группы AUC рассчитывают как

$$AUC=[(День\ 1 - День\ 0) \times \text{Среднее значение (балл ИАБ День 0 и День 1)}] + [(День\ 2 - День\ 1) \times \text{Среднее значение (балл ИАБ День 1 и День 2)}].$$

Параметрический t-критерий Стьюдента сравнивают с AUC балла ИАБ групп носитель/носитель и носитель/оксазолон, чтобы оценить индуцировано ли заболевание после обработки оксазолоном. После этого следует однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Даннетта (Dunnett's post hoc test) для сравнения AUC балла ИАБ групп носитель/оксазолон и (испытуемое соединение)/оксазолон. Статистический уровень значимости определяют с помощью уровня значимости  $\alpha$ , установленного при  $p < 0,05$ .

В модели индуцированного оксазолоном острого колита соединение формулы 1 (3, 10, 30 и 60 мг/кг, п/о, BID) обеспечивает значимое купирование индуцированного оксазолоном колита со степенью проявления, подобной степени, достигаемой с помощью тофацитиниба (30 и 60 мг/кг, п/о, BID). В отдельном эксперименте в оксазолоновой модели соединение формулы 4 (3, 10, и 30 мг/кг, п/о, BID) обеспечивает значимое купирование индуцированного оксазолоном колита со степенью проявления, подобной степени, достигаемой с помощью тофацитиниба (30 мг/кг, п/о, BID).

Биологическое исследование 7. Иммуносупрессивный эффект в мышинных селезеночных натуральных клетках-киллерах (НК).

Истощение популяции мышинных селезеночных клеток представляет собой экспериментальную модель иммуносупрессии (Kudlacz et al., Am. J. of Transplantation, 2004, 4, 51-57). Соединение 1 оценивают в модели мышинных селезеночных клеток, следуя тому же стандартному методу лечения, как и метод, используемый в модели индуцированного оксазолоном колита (биологическое исследование 6).

Для исследования используют взрослых самцов мышей Balb/C (возраст 12-14 недель) от компании Harlan. Соединение 1 (1, 3 и 10 мг/кг, BID) и тофацитиниб (10, 30 и 60 мг/кг, BID) вводят перорально в течение трех дней животным, ранее не использовавшимся в опытах. Селезенки берут для исследований через 30 мин или 3 ч после последнего введения дозы и измельчают сразу же для окрашивания клеточных подтипов. Перед фиксацией меченые флуорофором антитела для CD19 (FITC; В-клетки), CD3e (ПЭ; пан-Т-клетки) и DX5 (APC; НК клетки) инкубируют с образцами спленоцитов от каждого животного, чтобы получить возможность для одновременного процентного анализа множества подтипов на проточном цитометре. Число всех клеток селезенки для каждого животного измеряют с помощью портативного автоматического устройства для подсчета клеток Scepter™ 2.0.

Абсолютное число популяции подтипа лимфоцитов (например, селезеночных В, Т и НК клеток) рассчитывают из процента каждого подтипа, умноженного на общее количество клеток селезенки для каждого животного. Используют однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Даннетта для сравнения числа лимфоцитов селезенки групп носителя и испытуемого соединения. Уровень значимости  $\alpha$  устанавливают при  $p < 0,05$ . Данные представляют в виде (среднее значение)  $\pm$  СОС для каждой группы.

Тофацитиниб (10, 30 и 60 мг/кг, п/о, TID) значительно и в зависимости от дозы модели понижает количество селезеночных НК клеток. В таком же исследовании на количество селезеночных НК клеток не влияет соединение 1 при п/о (BID) введении дозы до 10 мг/кг (максимальная испытанная доза). Никакого эффекта от лечения с помощью любого соединения не наблюдают в случае популяций В- и Т-клеток.

Такие данные в сочетании с противоколитным действием соединения 1 в мышинной модели индуцированного оксазолоном колита (биологическое исследование 6) дают возможность рассчитать функциональный терапевтический индекс, который представлен ниже в табл. 5.

Таблица 5. Функциональный терапевтический индекс

| Соединение   | Эффективность in vivo<br>(оксазолоновый колит) *<br>(мг/кг) | Системная функциональная активность<br>(истощение селезеночных НК)<br>(мг/кг) | Функциональный терапевтический индекс<br>(кратность) |
|--------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Соединение 1 | 3                                                           | >10                                                                           | >3                                                   |
| Тофацитиниб  | 30                                                          | 10                                                                            | 0,3                                                  |

\* Эффективная доза, которая проявляет сравнимый фармакологический эффект в оксазолоновой модели при сравнении с ее носителем.

Биологическое исследование 8. Стабильность в фекальном гомогенате толстой кишки крысы.

Цель данного исследования состоит в определении стабильности рассматриваемых соединений в фекальном гомогенате толстой кишки крысы, т.е. время полураспада для разложения в присутствии  $\beta$  глюкуронидазы в фекалиях толстой кишки крысы.

После умерщвления самцов крыс, ранее не использовавшихся в опытах (~300 г), путем обескровливания проколом в сердце толстую кишку перевязывают и переносят в анаэробную камеру (AS-580, Anaerobe Systems). Фекальное содержимое извлекают внутри камеры и разбавляют 1:10 (1 г к 9 мл фосфатного буфера), затем гомогенизируют с использованием ручного гомогенизатора Omni Tissue Master. Фекальный гомогенат центрифугируют при 2000 г в течение 10 мин для удаления балластных веществ, на-

досадочную жидкость удаляют и используют для инкубации.

Испытуемые объекты и позитивный контроль (сульфасалазин) готовят в виде 10 мМ исходных растворов в ДМСО. Конечная концентрация субстрата для каждого анализа составляет 10 мкМ (30 мкМ для соединения 5). Реакции начинают путем добавления аликвоты 5 мкл разбавленного исходного раствора испытуемого соединения к 300 мкл (надосадочной жидкости)-гомогената из фекалий. Через 0, 15, 30, 60, 90 и 120 мин после инициирования реакции аликвоту 50 мкл переносят в 200 мкл ацетонитрила с 3% муравьиной кислоты и молекулой внутреннего стандарта. Все образцы центрифугируют при 2000 g в течение 10 мин, после чего 50 мкл надосадочной жидкости разбавляют в 150 мкл воды для анализа на системе ЖХ-МС. Рассчитывают *in vitro* периоды полураспада по убыли пролекарства следующим образом: ( $T^{1/2}=0,693/\text{константа скорости элиминации}$ ).

Таблица 6. Стабильность *in vitro* в толстой кишке

| Соединение, № | $T^{1/2}$ (мин)           |
|---------------|---------------------------|
| 1             | 1-15 (Несколько значений) |
| 4             | 1-13 (Несколько значений) |
| 5             | 6                         |
| 6             | 7                         |
| 7             | 3-8 (Несколько значений)  |

Биологическое исследование 9. Фармакокинетика при пероральном введении мышши.

Цель данного исследования заключается в оценке превращения пролекарств по изобретению в тофацитиниб в плазме и в толстой кишке после перорального введения дозы мышам.

Самцы мышей Balb/c ( $n=2$ /временная точка) получают разовую п/о дозу испытуемых соединений через желудочный зонд (5 мг/кг в смеси (1:20) 5% ДМСО и 1% НРМС). Через 2 и 6 ч после введения дозы мышей умерщвляют посредством обескровливания проколом в сердце, полученные образцы крови помещают в пробирки Microtainer®, содержащие NaF, и затем помещают на лед. Плазму получают путем центрифугирования (центрифуга Eppendorf, 5804R) в течение 4 мин приблизительно при 12000 об/мин при 4°C.

Толстые кишки удаляют из обескровленных мышей и фекальное содержимое толстой кишки осторожно извлекают. Толстые кишки промывают физиологическим раствором и высушивают путем промокания. Затем их гомогенизируют в 3 объемах стерилизованной воды с использованием гомогенизатора Precellys приблизительно при 4°C. Все образцы хранят при -80°C для последующего биоанализа.

Концентрации тофацитиниба, высвобожденного из пролекарства, в образце каждой ткани определяют следующим способом. Образцы плазмы и гомогената толстой кишки перемешивают вихревым способом, объединяют с аликвотой 50 мкл плазмы крысы, экстрагируют с помощью 200 мкл ACN, содержащего внутренний стандарт, и количественно определяют относительно внутреннего стандарта с помощью ЖХ-МС. Площадь под концентрационной кривой ( $AUC_{0-6}$  ч) рассчитывают для испытуемого соединения и высвобожденного тофацитиниба в плазме и в толстой кишке. Ключевым параметром для оценки стабильности является отношение  $AUC$  тофацитиниба (толстая кишка)/плазма.

Таблица 7. Концентрация тофацитиниба у мышши

| Соединение, № | Плазма<br>$AUC$<br>(мг·час/мл) | Толстая кишка<br>$AUC$<br>(мг·час/мл) | Отношение<br>толстая<br>кишка/плазма |
|---------------|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1             | 0,013                          | 7,6                                   | 585                                  |
| 3             | 0,001                          | 9,03                                  | 9030                                 |

Биологическое исследование 10. Фармакокинетика при пероральном введении крысе.

Цель данного исследования заключается в оценке превращения пролекарств по изобретению в тофацитиниб в плазме и в толстой кишке после перорального введения дозы крысам.

Самцы крыс Sprague Dawley ( $n=2$ /временная точка) получают разовую п/о дозу испытуемых соединений через желудочный зонд (5 мг/кг в смеси (1:20) 5% ДМСО и 1% НРМС). Через 0,5, 1, 3, 6 и 24 ч после введения дозы крыс умерщвляют посредством обескровливания проколом в сердце, полученные образцы крови помещают в пробирки Microtainer®, содержащие NaF, и затем помещают на лед. Плазму получают путем центрифугирования (центрифуга Eppendorf, 5804R) в течение 4 мин приблизительно при 12000 об/мин при 4°C.

Толстые кишки удаляют из обескровленных крыс и содержимое толстой кишки осторожно извлекают. Толстые кишки промывают физиологическим раствором и высушивают путем промокания. Затем их гомогенизируют в 3 объемах стерилизованной воды с использованием гомогенизатора Precellys приблизительно при 4°C. Все образцы хранят при -80°C для последующего биоанализа.

Концентрации тофацитиниба, высвобожденного из пролекарства, в образце каждой ткани определяют следующим способом. Образцы плазмы и гомогената толстой кишки перемешивают вихревым способом, объединяют с аликвотой 50 мкл плазмы крысы, экстрагируют с помощью 200 мкл ACN, содержащего внутренний стандарт, и количественно определяют относительно внутреннего стандарта с помощью ЖХ-МС. Площадь под концентрационной кривой ( $AUC_{0-6}$  ч) рассчитывают для испытуемого соединения и высвобожденного тофацитиниба в плазме и в толстой кишке. Ключевым параметром для

оценки стабильности является отношение AUC тофацитиниба (толстая кишка)/плазма.

Таблица 8. Концентрация тофацитиниба в крысе

| Соединение,<br>№ | Плазма<br>AUC (мг·час/мл) | Толстая кишка<br>AUC<br>(мг·час/мл) | Отношение<br>толстая<br>кишка/плазма |
|------------------|---------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1                | 0,11                      | 14,3                                | 130                                  |
| 3                | 0,09                      | 35,9                                | 399                                  |
| 4                | 0,03                      | 11,8                                | 393                                  |
| 7                | 0,06                      | 10,8                                | 171                                  |

Биологическое исследование 11. Метаболическая стабильность соединений сравнения в содержимом толстой кишки крысы.

Фекальное содержимое толстой кишки собирают из самцов крыс Sprague Dawley, ранее не использовавшихся в опытах, разбавляют 1:10 (1 г к 9 мл фосфатного буфера) и затем гомогенизируют с использованием портативного гомогенизатора Omni Tissue Master. Испытуемые соединения, соединения сравнения С-1 и С-2, а также соединение по изобретению, соединение 1, готовят в виде 10 мМ исходных растворов в ДМСО и разбавляют в фосфатном буфере до конечной концентрации субстрата 10 мкМ. Аликвоту 5 мкл разбавленного испытуемого соединения добавляют в 300 мкл гомогената содержимого толстой кишки крысы, чтобы начать реакцию при 37°C. Из среды инкубации отбирают аликвоты (50 мкл) при следующих временных точках (0, 15, 50, 85 и 120 мин) и добавляют в 200 мкл АСН с 3% муравьиной кислоты и молекулой внутреннего стандарта. Получают стандартные кривые для каждого метаболита, тофацитиниба, 5-ASA (соединение С-1М) и ингибитора CRAC (соединение С-2М) с использованием таких же матрицы и методики разбавления, как и для образцов. Все образцы центрифугируют при 2000 g в течение 10 мин, после чего 50 мкл надосадочной жидкости разбавляют 150 мкл воды и анализируют с использованием системы ЖХ-МС Thermo Q-Exactive LC-MS. Для сведения данных в таблицу и построения графика используют GraphPad Prism и Microsoft Excel.

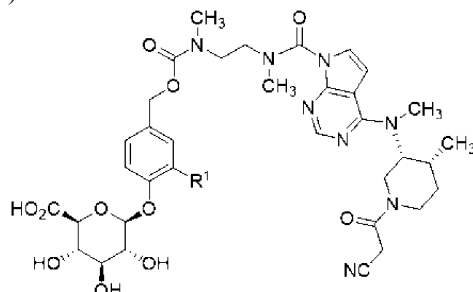
После инкубации при концентрации субстрата 10 мкМ в содержимом толстой кишки крысы соединения сравнения, а также соединения по изобретению, все демонстрируют быструю убыль исходной молекулы в инкубационной среде (время полураспада <15 мин). Однако при определении активного метаболита каждого пролекарства только соединение 1 дает поддающиеся измерению уровни его активного метаболита тофацитиниба. После инкубации 120 мин измеренная концентрация тофацитиниба составляет 8,8 мкМ.

Напротив, соединения С-1 и С-2 не способны давать поддающиеся измерению количества их активных метаболитов (соединение С-1М и С-2М соответственно). Динамика во времени продуцирования метаболита в течение 120 мин показана на фигуре.

Хотя изобретение описано со ссылкой на его конкретные аспекты или варианты осуществления, специалисту в данной области техники будет понятно, что могут быть выполнены различные изменения или могут быть заменены эквиваленты без отступления от сути и объема изобретения. Кроме того, в случаях, разрешенных применяемым патентным законодательством и нормативными требованиями, все публикации, патенты и патентные заявки, процитированные в данном документе, полностью включены в документ в таком же объеме, как если бы каждый документ по отдельности был включен в настоящую заявку посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

### 1. Соединение формулы (II)



(II)

где R<sup>1</sup> выбирают из атома водорода, C<sub>1-4</sub>алкила, C<sub>1-3</sub>алкоксигруппы, аминогруппы, нитрогруппы и атома галогена; или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором R<sup>1</sup> выбирают из атома водорода, метила, метокси-, аминогруппы, нитрогруппы и атома хлора.

3. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором R<sup>1</sup> представляет собой атом водорода.

4. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором R<sup>1</sup> представляет собой

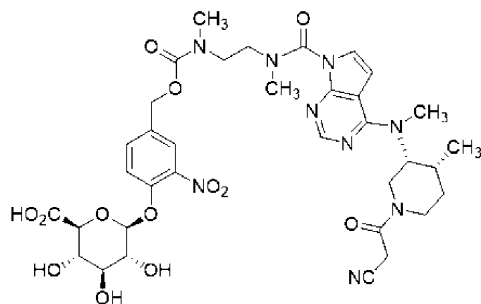
метил.

5. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором  $R^1$  представляет собой метокси.

6. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором  $R^1$  представляет собой аминогруппу.

7. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором  $R^1$  представляет собой хлор.

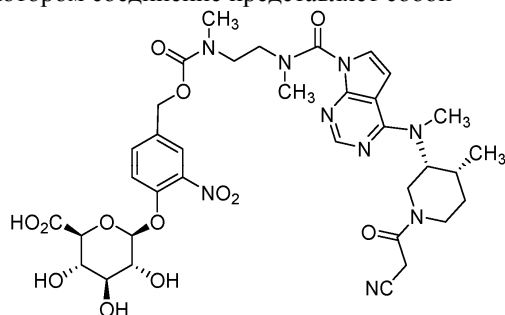
8. Соединение формулы 1



1

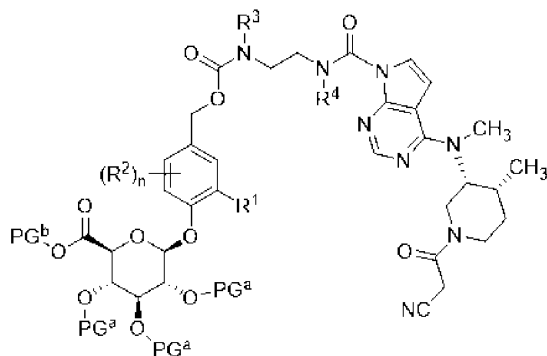
или его фармацевтически приемлемая соль.

9. Соединение по п.8, в котором соединение представляет собой



10. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и соединение по любому из пп.1-9.

11. Способ получения соединения формулы (II) по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли, включающий снятие защитной группы соединения формулы (I-A)



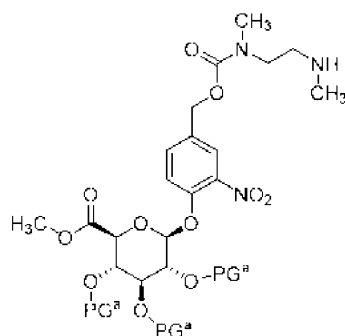
(I-A)

или его фармацевтически приемлемой соли; где  $R^1$  принимает значения, определенные в п.1,  $R^3$  и  $R^4$  представляют собой метил,  $n$  равно 0; каждый заместитель  $PG^a$  независимо представляет собой защитную группу для гидроксильной группы; и  $PG^b$  представляет собой защитную группу для карбоксильной группы.

12. Способ по п.11, в котором  $R^1$  представляет собой нитрогруппу; каждый заместитель  $PG^a$  представляет собой ацетил; и  $PG^b$  представляет собой метил.

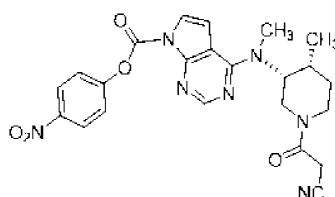
13. Способ получения соединения формулы 1 по п.8 или его фармацевтически приемлемой соли, включающий:

(a) взаимодействие соединения формулы 12'



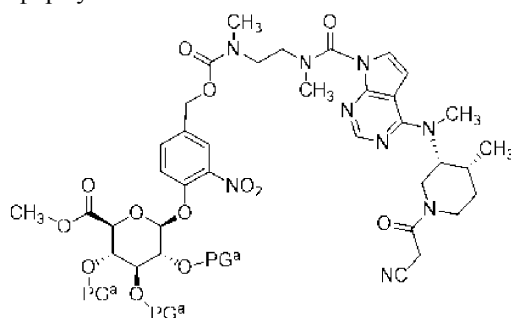
12'

или его фармацевтически приемлемой соли; где каждый заместитель PG<sup>a</sup> независимо представляет собой защитную группу для гидроксильной группы с соединением формулы 13



13

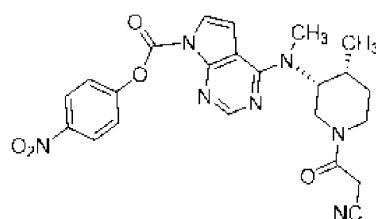
с получением соединения формулы 14'



14'

и (b) снятие защитной группы соединения формулы 14' с получением соединения формулы 1 или его фармацевтически приемлемой соли.

14. Соединение формулы 13



13

или его фармацевтически приемлемая соль.

15. Применение соединения по п.8 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта у млекопитающего.

16. Применение по п.15, в котором воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта представляет собой язвенный колит.

17. Применение по п.15, в котором воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта представляет собой болезнь Крона.

18. Применение по п.15, в котором воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта представляет собой колит, ассоциирующийся с терапией ингибитором иммунных контрольных точек.

19. Применение соединения по п.8 или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта у млекопитающего.

20. Применение по п.19, в котором воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта представляет собой язвенный колит.

21. Применение по п.19, в котором воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта представляет собой болезнь Крона.

22. Применение по п.19, в котором воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта представляет собой колит, ассоциирующийся с терапией ингибитором иммунных контрольных точек.

23. Способ лечения воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта у млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение по п.8 или его фармацевтически приемлемую соль.

24. Способ по п.23, в котором воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта представляет собой язвенный колит.

25. Способ по п.23, в котором воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта представляет собой болезнь Крона.

26. Способ по п.23, в котором воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта представляет собой колит, ассоциирующийся с лечением ингибитором иммунных контрольных точек.

27. Способ доставки тофацитиниба к толстой кишке млекопитающего, причем способ включает введение перорально млекопитающему глюкуронид-содержащего пролекарства тофацитиниба, представляющего собой соединение по любому из пп.1-9, и это пролекарство расщепляется  $\beta$ -глюкуронидазой в толстой кишке с высвобождением тофацитиниба.

