

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036645

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.03

(21) Номер заявки
201991767

(22) Дата подачи заявки
2012.11.08

(51) Int. Cl. C07D 473/34 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ ПУРИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(31) 11188511.7

(32) 2011.11.09

(33) EP

(43) 2019.12.30

(62) 201490947; 2012.11.08

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

(56) US-B1-6376501
US-A-6028076
US-A1-2007225303
WO-A1-2011049825
WO-A1-2009005687
WO-A1-2008114008
EP-A1-2138497
EP-A1-1939198

(72) Изобретатель:
Бонфанти Жан-Франсуа, Дубле
Фредерик Марк Морис (FR),
Эмбрехтс Вернер (BE), Фортэн Жером
Мишель Клод (FR), Мак Гоуэн Дэвид
Крейг (BE), Мюллер Филипп (FR),
Рабуассон Пьер Жан-Мари Бернар
(BE)

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

(57) Изобретение относится к производным пурина, способам их получения, фармацевтическим композициям и их применению при лечении вирусных инфекций.

036645 B1

036645 B1

036645

B1

Настоящее изобретение относится к производным пурина, фармацевтическим композициям, лекарственным средствам и их применению при лечении вирусных инфекций.

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

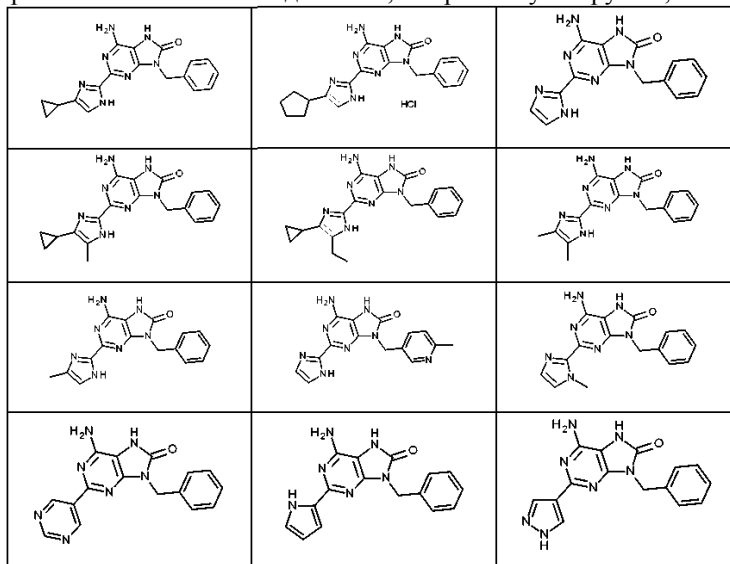
Установлено, что большинство видов млекопитающих имеют от 10 до 15 типов толл-подобных рецепторов. В общей сложности у человека и мышей выявили 13 TLR (под названием TLR1-TLR13), а у других видов млекопитающих обнаружили эквивалентные формы многих из них. Тем не менее, эквиваленты определенных TLR, обнаруженных у человека, не присутствуют у всех млекопитающих. Например, ген, кодирующий белок, аналогичный TLR10 у людей, присутствует у мышей, но, по-видимому, в определенный момент в прошлом он был поврежден ретровирусом. С другой стороны, у мышей экспрессируются TLR11, 12 и 13, ни один из которых не представлен у человека. У других млекопитающих могут экспрессироваться TLR, которые не обнаружены у человека. Другие виды, не являющиеся млекопитающими, могут иметь TLR, отличные от таковых у млекопитающих, доказательством этому служит TLR14, который обнаружен у рыбы фугу. Это может осложнить способ применения подопытных животных в качестве моделей врожденного иммунитета человека.

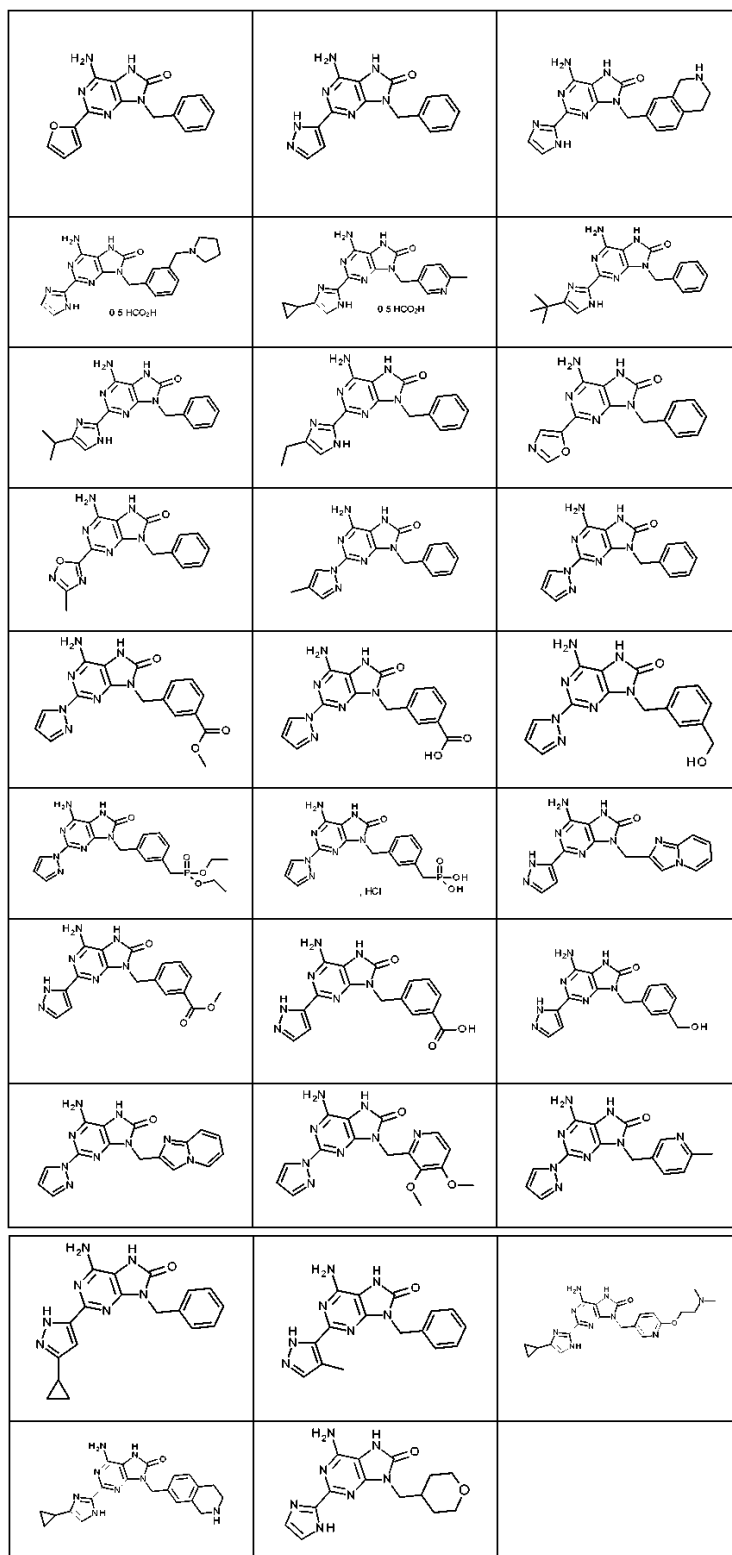
Обзор по толл-подобным рецепторам смотрите, например, в следующей статье в журнале: Hoffmann, J.A., Nature, 426, p33-38, 2003.

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

Тем не менее, существует острая необходимость в новых модуляторах толл-подобных рецепторов, характеризующихся предпочтительной избирательностью, более высокой активностью, более высокой стабильностью к инактивации в процессе метаболизма и улучшенным профилем безопасности по сравнению с соединениями известного уровня техники.

Настоящее изобретение относится к соединению, выбранному из группы, состоящей из:





Кроме того, к настоящему изобретению относится фармацевтическая композиция для активации толл-подобного рецептора 7 (TLR7), содержащая соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

Частью настоящего изобретения также является лекарственное средство для активации TLR7, включающее соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для активации TLR7.

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции, включающей соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, для активации TLR7.

Фармацевтически приемлемые соли соединений по настоящему изобретению включают их соли присоединения кислоты и основания. Подходящие соли присоединения кислоты образуются от кислот, которые образуют нетоксичные соли. Подходящие основные соли образуются от оснований, которые образуют нетоксичные соли.

Соединения по настоящему изобретению или любая их подгруппа могут быть составлены в различные фармацевтические формы для целей введения. В качестве подходящих композиций могут приводиться все композиции, обычно применяемые для системного введения лекарственных средств. Для получения фармацевтических композиций по настоящему изобретению эффективное количество конкретного соединения, необязательно в форме соли присоединения, в качестве активного ингредиента объединяют в однородную смесь с фармацевтически приемлемым носителем, при этом носитель может принимать широкое разнообразие форм в зависимости от формы препарата, необходимой для введения. Целесообразно, чтобы данные фармацевтические композиции находились в виде единичной лекарственной формы, подходящей, например, для перорального, ректального или чрескожного введения. Например, при получении композиций в пероральной лекарственной форме может применяться любая из общепринятых фармацевтических сред, такая как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п. в случае пероральных жидких препаратов, таких как суспензии, сиропы, настойки, эмульсии и растворы; или твердых носителей, таких как крахмалы, сахара, каолин, разбавители, смазывающие средства, связующие, средства для улучшения распадаемости и т.п. в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Благодаря своей простоте введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные пероральные формы единицы дозирования, в случае которых очевидно применяются твердые фармацевтические носители. Также включены препараты твердой формы, которые незадолго до применения могут быть превращены в жидкие формы. В композициях, подходящих для чрескожного введения, носитель необязательно включает средство усиления проникновения и/или подходящее смачивающее средство, необязательно комбинированное с подходящими добавками любой природы в минимальных пропорциях, при этом добавки не оказывают никакого значительного вредного воздействия на кожу. Указанные добавки могут облегчать введение в кожу и/или могут быть полезными для получения необходимых композиций. Данные композиции могут вводиться различными путями, например, такими как через трансдермальный пластырь, точечно, в виде мази. Соединения по настоящему изобретению также могут вводиться посредством ингаляции или инсуффляции при помощи способов и составов, применяемых в данной области для введения таким путем. Таким образом, в основном соединения по настоящему изобретению могут вводиться в легкие в форме раствора, суспензии или сухого порошка.

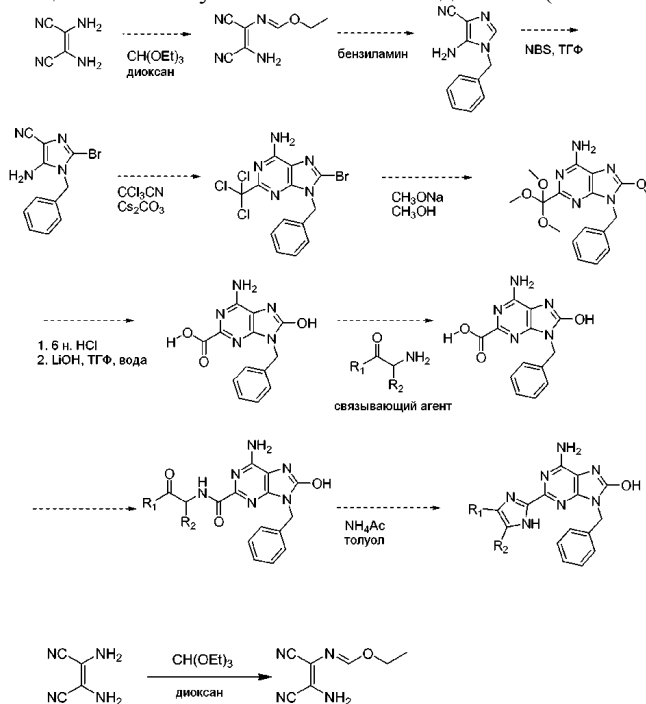
Особенно предпочтительно составление вышеуказанных фармацевтических композиций в единичной лекарственной форме для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, применяемая в данном документе, относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок, при этом каждая единица содержит предварительно установленное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Примерами таких единичных лекарственных форм являются таблетки (включая таблетка с насечкой или таблетки, покрытые оболочкой), капсулы, пилюли, пакеты для порошкообразного продукта, пластинки, суппозитории, инъеклируемые растворы или суспензии и т.п., и их отдельное кратное количество.

Специалисты в области лечения инфекционных заболеваний смогут определить эффективное количество исходя из результатов тестов, представленных далее в данном документе. В основном предполагается, что эффективное суточное количество может составлять от 0,01 до 50 мг/кг массы тела, более предпочтительно от 0,1 до 10 мг/кг массы тела. Может быть целесообразным введение необходимой дозы в виде двух, трех, четырех или более частей дозы при подходящих интервалах в течение дня. Указанные части дозы могут составляться в виде единичных лекарственных форм, например, содержащих от 1 до 1000 мг, и, в частности, от 5 до 200 мг активного ингредиента на единицу лекарственной формы.

Точная дозировка и частота введения зависит от конкретного применяемого соединения по настоящему изобретению, конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, подлежащего лечению, возраста, веса и общего физического состояния конкретного пациента, а также другой лекарственной терапии, которую может проходить человек, что является хорошо известным специалистам в данной области. Более того, очевидно, что эффективное количество может быть снижено или увеличено в зависимости от реакции человека, проходящего лечение, и/или в зависимости от оценки врача, предписывающего соединение по настоящему изобретению. Таким образом, вышеупомянутые диапазоны эффективного количества являются только рекомендациями и не предназначены для ограничения в той или иной мере объема или применения настоящего изобретения.

Экспериментальная часть.

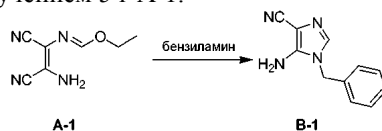
Общая схема получения конечных соединений (способ 1)



A-1

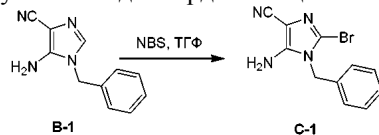
Получение промежуточного соединения A-1.

Диаминмалеонитрил (6 г, 55 ммоль) и триэтилортоформат (9,2 мл, 55 ммоль) смешивали в 1,4-диоксане (95 мл) и нагревали в условиях перегонки до тех пор, пока не собрали 65 мл 1,4-диоксана/этанола. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и растворитель выпаривали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с применением градиента 25% этилацетат в петролейном эфире с получением 5 г A-1.



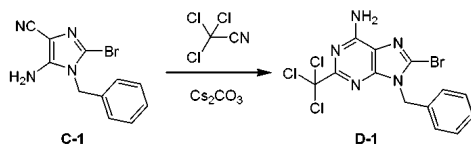
Получение промежуточного соединения B-1.

Бензиламин (2,86 мл, 26,3 ммоль) добавляли по каплям к раствору A-1 (4,1 г, 25 ммоль) и анилина гидрохлорида (50 мг) в этаноле (80 мл), перемешивая при 10°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакционную смесь добавляли по каплям к 1 М NaOH (50 мл), перемешивая при 10°C, и полученную в результате суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Твердый продукт собирали фильтрацией, промывали водой и высушивали в вакууме. Титульное соединение B-1 (4 г) получали в виде твердого вещества практически белого цвета.



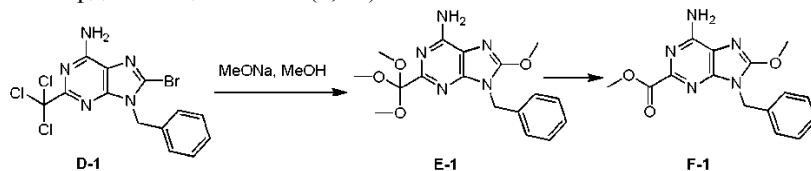
Получение промежуточного соединения C-1.

N-Бромосукцинимид (4 г, 22 ммоль) по частям добавляли к суспензии B-1 (4 г, 20 ммоль) в ТГФ (50 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Растворитель выпаривали в вакууме и остаток экстрагировали из насыщенного водного раствора NaHCO_3 (50 мл) с этилацетатом (300 мл), высушивали над Na_2SO_4 , твердые вещества удаляли фильтрацией и растворители из фильтрата удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с применением градиента дихлорметан - 5% метанол в дихлорметане. Наилучшие фракции объединяли, растворители удаляли при пониженном давлении с получением розового твердого вещества C-1 (3 г).



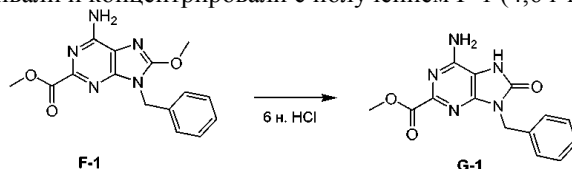
Получение промежуточного соединения D-1.

Трихлорацетонитрил (4,8 г, 17,3 ммоль) добавляли к суспензии из C-1 (4 г, 14,4 ммоль) и Cs_2CO_3 (9,4 г, 29 ммоль) в толуоле (50 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч. Данную смесь выливали в воду (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×50 мл), высушивали над Na_2SO_4 , твердые вещества удаляли фильтрацией и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток суспендировали в этаноле (20 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Полученное в результате твердое вещество собирали фильтрацией и промывали метанолом с получением практически белого твердого вещества D-1 (2,7 г).



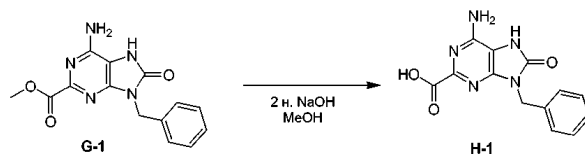
Получение промежуточного соединения F-1.

Метоксид натрия (2,4 г, 0,06 моль) добавляли к суспензии D-1 (5 г, 12 ммоль) в метаноле (100 мл) и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 16 ч. Смесь охлаждали в ледяной бане и гасили реакцию водой. Метанол выпаривали в вакууме и остаток экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушивали и концентрировали с получением F-1 (4,6 г неочищенного продукта).



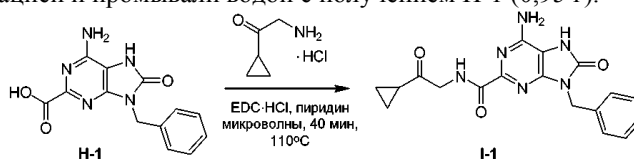
Получение промежуточного соединения G-1.

Промежуточное соединение F-1 (4,6 г, 15 ммоль) суспендировали в 6 н. HCl (водн.) (75 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 32 ч при комнатной температуре. Данную смесь нейтрализовали аммиаком и полученный в результате осадок собирали фильтрацией и промывали водой с получением G-1 (3,2 г).



Получение промежуточного соединения H-1.

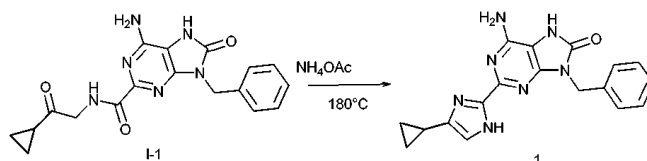
2 н. NaOH (водн.) добавляли к раствору G-1 (1 г, 3,34 ммоль) в метаноле (50 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Метанол удаляли при пониженном давлении и реакционную смесь подкисляли до pH 2 с помощью 2 н. HCl (водн.). Полученный в результате осадок собирали фильтрацией и промывали водой с получением H-1 (0,95 г).



Получение промежуточного соединения I-1.

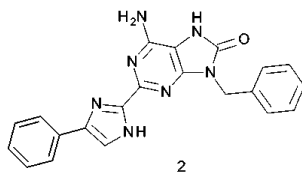
Смесь из H-1 (500 мг, 1,4 ммоль), аминокетона 2 (284 мг, 1,6 ммоль) и EDCI (460 мг, 2,4 ммоль) в пиридине (10 мл) нагревали в микроволновой печи до 110°C в течение 0,5 ч. Смесь концентрировали с получением неочищенного продукта, который промывали ацетонитрилом (10 мл) и холодной водой с получением промежуточного соединения I-1 в виде грязно-белого твердого вещества (0,5 г).

Соединение 1.



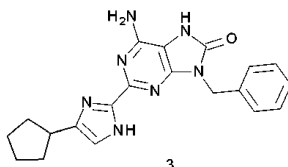
NH_4OAc (5 г) вносили в сосуд и нагревали в масляной бане до плавления. Затем добавляли I-1 (100 мг) и реакционную смесь нагревали в микроволновой печи в течение 1 ч при 180°C. Смесь выливали в воду и экстрагировали смешанным органическим растворителем (дихлорметан:изопропанол 3:1, 2×60 мл), высушивали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) с получением желтого твердого вещества 1 (105 мг).

Соединение 2.



Соединение 2 синтезировали согласно процедуре для синтеза соединения 1 (230 мг).

Соединение 3.



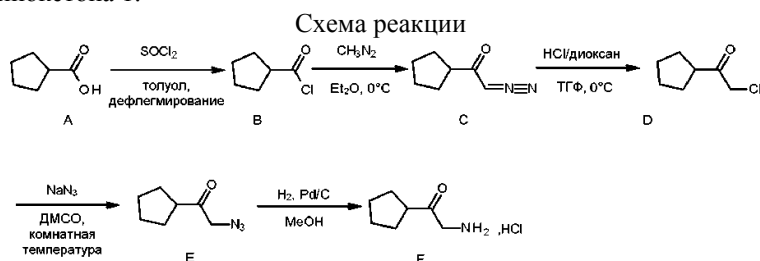
Соединение 3 синтезировали согласно процедуре для синтеза соединения 1 (205 мг).

Общая процедура получения аминокетонатов.



Карбоновую кислоту (1) превращают в соответствующий хлорангидрид 2 с помощью тионилхлорида. Также возможно применение других хлорирующих средств, например оксалилхлорида или оксихлорида фосфора. Хлорангидрид (2) обрабатывают диазометаном при пониженной температуре с получением диазокетона (3). Диазокетон (3) превращают в альфа-хлоркетон (4) посредством присоединения хлористоводородной кислоты при низкой температуре. Хлор в альфа-хлоркетоне замещают азидом (4) из соответствующего источника азидов, подобного натрия азиду, в присутствии, как правило, биполярного апротонного растворителя, например ДМСО.

Получение аминокетона 1.



Этап 1.

К раствору А (15 г, 0,13 моль) в толуоле (50 мл) добавляли SOCl_2 (15 мл). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 5 ч. Толуол удаляли при пониженном давлении. Получали хлорангидрид в виде коричневой жидкости (16 г) и непосредственно применяли на следующем этапе.

Этап 2.

К раствору В (16 г, 0,12 моль) в диэтиловом эфире (100 мл) добавляли CH_2N_2 (200 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при данной температуре. Эфир удаляли в вакууме при комнатной температуре. Продукт очищали с помощью флеш-хроматографии (силикагель, элюент: петролейный эфир:этилацетат 10:1) с получением С (12 г).

^1H -ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ (м.д.) 5,18 (шир.с, 1H), 2,65 (шир.с, 1H), 1,45-1,81 (м, 8H).

Этап 3.

К раствору С (12 г, 0,096 моль) в ТГФ (65 мл) добавляли по каплям 4 н. HCl /диоксан при 0°C. Реакцию контролировали с помощью ТСХ. Реакцию нейтрализовали с помощью NaHCO_3 (насыщ. воды.). Смесь экстрагировали этилацетатом (2×150 мл), высушивали и концентрировали с получением D (11 г). Данный продукт сразу же применяли на следующем этапе.

^1H -ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ (м.д.) 4,10 (с, 2H), 3,04 (квинтет, $J=7,3$ Гц, 1H), 1,54-1,87 (м, 8H).

Этап 4.

К раствору D (7,3 г, 0,05 моль) в ДМСО (30 мл) добавляли NaN_3 (3,9 г, 0,06 моль). Реакцию перемешивали в течение ночи и контролировали с помощью ТСХ. Реакционную смесь выливали в воду (50

мл) и экстрагировали этилацетатом (2×100 мл), высушивали над сульфатом натрия, удаляли твердые вещества путем фильтрации и удаляли растворители из фильтрата при пониженном давлении. Неочищенный продукт удаляли с помощью хроматографии с силикагелем с применением градиента петролейный эфир - этилацетат с получением E (5,28 г).

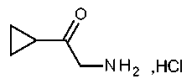
¹H-ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ (м.д.) 3,93 (с, 2H), 2,83 (квинтет, J=7,3 Гц, 1H), 1,56-1,84 (м, 8H).

Этап 5.

Смесь E (3,28 г, 0,02 моль), конц. HCl (1,8 мл, 0,02 моль) и 1 г Pd/C (10%) в 30 мл метанола перемешивали в течение ночи в атмосфере водорода при 50 фунтов/кв.дюйм (344,7 кПа). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали с получением аминокетона-1 (2 г).

¹H-ЯМР (MeOD, 400 МГц): δ (м.д.) 4,03 (с, 2H), 3,01-3,12 (квинтет, J=7,3 Гц, 1H), 1,67-1,98 (м, 8H).

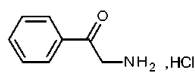
Аминокетон-2.



Аминокетон 2

Аминокетон-2 получали в соответствии с процедурой для получения аминокетона-1.

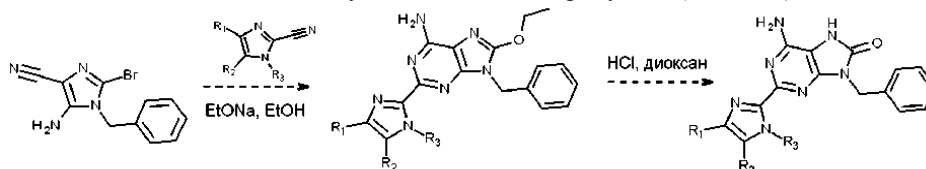
Аминокетон-3.



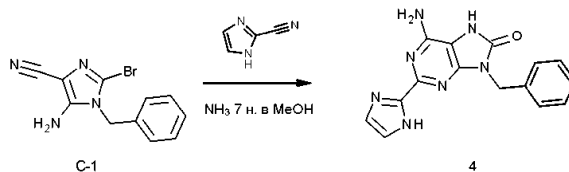
Аминокетон 3

Аминокетон-3 получали в соответствии с процедурой для получения аминокетона-1.

Общая схема получения конечных продуктов (способ 2)

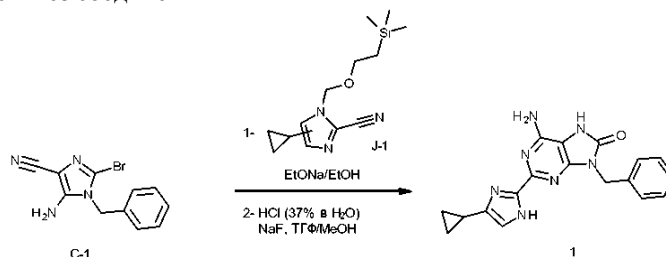


Получение соединения 4



Смесь C-1 (1,6 г, 5,78 ммоль) (ее синтез описан в WO 20060117670 на с. 59, 60: "Получение 6, 7 и 8" соответственно для получения 5 амино-1-бензил-2-бром-1H-имидазол-4-карбонитрила) и 2-цианоимидазола (592 мг, 6,35 ммоль) в NH₃/MeOH (7 н.) (60 мл) перемешивали при 140°C в течение 48 ч в реакторе высокого давления. Выпаривали растворитель. Неочищенное соединение очищали с помощью колоночной хроматографии через колонку с силикагелем (15-40 мкм, 40 г) в DCM/MeOH/NH₄OH 97/3/0,5→95/5/0,5 с получением соединения 4 (78 мг, выход 4,4%).

Альтернативный синтез соединения 1



Этап 1.

EtONa (904 мг; 13,3 ммоль) добавляли к раствору 2-цианоимидазола I-1 (0,7 г; 2,66 ммоль) и промежуточного соединения C-1 (736 мг; 2,66 ммоль) в EtOH (30 мл). Смесь перемешивали при 90°C в течение 16 ч. Удаляли растворитель при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (жидкостной хроматографии) (SiOH с зернами неправильной формы, 45 г Merck, подвижная фаза от 97/3/0,1 до 95/5/0,5) с получением 0,51 г SEM-защищенного этоксипромежуточного соединения в виде светло-желтого твердого вещества (выход 38%).

ВЭЖХ Rt (время удерживания) (мин)=7,45; МС М+(H⁺): 506 способ (v2003v2002).

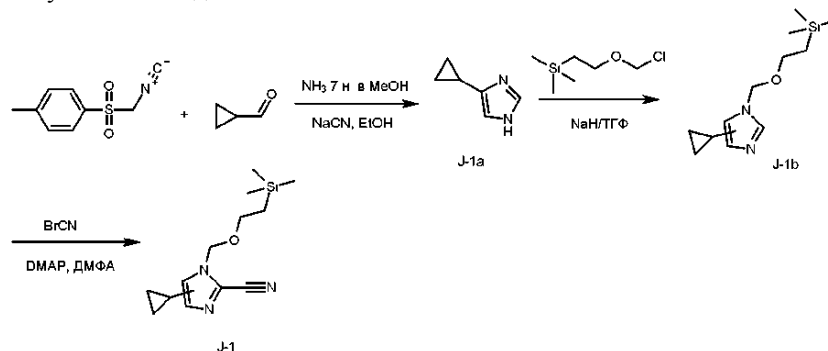
Этап 2.

NaF (170 мг; 4,05 ммоль) добавляли к раствору SEM-защищенного этоксипромежуточного соединения (0,41 г; 0,811 ммоль) в ТГФ (28 мл), HCl (37% в H₂O) (28 мл) и MeOH (10 мл). Смесь перемешивали

ли при 40°C в течение 16 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры (RT) и добавляли 10%-ный раствор K_2CO_3 до тех пор, пока pH раствора не стал щелочным. Водный слой насыщали порошком K_2CO_3 и продукт экстрагировали DCM/MeOH (5%) (3 раза). Объединенные органические слои высушивали над $MgSO_4$, фильтровали и удаляли растворитель при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью ЖХ (SiOH с зернами неправильной формы 15-40 мкм, подвижная фаза DCM/MeOH/ NH_3 водн. от 95/5/0,5 до 90/10/0,5) с получением 120 мг соединения 1 в виде белого порошка (выход 43%).

Синтез промежуточных продуктов 2-цианоимидазола.

Синтез промежуточного соединения J-1



$NaCN$ (360 мг; 7,35 ммоль) добавляли к суспензии циклопропанкарбоксальдегида (5 г; 71,3 ммоль) и тозилметилизоцианида (13,7 г; 69,9 ммоль) в EtOH (200 мл). Полученную в результате смесь перемешивали в течение 1 ч. при комнатной температуре. Растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток промывали смесью гептан/эфир (1:1). Бежевый сухой порошок перемешивали в NH_3 /MeOH 7 н. (480 мл; 3,36 моль) и смесь перемешивали при 100°C в стальном сосуде высокого давления в течение 16 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и растворитель выпаривали при пониженном давлении. iPr_2O добавляли к остатку и твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат выпаривали досуха и неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зернами неправильной формы 20-45 мкм, 1000 г DAVISIL). Подвижная фаза (0,5% NH_4OH , 94% DCM, 6% MeOH). Отбирали очищенную фракцию и выпаривали до получения 4,9 г промежуточного соединения J-1a в виде коричневого масла (65% выход).

1H -ЯМР (DMCO- d_6 , 400 МГц): δ (м.д.) 8,60 (шир.с, 1H), 7,58 (с, 1H), 6,76 (с, 1H), 1,85 (м, 1H), 0,86 (м, 2H), 0,71 (м, 2H).

J-1a (4,84 г; 44,8 ммоль) в ТГФ (60 мл) добавляли по каплям к суспензии NaH (1,97 г; 49,2 ммоль) в ТГФ (200 мл) при 0°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин и SEM-Cl (9,9 мл; 55,9 ммоль) в ТГФ (20 мл) добавляли по каплям при 0°C. Смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере N_2 в течение 16 ч. Добавляли воду и экстрагировали продукт с помощью DCM. Органический слой высушивали над $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зернами неправильной формы 20-45 мкм, 150 г Merck, градиент подвижной фазы от 50% DCM, 50% гептана до 100% DCM). Фракции, содержащие чистое соединение, объединяли и удаляли при пониженном давлении растворитель с получением 6,6 г J-1b в виде желтого масла (62%).

Смесь двух региоизомеров: 70/30.

Минорный региоизомер:

1H -ЯМР (DMCO- d_6 , 400 МГц): δ (м.д.) 7,64 (с, 1H), 6,56 (с, 1H), 5,34 (с, 1H), 3,45 (т, $J=8,08$ Гц, 2H), 1,73-1,78 (м, 1H), 0,80-0,86 (м, 2H), 0,72-0,74 (м, 2H), 0,52-0,57 (м, 2H), -0,04 (с, 9H).

Основной региоизомер:

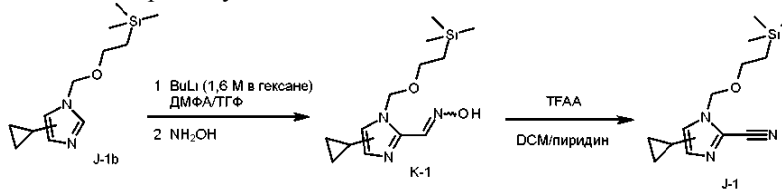
1H -ЯМР (DMCO- d_6 , 400 МГц): δ (м.д.) 7,56 (с, 1H), 6,94 (с, 1H), 5,20 (с, 1H), 3,43 (т, $J=8,08$ Гц, 2H), 1,73-1,78 (м, 1H), 0,80-0,86 (м, 2H), 0,72-0,74 (м, 2H), 0,56-0,62 (м, 2H), -0,04 (с, 9H).

BrCN (6,11 г; 57,7 ммоль) добавляли к раствору DMAP (7,05 г; 57,7 ммоль) в ДМФА (60 мл) при 10°C. Реакция являлась экзотермической до 35°C и образовывался бледно-желтый осадок. Смесь охлаждали до 10°C и добавляли J-1b (5,5 г; 2 3,1 ммоль). Смесь перемешивали при 40°C в течение 6 ч. Добавляли воду и экстрагировали продукт с помощью Et₂O (2 раза). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, высушивали над $MgSO_4$, фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении.

Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зернами неправильной формы 15-40 мкм, 220 г grace, подвижная фаза гептан/DCM от 50/50 до 10/90) с получением 2,2 г неочищенного J-1, которое дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зернами неправильной формы 15-40 мкм, 90 г merck, подвижная фаза гептан/DCM 30/70) с получением 0,94 г J-1 в виде смеси двух региоизомеров (выход 15%).

ВЭЖХ Rt (мин)=6,11; MC M+ (H^+): 264 (способ V1004V1012).

Альтернативный синтез промежуточного соединения J-1



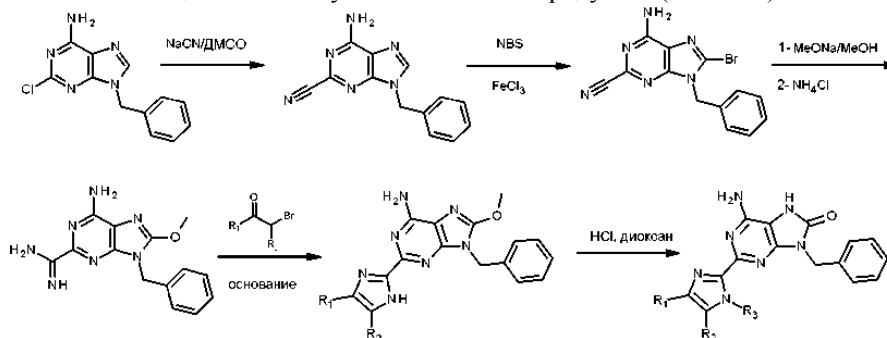
BuLi (1,6 M в гексане) (11 мл; 17,6 ммоль) добавляли к раствору J-1b (3,5 г; 14,7 ммоль) в ТГФ (60 мл) при -50°C . Смесь перемешивали при той же температуре в течение 30 мин и добавляли ДМФА (1,7 мл; 22 ммоль). Смесь медленно нагревали до комнатной температуры в течение 1 ч, добавляли $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (970 мг; 29,4 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Добавляли воду и продукт экстрагировали DCM (3 раза), промывали солевым раствором, высушивали над MgSO_4 и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением 4,1 г (количественный выход) смеси изомеров K-1 в виде желтого масла.

ВЭЖХ Rt (мин)=5,30, 5,41 и 5,90; МС M^+ (H^+): 282 (способ V2002V2002).

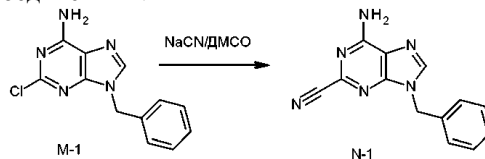
K-1 (3,1 г; 11 ммоль) растворяли в DCM (18 мл) и пиридине (19 мл) при комнатной температуре. Смесь охлаждали до 0°C и добавляли TFAA (4,6 мл; 33 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток растворяли в AcOEt. Органический слой промывали водой и солевым раствором, высушивали над MgSO_4 , фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зернами неправильной формы 15-40 мкм, 90 г merck, подвижная фаза гептан/DCM от 30/70 до DCM 100%) с получением 2,14 г промежуточного соединения J-1 (73%) в виде смеси двух изомеров.

ВЭЖХ Rt (мин)=6,51; МС M^+ (H^+): 264 (способ V2002V2002).

Общая схема получения конечных продуктов (способ 3)



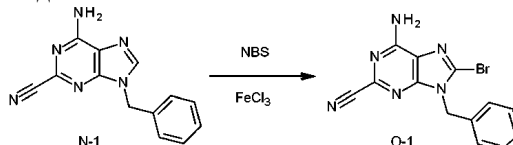
Синтез промежуточного соединения N-1



В микроволновой печи СЕМ смесь M-1 (его синтез был, например, описан в WO 2006117670, на с. 57, 58 "Получение 1-4" соответственно с получением 6-амино-9-бензил-2-хлор-7,9-дигидропури-8-она) (9,7 г, 37,351 ммоль), NaCN (3,11 г, 63,50 ммоль) в ДМСО (100 мл) перемешивали при 150°C в течение 4 ч. Смесь выливали в воду и отфильтровывали, промывали водой и высушивали под вакуумом при 60°C с получением 8,6 г промежуточного соединения N-1.

ВЭЖХ Rt (мин.)=5,23; МС M^+ (H^+): 251 (способ V2003V2002).

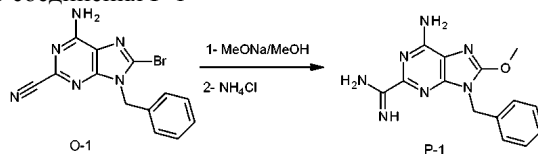
Синтез промежуточного соединения O-1



FeCl_3 (на кончике шпателя) добавляли к смеси N-1 (3,70 г, 147,84 ммоль) и NBS (26,2 г, 147,845 ммоль) в CHCl_3 (60 мл). Смесь перемешивали и нагревали с обратным холодильником в течение 3 ч, а затем охлаждали до комнатной температуры. Осадок отфильтровывали. Фильтрат выпаривали и очищали с помощью флеш-хроматографии через силикагель (15-40 мкм, 120 г, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 99-1) с получением 4,5 г неочищенного промежуточного соединения O-1. Фракцию поглощали с помощью CH_2Cl_2 и осадок отфильтровывали с получением 1,8 г промежуточного соединения O-1.

ВЭЖХ Rt (мин.)=5,77; МС M^+ (HCH_3CN^+): 370-372 (способ V2003V2002).

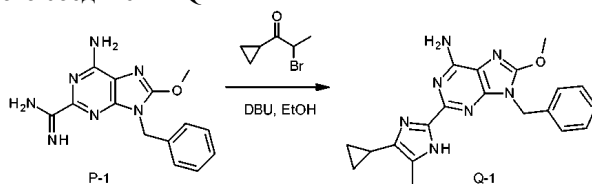
Синтез промежуточного соединения P-1



Смесь O-1 (0,82 г, 2,491 ммоль), MeONa/MeOH (30 вес.% раствор) (1,15 мл, 6,228 ммоль) в MeOH (15 мл) перемешивали при 50°C в течение 2 ч. Добавляли NH₄Cl (333 мг, 6,228 ммоль) и смесь перемешивали, и нагревали с обратным холодильником в течение 2 ч. Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью флеш-хроматографии через силикагель (15-40 мкм, 90 г, CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH: 85-14-1). Собирали и концентрировали очищенные фракции при пониженном давлении с получением 0,55 г промежуточного соединения P-1 (выход 74%).

ВЭЖХ Rt (мин)=4,46; МС М+ (H⁺): 298 (способ V2003V2002).

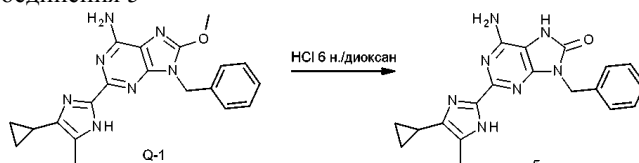
Синтез промежуточного соединения Q-1



2-Бром-1-циклопропилпропан-1-он (104 мг, 0,589 ммоль) добавляли по каплям к смеси P-1 (175 мг, 0,589 ммоль) и DBU (0,264 мл, 1,766 ммоль) в EtOH (5 мл). Смесь перемешивали и нагревали с обратным холодильником в течение 5 ч. Растворитель концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью флеш-хроматографии через силикагель (15-40 мкм, 40 г, CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH: 95/5/0,1). Очищенные фракции собирали и концентрировали при пониженном давлении с получением 40 мг промежуточного соединения Q-1. Неочищенное соединение применяли непосредственно на следующем этапе.

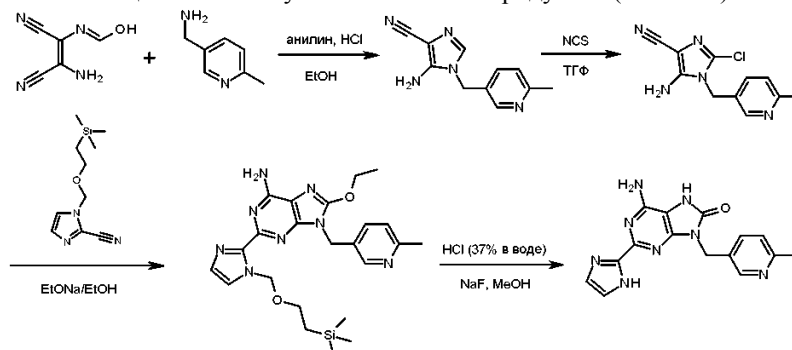
ВЭЖХ Rt (мин)=5,35; МС М+ (H⁺): 376 (способ V1005V1012).

Синтез конечного соединения 5

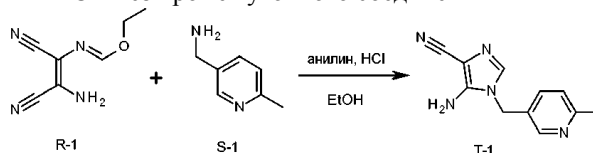


Смесь Q-1 (40 мг, 0,107 ммоль) в 6 н. HCl (1 мл) и диоксане (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч. Смесь частично выпаривали при пониженном давлении. Раствор охлаждали до 0°C, ошелачивали NaHCO₃ и экстрагировали с помощью EtOAc-CH₃OH (90-10). Объединенные органические слои высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью флеш-хроматографии через силикагель (15-40 мкм, 10 г, CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH: 88-12-0, 5). Собирали чистые фракции и концентрировали при пониженном давлении. Полученное в результате твердое вещество (35 мг) выкристаллизовывали из Et₂O с получением 25 мг соединения 5 (выход 64%, Т.пл.>260°C).

Общая схема получения конечных продуктов (способ 4)



Синтез промежуточного соединения T-1

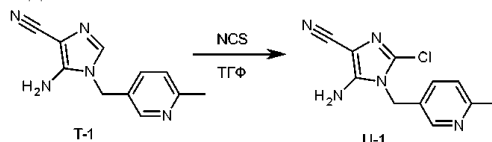


S-1 (синтез описан в J. Med. Chem. 1996, 39, 13, 2586-2593) (1,14 г; 9,33 ммоль) добавляли по кап-

лям к раствору R-1 (синтез описан в WO 2006/117670) (1,46 г; 8,89 ммоль) и анилина, HCl (18 мг; 0,14 ммоль) в EtOH (30 мл) при 10°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч. Водный раствор 3 M NaOH (30 мл) добавляли по каплям к раствору при 10°C и полученную в результате смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Водный слой экстрагировали с помощью DCM (3 раза). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃, высушивали над MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 1,20 г T-1 в виде коричневого твердого вещества (выход 63%). T-1 применяли на следующем этапе без дополнительной очистки.

ВЭЖХ Rt (мин.)=4,45; МС М+ (H⁺): 214 (способ V1010V1012).

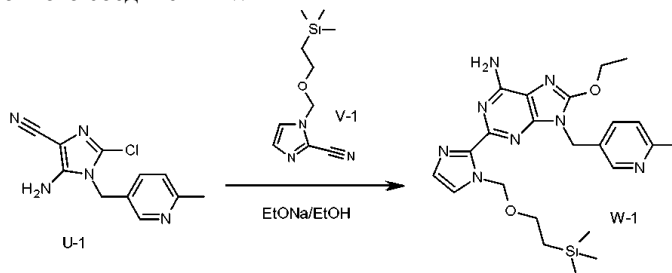
Синтез промежуточного соединения U-1



Раствор NCS (475 мг; 3,56 ммоль) в ТГФ (10 мл) добавляли по каплям к раствору T-1 (690 мг; 3,24 ммоль) в ТГФ (35 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч. в потоке N₂. Раствор NCS (260 мг; 1,94 ммоль) в ТГФ (5 мл) добавляли по каплям к раствору. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч в потоке N₂. Смесь поглощали DCM, промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃, промывали солевым раствором, высушивали над MgSO₄, фильтровали и выпаривали в вакууме с получением 950 мг коричневого твердого вещества. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зернами неправильной формы 15-40 мкм, 40 г Grace, жидкий образец, подвижная фаза: от 98% DCM, 2% MeOH до 90% DCM, 10% MeOH). Фракции, содержащие чистое соединение, объединяли и удаляли растворитель под вакуумом с получением 200 мг U-1 в виде коричневого твердого вещества (выход 25%).

ВЭЖХ Rt (мин.)=5,13; МС М+ (H⁺): 248-250 (способ V2012V2002).

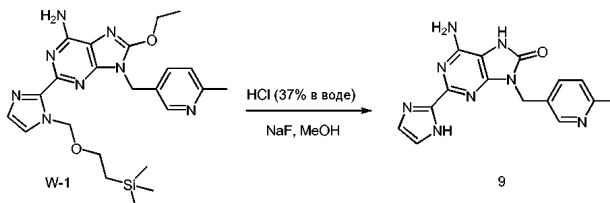
Синтез промежуточного соединения W-1



EtONa (398 мг; 5,85 ммоль) добавляли к раствору U-1 (290 мг; 1,17 ммоль) и V-1 (270 мг; 1,21 ммоль) в EtOH (15 мл). Смесь перемешивали при 90°C в течение 16 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зернами неправильной формы 15-40 мкм, 50 г merck, твердый образец, подвижная фаза 97/3/0,1). Фракции, содержащие чистое соединение, объединяли и удаляли растворитель с получением 210 мг W-1 в виде светло-желтого твердого вещества (выход 37%).

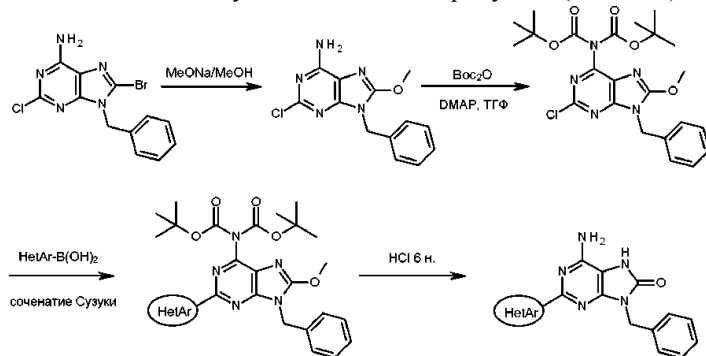
ВЭЖХ Rt (мин.)=6,68; МС М+ (H⁺): 248-250 (способ V1010V1012).

Синтез соединения 9

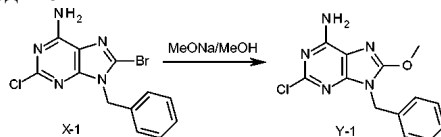


NaF (91 мг; 2,18 ммоль) добавляли к раствору W-1 (210 мг; 0,44 ммоль) в HCl 37% в воде (15 мл) и MeOH (10 мл). Смесь перемешивали при 40°C в течение 16 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и 10%-ный водный раствор K₂CO₃ добавляли до получения щелочного pH. Водный слой насыщали порошком K₂CO₃ и продукт экстрагировали с помощью DCM/MeOH (95/5) (3 раза). Объединенные органические слои высушивали над MgSO₄, фильтровали и удаляли растворитель при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зернами неправильной формы 15-40 мкм, merck 10 г, подвижная фаза DCM/MeOH/NH₃ водн. от 93/3/0,1 до 85/15/1). Фракции, содержащие чистое соединение, объединяли растворитель удаляли в вакууме и титльное соединение высушивали в вакууме в течение 16 ч при 60°C с получением 9,8 мг соединения 9 (6%) в виде светло-коричневого твердого вещества. Т.пл.>260°C.

Общая схема получения конечных продуктов (способ 5)



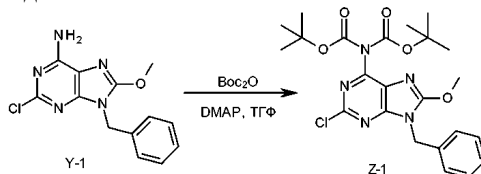
Синтез промежуточного соединения Y-1



Метоксид натрия (30 вес.% в MeOH) (15,6 мл, 84,172 ммоль) добавляли по каплям к смеси XI (синтез описан в Bioorg. Med. Chem., 11, 2003, 5501-5508) (5,7 г, 16,834 ммоль) в MeOH (150 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при 60°C в течение 6 ч и затем охлаждали до комнатной температуры. Осадок отфильтровывали и высушивали с выходом Y-1 3,25 г. Неочищенное соединение применяли на следующем этапе.

ВЭЖХ Rt (мин)=5,53; МС М+ (H⁺): 290-292 (способ V2003V2002).

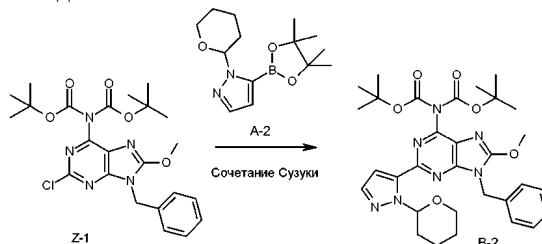
Синтез промежуточного соединения Z-1



Boc₂O (3,0 г, 13,806 ммоль) добавляли в потоке N₂ к смеси Y-1 (1,0 г, 3,452 ммоль), DMAP (42 мг, 0,345 ммоль) в THF (10 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при 80°C в течение 2 ч. Смесь выливали в воду и экстрагировали EtOAc. Органический слой промывали водой, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали растворитель. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ на (SiOH с зернами неправильной формы 20-45 мкм, 450 г matrex). Подвижная фаза (градиент от 98% DCM, 2% AcOEt до 95% DCM, 5% AcOEt) с получением 0,825 г Z-1 (выход 49%, Т. пл.=159°C).

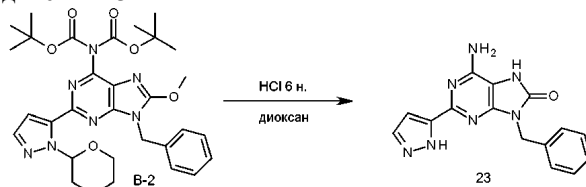
ВЭЖХ Rt (мин)=4,43; МС М+ (H⁺): 490-492 (способ V2015V2007).

Синтез промежуточного соединения B-2



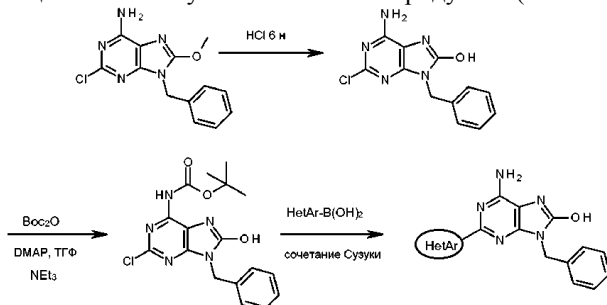
Раствор Z-1 (300 мг, 0,612 ммоль), A-2 (255 мг, 0,918 ммоль) и NaHCO₃ (257 мг, 3,06 ммоль) в смеси диоксан/вода (4/1) (3 мл) дегазировали барботированием с помощью N₂ в течение 10 мин. Добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (142 мг, 0,122 ммоль) и смесь перемешивали при 100°C в течение 5 ч. Добавляли воду и EtOAc и декантировали слои. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc. Органические слои объединяли, сушили над MgSO₄, фильтровали и растворитель выпаривали на следующем этапе без дополнительной очистки.

Синтез конечного соединения 23

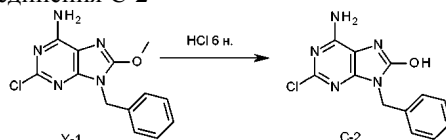


HCl 6 н. (10 мл) добавляли к раствору В-2 (0,7 г, 1,15 ммоль) в диоксане (7 мл) при 0°C. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч и затем охлаждали до 0°C и ошелачивали с помощью K₂CO₃. Смесь экстрагировали с помощью EtOAc+CH₃OH (90-10). Объединенные органические слои сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали растворитель. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ на (силикагель с зернами правильной формы 5 мкм 150×30,0 мм). Подвижная фаза (градиент от 0,3% NH₄OH, 97% DCM, 3% MeOH до 1,4% NH₄OH, 86% DCM, 14% MeOH) с выходом 67 мг конечного соединения 23 после кристаллизации из CH₃OH (выход 19%).

Общая схема получения конечных продуктов (способ 6)



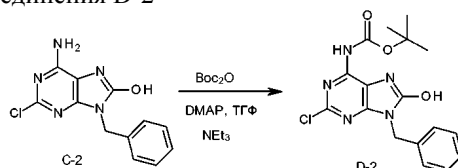
Синтез промежуточного соединения C-2



Смесь Y-1 (0,53 г, 1,829 ммоль) в 6 н. HCl (5 мл) и диоксана (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Осадок отфильтровывали, промывали минимальным количеством холодного диоксана и сушили с получением 0,28 г неочищенного продукта C-2, который применяли на следующем этапе без дополнительной очистки.

ВЭЖХ Rt (мин)=4,96; МС М+ (H⁺): 276-278 (способ V2003V2002).

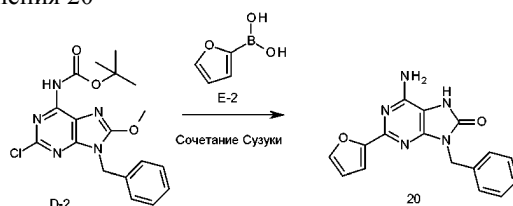
Синтез промежуточного соединения D-2



NEt₃ (0,187 мл, 1,345 ммоль) и затем Boc₂O (0,215 г, 0,987 ммоль) добавляли к смеси C-2 (0,28 г, 0,897 ммоль) и DMAP (11 мг, 0,0897 ммоль) в THF (3 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при 80°C в течение 2 ч. Добавляли воду и EtOAc. Слои декантировали. Органический слой сушили над MgSO₄, фильтровали и растворитель испаряли с выходом 0,18 г промежуточного соединения D-2. Неочищенное соединение применяли непосредственно на следующем этапе.

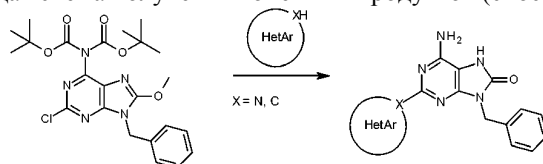
ВЭЖХ Rt (мин)=6,31; МС М+ (H⁺): 376-378 (способ V2002V2002).

Синтез конечного соединения 20

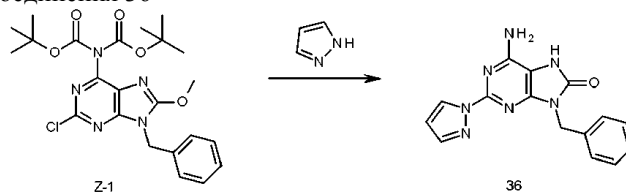


Раствор D-2 (240 мг, 0,64 ммоль), E-2 (107 мг, 0,96 ммоль) и NaHCO₃ (269 мг, 3,2 ммоль) в смеси диоксан/вода (4/1) (3,2 мл) дегазировали барботированием N₂ в течение 10 мин. Добавляли тетра-кис(трифенилфосфин)палладий (148 мг, 0,13 ммоль) и смесь перемешивали при 100°C в течение 16 ч. Добавляли воду и EtOAc и декантировали слои. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc. Органические слои объединяли, высушивали над MgSO₄, фильтровали и растворитель выпаривали. Неочищенный продукт очищали на обратной фазе с выходом 13 мг конечного соединения 20 (выход 6%).

Общая схема получения конечных продуктов (способ 7)



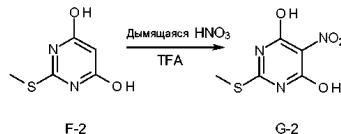
Синтез конечного соединения 36



Смесь Z-1 (300 мг, 0,612 ммоль) и пиразола (417 мг, 6,123 ммоль) перемешивали при 180°C в течение 1 ч (микроволновый реактор biotage). Неочищенное соединение очищали с помощью хроматографии через колонку с силикагелем (15-40 мкм, 25 г) в $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 96/4/0,5 с получением после кристаллизации в диизопропилэфире и высушивания при разреженном давлении при 80°C 85 мг конечного соединения 36.

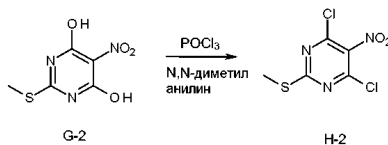
Общая схема получения конечных продуктов (способ 8)

Синтез промежуточного соединения G-2



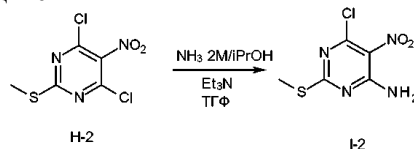
Раствор F-2 (50 г, 316,09 ммоль) в TFA (210 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь охлаждали до 5°C, а затем добавляли дымящуюся HNO_3 (19,5 мл, 426,73 ммоль) по каплям при 5°C. При добавлении температуру поддерживали на уровне 10-15°C. Удаляли ледяную баню, и после чего при достижении температуры 20°C проходила бурная экзотермическая реакция (от 20 до 45°C за 5 с). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Смесь выливали в смесь из воды и льда. Осадок отфильтровывали и промывали водой. Осадок высушивали под вакуумом при 50°C с получением 42 г (выход 65%) промежуточного соединения G-2. Данное промежуточное соединение применяли непосредственно на следующем этапе без какой-либо дополнительной очистки.

Синтез промежуточного соединения H-2



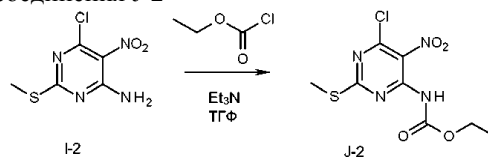
N,N-Диметиланилин (76,7 мл, 0,61 моль) добавляли по каплям к POCl_3 (93,7 мл, 1,01 моль) при 0°C. G-2 (41 г, 201,79 ммоль) добавляли по частям при 0°C, а затем смесь нагревали до 100°C в течение 2 ч. Раствор концентрировали в вакууме и удаляли остаточный POCl_3 путем азеотропной перегонки с толуолом (3 раза). Полученное в результате масло поглощали раствором CH_2Cl_2 -гептана (70-30) и фильтровали через стеклянный фильтр, содержащий SiO_2 . Фильтрат концентрировали и остаток очищали с помощью препаративной ЖХ на (SiOH с зернами неправильной формы 20-45 мкм, 1000 г davisil), подвижная фаза (80% гептан, 20% CH_2Cl_2). Собирали очищенные фракции и концентрировали с получением 37,8 г (выход 78%) промежуточного соединения H-2.

Синтез промежуточного соединения I-2



Раствор NH_3 2 М в iPrOH (115 мл, 229,31 ммоль) добавляли по каплям к раствору H-2 (36,7 г, 152,87 ммоль) и Et_3N (23,4 мл, 168,16 ммоль) в ТГФ (360 мл) (при добавлении температуру поддерживали на уровне RT с помощью бани с ледяной водой). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Смесь выпаривали досуха. Воду и EtOAc добавляли к остатку. Слои разделяли и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (дважды). Объединенные органические слои сушили над MgSO_4 , фильтровали и удаляли растворитель при пониженном давлении с получением 34,5 г (выход 100%) промежуточного соединения I-2.

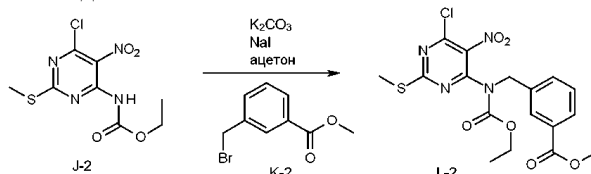
Синтез промежуточного соединения J-2



Этилхлорформиат (13,5 мл, 138,90 ммоль) добавляли к раствору I-2 (39,8 г, 126,27 ммоль) и Et_3N (26,5 мл, 189,40 ммоль) в ТГФ (1300 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч

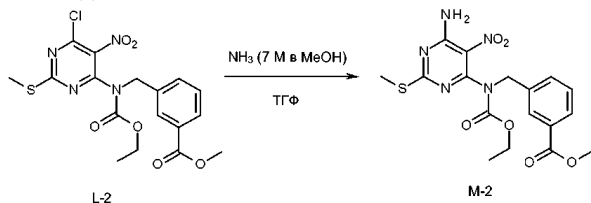
и растворитель частично испаряли при пониженном давлении. Остаток поглощали CH_2Cl_2 и водой. Разделяли слои; водный слой экстрагировали CH_2Cl_2 (дважды). Объединенные органические слои высушивали над MgSO_4 , фильтровали и удаляли растворитель при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью ЖХ (на SiOH зернах неправильной формы 20-45 мкм, 1000 г davisil), подвижная фаза (градиент от 85% гептана, 15% AcOEt до 80% гептана, 20% AcOEt). Очищенные фракции собирали и концентрировали с получением 35 г (выход 95%) промежуточного соединения J-2.

Синтез промежуточного соединения L-2



J-2 (5 г, 17,0 ммоль), K-2 (3,91 г, 17,0 ммоль), K_2CO_3 (5,90 г, 42,7 ммоль) и NaI (2,56 г, 17,0 ммоль) в ацетоне (130 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Раствор фильтровали и фильтрат выпаривали при пониженном давлении. Неочищенное соединение очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зерном неправильной формы 15-40 мкм, 120 г merck, твердая проба, подвижная фаза: гептан/ EtOAc от 100/0 до 80/20) с получением промежуточного соединения L-2 в виде бледно-желтого твердого вещества (выход 69%).

Синтез промежуточного соединения M-2



Реакцию завершали с получением двух партий по 2,7 г L-2.

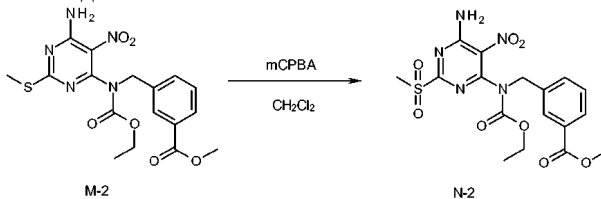
Протокол для одной партии 2,7 г:

в запаянной пробирке L-2 (2,70 г, 6,12 ммоль) перемешивали в NH_3 (7 М в MeOH) (50 мл) и ТГФ (50 мл) при комнатной температуре в течение 2 ч.

Смешивали две партии.

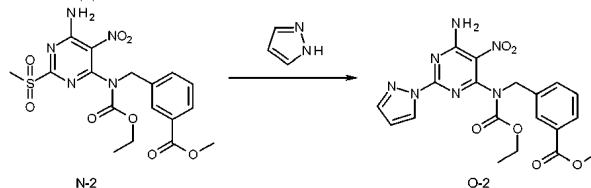
Смесь выпаривали в вакууме и остаток сушили с помощью азеотропной перегонки с EtOH (дважды) с получением желтого твердого вещества. Добавляли воду и EtOAc , слои разделяли и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (дважды). Объединенные органические слои сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали в вакууме с получением 4,9 г промежуточного соединения M-2 в виде желтого твердого вещества (выход 90%).

Синтез промежуточного соединения N-2



mCPBA (1,46 г, 5,93 ммоль) добавляли по частям к раствору M-2 (1 г, 2,37 ммоль) в CH_2Cl_2 (60 мл) при 0°C . Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч. Водный раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ добавляли к смеси. Слои разделяли и водный слой экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 (дважды). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 , сушили над MgSO_4 , фильтровали и удаляли растворитель при пониженном давлении с получением 980 мг промежуточного соединения N-2 в виде желтого твердого вещества (выход 91%). Промежуточное соединение N-2 применяли на следующем этапе без дополнительной очистки.

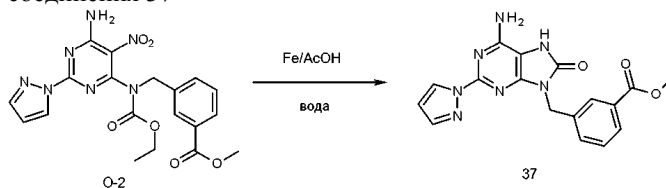
Синтез промежуточного соединения O-2



Смесь N-2 (500 мг, 1,10 ммоль) и пиразола (750 мг, 11,0 ммоль) перемешивали при 80°C в течение 45 мин. Полученную в результате смесь поглощали EtOAc и 1 М водным раствором HCl . Слои разделяли, органический слой сушили над MgSO_4 , фильтровали и сушили в вакууме с получением 550 мг желтого твердого вещества. Неочищенное соединение очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зерном

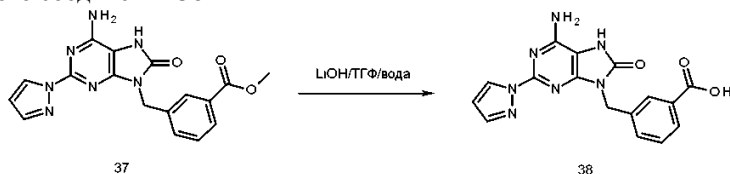
неправильной формы 15-40 мкм, 25 г гласе, твердая проба, подвижная фаза: градиент от $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ водн. 97/3/0,03 до 80/20/0,3 с получением 370 мг промежуточного соединения О-2 в виде твердого белого вещества (выход 76%).

Синтез конечного соединения 37



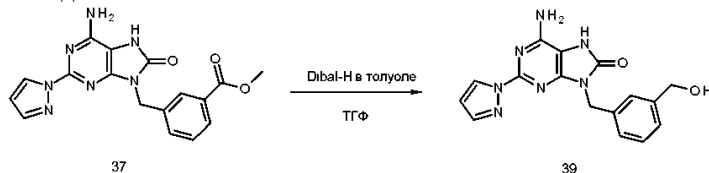
Fe (280 мг, 5,01 ммоль) добавляли к смеси О-2 (365 мг, 827 мкмоль) в AcOH (17 мл) и воде (1,8 мл). Смесь энергично перемешивали при комнатной температуре в течение 64 ч. Реакционную смесь фильтровали через целитовую подушку, концентрировали в вакууме совместно выпаривали с толуолом (дважды) с получением темного остатка. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зерном неправильной формы 15-40 мкм, 25 г мерск, твердая проба, градиент подвижной фазы: от $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ водн. от 96/4/0,4 до 80/20/3) с получением 250 мг белого твердого вещества, которое очищали снова с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зерном неправильной формы 15-40 мкм, 25 г мерск, твердая проба, градиент подвижной фазы: от $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ водн. 96/4/0,4 до 80/20/3) с получением 110 мг фракции 1 в виде белого твердого вещества (36%) и 25 мг фракции 2 в виде белого твердого вещества (8%). Общий выход: 45%. 8 мг фракции 2 сушили в вакууме в течение 16 ч при 40°C с получением 6 мг конечного соединения 37 в виде белого твердого вещества.

Синтез конечного соединения 38



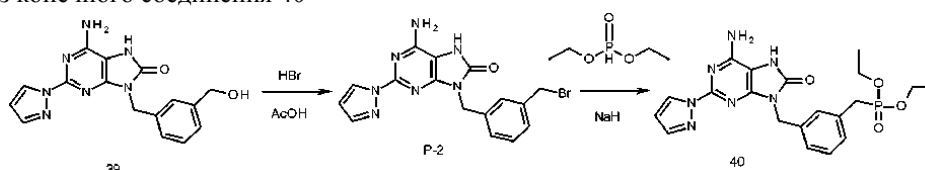
LiOH (9 мг, 123 мкмоль) добавляли к суспензии 37 (15 мг, 41,1 мкмоль) в TGФ (4 мл) и воде (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. 10%-ный водный раствор K_2CO_3 добавляли до щелочного pH. Водный слой насыщали порошком K_2CO_3 и продукт экстрагировали с помощью $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1) (3 раза). Объединенные органические слои сушили над MgSO_4 , фильтровали и удаляли растворитель при пониженном давлении с получением 200 мг. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (X-Bridge-C18, 5 мкм, 30×150 мм, подвижная фаза: градиент от H_2O (0,1% муравьиная кислота)/MeCN 90/10 до 0/100) с получением 12 мг конечного соединения 38 в виде белого твердого вещества (83%).

Синтез конечного соединения 39



Dibal-H (1,2 М в толуоле) (0,2 мл, 240 мкмоль) добавляли по каплям к раствору из 37 (30 мг, 82,1 мкмоль) в TGФ (3 мл) и толуола (1 мл) в атмосфере азота при 0°C. Раствор перемешивали при 0°C в течение 2 ч. Добавляли Dibal-H (0,2 мл, 240 мкмоль) и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Насыщенный водный раствор тартрата калия-натрия добавляли для нейтрализации реакции. Смесь разбавляли EtOAc с последующим энергичным перемешиванием в течение 30 мин. Органический слой отделяли от водного слоя, промывали солевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 40 мг. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зерном неправильной формы 15-40 мкм, 4 г гласе, твердая проба, градиент подвижной фазы: от $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ водн. от 96/4/0,04 до 80/20/2) с получением белого твердого вещества. Полученное белое твердое вещество сушили в вакууме в течение 16 ч при 40°C с получением 8 мг конечного соединения 39 (29%) в виде белого твердого вещества.

Синтез конечного соединения 40

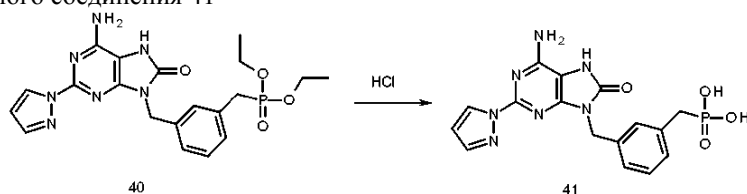


39 (45 мг, 133 мкмоль) растворяли в HBr (30% в AcOH) (10 мл). Смесь перемешивали при комнат-

ной температуре в течение 1 ч. Растворитель выпаривали и AcOH отгоняли азеотропно с толуолом (дважды) с получением 75 мг промежуточного соединения Р-2 в виде коричневого твердого вещества, которое применяли на следующем этапе без дополнительной очистки.

К суспензии NaH (53 мг, 1,33 ммоль) в ТГФ (4 мл) добавляли по каплям диэтилфосфит (0,130 мл, 1,33 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. К смеси добавляли раствор Р-2 (64 мг, 1,33 ммоль) в ТГФ (4 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. К суспензии NaH (53 мг, 1,33 ммоль) в ТГФ (4 мл) добавляли по каплям диэтилфосфит (0,130 мл; 1,33 ммоль) при комнатной температуре. Полученную в результате смесь добавляли к реакционной смеси. Полученную в результате реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли воду и EtOAc, слои разделяли и промывали органический слой водным раствором NaHCO₃ и соевым раствором, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 75 мг чистого масла. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ЖХ (SiOH с зерном неправильной формы 15-40 мкм, 25 г теck, сухой ввод образца, градиент подвижной фазы: от CH₂Cl₂/MeOH 100/0 до 85/15) с получением 38 мг белого твердого вещества, которое растирали в пентане. Полученное в результате твердое вещество фильтровали и сушили в вакууме в течение 16 ч при 50°C с получением 28 мг конечного соединения 40 в виде белого твердого вещества (выход 40%).

Синтез конечного соединения 41

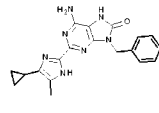
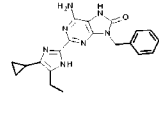
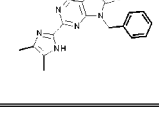
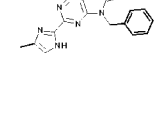
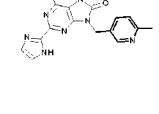
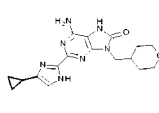
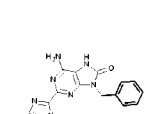
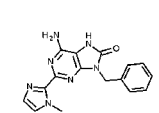
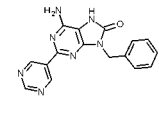


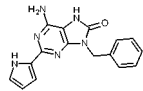
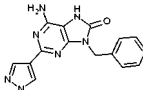
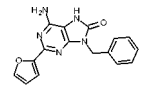
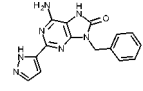
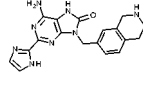
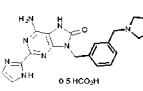
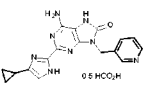
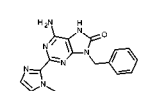
40 (590 мг, 1,29 ммоль) растворяли в HCl (37% в воде) (60 мл). Смесь перемешивали при 100°C в течение 16 ч. Растворитель выпаривали и H₂O азеотропно отгоняли с EtOH (дважды) с получением 605 мг конечного соединения 41 в виде белого твердого вещества (выход 100%).

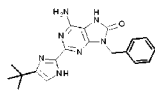
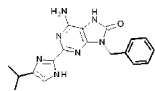
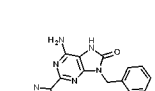
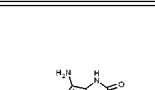
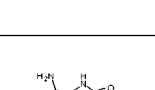
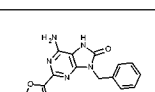
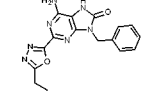
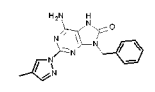
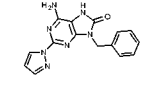
Таблица 1

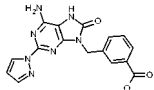
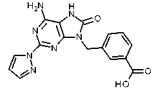
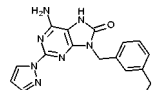
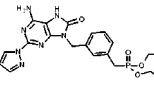
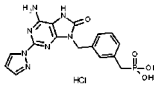
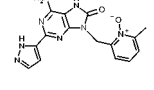
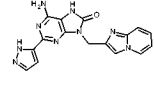
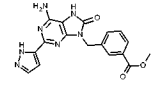
Соединение по настоящему изобретению

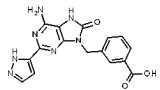
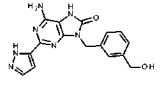
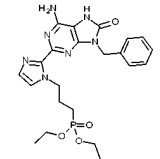
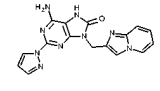
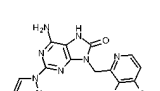
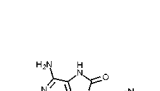
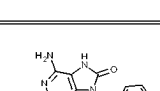
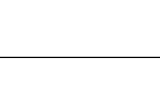
№	Структура	Масса, точное значение	Масса, найденное значение [M+H]	ЖХ-МС, время удерживания, способ	Способ синтеза	Т.пл. (°C)	¹ H-ЯМР
1		347,15	348	1,01, В	1,2		¹ H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d ₆): δ м.д. 0,84 (шир.с, 2H), 0,99 (д, J=6,7 Гц, 2H), 2,00 (шир.с, 1H), 3,16 (шир.с, 1H), 5,03 (шир.с, 2H), 7,08-7,21 (м, 2H), 7,24-7,35 (м, 3H), 7,36-7,45 (м, 3H), 11,51 (шир.с, 1H)
2		383,15	384	1,18, В	1		¹ H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆): δ м.д. 5,08 (с, 2H), 7,04 (шир.с, 2H), 7,29 (м, J=7,3 Гц, 1H), 7,34 (т, J=7,3 Гц, 2H), 7,40-7,48 (м, 3H), 7,49-7,56 (м, 2H), 7,97 (д, J=7,3 Гц, 2H), 8,20 (с, 1H), 11,28 (с, 1H)
3		375,18	376		1		¹ H-ЯМР (DMSO-d ₆ , 400 МГц): δ м.д. 14,45 (шир.с, 1H), 11,49 (с, 1H), 7,54 (с, 1H), 7,41 (д, J=8 Гц, 2H), 7,31 (т, J=8 Гц, 2H), 7,28 (т, J=8 Гц, 1H), 7,14 (шир.с, 2H), 5,06 (с, 2H), 3,15 (м, 1H), 2,08-2,06 (м, 2H), 1,74-1,62 (м, 6H)
4		307,12	308	1,87, V3018V3001	2	>260	¹ H-ЯМР (DMSO-d ₆ , 400 МГц): δ м.д. 12,34 (шир.с, 1H), 10,32 (шир.с, 1H), 7,22-7,44 (м, 5H), 7,18 (с, 1H), 7,01 (с, 1H), 6,48 (шир.с, 2H), 5,00 (с, 2H)

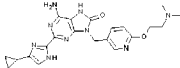
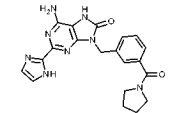
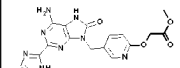
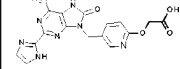
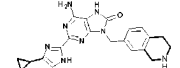
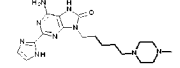
5		361,16	362	2,35, V3018V3001	3	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 11,89 (шир.с, 1H), 10,24 (шир.с, 1H), 7,21-7,40 (м, 5H), 6,51 (шир.с, 2H), 5,01 (с, 2H), 2,24 (с, 3H), 1,72-1,80 (м, 1H), 0,65-0,78 (м, 4H)
6		375,18	376	2,52, V3018V3001	3	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 11,85 (шир.с, 1H), 10,26 (с, 1H), 7,21-7,39 (м, 5H), 6,51 (шир.с, 2H), 5,02 (с, 2H), 2,65 (м, 2H), 1,78 (шир.с, 1H), 1,17 (т, J=6,5 Гц, 3H), 0,65-0,78 (м, 4H)
7		335,15	336	2,1, V3018V3001	3	230	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 11,98 (шир.с, 1H), 10,27 (с, 1H), 7,20-7,40 (м, 5H), 6,40 (с, 2H), 5,01 (с, 2H), 2,10 (шир.с, 6H)
8		321,13	322	2,01, V3018V3001	3		¹ H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d ₆) δ м.д. 12,00-12,17 (м, 1H), 10,29 (с, 1H), 7,35-7,40 (м, 2H), 7,32 (т, J=7,41 Гц, 2H), 7,23-7,29 (м, 1H), 6,66-6,90 (м, 1H), 6,44 (шир.с, 2H), 5,00 (шир.с, 2H), 2,10-2,26 (м, 3H)
9		322,13	323	2,47, V3018V3001	4	>260	¹ H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d ₆) δ м.д. 10,38 (шир.с, 1H), 8,56 (шир.с, 1H), 7,71 (д, J=7,07 Гц, 1H), 7,09-7,30 (м, 4H), 6,45 (шир.с, 2H), 4,99 (с, 2H), 1,25 (шир.с, 3H)
10		355,18	356	1,86, V3018V3001	4	>260	¹ H-ЯМР (500 МГц, MeOD) δ м.д. 6,83 (с, 1H), 3,95 (дл, J=2,84, 11,35 Гц, 2H), 3,87 (д, J=7,57 Гц, 2H), 3,36-3,44 (м, 2H), 2,25-2,37 (м, 1H), 1,89-1,98 (м, 1H), 1,60 (дл, J=1,89, 12,93 Гц, 2H), 1,41-1,52 (м, 2H), 0,88-0,96 (м, 2H), 0,71-0,77 (м, 2H).
11		365,16	366	2,11, V3018V3001	2	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 10,47 (шир.с, 1H), 7,22-7,38 (м, 5H), 7,20 (с, 1H), 6,91 (с, 1H), 6,62 (шир.с, 2H), 4,97 (с, 2H), 4,52 (т, J=5,4 Гц, 2H), 3,48 (т, J=5,4 Гц, 2H), 3,10 (с, 3H)
12		321,13	322	2,06, V3018V3001	2	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 7,16-7,33 (м, 5H), 7,10 (с, 1H), 6,84 (с, 1H), 6,24 (шир.с, 2H), 4,91 (с, 2H), 3,85 (с, 3H)
15		319,12	320	2,3, Villa	6		¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 300 МГц): δ м.д. 10,25 (шир.с, 1H), 9,47 (с, 2H), 9,23 (с, 1H), 7,40 (т, J=7,2 Гц, 2H), 7,34 (т, J=7,2 Гц, 2H), 7,27 (п, J=7,2 Гц, 1H), 6,70 (с, 2H), 5,75 (с, 1H), 5,02 (с, 2H)

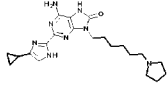
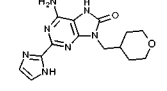
18		306,12	307	2,45, Villa	6		¹ H-ЯМР (ДМСO-d ₆ , 300 МГц): δ м.д. 11,10 (шир.с, 1H), 10,20 (шир.с, 1H), 7,43 (д, J=7,1 Гц, 2H), 7,33 (т, J=7,1 Гц, 2H), 7,26 (т, J=7,1 Гц, 1H), 6,83 (д, J=1,5 Гц, 1H), 6,68 (шир.с, 1H), 6,35 (с, 2H), 6,10 (д, J=1,5 Гц, 1H), 4,98 (с, 2H)
19		307,12	308	1,82, Villa	6		¹ H-ЯМР (ДМСO-d ₆ , 300 МГц): δ м.д. 12,97 (шир.с, 1H), 10,25 (шир.с, 1H), 8,02 (шир.с, 2H), 7,18-7,44 (м, 5H), 6,42 (с, 2H), 4,95 (с, 2H)
20		307,11	308	2,57, Villa	6		¹ H-ЯМР (ДМСO-d ₆ , 300 МГц): δ м.д. 10,60 (шир.с, 1H), 7,76 (шир.с, 1H), 7,19-7,40 (м, 5H), 7,00 (д, J=3,3 Гц, 1H), 6,66 (с, 2H), 6,59 (дд, J=3,3, 1,8 Гц, 1H), 5,0 (с, 2H)
23		307,12	308	2,03, V3018V3001	5	>260	¹ H-ЯМР (500 МГц, ДМСO-d ₆) δ м.д. 12,84-13,37 (м, 1H), 10,30 (шир.с, 1H), 7,23-7,76 (м, 6H), 6,70 (шир.с, 1H), 6,49 (шир.с, 2H), 4,98 (с, 2H)
24		362,16	363	2,20 V3018V3001	4	240	¹ H-ЯМР (ДМСO-d ₆ , 400 МГц): δ м.д. 12,25 (шир.с, 1H), 7,18 (д, J=8,1 Гц, 1H), 6,99-7,14 (м, 4H), 6,50 (с, 2H), 4,94 (с, 2H), 3,93 (с, 2H), 3,01-3,07 (м, 2H), 2,72 (т, J=5,6 Гц, 2H)
25		390,19	391	2,47 V3018V3001	4	196	¹ H-ЯМР (ДМСO-d ₆ , 400 МГц): δ м.д. 12,13 (шир.с, 1H), 10,38 (шир.с, 1H), 8,15 (шир.с, 0,49H, пик соли формиата), 7,39 (шир.с, 1H), 7,18-7,34 (м, 3H), 7,09 (шир.с, 2H), 6,50 (шир.с, 2H), 5,01 (шир.с, 2H), 3,71 (шир.с, 2H), 2,50-2,61 (м, 4H), 1,67 (шир.с, 4H)
26		362,16	363	1,90 V3018V3001	4	>260	¹ H-ЯМР (ДМСO-d ₆ , 400 МГц): δ м.д. 12,05 (шир.с, 1H), 10,27 (с, 1H), 8,56 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,15 (с, 0,59H, пик соли формиата), 7,70 (дд, J=8,2, 1,8 Гц, 1H), 7,20 (д, J=8,2 Гц, 1H), 6,93 (шир.с, 1H), 6,49 (шир.с, 2H), 4,97 (с, 2H), 2,41 (с, 3H), 1,78-1,90 (м, 1H), 0,70-0,87 (м, 2H), 0,64-0,70 (м, 2H)
27		351,14	352	1,78 V3018V3001	2	260	¹ H-ЯМР (ДМСO-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 10,37 (с, 1H), 7,23-7,38 (м, 5H), 7,21 (д, J=0,9 Гц, 1H), 6,91 (д, J=0,9 Гц, 1H), 6,58 (шир.с, 2H), 4,96 (с, 2H), 4,81 (т, J=5,7 Гц, 1H), 4,41 (т, J=5,7 Гц, 2H), 3,59 (кв., J=5,7 Гц, 2H)

28		363, 18	364	2,51 V3018V3001	2	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 11,78-12,24 (м, 1H), 10,28 (с, 1H), 7,07-7,47 (м, 5H), 6,21-6,93 (м, 3H), 5,01 (с, 2H), 1,13-1,45 (м, 9H)
29		349, 17	350	2,35 V3018V3001	2	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 11,80-12,14 (м, 1H), 10,41 (шир.с, 1H), 7,06-7,70 (м, 5H), 6,65-6,89 (м, 1H), 6,37-6,62 (м, 2H), 4,89-5,21 (м, 2H), 2,73-3,16 (м, 1H), 1,04-1,31 (м, 6H)
30		335, 15	336	2,18 V3018V3001	2	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 11,82-12,28 (м, 1H), 10,47 (шир.с, 1H), 7,08-7,56 (м, 5H), 6,63-7,01 (м, 1H), 6,38-6,59 (м, 2H), 4,78-5,07 (м, 2H), 2,53-2,69 (м, 2H), 0,95-1,35 (м, 3H)
31		375, 11	376	2,38 V3018V3001	2	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 13,07 (шир.с, 1H), 10,46 (шир.с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,39 (д, J=8,2 Гц, 2H), 7,32 (т, J=8,2 Гц, 2H), 7,26 (т, J=8,2 Гц, 1H), 6,65 (шир.с, 2H), 4,98 (с, 2H)
32		308, 10	309	2,06 V3018V3001	5		¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 10,44 (шир.с, 1H), 8,45 (с, 1H), 7,63 (с, 1H), 7,16-7,37 (м, 5H), 6,70 (шир.с, 2H), 4,96 (с, 2H)
33		323, 11	324	2,23 V3018V3001	5	>250	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 10,72 (шир.с, 1H), 7,11-7,56 (м, 5H), 6,94 (шир.с, 2H), 5,00 (шир.с, 2H), 2,41 (с, 3H)
34		367, 14	368	2,27 V3018V3001	5	>250	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 10,71 (шир.с, 1H), 7,16-7,49 (м, 5H), 6,96 (шир.с, 2H), 5,01 (с, 2H), 3,72 (т, J=6,3 Гц, 2H), 3,24 (с, 3H), 3,01 (т, J=6,3 Гц, 2H)
35		321, 13	322	2,42 V3018V3001	7	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 10,31 (шир.с, 1H), 8,24 (с, 1H), 7,51 (с, 1H), 7,18-7,40 (м, 5H), 6,78 (шир.с, 2H), 4,96 (с, 2H), 2,08 (с, 3H)
36		307, 12	308	2,25 V3018V3001	7	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ м.д. 10,33 (шир.с, 1H), 8,46 (д, J=2,5 Гц, 1H), 7,70 (с, 1H), 7,20-7,40 (м, 5H), 6,82 (шир.с, 2H), 6,48 (д, J=3,8 Гц, 1H), 4,97 (с, 2H)

37		365,12	366	2,24 V3018V3001	8	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 9,80 (шир.с, 1H), 8,47 (д, J=2,5 Гц, 1H), 7,99 (с, 1H), 7,87 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,70 (с, 1H), 7,65 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,50 (т, J=7,6 Гц, 1H), 6,84 (шир.с, 2H), 6,43-6,63 (м, 1H), 5,04 (с, 2H), 3,83 (с, 3H)
38		351,11	352	2,27 V3014V3001	8	332 ¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 13,01 (шир.с, 1H), 10,46 (шир.с, 1H), 8,47 (с, 1H), 7,95 (с, 1H), 7,84 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,69 (с, 1H), 7,60 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,46 (т, J=7,6 Гц, 1H), 6,87 (шир.с, 2H), 6,48 (с, 1H), 5,03 (с, 2H)
39		337,13	338	1,87 V3018V3001	8	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ (м.д.) 10,28 (шир.с, 1H), 8,46 (с, 1H), 7,70 (с, 1H), 7,10-7,37 (м, 4H), 6,82 (шир.с, 2H), 6,35-6,57 (м, 1H), 5,17 (т, J=5,7 Гц, 1H), 4,96 (с, 2H), 4,45 (д, J=5,7 Гц, 2H)
40		457,16	458	2,13 V3018V3001	8	218 ¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ (м.д.) 10,41 (шир.с, 1H), 8,46 (шир.с, 1H), 7,69 (с, 1H), 7,04-7,38 (м, 4H), 6,85 (шир.с, 2H), 6,47 (шир.с, 1H), 4,95 (шир.с, 2H), 3,85 (квинтет, J=7,0 Гц, 4H), 3,18 (д, J=21,4 Гц, 2H), 1,06 (т, J=7,0 Гц, 6H)
41		401,10	402	5,40 V2012V2002	8	101 ¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 10,43 (с, 1H), 8,46 (д, J=2,5 Гц, 1H), 7,69 (с, 1H), 7,10-7,31 (м, 4H), 6,84 (шир.с, 2H), 6,47 (дд, J=2,5, 1,5 Гц, 1H), 6,29 (шир.с, 2H), 4,90 (с, 2H), 2,92 (д, J=21,2 Гц, 2H)
42		338,12	339	2,45 V3014V3001	7	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ (м.д.) 10,20 (шир.с, 1H), 8,37 (д, J=2,2 Гц, 1H), 7,65 (с, 1H), 7,48 (д, J=6,9 Гц, 1H), 7,19 (т, J=6,9 Гц, 1H), 6,82-7,00 (м, 3H), 6,44 (дд, J=2,4, 1,7 Гц, 1H), 4,95-5,14 (м, 2H), 2,43 (с, 3H)
43		347,12	348	2,54 V3014V3001	7	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 12,48-13,42 (м, 1H), 9,90-10,57 (м, 1H), 8,44 (д, J=9,1 Гц, 1H), 7,37-7,99 (м, 3H), 7,19 (т, J=9,1 Гц, 1H), 6,83 (т, J=9,1 Гц, 1H), 6,69 (шир.с, 1H), 6,47 (шир.с, 2H), 5,12 (шир.с, 2H)
44		365,12	366	3,05 V3014V3001	7	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 12,32-13,87 (м, 1H), 9,94-10,53 (м, 1H), 7,4-8,26 (м, 5H), 6,61-6,89 (м, 1H), 6,28-6,59 (м, 2H), 5,05 (с, 2H), 3,83 (с, 3H)

45		351,11	352	2,13 V3014V3001	7	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 13,06 (шир.с, 2H), 10,32 (шир.с, 1H), 7,97 (с, 1H), 7,83 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,69 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,57 (шир.с, 1H), 7,46 (т, J=7,6 Гц, 1H), 6,72 (д, J=1,5 Гц, 1H), 6,48 (с, 2H), 5,04 (с, 2H)
46		337,13	338	1,63 V3018V3001	7	>260
47		485,19	486	2,11 V3018V3001	2	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 10,45 (с, 1H), 7,13-7,54 (м, 6H), 6,94 (с, 1H), 6,62 (шир.с, 2H), 4,98 (с, 2H), 4,33-4,48 (м, 2H), 3,82-4,02 (м, 4H), 1,76-1,92 (м, 2H), 1,47-1,66 (м, 2H), 1,15 (т, J=6,8 Гц, 6H)
48		347,12	348	1,81 V3018V3001	8	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 10,35 (шир.с, 1H), 8,27-8,53 (м, 2H), 7,77 (с, 1H), 7,67 (с, 1H), 7,47 (д, J=9,1 Гц, 1H), 7,15-7,27 (м, 1H), 6,76-6,88 (м, 3H), 6,36-6,53 (м, 1H), 5,09 (с, 2H)
49		368,13	369	1,94 V3018V3001	8	>260
50		322,13	323	2,78 V3014V3001	8	>260
51		347,15	348	2,35 V3018V3001	7	>260
52		351,14	352	1,93 V3018V3001	7	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 10,23 (шир.с, 1H), 7,68 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,15-7,40 (м, 5H), 6,72 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,46 (с, 2H), 4,97 (с, 2H), 4,87 (т, J=5,1 Гц, 1H), 4,17 (т, J=5,1 Гц, 2H), 3,75 (кв., J=5,1 Гц, 2H)
53		321,13	322	2,26 V3018V3001	7	192

54		435,21	436	1,32 V3018V3001	2	211	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ (м.д.) 11,90-12,42 (м, 1H), 10,14 (шир.с, 1H), 7,85-8,01 (м, 1H), 7,35-7,56 (м, 1H), 6,21-7,07 (м, 4H), 4,65-4,77 (м, 2H), 3,86-3,94 (м, 2H), 2,38-2,44 (м, 2H), 2,04 (с, 6H), 1,77-1,89 (м, 1H), 0,60-0,92 (м, 4H)
55		404,17	405	2,80 V3014V3001	2	218	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 12,52 (шир.с, 1H), 10,32 (с, 1H), 7,59 (с, 1H), 7,46-7,51 (м, 1H), 7,34-7,45 (м, 2H), 7,12 (шир.с, 2H), 6,49 (с, 2H), 4,94-5,25 (м, 2H), 3,41 (т, J=7,1 Гц, 2H), 3,20-3,29 (м, 2H), 1,79 (квинтет, J=7,1 Гц, 2H), 1,64 (квинтет, J=7,1 Гц, 2H)
57		396,13	397	1,79 V3018V3001	2	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ (м.д.) 12,47 (шир.с, 1H), 10,30 (шир.с, 1H), 8,25 (шир.с, 1H), 7,84 (д, J=8,2 Гц, 1H), 7,13 (шир.с, 2H), 6,90 (д, J=8,2 Гц, 1H), 6,50 (шир.с, 2H), 4,94 (шир.с, 2H), 4,87 (шир.с, 2H), 3,63 (с, 3H)
58		382,11	383	2,00 V3014V3001	2	>260	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 500 МГц): δ (м.д.) 11,87-13,45 (м, 2H), 10,50 (шир.с, 1H), 8,27 (шир.с, 1H), 7,83 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,22 (шир.с, 2H), 6,86 (д, J=7,6 Гц, 1H), 6,61 (шир.с, 2H), 4,94 (шир.с, 2H), 4,77 (шир.с, 2H)
60		402,19	403	2,61 V3014V3001	2	242	¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 8,98-12,14 (м, 1H), 8,21 (с, 1H), 6,04-7,47 (м, 6H), 4,95 (шир.с, 2H), 4,02 (шир.с, 2H), 3,13 (шир.с, 2H), 2,79 (шир.с, 2H), 1,67-1,97 (м, 1H), 0,42-0,94 (м, 4H)
61		385,23	386	2,14 V3014V3001	2		¹ H-ЯМР (ДМСО-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 11,85 (шир.с, 1H), 10,32 (с, 1H), 7,09 (с, 2H), 6,46 (с, 2H), 3,61 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,30-2,48 (м, 10H), 2,27 (с, 3H), 1,74 (квинтет, J=7,2 Гц, 2H), 1,49 (квинтет, J=7,2 Гц, 2H), 1,20-1,36 (м, 2H)

62		410,25	411	1,67 V3018V3001	2	174	¹ H-ЯМР (DMSO-d ₆ , 500 МГц): δ (м.д.) 11,91 (шир.с, 1H), 10,29 (шир.с, 1H), 6,84 (шир.с, 1H), 6,49 (шир.с, 2H), 3,79 (т, J=6,9 Гц, 2H), 2,52-2,70 (м, 6H), 1,80-1,90 (м, 1H), 1,71 (шир.с, 5H), 1,39-1,52 (м, 2H), 1,17-1,38 (м, 5H), 0,51-0,91 (м, 4H)
63		315,14	316	2,37 V3014V3001	2	>260	¹ H-ЯМР (DMSO-d ₆ , 400 МГц): δ (м.д.) 12,35 (шир.с, 1H), 10,24 (шир.с, 1H), 7,11 (шир.с, 2H), 6,44 (с, 2H), 3,78-3,87 (м, 2H), 3,70 (д, J=7,1 Гц, 2H), 3,24 (т, J=10,9 Гц, 2H), 1,99-2,18 (м, 1H), 1,08-1,76 (м, 4H)

Аналитические методики.

Все соединения исследовали посредством ЖХ-МС. Применяли следующие методики ЖХ-МС.

Способ VILLA.

Все анализы проводили с применением квадрупольного ЖХ/MSD серий Agilent 1100, соединенного с системой для жидкостной хроматографии (ЖХ) серий Agilent 1100, состоящей из насоса для двухкомпонентных смесей с дегазатором, автоматического устройства подготовки и отбора проб, термостатированной колонки, детектора на диодной матрице. Масс-спектрометр (МС) применяли с источником электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении (API-ES). Капиллярное напряжение устанавливали на 3000 В, напряжение фрагментатора до 70 В и температуру квадруполь поддерживали при 100°C. Значения потока и температуры сушильного газа составляли 12,0 л/мин и 350°C соответственно. Азот применяли в качестве газа-распылителя при давлении 35 фунтов/кв.дюйм (241,3 кПа) изб. Сбор данных проводили с помощью программного обеспечения Agilent Chemstation.

В дополнение к общей методике анализа осуществляли на колонке YMC pack ODS-AQ C18 (длинной 50 мм × внутр. диам. 4,6 мм; размером частиц 3 мкм) при 35°C со скоростью потока 2,6 мл/мин. Градиентное элюирование проводили от 95% (вода+0,1% муравьиная кислота)/5% ацетонитрил до 5% (вода+0,1% муравьиная кислота)/95% ацетонитрил за 4,80 мин, конечную композицию подвижной фазы удерживали дополнительно в течение 1,00 мин. Стандартный объем вводимой пробы составлял 2 мкл. Диапазоны измерений устанавливали на 190-400 нм для UV-PDA-детектора и 100-1400 масса/заряд для МС-детектора.

Способ В система ACQUITY UPLC с SQD-детектором.

Подвижная фаза: А: метанол, В: 10 mM ацетат аммония в 90% воды и 10% ацетонитрил.

Колонка: тип колонки: колонка Aquity UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм (Waters № 186002350), температура: 70°C. Программа градиента. Поток: 0,7 мл/мин, остановка сбора данных: 1,8 мин. Время остановки: 2 мин.

Время (мин.)	% А	% В	Скорость потока (мл/мин.)
0,00	5	95	0,7
1,30	95	5	0,7
1,50	95	5	0,7
1,70	5	95	0,7
2,00	5	95	0,7

Объем вводимой пробы: 0,75 мкл. Тип ввода пробы: неполная петля с переполнением иглы.

Начальная длина волны: 210 нм. Конечная длина волны: 400 нм. Разрешающая способность: 1,2 нм.

Частота ввода проб: 20 точек/с.

МС-способ.

Функция 1.

Режим ионизации: ES+. Формат данных: центроид.

Начальная масса: 160. Конечная масса: 1000.

Время сканирования (с): 0,1. Время начала (мин.): 0,0. Время завершения (мин.): 2,0. Напряжение на конусе (В): 30.

Функция 2.

Режим ионизации: ES-. Формат данных: центроид. Начальная масса: 160. Конечная масса: 1000.

Время сканирования (с): 0,1. Время начала (мин.): 0,0. Время завершения (мин.): 2,0. Напряжение на конусе (В): 30. Поток в МС: 7 00 мкл/мин.

Общая процедура VDR1 (для методик V100×V10xx.olg и V200×V20xx.olg).

ВЭЖХ измерения осуществляли с применением системы Alliance HT 2795 (Waters), состоящей из

насоса для четырехкомпонентных смесей с дегазатором, автоматического устройства подготовки и ввода пробы, диодно-матричного детектора (DAD) и колонки, как указано в соответствующих способах ниже, колонку поддерживают при температуре 30°C. Поток из колонки разделяли к МС-спектрометру. МС-детектор оснащали источником ионизации электрораспылением. Напряжение капиллярной иглы составляло 3 кВ, а температуру источника поддерживали на уровне 100°C на LCT (временепролетный масс-спектрометр с интерфейсом Zspray™ от Waters - для методик V100×V10xx.олп), и 3,15 кВ при 110°C на ZQ™ (простой квадрупольный масс-спектрометр с интерфейсом Zspray™ от Waters - для методик V200×V20xx.олп). Азот применяли в качестве распылительного газа. Сбор данных проводили с помощью системы обработки данных Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Общая процедура VDR2 (для методик V300×V30xx.олп).

Измерение с помощью ЖХ проводили с применением системы для UPLC (сверхэффективной жидкостной хроматографии) Acquity (Waters), состоящей из насоса для двухкомпонентных смесей с дегазатором, автоматического дозатора, диодно-матричного детектора (DAD) и колонки, как определено в соответствующих способах ниже, причем колонку выдерживали при температуре 40°C. Поток из колонки разделяли к МС-детектору. МС-детектор оснащали источником ионизации электрораспылением. Напряжение капиллярной иглы составляло 3 кВ, и температуру в Quattro (тройном квадрупольном масс-спектрометре от Waters) поддерживали при 130°C. Азот применяли в качестве распылительного газа. Сбор данных проводили с помощью системы обработки данных Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Способ V1005V1012.

В дополнение к общей методике VDR1: обращенно-фазовую ВЭЖХ выполняли на колонке Waters X-bridge (3,5 мкм, 4,6×100 мм) со скоростью потока 0,8 мл/мин. Две подвижные фазы (подвижная фаза А: 100% 7 мМ ацетат аммония; подвижная фаза В: 100% ацетонитрил) применяли для соблюдения условия градиента от 80% А до 20% В (удерживание в течение 0,5 мин) до 90% В за 4,5 мин, 90% В в течение 4 мин, и повторное уравнивание при исходных условиях в течение 3 мин. Применяли объем вводимой пробы 5 мкл. Напряжение на конусе составляло 20 В для режима положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектры получали сканированием от 100 до 1000 за 0,4 с с применением времени задержки 0,3 с между сканированиями.

Способ V1004V1012.

В дополнение к общей методике VDR1: обращенно-фазовую ВЭЖХ выполняли на колонке Kromasil C18 (3,5 мкм, 4,6×100 мм) со скоростью потока 0,85 мл/мин. Три подвижные фазы (подвижная фаза А: 100% 7 мМ ацетат аммония; подвижная фаза В: 100% ацетонитрил; подвижная фаза С: 0,2% муравьиной кислоты +99,8% воды сверхвысокой очистки) применяли для соблюдения условия градиента от 35% А, 30% В и 35% С (удерживание в течение 1 мин) до 100% В за 3 мин, 100% В в течение 4,5 мин и повторно с исходными условиями в течение 3 мин. Применяли объем вводимой пробы 5 мкл. Напряжение на конусе составляло 20 В для режима положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектры получали сканированием от 100 до 1000 за 0,4 с с применением времени задержки 0,3 с между сканированиями.

Способ V1010V1012.

В дополнение к общей методике VDR1: обращенно-фазовую ВЭЖХ выполняли на колонке Waters Atlantis C18 (5 мкм, 3,9×100 мм) со скоростью потока 0,8 мл/мин. Три подвижные фазы (подвижная фаза А: 100% 7 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 100% ацетонитрил; подвижная фаза С: 0,2% муравьиной кислоты +99,8% воды сверхвысокой очистки) применяли для соблюдения условия градиента от 50% А и 50% С (удерживание в течение 1,5 мин) до 10% А, 80% В и 10% С за 4,5 мин, удерживание 4 мин, и повторное уравнивание с исходными условиями в течение 3 мин. Применяли объем вводимой пробы 5 мкл. Напряжение на конусе составляло 20 В для режима положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектры получали сканированием от 100 до 1000 за 0,4 с с применением времени задержки 0,3 с между сканированиями.

Способ V2002V2002+LCpos_court.олп.

В дополнение к общей методике VDR1: обращенно-фазовую ВЭЖХ выполняли на колонке Kromasil C18 (3,5 мкм, 4,6×100 мм) со скоростью потока 0,8 мл/мин. Три подвижные фазы (подвижная фаза А: 100% 7 мМ ацетат аммония; подвижная фаза В: 100% ацетонитрил; подвижная фаза С: 0,2% муравьиной кислоты +99,8% воды сверхвысокой очистки) применяли для соблюдения условия градиента от 35% А, 30% В и 35% С (удерживание в течение 1 мин) до 100% В за 4 мин, 100% В в течение 4 мин и повторно уравнивали с исходными условиями в течение 2 мин. Применяли объем вводимой пробы 10 мкл. Напряжение на конусе составляло 20 В для режима положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектры получали сканированием от 100 до 1000 за 0,4 с с применением времени задержки 0,3 с между сканированиями.

Способ V2003V2002.

В дополнение к общей методике VDR1: обращенно-фазовую ВЭЖХ выполняли на колонке X-Bridge C18 (3,5 мкм, 4,6×100 мм) со скоростью потока 0,8 мл/мин. Две подвижные фазы (подвижная фаза А: 100% 7 мМ ацетат аммония; подвижная фаза В: 100% ацетонитрил); применяли для соблюдения условия градиента от 80% А, 20% В (удерживание в течение 0,5 мин) до 10% А, 90% В в течение 4,5 мин,

удерживание при 10% А и 90% В в течение 4 мин и повторно уравнивали с исходными условиями в течение 3 мин. Применяли объем вводимой пробы 10 мкл. Напряжение на конусе составляло 20 В для режима положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектры получали сканированием от 100 до 1000 за 0,4 с с применением времени задержки 0,3 с между сканированиями.

Способ V2012V2002.

В дополнение к общей методике VDR1: обращенно-фазовую ВЭЖХ выполняли на колонке Waters Atlantis C18 (5 мкм, 3,9×100 мм) со скоростью потока 0,8 мл/мин. Три подвижные фазы (подвижная фаза А: 100% 7 мМ ацетат аммония; подвижная фаза В: 100% ацетонитрил; подвижная фаза С: 0,2% муравьиной кислоты+99,8% воды сверхвысокой очистки) применяли для соблюдения условия градиента от 50% А, 0% В и 50% С (удерживание в течение 1,5 мин) до 10% А, 80% В и 10% в течение 3,5 мин, удерживали при данных условиях в течение 4 мин и повторно уравнивали с исходными условиями в течение 3 мин. Применяли объем вводимой пробы 10 мкл. Напряжение на конусе составляло 20 В для режима положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектры получали сканированием от 100 до 1000 за 0,4 с с применением времени задержки 0,3 с между сканированиями.

Способ V2015V2007.

В дополнение к общей методике VDR1: обращенно-фазовую ВЭЖХ выполняли на колонке Supelco Ascentis Express C18 (2,7 мкм, 3,0×100 мм) со скоростью потока 0,7 мл/мин. Две подвижные фазы (подвижная фаза А: 100% 7 мМ ацетат аммония; подвижная фаза В: 100% ацетонитрил) применяли для соблюдения условия градиента от 80% А и 20% В (удерживание в течение 0,5 мин) до 5% А и 95% В в течение 2,5 мин, удерживали в течение 4,5 мин и возвращали к исходным условиям в течение 1,5 мин, и удерживали в течение 1 мин. Применяли объем вводимой пробы 5 мл. Напряжение на конусе составляло 20 В для режима положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектры получали сканированием от 100 до 1000 за 0,4 с с применением времени задержки 0,3 с между сканированиями.

Способ V3018V3001.

В дополнение к общей методике VDR2: обращенно-фазовую UPLC проводили на колонке Waters Acquity BEH (мостиковый гибрид этилсилоксана/силикагеля) C18 (1,7 мкм, 2,1×100 мм) со скоростью потока 0,343 мл/мин. Две подвижные фазы (подвижная фаза А: 95% 7 мМ ацетат аммония/5% ацетонитрил; подвижная фаза В: 100% ацетонитрил) применяли для осуществления условия градиента от 84,2% А и 15,8% В (удерживание в течение 0,49 мин) до 10,5% А и 89,5% В, удерживали в течение 2,18 мин и приводили к начальным условиям в течение 0,73 мин, удерживали в течение 0,73 мин. Применяли объем вводимой пробы 2 мкл. Напряжение на конусе составляло 20 В для режима положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектры получали сканированием от 100 до 1000 за 0,2 с с применением времени задержки 0,1 с между сканированиями.

Способ V3014V3001.

В дополнение к общей методике VDR2: обращенно-фазовую ВЭЖХ выполняли на колонке ТЗ с HSS (высокопрочный диоксид кремния) от Waters (1,8 мкм, 2,1×100 мм) со скоростью потока 0,35 мл/мин. Две подвижные фазы (подвижная фаза А: 95% 7 мМ ацетат аммония/5% ацетонитрил; подвижная фаза В: 100% ацетонитрил) применяли для осуществления условия градиента от 99% А (удерживание в течение 0,5 мин) до 15% А и 85% В в течение 4,5 мин, удерживали в течение 2 мин и приводили к начальным условиям в течение 0,5 мин, удерживали в течение 1,5 мин. Применяли объем вводимой пробы 2 мкл. Напряжение на конусе составляло 20 В для режима положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектры получали сканированием от 100 до 1000 за 0,2 с с применением времени задержки 0,1 с между сканированиями.

Биологическая активность соединений по настоящему изобретению.

Описание анализов биологической активности.

Анализы с помощью репортерного гена для оценки активности TLR7 (24 ч).

Способность соединений активировать TLR7 человека оценивали с помощью клеточного анализа с применением репортерного гена с применением клеток HEK293, временно трансфицированных посредством экспрессирующего вектора TLR7 или TLR8 и репортерного конструкта NFB-luc. В одном случае конструкт экспрессии TLR экспрессирует соответствующую последовательность дикого типа или мутантную последовательность, содержащую делецию во втором богатом лейцином повторе (dIRR2) TLR. Как ранее указывалось, такие мутантные белки TLR более восприимчивы к активации агонистом (документ US 7498409).

Кратко, клетки HEK293 выращивали в среде для культивирования (DMEM, дополненная 10% FCS и 2 мМ глутамина). Для трансфекции клеток в 10 см чашках клетки отделяли трипсином-EDTA, трансфицировали смесью из плазмиды CMV-TLR7 или плазмиды TLR8 (750 нг), плазмиды NFB-luc (375 нг) и реагента для трансфекции и инкубировали 24 или 48 ч при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂. Трансфицированные клетки затем отделяли трипсином-ЭДТА, промывали в PBS и ресуспендировали в среде до плотности 1,67×10⁵ клеток/мл. 30 мкл клеток затем распределяли в каждую лунку в 384-луночных планшетах, где уже содержалось 10 мкл соединения в 4% ДМСО. После 6 ч инкубации при 37°C, 5% CO₂ определяли люциферазную активность путем добавления 15 мкл субстрата Steady Lite Plus

(Perkin Elmer) в каждую лунку и считывали показания, полученные на устройстве для считывания микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Кривые доза-эффект были составлены исходя из измерений, выполненных в четырех параллельных анализах. Для каждого соединения определяли значения самых низких эффективных концентраций (LEC), определенных как концентрация, которая индуцирует эффект, который по меньшей мере в два раза выше допустимого отклонения анализа. Токсичность соединения определяли одновременно с применением одинаковых серий разбавления соединения - 30 мкл на лунку с клетками, трансфицированными только конструктом CMV-TLR7 ($1,67 \times 10^5$ клеток/мл), в 384-луночных планшетах. Жизнеспособность клеток измеряли после 6 ч инкубации при 37°C, 5% CO₂ посредством добавления 15 мкл ATP lite (Perkin Elmer) на лунку и считывания показаний с устройством для считывания микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Данные указывали как CC₅₀.

Анализ продуцирования интерферона в клетках человека PBMC (PBMC-HUH7_EC₅₀).

Активация TLR7 человека приводит к усиленному продуцированию интерферона плазматическими дендритными клетками, присутствующими в крови человека. Способность соединения индуцировать выработку интерферона оценивали посредством изучения противовирусной активности в системе репликона HCV после инкубации в присутствии кондиционированных сред из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Анализ репликона HCV основан на конструкте бицистронной экспрессии, как описано у Lohmann et al. (Science (1999) 285: 110-113; Journal of Virology (2003) 77: 3007-15 3019) с модификациями, описанными Krieger et al. (Journal of Virology (2001) 75: 4614-4624). При анализе применяли стабильно трансфицированную клеточную линию Huh-7 luc/neo, содержащую РНК, кодирующую бицистронный конструкт экспрессии, содержащий участки дикого типа NS3-NS5B типа 1b HCV, транслируемые на участке внутренней посадки рибосомы (IRES) у вируса энцефаломиокардита (EMCV), при этом предварительно вводили репортерный ген (люцифераза светлячка) и селективный маркерный ген (neoR, неомицин-фосфотрансфераза). Конструкт фланкирован 5' и 3' NTR (нетранслируемые участки) из HCV типа 1b. Непрерывное культивирование клеток с репликонами в присутствии G418 (neoR) зависит от репликации РНК HCV. Для анализа кондиционированных сред клеточной культуры применяли стабильно трансфицированные клетки с репликонами, которые автономно и интенсивно реплицируют РНК HCV, кодирующую *inter alia* люциферазу. Кратко, PBMC получали из лейкоцитарных пленок по меньшей мере от двух доноров с применением стандартного протокола центрифугирования с фиколлом. Выделенные PBMC ресуспендировали в среде RPMI, дополненной 10% сывороткой АВ человека, и 2×10^5 клеток/на лунку распределяли в 384-луночных планшетах, содержащих соединения (общий объем 70 мкл). После инкубации в течение ночи 10 мкл надосадочной жидкости переносили в 384-луночные планшеты, содержащие $2,2 \times 10^3$ клеток с репликонами/на лунку в 30 мкл (помещенные в планшеты за день до этого). После 24 ч инкубации репликацию определяли посредством анализа люциферазной активности с применением 40 мкл/на лунку субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) и измеряли посредством микропланшетного ридера с возможностью визуализации ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Ингибирующую активность каждого соединения в отношении клеток Huh7-luc/neo записывали в виде величин EC₅₀, определенных как концентрация соединения, нанесенного на PBMC, которая привела к снижению люциферазной активности на 50%, что, в свою очередь, свидетельствует о степени репликации РНК - репликона при переносе определенного количества среды для культивирования PBMC. Рекомбинантный интерферон α-2a (Roferon-A) применяли в качестве стандартного контрольного соединения. Все соединения продемонстрировали CC₅₀ > 24 мкМ в ТОХ-анализе HEK293, описанном выше.

Анализ продуцирования интерферона в клетках человека PBMC (PBMC HEK-ISRE-luc LEC).

Активация TLR7 человека приводит к усиленному продуцированию интерферона плазматическими дендритными клетками, присутствующими в крови человека. Способность соединения индуцировать выработку интерферона оценивали посредством определения интерферона в кондиционированных средах из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Наличие интерферона в образцах определяли с помощью репортерной клеточной линии для выявления интерферона, стабильно экспрессирующей репортерный конструкт с интерферон-стимулируемыми реагирующими элементами (ISRE)-luc. Элемент ISRE с последовательностью GAAACTGAACT высокочувствителен к транскрипционному фактору STAT1-STAT2-IRF9, который активируется при связывании IFN-I с рецептором IFN (Clontech, PT3372-5W). Кратко, PBMC получали из лейкоцитарных пленок по меньшей мере от двух доноров с применением стандартного протокола центрифугирования с фиколлом. Выделенные PBMC ресуспендировали в среде RPMI, дополненной 10% сывороткой АВ человека, и 2×10^5 клеток/на лунку распределяли в 384-луночных планшетах, содержащих соединения (общий объем 70 мкл). После инкубации в течение ночи 10 мкл надосадочной жидкости переносили в 384-луночные планшеты, содержащие 5×10^3 HEK-ISRE-luc клеток/лунка в 30 мкл (помещенные в планшеты за день до этого). После 24 ч инкубации активацию элементов ISRE определяли посредством анализа люциферазной активности с применением 40 мкл/на лунку субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) и определяли посредством микропланшетного ридера с возможностью визуализации ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Стимулирующую активность для каждого соединения на клетки HEK-ISRE-luc представили как LEC. LEC, в свою очередь, свидетельствует о степени активации ISRE при переносе определенного количества среды для культивирования PBMC.

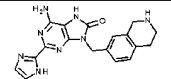
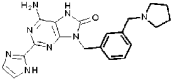
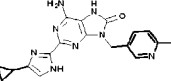
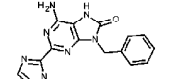
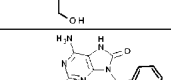
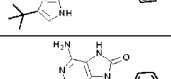
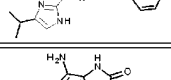
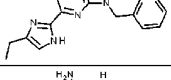
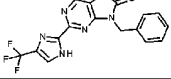
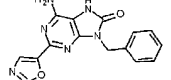
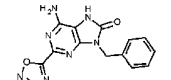
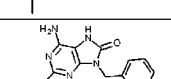
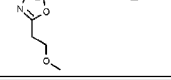
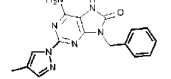
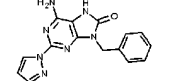
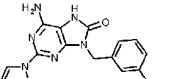
Рекомбинантный интерферон α -2a (Roferon-A) применяли в качестве стандартного контрольного соединения.

Значения LEC для соединений в табл. 2 на HEK293 TLR8-NF γ B-luc и HEK293 NF γ B-luc были больше, чем наивысшая тестируемая концентрация (больше 10 мкМ для соединения 6 и больше 25 мкМ для всех других соединений).

Таблица 2

Биологическая активность соединений по настоящему изобретению

№	Структура	TLR7- wt_LEC 24 ч. (мкМ)	TLR7- dLR2_LEC 24 ч. (мкМ)	TLR7- wt_LEC 48 ч. (мкМ)	TLR7- dLR2_LEC 48 ч. (мкМ)	PBMC- HUH7_EC ₅₀ (мкМ)	PBMC HEK- ISRE-luc (LEC; мкМ)
1			0,33	8,25	0,18	0,081	0,064
2		4,72	1,2			0,531	
3		>24,59	7,67			13,97	
4			0,077	1,23	0,04	0,16	0,12
5			2,2	21,47	1,13	0,2	0,13
6			0,66	6,32	0,34	0,053	0,04
7				>25	1,46	0,64	0,88
8				5,91	0,17	0,17	0,25
9				0,88	0,07	0,05	0,03
10			18,93	>25	10,13	0,73	0,44
11				5,36	0,19	0,33	0,32
12				8,08	0,3	0,59	0,34
15		>24,59	10,57	>25	9,75	16,94	
18		>24,59	3,23	20,31	3,81	2,58	
19		>24,59	13,31	>25	16,6	12,36	
20			0,5	6,34	0,5	0,68	
23				0,23	0,007	0,13	0,12

24				1,81	0,11	0,046	0,03
25				2,46	0,39	0,006	0,007
26				2,42	0,21	0,005	0,006
27				6,03	0,63	0,8	0,43
28				>25	8,77	>23,81	>23,81
29					1,58	1,66	0,82
30				12,71	0,14	0,17	0,12
31				23,23	0,51	1,3	2,2
32				6,5	0,97	1,51	0,97
33				21,66	0,98	0,81	0,52
34				>25	1,21	0,69	0,49
35				0,36	0,033	0,17	0,10
36				0,22	0,017	0,047	0,033
37				0,05			0,01
38				0,38			>25
39				0,05			0,01

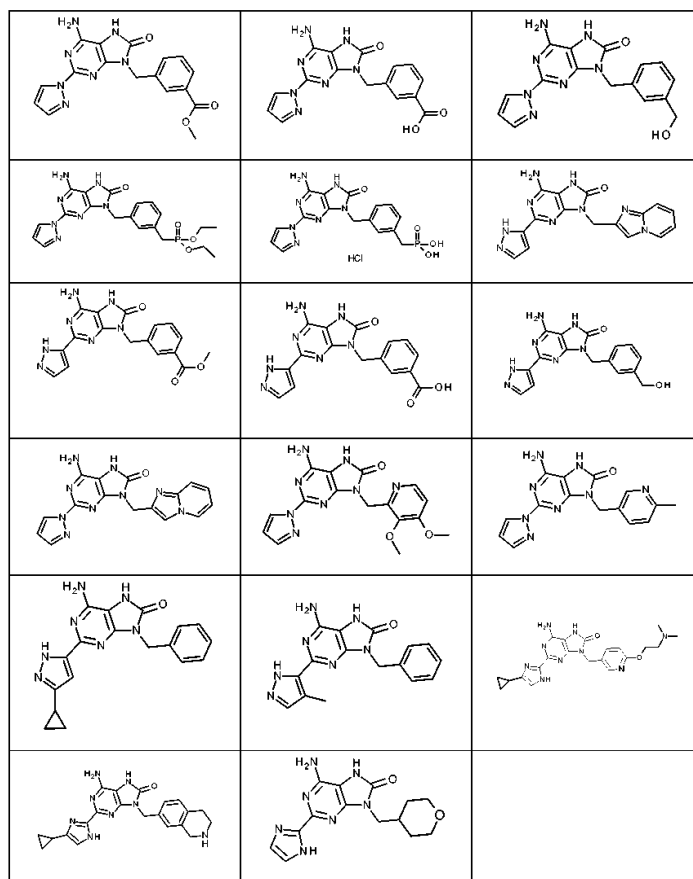
40				0,03			0,01
41				0,03			0,40
42				1,73			0,45
43				0,50			0,15
44				0,10			0,04
45				0,58			1,37
46				0,21			0,03
47				14,12			1,64
48				0,01			0,01
49				0,31			0,06
50				0,03			0,01
51				0,16			0,17
52				4,42	0,41		0,42
53				3,17	0,36	0,76	
54				16,1	5,65	0,05	0,07
55				4,11	0,06	1,27	1,16

57				0,44	0,06	1,21	1,38
58				0,99	0,06	2,75	2,69
60				>25	1,25	0,034	0,019
61				>25	9,73	1,34	0,95
62				21,2	>25	0,70	0,72
63				>25	2,58	6,72	4,39

Все соединения тестировали в анализах с репортерным геном для оценки активности TLR8, и они показали LEC больше 17 мкМ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, выбранное из группы, состоящей из:



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Фармацевтическая композиция для активации толл-подобного рецептора 7 (TLR7), содержащая соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

3. Лекарственное средство для активации TLR7, включающее соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль.

4. Применение соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли для активации TLR7.

5. Применение фармацевтической композиции по п.2 для активации TLR7.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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